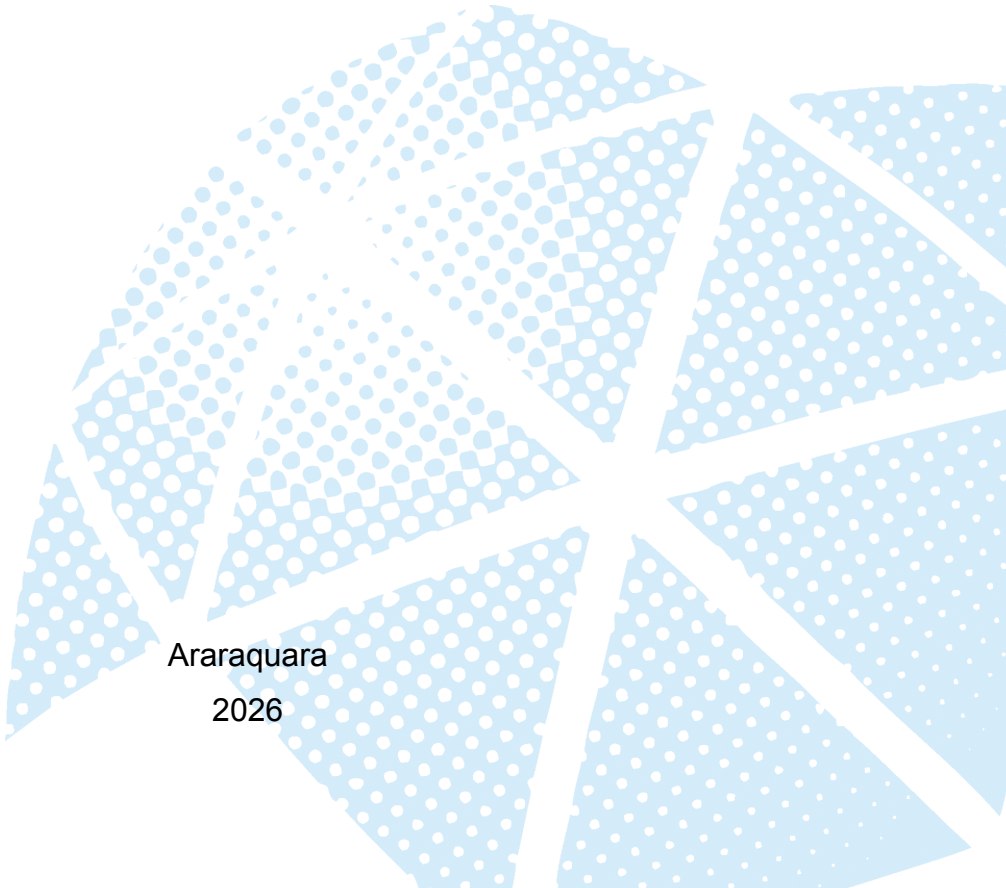


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

BIANCA VERNIZZI SILVA

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE NOVOS AGENTES REVERSORES
DE LATENCIADOS RESERVATÓRIOS DO VÍRUS HIV DIRECIONADOS AO
SISTEMA LINFÁTICO**

Araraquara
2026



BIANCA VERNIZZI SILVA

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE NOVOS AGENTES REVERSORES
DE LATENCIADOS RESERVATÓRIOS DO VÍRUS HIV DIRECIONADOS AO
SISTEMA LINFÁTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Araraquara, para
obtenção do título de bacharel em
Farmácia.

Orientador(a): Prof. Dr. Jean Leandro dos
Santos

Coorientadora: Dra. Juliana Romano
Lopes

Araraquara

2026

S586p

Silva, Bianca Vernizzi.

Planejamento e síntese de novos agentes reversores de latenciados reservatórios do vírus HIV direcionados ao sistema linfático / Bianca Vernizzi Silva. – Araraquara, 2026.
53 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara.

Orientador: Jean Leandro dos Santos.

Coorientadora: Juliana Romano Lopes.

1. Inibidores de HDAC. 2. Histonas. 3. Epigenética. 4. Reativação da latência. 5. HIV. 6. *Shock and Kill*. 7. Agentes reversores de latência (LRA). 8. Medicamentos Projetos. 9. Moléculas Modelos. I. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Lopes, Juliana Romano, coorient. III. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

Esta ficha não pode ser modificada

BIANCA VERNIZZI SILVA

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE NOVOS AGENTES REVERSORES DE
LATENCIADOS RESERVATÓRIOS DO VÍRUS HIV DIRECIONADOS AO SISTEMA
LINFÁTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Data da defesa: 01/12/2025

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Me. Livia da Rocha Fernandes
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Mateus Mello de Souza
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Me. Andressa Francielli Bonjorno
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Me. Bruna Cristina Lopes Domingues
UNESP - FACULDADE DE UNESP - FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - Campus de Araraquara

Dedico este trabalho às universidades
públicas do Brasil ...

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88887.503193/2020-00.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de pesquisa (processo 2021/3014 e 2022/5372).

Agradeço a todos que apoiaram o desenvolvimento deste trabalho:

Meu orientador, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, o qual me deu a oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa e me confiou seus ensinamentos. Também à minha coorientadora, Dra. Juliana Romano Lopes que passou seus conhecimentos e sempre esteve disponível para me ajudar e iluminar o meu caminho;

Meu noivo, Breno, que sempre me incentivou e me ajudou em todos momentos;

Minha família e amigos que sempre apoiaram o desenvolvimento deste trabalho. Em especial à minha mãe, Rosiane, por sempre me amparar, fazer ser possível a minha graduação e me incentivar a sempre ser uma versão melhor de mim mesma;

Também ao grupo de pesquisa que compartilhou seus conhecimentos, companheirismo e amizade.

RESUMO

Propõe-se, neste trabalho, a investigação *in silico* de novos inibidores seletivos de HDACs de classe I, desenhados por estratégias de planejamento de fármacos a partir do entinostat (MS-275) como estrutura de referência. Os compostos alvo visam inibir HDACs e, conseqüentemente, aumentar a acetilação de histonas, favorecendo a reativação transcricional do provírus do HIV em células latentes — predominantemente linfócitos T CD4+ presentes em reservatórios do sistema linfático — no contexto da estratégia “*shock and kill*”. Foram planejados 23 compostos e realizadas simulações de ancoramento molecular (*docking*) no Maestro® v11.8 (Schrödinger®) para avaliar as interações dos compostos com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo das HDACs. Com base nas poses tridimensionais e nos valores de docking score, três candidatos prioritários foram selecionados para o planejamento de rotas sintéticas. Dentre esses, o composto M19 foi sintetizado com sucesso, apresentando rendimento global de 41,5%, demonstrando a viabilidade sintética da estratégia proposta.; com base nas poses tridimensionais e no *docking score*, selecionaram-se três candidatos prioritários, para os quais se planejaram rotas sintéticas. Os resultados indicam que essas entidades químicas apresentam perfil promissor como inibidores seletivos de HDAC3, configurando bons candidatos relevantes para estudos experimentais futuros, incluindo ensaios (enzimáticos, celulares e de validação de seletividade).

Palavras-chave: inibidores de HDAC; HDAC classe I; epigenética; reativação da latência; HIV-1; “*shock and kill*”; agentes reversores de latência (LRA); planejamento de fármacos; modelagem/docking molecular.

ABSTRACT

This work proposes an in silico investigation of novel selective inhibitors of class I HDACs, designed using drug design strategies based on entinostat (MS-275) as a reference structure. The target compounds aim to inhibit HDACs and, consequently, increase histone acetylation, thereby promoting transcriptional reactivation of the HIV provirus in latent cells — predominantly CD4⁺ T lymphocytes present in lymphatic system reservoirs — within the context of the “shock and kill” strategy. A total of 23 compounds were designed, and molecular docking simulations were performed using Maestro® v11.8 (Schrödinger®) to evaluate compound interactions with amino acid residues in the HDAC active site. Based on three-dimensional binding poses and docking score values, three priority candidates were selected for synthetic route planning. Among these, compound M19 was successfully synthesized, achieving an overall yield of 41.5%, demonstrating the synthetic feasibility of the proposed strategy. The results indicate that these chemical entities exhibit a promising profile as selective HDAC3 inhibitors, making them relevant candidates for future experimental studies, including enzymatic, cellular, and selectivity validation assays.

Keywords: HDAC inhibitors; class I HDAC; epigenetics; latency reactivation; HIV-1; “shock and kill”; latency-reversing agents (LRA); drug design; molecular modeling/docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação morfológica do HIV-1	12
Figura 2 – Ciclo de infecção HIV-1	13
Figura 3 – Principais classes de ARTs	15
Figura 4 – Célula latente com baixa expressão genética e a célula ativa produzindo pró-vírus.	16
Figura 5 – Rebote viral depois de cessar a terapia	17
Figura 6 – Estratégia <i>Shock and Kill</i>	18
Figura 7 – Ação das enzimas HAT e HDAC no material genético	19
Figura 8 – Entinostat (MS-275)	22
Figura 9 – Entinostat empregado como estrutura protótipo, evidenciando o grupo de reconhecimento (zinc-binding group, ZBG), a cadeia alifática (linker) e o grupo CAP.	24
Figura 10 – Planejamento das 23 novas moléculas a partir do Entinostat	25
Figura 11 – Enzimas preparadas para fazer a simulação de interação do sítio ativo com as 23 estruturas	26
Figura 12 – Rota sintética geral dos compostos	27
Figura 13 – Rota sintética do entitostat	27
Figura 14 – Rota sintética do composto intermediário (27)	28
Figura 15 – Rota sintética do composto intermediário (31)	29
Figura 16 – Rota sintética do composto intermediário (20) e final M19 (29)	30
Figura 17 – Interações do composto M19 no sítio ativo do HDAC3 em uma visualização 2D	33
Figura 18 – Simulação da M17 com a enzima HDAC3 (código 4A69) mostrando a distância de 2.21Å e 2.49Å do átomo realizado no software Maestro®.	34
Figura 19 – Interações do composto M19 em verde e do modelo, entinostat, em roxo nos sítios ativos do HDAC3 em A e HDAC2 em B, com os respectivos DS.	37
Figura 20 – ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) espectro de RMN do composto (20)	39
Figura 21 – ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) espectro de RMN do composto (27)	42

Figura 22 – ^{13}C (600 MHz, DMSO- d_6) espectro de RMN do composto (27).	42
Figura 23 – ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) espectro de RMN do composto (31)	44
Figura 24 – ^{13}C (APT, 600 MHz, DMSO- d_6) espectro de RMN do composto (31)	45
Figura 25 – ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) espectro de RMN da molécula M19	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – IC_{50} do MS-275 em diferentes isoformas HDAC	21
Tabela 2 – Ancoragem molecular <i>in silico</i> com as HDACs e o fármaco entinostat	36
Tabela 3 – Análise de múltiplos para composto (20).	38
Tabela 4 – Análise de múltiplos para (27).	40
Tabela 5 – Análise de múltiplos para (31).	45
Tabela 6 – Análise de múltiplos para M19 (29).	46

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1.1 Vírus e Epidemiologia	11
1.2 Tratamento para portadores de HIV	13
1.2.1 Tratamento direcionado às células latentes	17
2 DESENVOLVIMENTO	23
2.1 MATERIAL E MÉTODO	23
2.1.1 Planejamento estrutural	23
2.1.2 Modelagem molecular	24
2.1.3 Metodologia Sintética	25
2.1.3.1 Síntese do intermediário (27) dos compostos: M20 e M21	26
2.1.3.1.1 Procedimento experimental do intermediário (27)	27
2.1.3.2 Síntese do intermediário (31) dos compostos: M18 e M22	28
2.1.3.2.1 Procedimento experimental do intermediário (31)	28
2.1.3.3 Síntese do Composto Final M19 (29)	29
2.1.3.3.1 Procedimento experimental	29
2.1.4 Métodos de purificação	30
2.1.4.1 Biotage® Isolera™	30
2.1.4.2 Coluna cromatográfica líquida de bancada	30
2.1.5 Identificação e Caracterização estrutural	31
2.1.5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	31
2.1.5.2 Determinação da faixa de fusão	31
2.1.5.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	31
2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
2.2.1 Planejamento estrutural	31
2.2.2 Estudo de ancoragem molecular frente às HDACs	32
2.2.3 Caracterização estrutural	36
2.2.3.1 Caracterização do composto intermediário (20)	36
2.2.3.2 Caracterização do composto intermediário (27)	37
2.2.3.3 Caracterização do composto intermediário (31)	40
2.2.3.4 Caracterização do composto final (29)	43
3 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

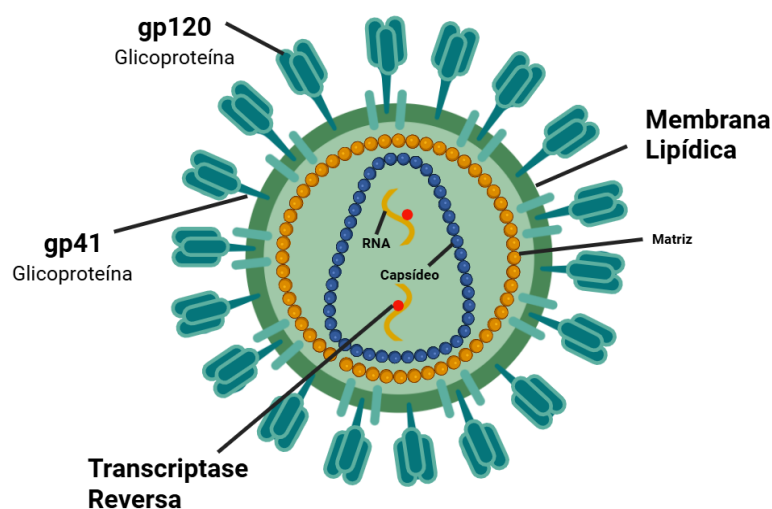
INTRODUÇÃO

1.1 Vírus e Epidemiologia

Em 2021 durante uma reunião da IAS (*The Internacional AIDS Society*) com as grandes mentes da atualidade dentro das pesquisas sobre o vírus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), o qual é causador da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), foram decididos pontos chaves para direcionar as pesquisas nos próximos 5 anos. Dentre esses pontos chaves, os quais visam acelerar a busca da cura por meio da colaboração entre os grupos de pesquisa ao redor do mundo, foi destacado no tópico “Visando o provírus” o desenvolvimento de melhores estratégias para reverter a latência das células que há persistência do vírus (Deeks *et al.*, 2021).

A razão dessa colaboração internacional é que mesmo com os avanços científicos e melhorias nos tratamentos antirretrovirais (TARV) para os pacientes vivendo com o vírus ainda há um cenário pandêmico, onde em 2024 por volta de 630.000 pessoas morreram por motivos relacionados com o HIV. Estima-se que 40,8 milhões de pessoas vivem com o vírus HIV e por volta de 77,45% (31,6 milhões) deles têm acesso ao tratamento (UNAIDS epidemiological estimates, 2024). Em 2025, a Assembleia Geral das Nações Unidas sobre HIV se reuniu para analisar o quadro atual e foi estabelecida a meta de redução de 90% das mortes relacionadas ao vírus até 2030 (UNAIDS, 2025).

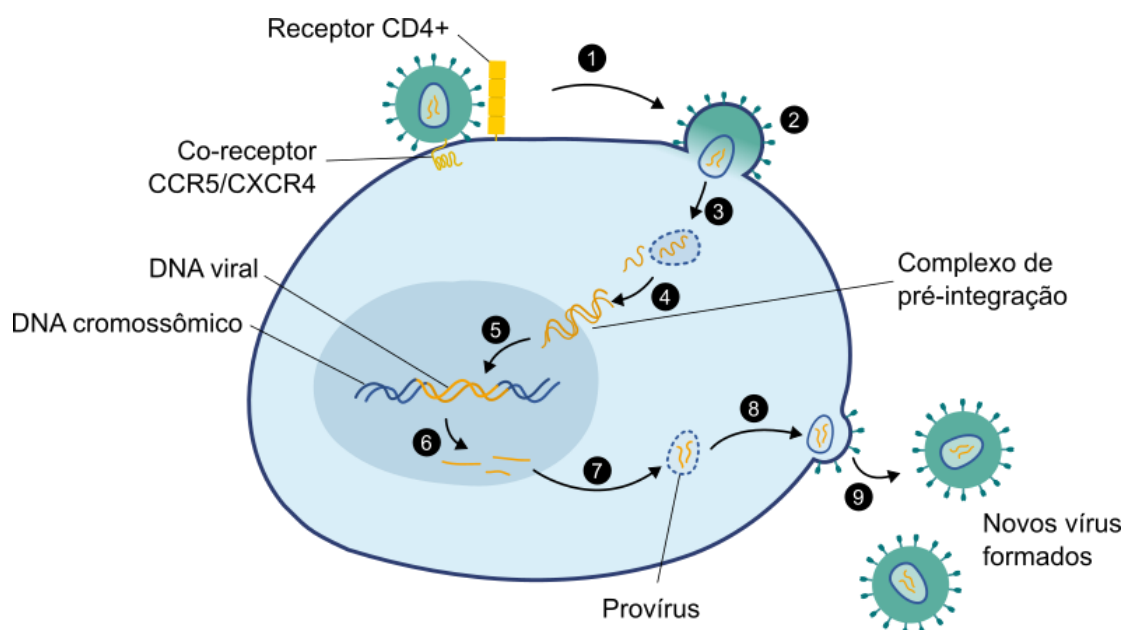
Figura 1 – Representação morfológica do HIV-1.



Fonte: Elaboração Própria, 2025.

O HIV é um retrovírus, um patógeno genômico que pode ser dividido em dois tipos: HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 (Figura 1) é o mais comum no mundo, com uma progressão clínica mais rápida e uma maior taxa de transmissão (Drylewicz *et al.*, 2008). Ele pertence à subfamília dos lentivírus e é capaz de transcrever reversamente seu material genético. Seu capsídeo é indispensável para a invasão da célula hospedeira (Figura 2). As glicoproteínas gp120 e a subunidade glicoproteica transmembrana, gp41 da gp160, presentes nos spikes, interagem com os receptores CD4+, CCR5 (receptor de β -quimiocina) e CXCR4 (receptor de quimiocina acoplado à proteína G), permitindo uma mudança conformacional que possibilita a entrada do vírus (Naif, 2013; Scoca; Di Nunzio, 2021; Yu Jiang, 2022).

Figura 2 – Ciclo de infecção HIV-1.



- | | |
|-------------------------|---------------------------------|
| 1. Adsorção | 6. Produção de proteínas virais |
| 2. Fusão | 7. Encapsidação |
| 3. Descapsidação | 8. Brotamento |
| 4. Translocação Nuclear | 9. Maturação |
| 5. Integração | |

Fonte: Elaboração Própria, 2025.

Essa interação desencadeia a fusão das membranas mediada pela gp14, permitindo a aproximação estrutural entre as membranas viral e celular (Kilby; Eron, 2003). Após a descapsidação, o material genético viral, 2 fitas de RNA, é liberado dentro do citoplasma da célula, onde ocorre a transcrição reversa de forma não simultânea, originando o complexo de pré-integração (PIC) a partir do cDNA viral (McLaren; Fellay, 2021). O PIC apresenta uma região de estrutura tripla, devido a uma sobreposição de 99 nucleotídeos na fita positiva, o que é indispensável para a passagem do PIC para o núcleo. Uma vez no núcleo, a enzima integrase viral catalisa a integração do cDNA ao genoma da célula hospedeira, estabelecendo o provírus (Stevenson, 2000).

1.2 Tratamento para portadores de HIV

O desenvolvimento da TARV é uma trajetória longa e complexa, iniciada em 1981 com o primeiro relatório oficial do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) e marcada, em 1987, pela aprovação do primeiro fármaco, a Zidovudina (AZT). Desde então, a TARV tem passado por sucessivos avanços científicos e tecnológicos, ainda enfrentando inúmeros desafios na busca por uma cura funcional e sustentável (UNAIDS, 2021).

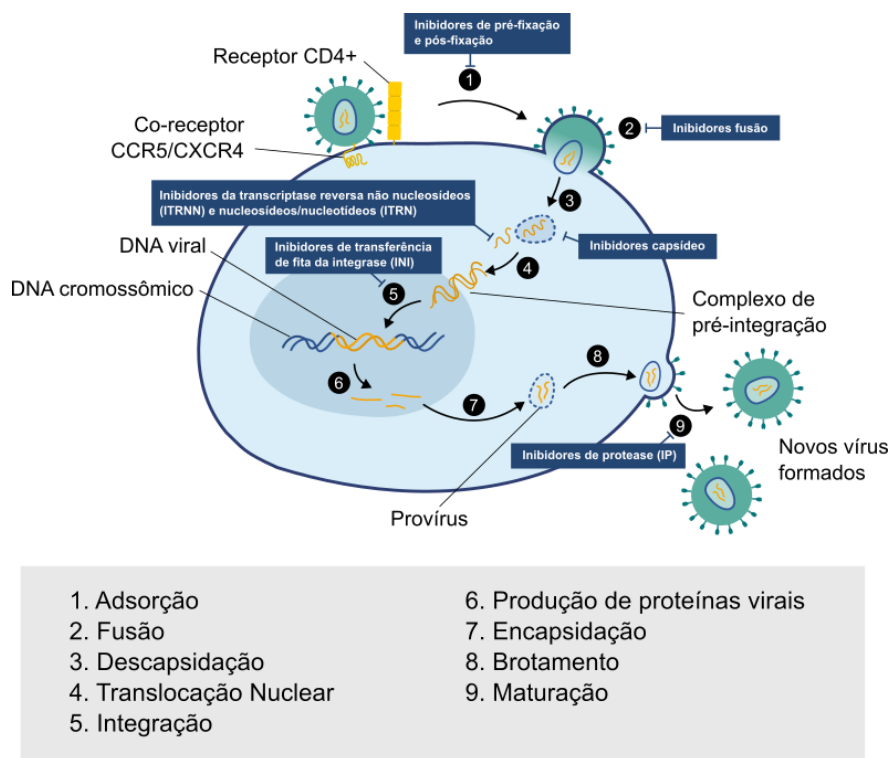
Atualmente, uma pessoa com acesso aos serviços de tratamento pode tanto se prevenir da infecção pelo vírus quanto controlá-la, quando já infectada, por meio de um comprimido diário ou de uma injeção aplicada a cada dois meses (Landovitz; Scott; Deeks, 2023). Por mais que a medicina moderna avançou muito para o tratamento e prevenção contra HIV, a epidemia permanece. Somente em 2024, cerca de 1,3 milhões de pessoas contraíram o vírus e desde o início da epidemia 91,4 milhões de pessoas faleceram de causas relacionadas ao HIV (UNAIDS, 2025).

A prevenção da infecção pelo HIV pode ser realizada por meio da PrEP. No Brasil (atualizado a out/2025), a PrEP está disponível principalmente em duas modalidades orais com tenofovir/emtricitabina (TDF/FTC): a diária, indicada de forma ampla, com carga inicial de 2 comprimidos; e a sob demanda (2+1+1), opção para homens cis, pessoas não binárias e travestis/mulheres trans não em uso de estradiol. Nos Estados Unidos, o lenacapavir foi aprovado pela FDA em 2025 como a primeira opção de PrEP de ação prolongada com proteção por 6 meses (injeção subcutânea semestral), atuando como inibidor do capsídeo do HIV-1 e bloqueando

etapas críticas da descapsidação e do ciclo viral. No Brasil, o lenacapavir ainda não possui registro na ANVISA para PrEP (até outubro de 2025); a opção de longa ação disponível é o cabotegravir (injeção a cada 2 meses) (Landovitz; Scott; Deeks, 2023 e Bernice; Kilcrease, 2022).

Embora a TARV tradicional siga as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), sua composição pode variar conforme a disponibilidade de medicamentos, as condições econômicas, a epidemiologia local e até fatores culturais. De modo geral, essas terapias consistem na combinação de diferentes ARVs, com mecanismos complementares, visando impedir a infecção e a replicação viral, além de eliminar células infectadas. Entre as principais classes dos ARTs (Figura 3), destacam-se os inibidores de pré-fixação, pós-fixação e fusão; os inibidores de capsídeo; os inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos (ITRNN) e nucleosídeos/nucleotídeos (ITRN); os inibidores de transferência de fita da integrase (INI); e os inibidores de protease (IP) (Chou; Maggirwar; Marsden, 2024 e UNAIDS, 2021).

Figura 3 – Principais classes de ARTs.

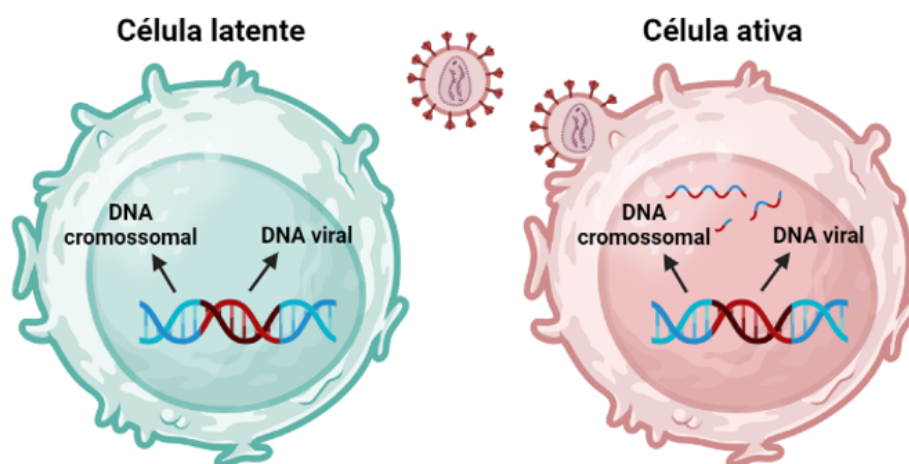


Fonte: Elaboração Própria, 2025.

O Brasil, pioneiro na implementação da TARV no sistema público de saúde em 1997, continua a buscar estratégias terapêuticas mais eficazes. Em 2024,

o país incorporou ao SUS (Sistema Único de Saúde) o fostemsavir trometamol, um inibidor de ligação indicado para o tratamento da infecção pelo HIV-1. Esse pró-fármaco, ao ser clivado, interage com a subunidade gp120 da glicoproteína gp160, impedindo a ligação do vírus às células hospedeiras e, consequentemente, sua infecção (Brasil, 2024; UNAIDS, 2021).

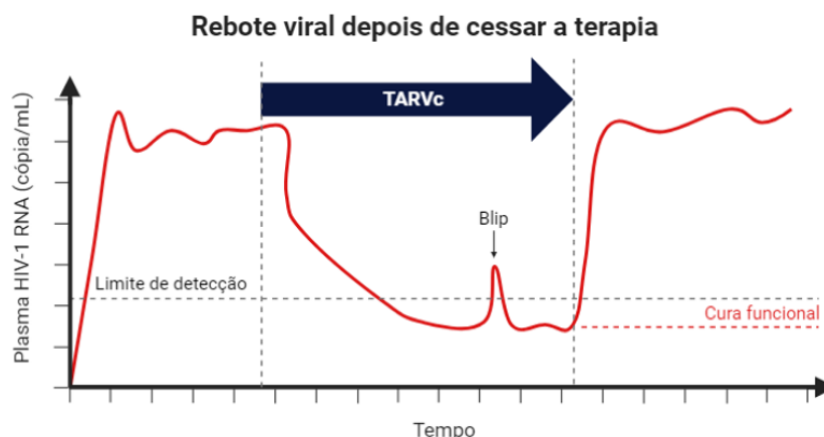
Figura 4 – Célula latente com baixa expressão genética e a célula ativa produzindo pró-vírus.



Fonte: Elaboração Própria, 2023.

Os reservatórios de células latentes (Figura 4) representam o principal obstáculo para que a TARV alcance a cura funcional do HIV. Isso ocorre porque essas células não são eliminadas pelo tratamento convencional e, embora o genoma viral permaneça integrado em regiões transcricionalmente silenciadas, cerca de 5% ainda mantém capacidade de replicação (Deeks *et al.*, 2021). Esses reservatórios também constituem um importante fator de risco clínico, pois qualquer interrupção da TARV combinatória pode levar ao rebote virêmico (Figura 5). Atualmente, sabe-se que tais células podem incluir linfócitos T CD4⁺, macrófagos, células dendríticas, astrócitos, adipócitos, entre outras, evidenciando a heterogeneidade dos tecidos envolvidos e a consequente dificuldade em desenvolver uma estratégia terapêutica universal (Ait-Ammar *et al.*, 2019).

Figura 5 – Rebote viral depois de cessar a terapia.



Fonte: Retirado e adaptado de Kulpa; Chomont, 2015.

Entre os diversos tecidos envolvidos, o sistema linfático destaca-se como um dos principais reservatórios quantitativos de células latentes, associado à presença de linfócitos T CD4⁺. Essas células constituem alvos preferenciais do HIV por expressarem as estruturas necessárias para a adsorção viral, permitindo a fusão entre as membranas viral e celular, mediada pelo receptor CD4 e pelo co-receptor CXCR4. Além disso, os linfócitos T CD4⁺ expressam marcadores de *checkpoint* imunológico, o que contribui para a persistência viral e a evasão do sistema imune (Scholz; Kashuba, 2021).

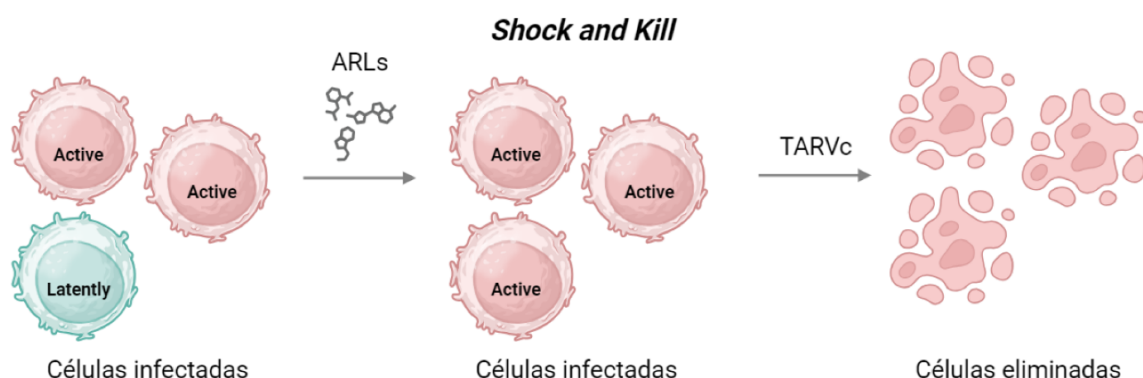
O desafio de atingir e eliminar o reservatório latente do HIV, assim como de estudá-lo, está diretamente relacionado às suas características biológicas. Como essas células expressam pouco ou nenhum RNA ou proteína viral, e carecem de marcadores específicos, torna-se extremamente difícil distinguir uma célula infectada de uma célula não infectada. A situação é agravada pela baixa frequência dessas células *in vivo*, estimada em aproximadamente uma a cada milhão de linfócitos T CD4⁺, e pela distribuição tecidual ampla e heterogênea, uma vez que a maioria é transportada pelo sistema linfático e apenas cerca de 2% permanece no sangue periférico (Chou; Maggirwar; Marsden, 2024).

A persistência prolongada desses reservatórios decorre, em parte, da capacidade das células latentemente infectadas de se proliferarem mesmo em estado de latência, especialmente sob estímulos de citocinas como IL-7 e IL-15, o que permite a replicação do genoma proviral e a formação de novos clones geneticamente idênticos, perpetuando a infecção (Chou; Maggirwar; Marsden, 2024).

1.2.1 Tratamento direcionado às células latentes

Diante da importância da eliminação das células latentes para alcançar a cura dos pacientes portadores do HIV, diversas estratégias vêm sendo estudadas, incluindo abordagens medicamentosas e não medicamentosas. Entre as não medicamentosas, destacam-se os anticorpos amplamente neutralizantes (bNAbs), que estimulam funções efetoras imunológicas; as terapias genéticas baseadas em CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*); a imunoterapia; e o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Embora esta última seja um procedimento invasivo, ganhou grande relevância após resultar na cura de alguns pacientes, como o “Paciente de Berlim”, Timothy Brown, que recebeu células contendo a mutação homozigótica CCR5 Δ 32. Essa mutação impede a expressão funcional do receptor CCR5, essencial para a entrada do vírus na célula hospedeira (Sáez-Cirión *et al.*, 2024 e Chou; Maggirwar; Marsden, 2024).

Figura 6 – Estratégia *Shock and Kill*.



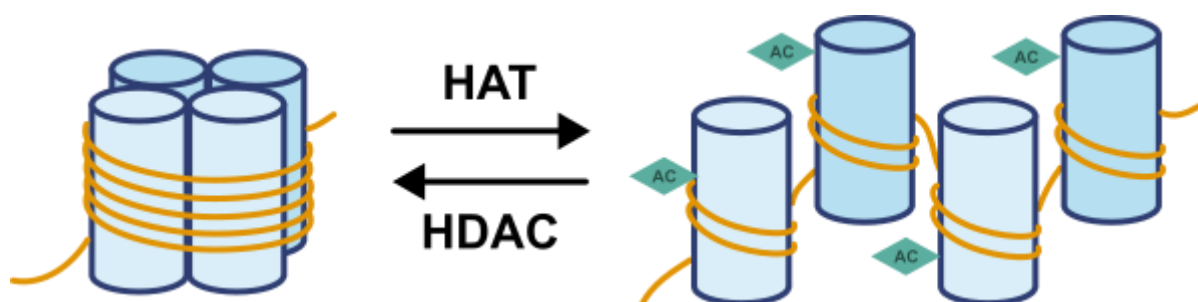
Fonte: Elaboração Própria, 2023.

Já entre as abordagens medicamentosas, destacam-se os agentes reversores de latência (LRAs), capazes de ativar células infectadas latentes. Essa estratégia, conhecida como *Shock and Kill* (Figura 6), ocorre em duas etapas: na primeira, o *shock*, os LRAs promovem a reversão da latência, induzindo a expressão de proteínas virais nas células dos reservatórios enquanto a TARV é mantida para evitar novas infecções; na segunda, o *kill*, essas células reativadas são eliminadas por efeitos citopáticos virais ou por mecanismos citolíticos mediados pelo próprio sistema imunológico (Deeks, 2012; Chou; Maggirwar; Marsden, 2024).

Entretanto, a aplicação clínica dos LRAs ainda enfrenta desafios, sobretudo quanto à eficácia e segurança. Um dos principais obstáculos é atingir todas as células latentes, o que se torna difícil devido à heterogeneidade dos tipos celulares e dos tecidos onde os reservatórios se localizam. Além disso, muitos LRAs apresentam alta toxicidade ou provocam ativação inespecífica de células T, gerando efeitos colaterais fora do alvo (Cao *et al.*, 2019).

Diversos agentes estão sendo testados in vivo em ensaios clínicos e apresentam uma ampla variedade de mecanismos de ação. Entre eles estão os agonistas de PKC (*protein kinase C*); agonistas de TLR (*Toll-like receptor*); estimuladores de NF- κ B, como os miméticos de SMAC; imunomoduladores e modificadores epigenéticos. Estes últimos abrangem os inibidores de HDAC (Histona Deacetilase), HMT (Histona Metiltransferase) e DNMT (DNA Metiltransferase), responsáveis por alterar as modificações epigenéticas das histonas e do DNA, modulando a estrutura da cromatina e, consequentemente, a expressão gênica do provírus integrado (Abner; Jordan, 2019).

Figura 7 – Ação das enzimas HAT e HDAC no material genético.



Fonte: Elaboração Própria, 2025.

Atualmente, a acetilação e o processo inverso, a desacetilação, destacam-se como mecanismos epigenéticos promissores na regulação da expressão gênica. As enzimas responsáveis por essas modificações no *N*-terminal dos resíduos de lisina das histonas são as HATs e as HDACs, respectivamente (Figura 7). Tais processos modulam o grau de condensação da cromatina, alterando a acessibilidade do DNA à maquinaria transcricional: a acetilação tende a relaxar a estrutura da cromatina, facilitando a transcrição, enquanto a desacetilação a condensa, dificultando o acesso (Cao; Zwinderman; Dekker, 2018).

No contexto da estratégia *Shock and Kill* para a eliminação dos reservatórios, busca-se aumentar a expressão gênica das regiões do genoma onde o pro-vírus foi integrado. Para isso, é necessário promover a acetilação das histonas associadas a essas regiões, o que é alcançado por meio do uso de inibidores de HDAC (iHDACs). Esses compostos impedem a remoção dos grupos acetila pelas HDACs, permitindo que as HATs induzam a hiperacetilação e, conseqüentemente, a ativação da célula latente (Cao; Zwinderman; Dekker, 2018).

Atualmente, são conhecidas 18 isoformas das enzimas HDACs em humanos, podendo serem classificadas em dois grandes grupos conforme sua dependência catalítica: as HDACs dependentes de Zn^{2+} , nas quais o íon de zinco atua como cofator ou ativador catalítico, e as HDACs dependentes de NAD^+ , em que o dinucleotídeo de nicotinamida e adenina funciona como coenzima essencial para a atividade enzimática. As HDACs dependentes de zinco são subdivididas em três classes principais: I, II e IV. A classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8) é predominantemente nuclear, enquanto as enzimas da classe II (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 e HDAC10) localizam-se tanto no núcleo quanto no citoplasma, devido a processos de fosforilação mediados por proteína quinase C ou D. Já a classe IV, representada pela HDAC11, apresenta um domínio catalítico que combina características estruturais das classes I e II. As isoformas das classes I e II compartilham semelhança estrutural com a proteína RPD3 (*Reduce Potassium Dependency 3*) (Sarkar *et al.*, 2020).

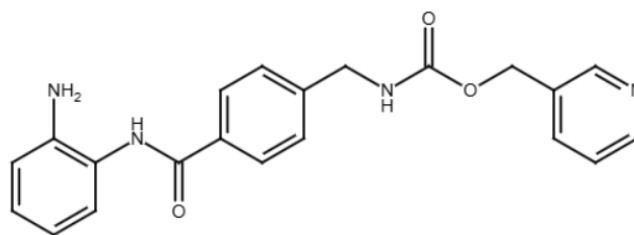
Diversos compostos com potencial inibitório para HDACs vêm sendo investigados, entre eles o entinostat (MS-275), um dos inibidor seletivo de HDACs da classe I, com exceção à HDAC8 (Khan *et al.*, 2008). Esse fármaco tem se destacado nos estudos clínicos por sua alta seletividade e perfil de segurança mais favorável em comparação aos inibidores de amplo espectro (HDACi pan). Conforme mostrado na Tabela 1, os valores de concentração inibitória média (IC_{50}) do entinostat são significativamente menores para as isoformas da classe I, evidenciando sua preferência de ação sobre esse grupo enzimático (Adhikari; Jha; Ghosh, 2021).

Tabela 1 - IC_{50} do MS-275 em diferentes isoformas HDAC.

Isoforma HDAC	IC_{50} (nM)
1	262
2	306
3	499
8	2700
4	>30000
5	>30000
7	>30000
9	>30000
6	>30000
10	254
11	>649

Fonte: Adaptado de Adhikari; Jha; Ghosh, 2021.

Figura 8 – Entinostat (MS-275).



Fonte: Elaboração Própria, 2025.

Seu perfil de seletividade é compreendido pela quelação bidentada do íon Zn^{2+} pelo nitrogênio da anilina e do oxigênio da carbonila presentes no ZBG (*Zinc-Binding Group* ou Grupo de Reconhecimento), o que promove a projeção do anel aromático (*Cap Group* ou Grupo Funcional) à cavidade de ligação. Ambos desses grupos são ligados pelo *Linker*, contribuindo para um maior tempo de interação no sítio ativo (Pires *et al.*, 2025).

Os ensaios clínicos com o MS-275 (Figura 8) têm demonstrado resultados promissores em diferentes tipos de tumores, sem ocorrência de resistência cruzada (Jóna *et al.*, 2011). Além disso, observou-se uma tendência favorável ao uso combinado com outros agentes terapêuticos (Ngamphaiboon *et al.*, 2015). O efeito antitumoral do entinostat decorre do mesmo princípio que fundamenta a estratégia *Shock and Kill*, a modulação epigenética das enzimas HDACs de classe I (Bruner *et al.*, 2016).

Embora os resultados de ensaios clínicos com diferentes inibidores de HDAC ainda sejam limitados, como observado no uso do vorinostat (Fidler *et al.*, 2019) e em outros estudos sem impacto significativo sobre os reservatórios virais (Cillo; Mellors, 2016), essas evidências reforçam a necessidade de desenvolver novas alternativas terapêuticas mais eficazes.

Nesse contexto, o entinostat tem se destacado como um promissor agente LRA, demonstrando capacidade de promover a ativação de células T CD4⁺ HIV latentes *in vitro* (Wightman *et al.*, 2013). Além disso, sua combinação com o composto bryostatin-1 potencializou a reativação viral em células J-Lat 10.6, uma linhagem de células T contendo o genoma do HIV-1 integrado em estado latente (Marsden *et al.*, 2018). Esses resultados evidenciam o potencial do entinostat como ponto de partida para o desenvolvimento de novas moléculas, objetivo central do presente trabalho.

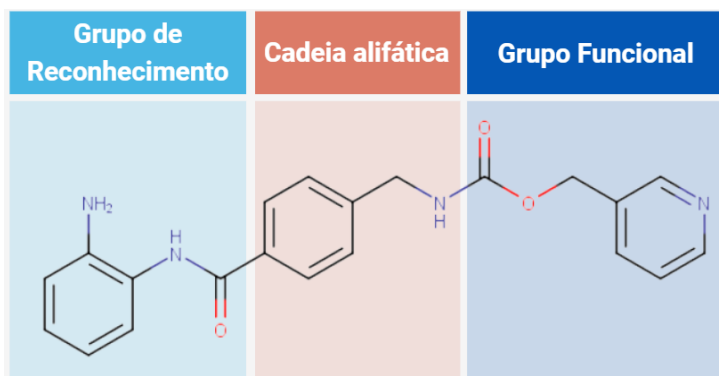
2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODO

2.1.1 Planejamento estrutural

Neste trabalho, o entinostat (Figura 9), um inibidor seletivo de HDACs de classe I, foi empregado como protótipo para o desenvolvimento de moléculas inovadoras, com o objetivo de gerar potenciais inibidores de HDACs de classe I mais eficazes para a estratégia *Shock and Kill*.

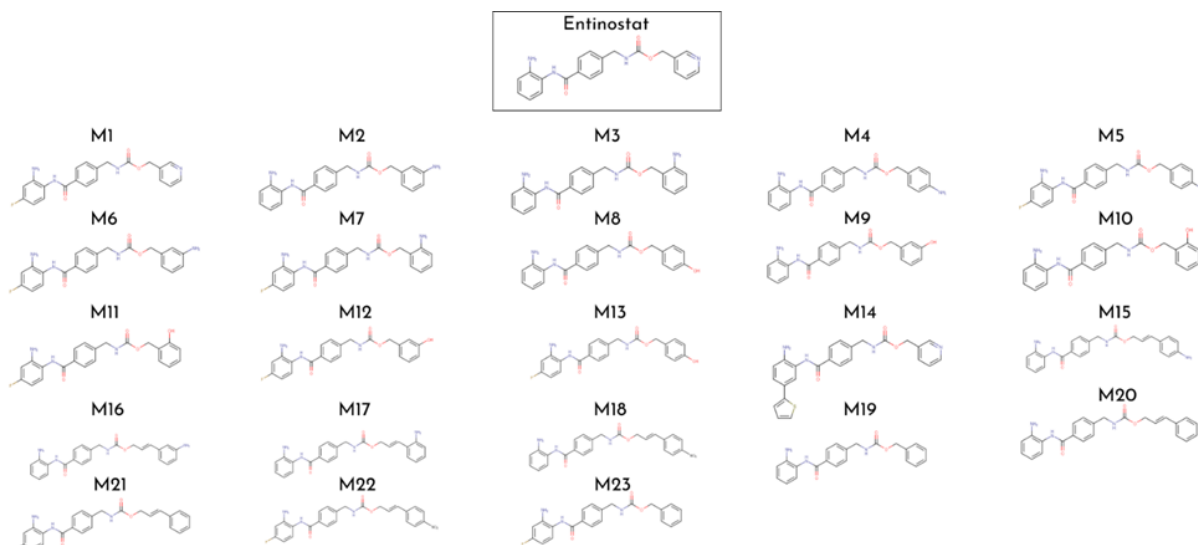
Figura 9 – Entinostat empregado como estrutura protótipo, evidenciando o grupo de reconhecimento (zinc-binding group, ZBG), a cadeia alifática (linker) e o grupo CAP.



Fonte: Elaboração Própria, 2025.

Modificações estruturais estratégicas foram realizadas no composto entinostat, considerando as interações moleculares observadas com o sítio ativo alvo das enzimas HDAC1, HDAC2 e HDAC3. Essas análises fundamentaram o planejamento de 23 novas estruturas (Figura 10).

Figura 10 – Planejamento das 23 novas moléculas a partir do Entinostat.



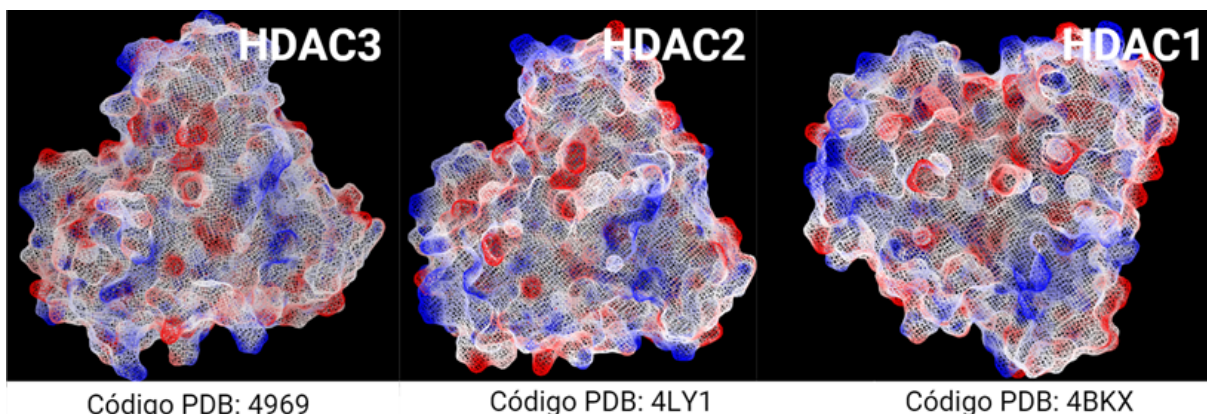
Fonte: Elaboração Própria, 2023.

2.1.2 Modelagem molecular

Os estudos de docking molecular dessas estruturas foram conduzidos no software Maestro[®] versão 11.8 (SCHRÖDINGER[®]) em um computador com sistema operacional Windows 11, processador Intel Cores i5 (10^o geração), placa de vídeo NVIDIA GeForce MX230 e memória RAM de 8GB.

As estruturas cristalográficas importadas para o software foram obtidas no banco de dados PDB (Protein Data Bank): HDAC1 sob o código 4BKX e com resolução 3,00 Å; HDAC2 sob o código 4LY1 e com resolução 3,00 Å e HDAC3 sob o código 4A69 e com resolução 2,06 Å. A partir delas foi executada a função *Protein Preparation Wizard*, que tem como objetivo: adicionar átomos de hidrogênio ausentes; colocar o estado de ionização correto de metais e fazer o tratamento do campo de força; remoção de água cocrystalizada; preencher cadeias laterais incompletas e minimização de energia (OPLS3). Após essa etapa, é executada a ferramenta *Grid Generation*, que permite a indicação de onde está o sítio ativo das enzimas HDACs, essa seleção teve dimensões de 10 Å x 10 Å x 10 Å e assim finaliza-se o processo de preparação da proteína (Figura 11).

Figura 11 – Enzimas preparadas para fazer a simulação de interação do sítio ativo com as 23 estruturas.



Fonte: Elaboração Própria, 2023.

Adiante os ligantes foram importados em seu modelo SDF para a área de trabalho do software e foi executada a função *LigPrep (Ligand Preparation)* que visa minimizar energeticamente o campo de força e simular as possíveis ionizações no pH entre 5 e 9.

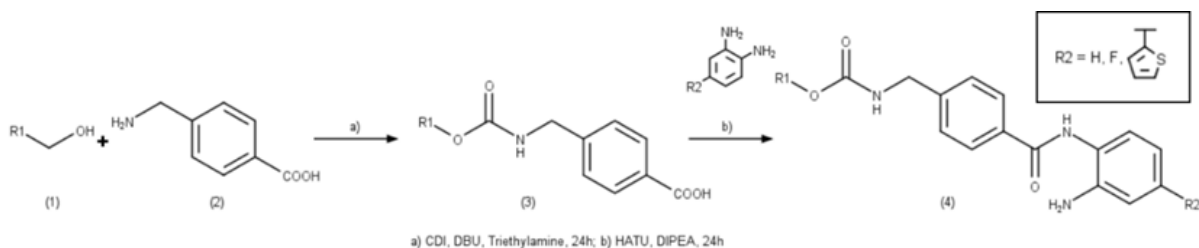
Por fim foi executado a ferramenta *Ligand Docking*, onde foram definidas 50 poses para cada estrutura com restrição de interação com átomo de metal, Zn^{2+} , ou seja, uma quelatação é executada com o *Glide SP* – amostragem exaustiva de torções do ligante no acoplamento, usando o receptor OPLS34. Suas posições e interações com o sítio da enzima foram avaliados e ranqueados de acordo com os valores de *docking score* gerados (DS), uma vez que o valor de *Glide Score* (GS) era o mesmo por não ter tido modificações na penalidades do Epik state.

O protocolo foi validado por redocking do ligante co-cristalizado, obtendo RMSD (*Root Mean Square Deviation*) inferior a 2 Å entre pose predita e experimental; empregaram-se restrições de coordenação a Zn^{2+} , geração de microestados (Epik, pH $7,4 \pm 0,5$) e rescoring MM-GBSA para as 10 melhores poses por composto.

2.1.3 Metodologia Sintética

A rota sintética desses compostos foi estabelecida por meio das reações de acoplamentos em duas etapas, como pode ser analisado na Figura 12. As cadeias laterais, R1, serão expostas ao longo deste tópico.

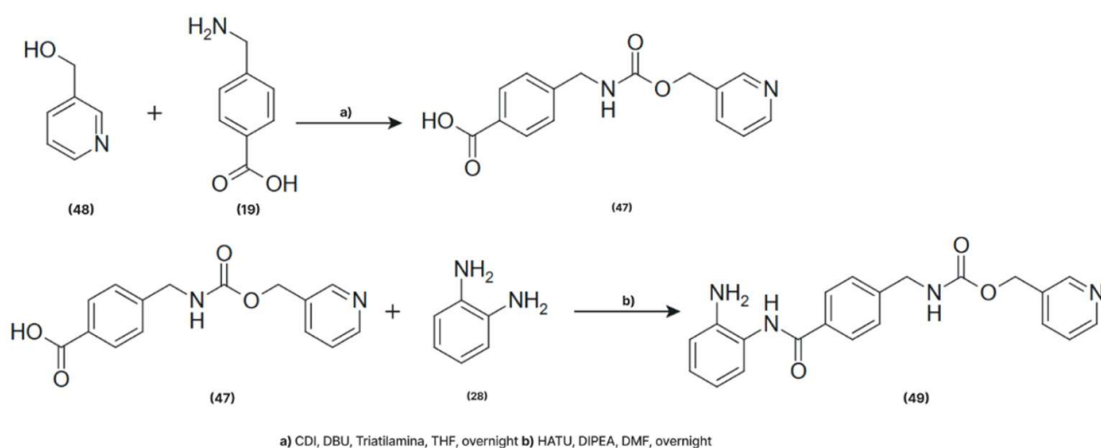
Figura 12 – Rota sintética geral dos compostos.



Fonte: Elaboração Própria, 2023.

Como exemplo ilustrativo, a Figura 13 apresenta a rota sintética do entinostat, baseada na rota sintética geral descrita anteriormente.

Figura 13 – Rota sintética do entinostat.

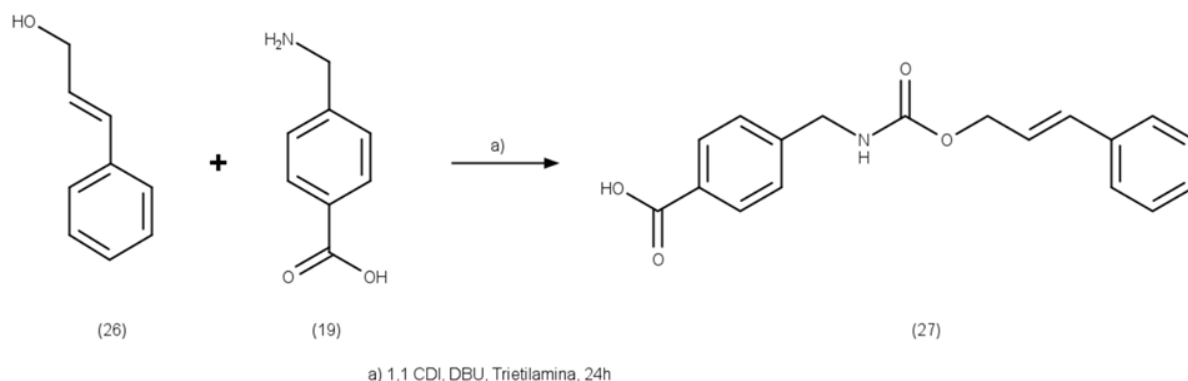


Fonte: Elaboração Própria, 2025.

2.1.3.1 Síntese do intermediário (27) dos compostos: M20 e M21

Essa rota sintética (Figura 14) tem como objetivo produzir o produto intermediário para ser utilizado nas rotas dos produtos finais M20 e M21.

Figura 14 – Rota sintética do composto intermediário (27).



Fonte: Elaboração Própria, 2023.

2.1.3.1.1 Procedimento experimental do intermediário (27)

Em um balão de 10 mL de fundo redondo foi adicionado 80,16 μ L (0,675 mmol) de álcool cinâmico (26) e 0,5 mL de THF anidro; o balão foi submetido ao banho de gelo até atingir 10 °C em repouso. Já em outro balão de 10 mL de fundo redondo foi adicionado 120,387 mg (0,742 mmol) de CDI com 1 mL de THF anidro sob agitação por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado gota a gota a solução do primeiro balão ao último, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro. Manteve-se o balão sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

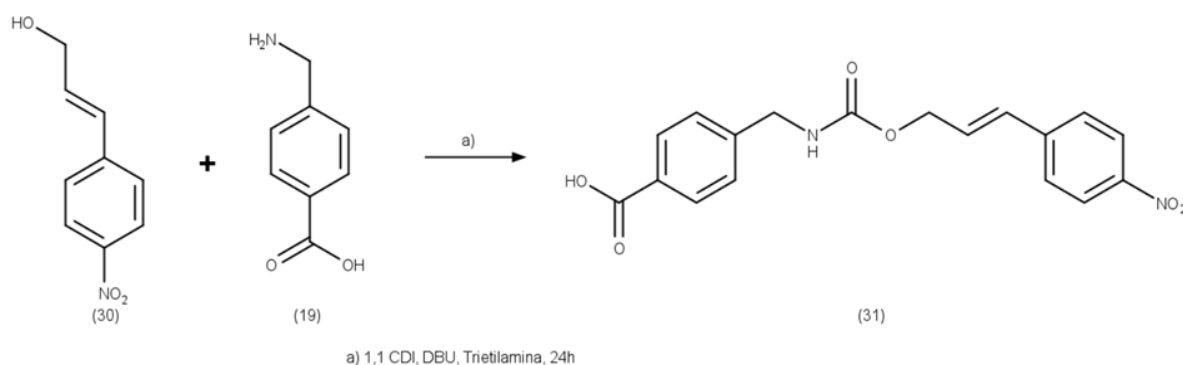
Em seguida, preparou-se uma dispersão com 102,025 mg (0,675 mmol) de PAMBA (19), 100,99 μ L (0,675 mmol) de DBU (24), 94,07 μ L (0,675 mmol) de trietilamina e 1 mL de THF anidro. Dessa forma, a reação que estava em agitação foi adicionada à dispersão gota a gota novamente e deixada overnight sob temperatura ambiente. Posteriormente, após o acompanhamento feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD) na fase móvel 5:5 de hexano:acetato, foi realizada a rotaevaporação do solvente. Em seguida, foi adicionada água destilada em banho de gelo e ajustado o pH para 5 com ácido clorídrico 10 M, o que promoveu a precipitação de um sólido amarelo-claro (27), o qual foi isolado por filtração a vácuo.

O sólido foi analisado por cromatografia (CCD) e decidiu-se que a melhor fase móvel para purificá-lo seria 5:5, isocrática, hexano-acetato. A purificação foi realizada por meio de coluna cromatográfica no equipamento Biotage® Isolera™, obtendo-se o composto final com rendimento de 44,64%.

2.1.3.2 Síntese do intermediário (31) dos compostos: M18 e M22

Essa rota sintética (Figura 15) tem como objetivo de produzir o produto intermediário (31) para ser utilizado na rota do produto final M18 e M22

Figura 15 – Rota sintética do composto intermediário (31).



Fonte: Elaboração Própria, 2023.

2.1.3.2.1 Procedimento experimental do intermediário (31)

Em um balão de 10 mL de fundo redondo foi adicionado 0,567 μ L (0,567 mmol) de álcool nitrocinâmico (30) e 0,5 mL de THF anidro; o balão foi submetido ao banho de gelo até atingir 10 °C em repouso. Já em outro balão de 10 mL de fundo redondo foi adicionado 99,55 mg (0,624 mmol) de CDI com 1 mL de THF anidro sob agitação por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado gota a gota a solução do primeiro balão ao último, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro. Manteve-se o balão sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Em seguida, preparou-se uma dispersão com 85,79 mg (0,567 mmol) de PAMBA (19), 84,88 μ L (0,567 mmol) de DBU, 79,54 μ L (0,567 mmol) de trietilamina e 1 mL de THF anidro. Dessa forma, a reação que estava em agitação foi adicionada à dispersão gota a gota novamente e deixada overnight sob temperatura ambiente. Posteriormente, após o acompanhamento feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD) na fase móvel 6:4 de hexano:acetato, foi realizada a rotaevaporação do solvente. Em seguida, foi adicionada água destilada em banho de gelo e ajustado o pH para 5 com ácido clorídrico 10 M, o que promoveu a precipitação de um sólido laranja (31), o qual foi isolado por filtração a vácuo.

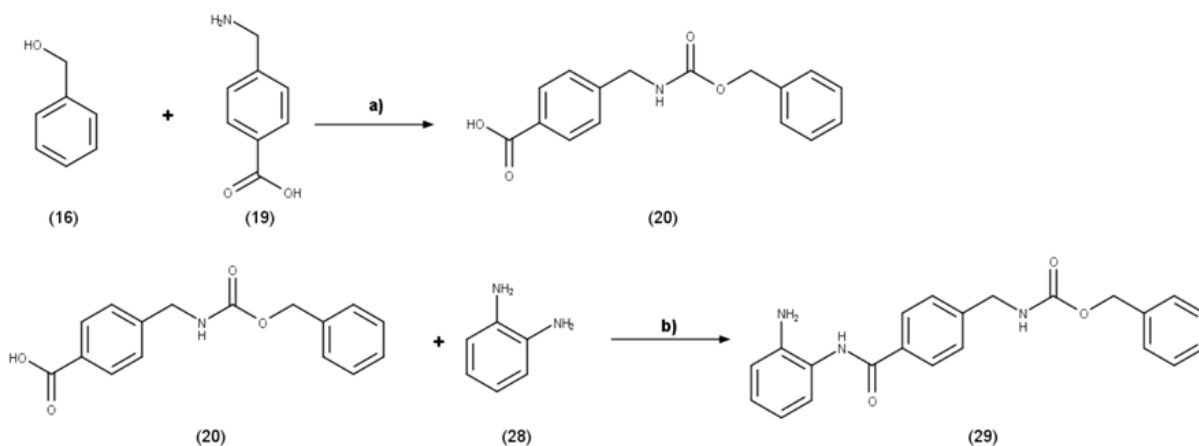
O sólido foi analisado por cromatografia (CCD), e decidiu-se que a melhor fase móvel para purificá-lo seria 5:5, isocrática, hexano-acetato. A purificação foi

realizada por meio da coluna cromatográfica do equipamento Biotage® Isolera™, obtendo-se o composto final com rendimento de 37,37%.

2.1.3.3 Síntese do Composto Final M19 (29)

A metodologia sintética para realizar a formação do composto final (29), equivalente à M19, está de acordo com o esquema abaixo (Figura 16).

Figura 16 – Rota sintética do composto intermediário (20) e final M19 (29).



a) CDI, DBU, Trietilamina, THF, overnight b) HATU, DIPEA, DMF, overnight

Fonte: Elaboração Própria, 2023.

2.1.3.3.1 Procedimento experimental

Em um balão de 10 mL de fundo redondo foi adicionado 285,71 μ L (2,774 mmol) de álcool benzílico (16) e 0,5 mL de THF anidro; o balão foi submetido ao banho de gelo até atingir 10 °C em repouso. Já em outro balão de 10 mL de fundo redondo foi adicionado 494,8 mg (3,051 mmol) de CDI com 1 mL de THF anidro sob agitação por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado gota a gota a solução do primeiro balão ao último, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro. Manteve-se o balão sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente.

Em seguida, preparou-se uma dispersão com 419,34 mg (2,774 mmol) de PAMBA (19), 414,87 μ L (2,774 mmol) de DBU, 386,66 μ L (2,774 mmol) de trietilamina e 1 mL de THF anidro. Dessa forma, a reação que estava em agitação foi adicionada à dispersão gota a gota novamente e deixada overnight sob temperatura

ambiente. Posteriormente, após o acompanhamento feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD) na fase móvel 5:5 de hexano:acetato, foi realizada a rotaevaporação do solvente. Em seguida, foi adicionada água destilada em banho de gelo e ajustado o pH para 5 com ácido clorídrico 10 M, o que promoveu a precipitação de um sólido branco (20), o qual foi isolado por filtração a vácuo. O sólido (482,9 mg) foi analisado por cromatografia (CCD), mostrando ser um composto puro, com faixa de fusão de 209 °C em triplicata, e confirmou-se sua composição química por RMN.

O acoplamento do composto (20) ao (28) foi realizado da seguinte forma: utilizou-se um balão de 10 mL de fundo redondo para adicionar 80 mg (0,296 mmol) do composto intermediário (20), juntamente com 146,323 mg (0,385 mmol) de HATU [1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazol[4,5-b]piridina-3-óxido hexafluorofosfato], 67,031 µL (0,385 mmol) de DIPEA e 5 mL de DMF anidro. A reação foi mantida sob agitação overnight, em temperatura ambiente e atmosfera de N₂.

O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando fase móvel 5:5 de hexano:acetato, revelado sob luz UV a 254 nm. Por fim, foi realizada a extração com 50 mL de acetato de etila e 50 mL de água destilada, repetindo a lavagem por três vezes. A fase orgânica foi seca, resultando em um sólido laranja (29) com massa de 75,8 mg, o qual foi analisado novamente por CCD nas mesmas condições, demonstrando estar puro.

2.1.4 Métodos de purificação

2.1.4.1 Biotage® Isolera™

A purificação dos compostos foi feita com a coluna Biotage® SNAP ULTRA 10g e SNAP ULTRA 25g, utilizando a metodologia isocrática com acetato e hexano como fase móvel. O fluxo era de 36mL/min e utilizava como detecção o comprimento de onda de 254nm.

2.1.4.2 Coluna cromatográfica líquida de bancada

Esse procedimento implica o uso de solventes orgânicos, como acetato de etila e hexano como fase móvel e sílica flash como fase estacionária. O que permite a separação de diferentes compostos devido a sua diferente polaridade.

2.1.5 Identificação e Caracterização estrutural

Foram utilizados tais métodos para identificar e caracterizar os compostos finais e intermediários sintetizados no decorrer desse trabalho:

2.1.5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As cromatoplasas utilizadas para o acompanhamento das reações foram de alumínio (AL TLC - Merck ®) de sílica-gel 60 F254. Para visualização da análise de CCD as placas foram expostas a luz ultravioleta (254 e 365nm).

2.1.5.2 Determinação da faixa de fusão

As faixas de fusão dos compostos foram aferidas no equipamento de ponto de fusão capilar Melting Point Apparatus SMP3, Stuart Scientific ®.

2.1.5.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

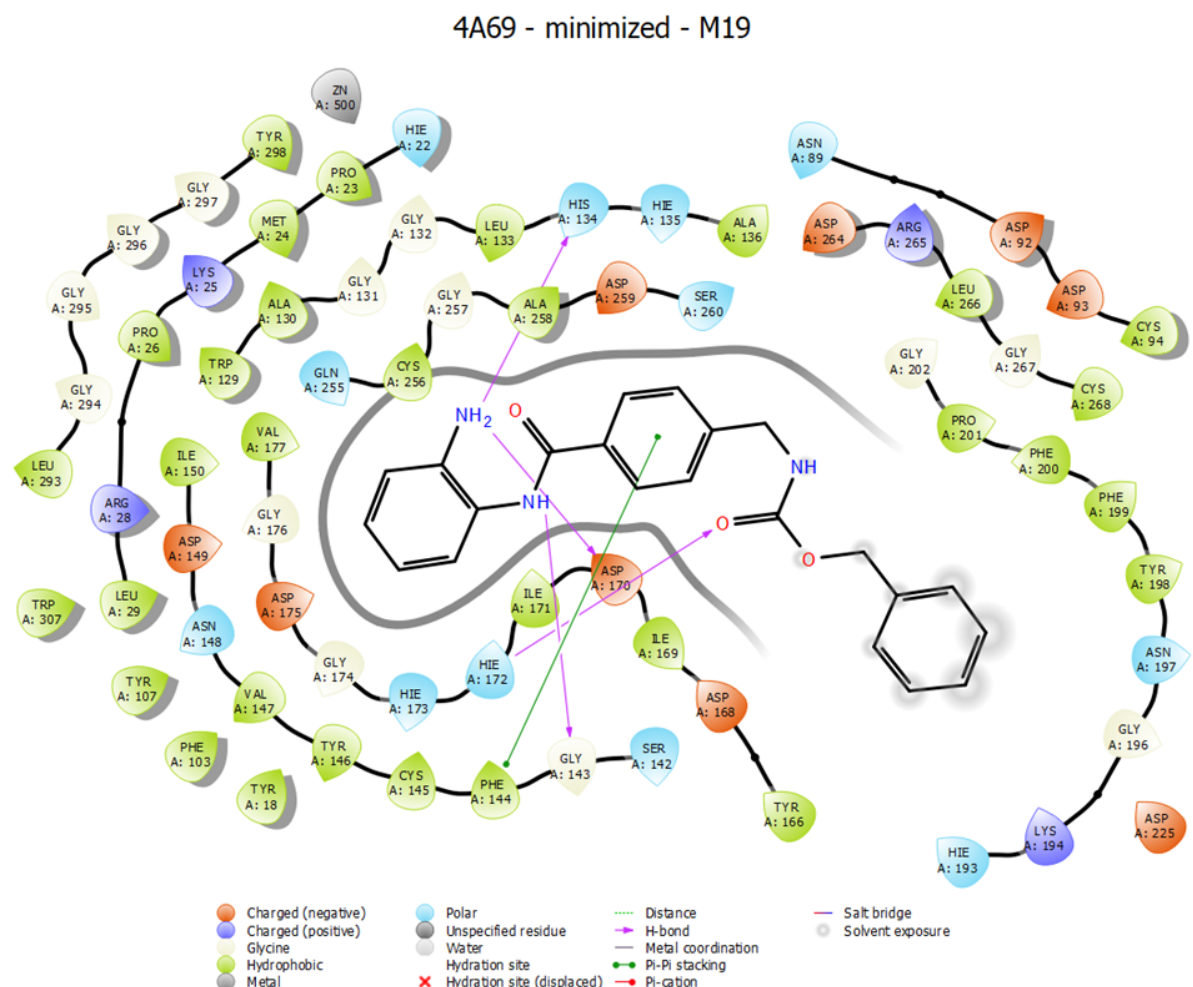
As análises feitas pelo RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (Bruker 600MHz e 300MHz, ambos encontrados no IQ da UNESP de Araraquara) foram feitas a partir da alíquota dos compostos no solvente deuterado DMSO- d_6 .

2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Planejamento estrutural

As novas moléculas foram planejadas utilizando estratégias de ancoragem molecular por meio da compreensão das possíveis interações com o alvo e ainda utilizando softwares para ter resultados mais precisos. A partir do modelo, entinostat, foi realizado modificações com objetivo de melhorar as interações com o sítio ativo. A análise visual e o docking score (DS), um valor calculado por meio do software Maestro® versão 11.8 (SCHRÖDINGER®), o qual leva em consideração a energia livre de interação com o ligante, foram pontos decisivos para se realizar a seleção dos promissores novos inibidores. Quanto menor for o DS, melhor é o desempenho da molécula com sítio ativo, levando em consideração fatores, como: campo de força e interações positivas ou negativas com o ligante (Figura 17).

Figura 17 – Interações do composto M19 no sítio ativo do HDAC3 em uma visualização 2D.



Fonte: Elaboração Própria, 2023.

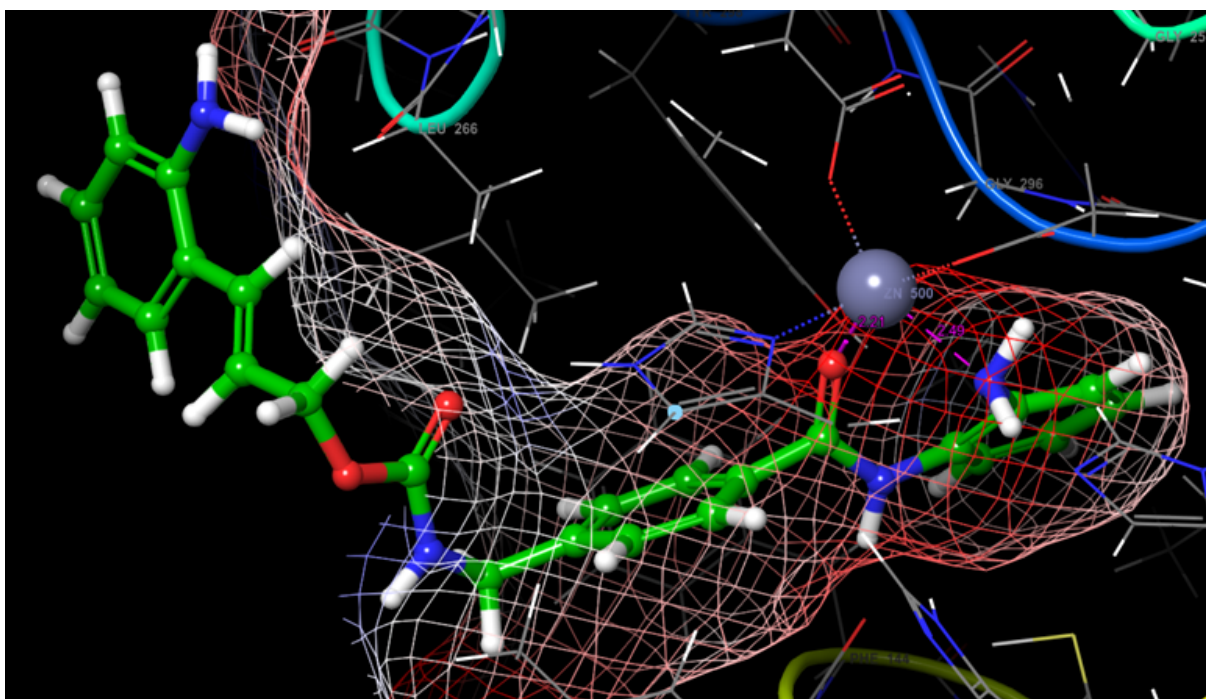
2.2.2 Estudo de ancoragem molecular frente às HDACs

O resultado da ancoragem molecular para interagir com o sítio da HDAC1, HDAC2 e HDAC3 no modelo *in silico* mostrou que algumas moléculas apresentam características semelhantes ao modelo. Sendo elas capazes de fazer a quelação com átomo de Zn^{2+} presente nas cavidades da enzima e apresentando distância adequada (Figura 18), com exceção das moléculas M13 e M14. As quais não apresentaram tais características devido ao impedimento alostérico na enzima HDAC3, mas na HDAC1 e HDAC2 já se observa que não houve esse impedimento devido ao bolsão adicional de 14 Å (Figura 19).

Para garantir a confiabilidade do protocolo de ancoragem, foi realizada a validação por redocking do co-ligante nativo, obtendo-se valores de $RMSD \leq 2,0$ Å

em relação à pose cristalográfica, confirmando a reprodutibilidade do método. O controle de coordenação do íon Zn^{2+} foi assegurado por meio da aplicação de restrições e penalidades específicas. Além disso, os estados de protonação e tautomeria dos ligantes foram avaliados utilizando o módulo Epik (pH $7,4 \pm 0,5$), garantindo representações adequadas às condições fisiológicas. O estado de oxidação e coordenação do metal também foi documentado para cada complexo, assegurando a consistência química do modelo.

Figura 18 - Simulação da M17 com a enzima HDAC3 (código 4A69) mostrando a distância de 2.21Å e 2.49Å do átomo de Zn^{2+} realizado no software Maestro.



Fonte: Elaboração Própria, 2023.

As melhores posições das estruturas geraram um valor de DS, docking score (Tabela 2), os quais podem ser comparados com o do inibidor de HDAC3, Entinostat como mostra na segunda linha da tabela ($DS_{HDAC1} = -8,989$, $DS_{HDAC2} = -8,818$ e $DS_{HDAC3} = -8,118$).

Tabela 2 - Ancoragem molecular in sílico com as HDACs e o padrão entinostat

Composto	HDAC1	HDAC2	HDAC3
entinostat	-8,989	-9,818	-8,118
M1	-8,668	-9,828	-9,023
M2	-9,637	-10,836	-9,070
M3	-8,945	-10,101	-8,092
M4	-8,807	-10,439	-9,133
M5	-9,556	-9,940	-8,284
M6	-8,926	-10,076	-7,155
M7	-9,084	-9,901	-8,466
M8	-9,625	-10,235	-8,038
M9	-9,775	-11,242	-8,086
M10	-9,148	-10,483	-9,273
M11	-8,923	-9,888	-6,360
M12	-9,579	-10,303	-6,925
M13	-8,871	-10,940	-
M14	-5,197	-9,029	-
M15	-8,864	-9,056	-7,317
M16	-9,168	-9,622	-8,931
M17	-9,131	-9,447	-9,858
M18	-8,947	-9,621	-8,862
M19	-9,110	-10,124	-9,791
M20	-7,932	-9,698	-7,682
M21	-8,423	-9,181	-6,835
M22	-8,886	-9,007	-5,771
M23	-8,667	-10,118	-9,193
M20	-7,932	-9,698	-7,682
M21	-8,423	-9,181	-6,835
M22	-8,886	-9,007	-5,771
M23	-8,667	-10,118	-9,193

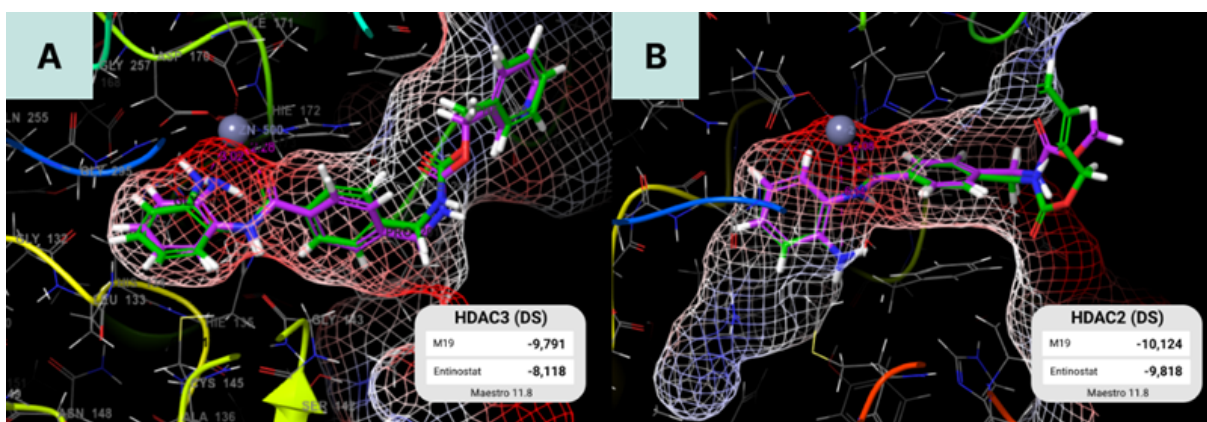
Fonte: Elaboração Própria, 2023.

Levando em consideração que os valores de *Docking Score* (DS) foram obtidos utilizando o método *Glide SP (Standard Precision)*, o qual realiza uma amostragem exaustiva das possíveis conformações de cada ligante, demandando aproximadamente 10 segundos de processamento por pose, podendo maximizar a distinção entre compostos com alta afinidade de ligação e aqueles com baixa ou nenhuma capacidade de interação com o alvo enzimático.

Dessa forma, a triagem virtual realizada permitiu auxiliar na seleção dos compostos mais promissores para etapas subsequentes. Entre eles, o composto M19 apresentou valores de DS inferiores (indicando melhor afinidade *in silico*) em comparação ao protótipo entinostat ($DS_{HDAC1} = -9,110$, $DS_{HDAC2} = -10,124$ e $DS_{HDAC3} = -9,791$), sendo, portanto, um dos principais candidatos selecionados.

Outros compostos, como M2, M5, M7 e M10, também demonstraram potencial atividade superior frente às três isoformas avaliadas (HDAC1, HDAC2 e HDAC3). Em contrapartida, as moléculas M14, M15, M20, M21 e M23 não apresentaram valores de DS expressivos no estudo *in silico*. De forma mais específica, observou-se que a molécula M9 apresentou o menor valor de DS para HDAC1 (-9,775); a molécula M13 destacou-se frente à HDAC2 (-10,940); e a molécula M17 apresentou a melhor interação com o sítio ativo da HDAC3 (DS = -9,858).

Figura 19 – Interações do composto M19 em verde e do modelo, entinostat, em roxo nos sítios ativos do HDAC3 em A e HDAC2 em B, com os respectivos DS.



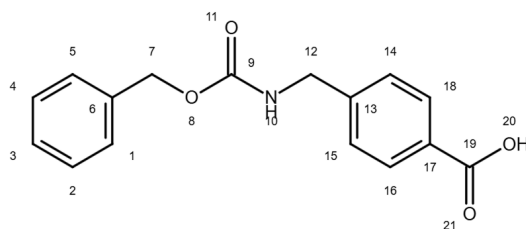
Fonte: Elaboração Própria, 2023.

2.2.3 Caracterização estrutural

2.2.3.1 Caracterização do composto intermediário (20)

O composto intermediário (20), precursor à M19 e M23, foi obtido com rendimento de 61,01% considerando todos os processos sintéticos submetidos. Após sua obtenção, sua caracterização estrutural por meio de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) foi realizada conforme o espectro abaixo (Figura 20).

Tabela 3 - Análise de múltiplos para composto (20).

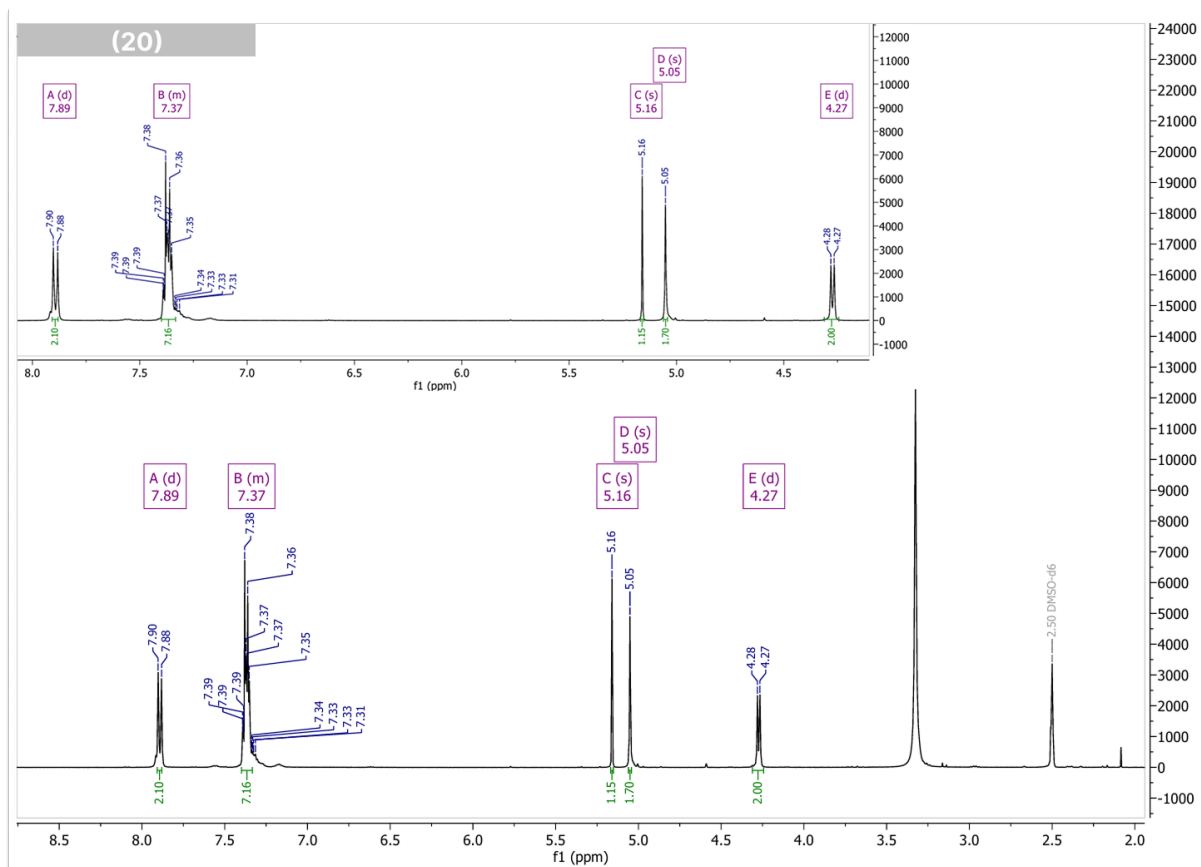


Posição	δ (ppm)	Multiplicidade	J's (Hz)	Integração
1, 2, 3, 4, 5, 14 e 15	7,37	m	-	7,16
16 e 18	7,89	d	8,17	2,1
12	4,27	d	6,16	2
10	5,16	s	-	1,15
7	5,05	s	-	1,7

Fonte: Elaboração Própria, 2025.

Na Tabela 3 são apresentados os deslocamentos químicos de ^1H que confirmam a estrutura do composto (20). Os sinais múltiplos em δH 7,37 ppm (7H, m) correspondem aos hidrogênios aromáticos das posições 1–5 e 14–15. O duplete em δH 7,89 ppm (2H, $J = 8,17$ Hz) é atribuído aos hidrogênios orto nas posições 16 e 18. O sinal em δH 4,27 ppm (d, 2H, $J = 6,16$ Hz) indica a presença de um grupo metilênico na posição 12 adjacente ao nitrogênio da amida. Já em δH 5,16 ppm (s, 1H, s) corresponde ao próton amídico. Por fim, o sinal em δH 5,05 ppm (s, 2H) é característico de um grupo metilênico ligado ao oxigênio do éster na posição, o que confirma a estrutura desejada.

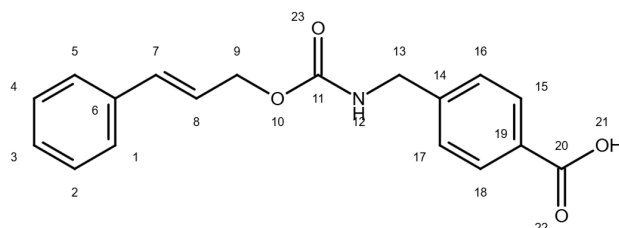
Figura 20 - ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) espectro de RMN do composto (20).



Fonte: Elaboração Própria, 2023.

2.2.3.2 Caracterização do composto intermediário (27)

O composto intermediário (27), precursor de M20 e M21, foi obtido com rendimento de 44,64% considerando todos os processos sintéticos submetidos. Após sua obtenção, sua caracterização estrutural por meio de RMN de ^1H e ^{13}C (600 MHz e 1500 MHz, respectivamente, com DMSO- d_6) foi realizada conforme os espectros abaixo (Figura 21 e 22).

Tabela 4 - Análise de múltiplos para (27).

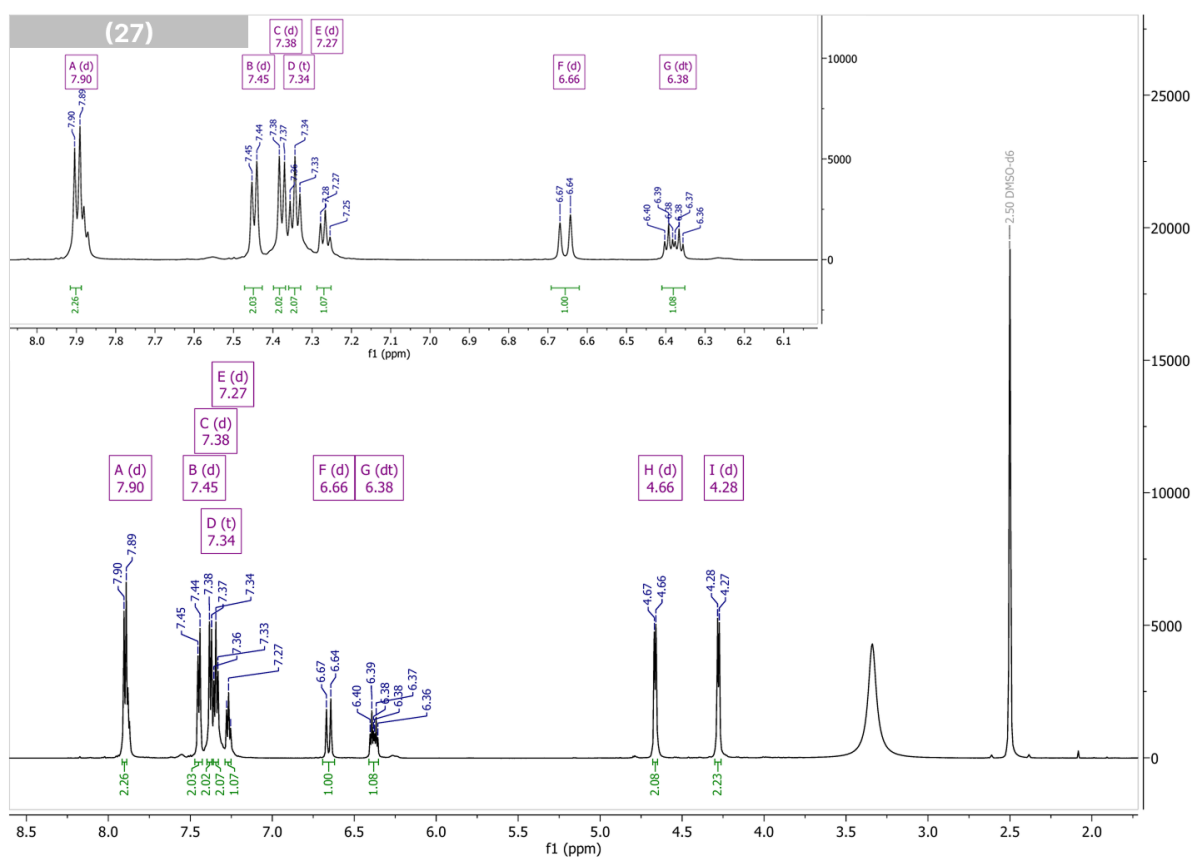
Posição	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	<i>Multiplicidade_H</i>	<i>J's_H</i> (Hz)	<i>Integral_H</i>
1,5	7,45	126,41	d	7.44	1.66
2,4	7,34	128,69	t	7.58, 7.58	2.00
3	7,27	127,89	d	7.29	0.75
6	-	144,90	-	-	-
7	6,66	132,37	d	15.96	0.74
8	6,38	124,81	dt	6.01, 6.01, 15.89	0.98
9	4,66	64,41	d	5.57	1.87
11	-	156,33	-	-	-
13	4,28	43,60	d	6.08	1.71
14	-	136,07	-	-	-
15 e 18	7.90	129,40	d	8.11	2.00
16 e 17	7.38	126,98	d	8.07	1.81
19	-	128,69	-	-	-
0		67,19	-	-	-

Fonte: Elaboração Própria, 2025.

Na Tabela 4 são apresentados os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C que confirmam a estrutura do composto (27). Os sinais entre δH 7,27–7,90 ppm (δC 126,41–129,40 ppm) correspondem aos hidrogênios dos anéis benzênicos nas posições 1–5 e 15–18. Os dupletos em δH 6,66 ppm (d, 1H, J = 15,96 Hz, δC 132,37

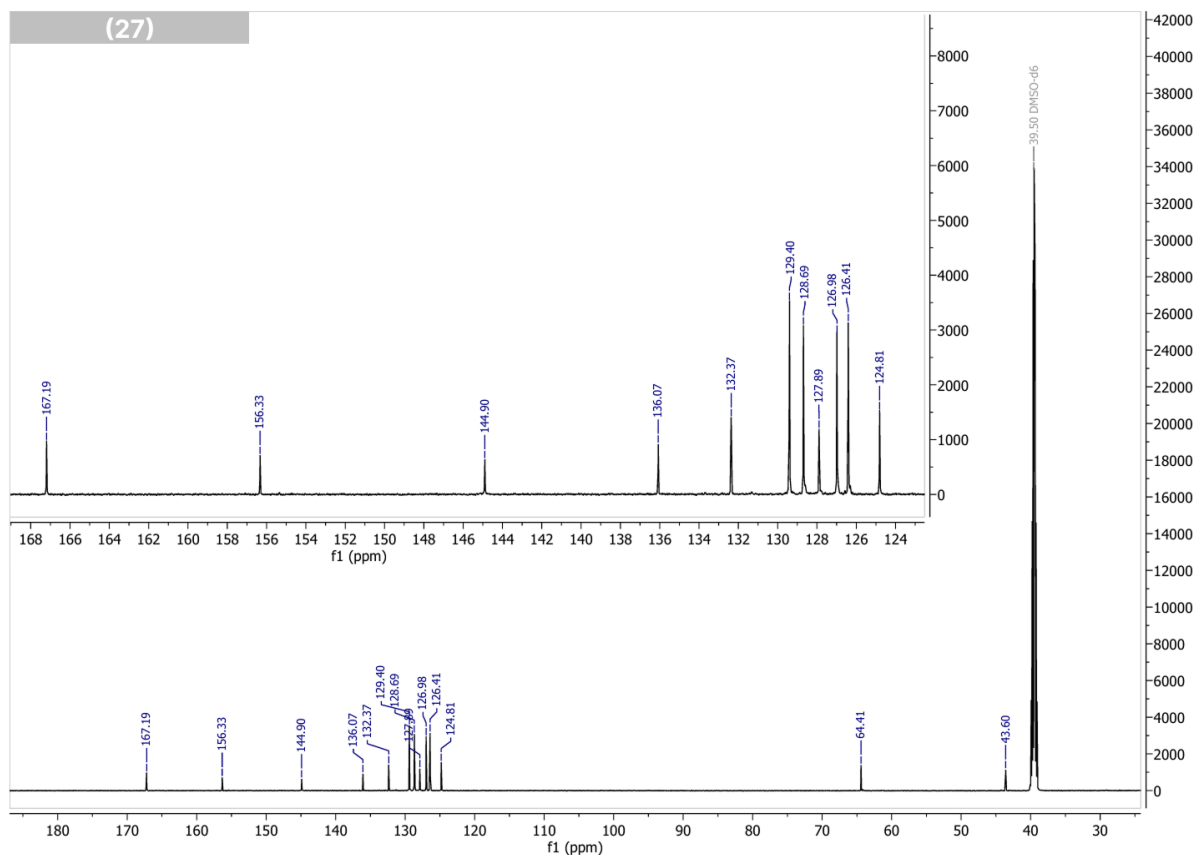
ppm) e δH 6,38 ppm (dt, 1H, $J = 6,01, 6,01$ e $15,89$ Hz, δC 124,81 ppm) indicam a presença de hidrogênios vinílicos nas posições 7 e 8, característicos de uma ligação dupla trans conjugada. O sinal em δH 4,66 ppm (d, 2H, $J = 5,57$ Hz, δC 64,41 ppm) é atribuído ao grupo metilênico ligado ao oxigênio do éster na posição 9, enquanto o duplete em δH 4,28 ppm (2H, $J = 6,08$ Hz, δC 43,60 ppm) corresponde ao metileno da posição 13, adjacente ao nitrogênio amídico. Por fim, os carbonos das carbonilas de éster e do ácido carboxílico aparecem em δC 156,33 ppm (posição 11) e δC 167,19 ppm (posição 20), respectivamente, confirmando a presença dos grupos carbonílicos esperados e corroborando a estrutura proposta.

Figura 21 - ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) espectro de RMN do composto (27).



Fonte: Elaboração Própria, 2023.

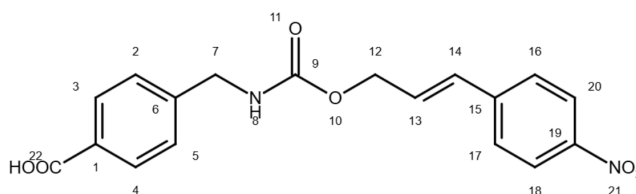
Figura 22 - ^{13}C (150 MHz, DMSO-d₆) espectro de RMN do composto (27).



Fonte: Elaboração Própria, 2023.

2.2.3.3 Caracterização do composto intermediário (31)

O composto intermediário (31), precursor à M18 e M22, foi obtido com rendimento de 37,93% considerando todos os processos sintéticos submetidos. Após sua obtenção, sua caracterização estrutural por meio de RMN de ^1H e ^{13}C (600 MHz e 1500 MHz, respectivamente, com DMSO-d₆) foi realizada conforme os espectros abaixo (Figura 23 e 24).

Tabela 5 - Análise de múltiplos para (31).

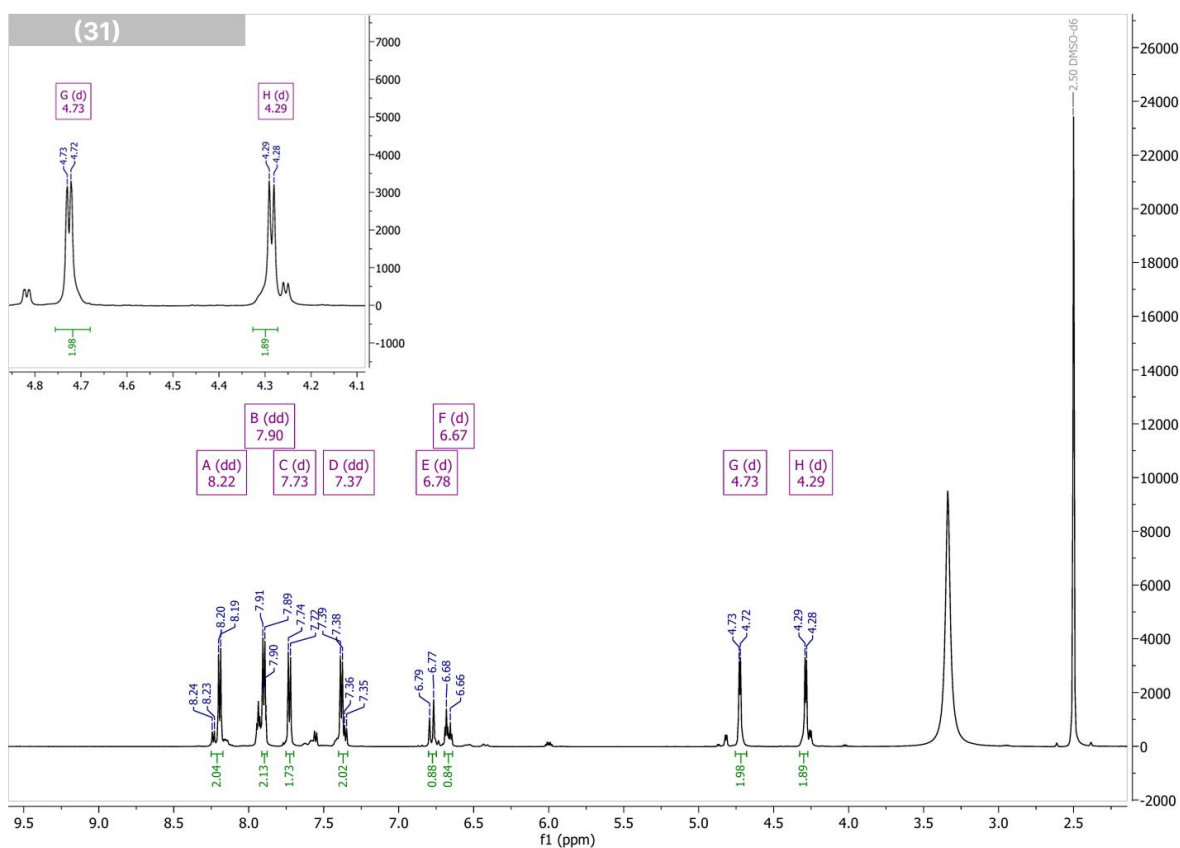
Posição	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	Multiplicidade _H	$J's_H$ (Hz)	Integral _H
1	-	129,63	-	-	-
2	7,37	129,41	dd	8,18; 16,44	2,02
3	7,9	129,79	dd	4,61; 8,09	2,13
4	7,9	-	dd	4,61; 8,09	2,13
5	7,37	-	dd	8,18; 16,44	2,02
6	-	144,82	-	-	-
7	4,29	43,63	d	6,1	1,89
9	-	156,19	-	-	-
12	4,73	63,96	d	4,78	1,98
13	6,78	123,97	d	16,08	0,88
14	6,67	142,89	d	16,01	0,84
15	-	130,41	-	-	-
16 e 17	7,73	127,41	d	8,73	1,73
18 e 20	8,22	127,00	dd	8,72; 25,43	2,04
19	-	146,54	-	-	-
22	-	167,20	-	-	-

Fonte: Elaboração Própria, 2025.

Na Tabela 5 são apresentados os deslocamentos químicos de 1H e ^{13}C que confirmam a estrutura do composto (31). Os sinais aromáticos entre δH 7,37–7,90 ppm (δC 129,41 ppm e 129,79 ppm) correspondem aos hidrogênios das

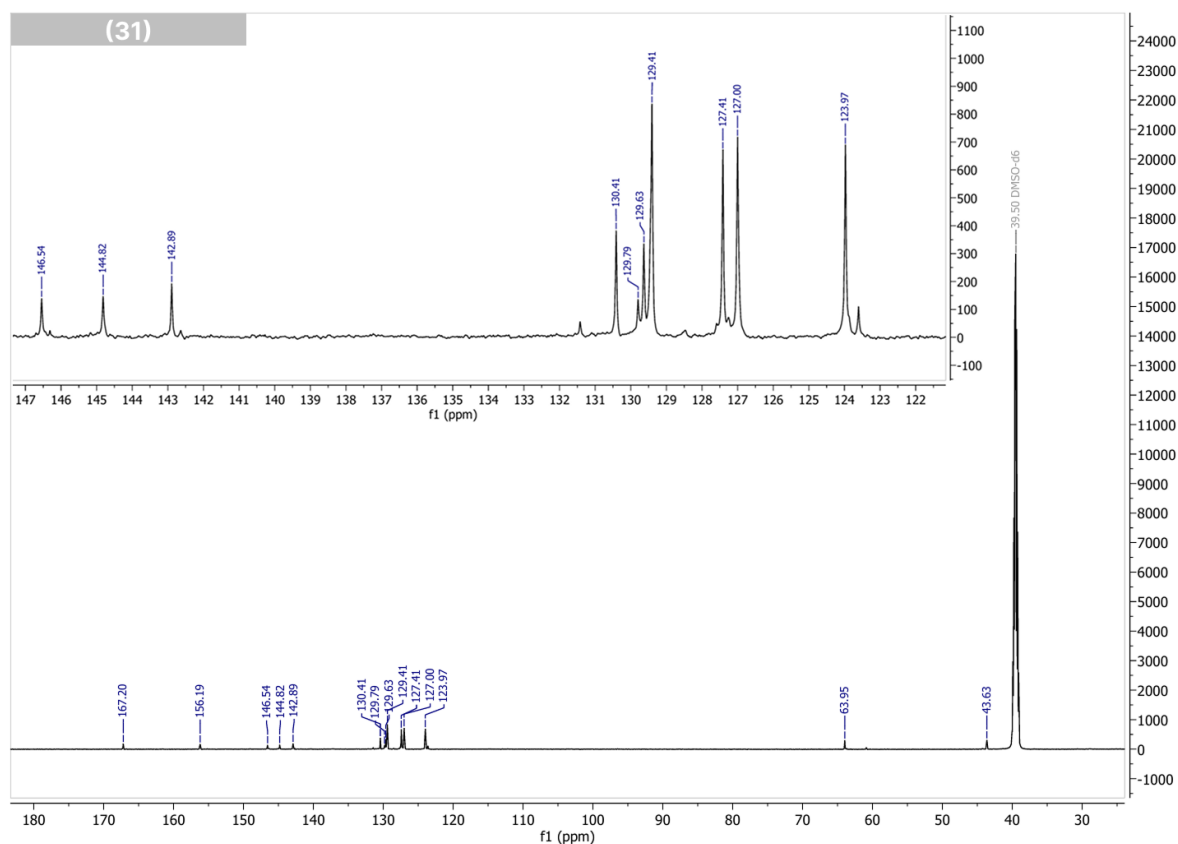
posições 2–5, típicos de anéis benzênicos substituídos. Os dupletos em δ H 6,78 (1H, $J=16,01$ Hz, δ C 123,97 ppm) e δ H 6,67 ppm (1H, $J=16$ Hz, δ C 142,89 ppm) indicam hidrogênios vinílicos, posição 13 e 14, de uma ligação dupla trans. Já os sinais em δ H 4,29 ppm (d, 2H, $J=6,1$ Hz, δ C 43,63 ppm) e δ H 4,73 ppm (d, 2H, $J=4,78$, δ C 63,96 ppm) são atribuídos a grupos metilênicos da posição 7 e 13. O intervalo de δ H 7,73–8,22 ppm (δ C 127–146 ppm) apresenta múltiplos sinais de hidrogênios aromáticos conjugados. Por fim, o carbono na posição 22 é indicado em δ C 167,20 ppm, o que confirma a presença de uma carbonila conjugada, coerente com a estrutura proposta.

Figura 23 - ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) espectro de RMN do composto (31).



Fonte: Elaboração Própria, 2025.

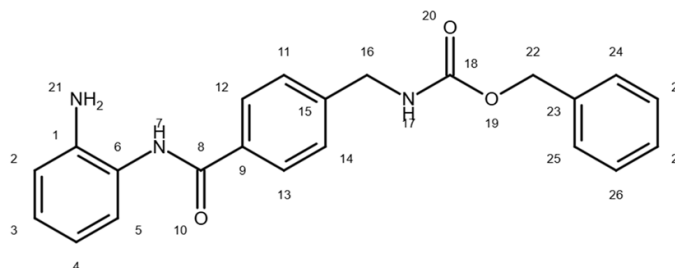
Figura 24 - ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) espectro de RMN do composto (31).



Fonte: Elaboração Própria, 2025.

2.2.3.4 Caracterização do composto final (29)

O composto final (29), equivalente à M19, foi obtido com rendimento total de 41,51% considerados todos os processos sintéticos submetidos e de 68,03% de rendimento parcial, ou seja, da última etapa. Após sua obtenção, sua caracterização estrutural por meio de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) foi realizada conforme o espectro abaixo (Figura 25).

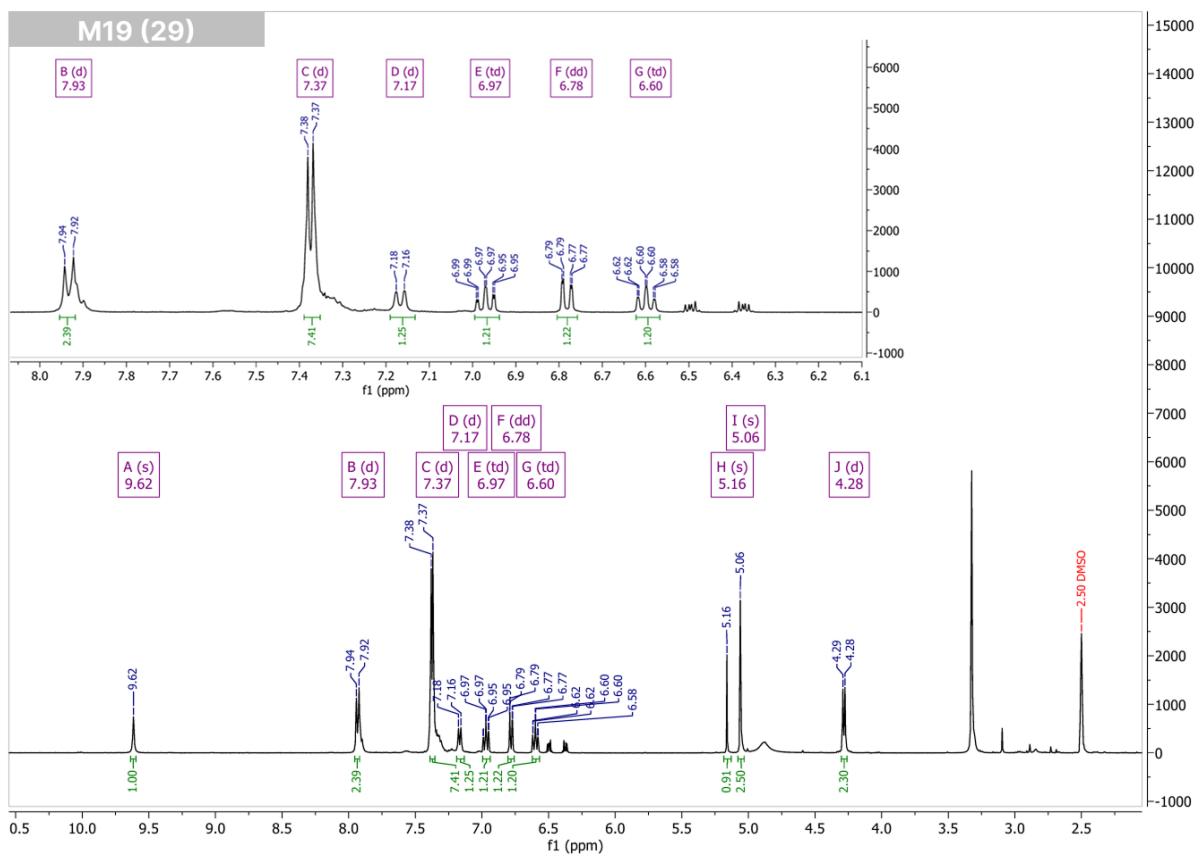
Tabela 6 - Análise de múltiplos para M19 (29).

Posição	(ppm)	Multiplicidade	J's (Hz)	Integração
2	6,78	dd	8,03; 1,44	1,22
3	6,97	td	7,60; 7,56; 1,56	1,21
4	6,60	td	7,51; 7,47; 1,45	1,20
5, 11, 14, 23, 26, 27 e 28	7,37	d	4,89	7,41
7	9,62	s	-	1,00
12 e 13	7,93	d	8,12	2,39
16	4,28	d	6,18	2,30
17	5,16	s	-	0,91
22	5,06	s	-	2,50
24 e 25	7,17	d	7,57	1,25

Fonte: Elaboração Própria, 2025.

Na tabela 6 pode ser analisado os deslocamentos químicos de ^1H característicos que confirmam a obtenção do composto (29). Em δ 9,62 ppm (1H), o simpleto indica o hidrogênio do grupo amida na posição 7. O sinal em δ 5,16 ppm (s, 1H) indica o hidrogênio do grupo carbamato na posição 17. Na região δ 7,37-6,60 ppm, os sinais são provenientes dos hidrogênios de sistemas aromáticos. Além disso, em δ 7,93 ppm (2H, $J=8,12\text{Hz}$) o duplete indica os hidrogênios aromáticos orto-substituídos da posição 12 e 13. Em δ 4,28 ppm (2H, $J=8,12\text{ Hz}$), o duplete é indicativo dos hidrogênios do grupo metilênico da posição 16. Por fim, os hidrogênios do grupo amina terminal estão indicados pelo simpleto em δ 5,06 ppm (2H), corroborando a formação do produto esperado.

Figura 25 - ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) espectro de RMN da molécula M19.



Fonte: Elaboração Própria, 2025.

3 CONCLUSÃO

Os resultados dos estudos de docking molecular demonstram quais compostos planejados foram capazes de interagir com sítio ativo das HDAC1, HDAC2 e HDAC3. Tais moléculas apresentaram pose adequada, boa proximidade com o átomo de Zn^{2+} da estrutura da enzima e também valores de DS similares e muitas vezes superior ao modelo, entinostat, inibidor de HDAC. Desta forma, apresentam perfil *in silico* compatível para inibição enzimática.

Os 23 candidatos geraram poses e energias de interação compatíveis com a inibição de HDACs de classe I; M19 foi sintetizado e caracterizado por RMN 600 Hz, com rendimento global de 41,5%. Os dados *in silico* sustentam afinidade preferencial por HDAC3 a ser confirmada por ensaios enzimáticos seletivos (HDAC1/2/3) e modelos celulares de reativação da latência.

REFERÊNCIAS

- ABNER, Erik; JORDAN, Albert. HIV “shock and kill” therapy: In need of revision. **Antiviral Research**, v. 166, p. 19–34, jun. 2019.
- ADHIKARI, Nilanjan; JHA, Tarun; GHOSH, Balaram. Dissecting Histone Deacetylase 3 in Multiple Disease Conditions: Selective Inhibition as a Promising Therapeutic Strategy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 13, p. 8827–8869, 8 jul. 2021.
- AIT-AMMAR, Amina *et al.* Current Status of Latency Reversing Agents Facing the Heterogeneity of HIV-1 Cellular and Tissue Reservoirs. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 3060, 2019.
- BERNICE, Fidelia; KILCREASE, Christin. Novel and Investigational HIV Therapies for Treatment and Prevention: Focus on Cabotegravir, Islatravir, and Lenacapavir. **Current Infectious Disease Reports**, v. 24, n. 7, p. 89–96, 1 jul. 2022.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e do Complexo Econômico-Industrial da Saúde. **Portaria SECTICS/MS nº 20, de 18 de abril de 2024**. Brasília, DF, 2024.
- BRUNER, Katherine M. *et al.* Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. **Nature Medicine**, v. 22, n. 9, p. 1043–1049, set. 2016.
- CAO, Fangyuan; ZWINDERMAN, Martijn R. H.; DEKKER, Frank J. The Process and Strategy for Developing Selective Histone Deacetylase 3 Inhibitors. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 551, mar. 2018.
- CAO, Shijie *et al.* Hybrid nanocarriers incorporating mechanistically distinct drugs for lymphatic CD4+ T cell activation and HIV-1 latency reversal. **Science Advances**, v. 5, n. 3, p. eaav6322, 27 mar. 2019.
- CHOU, Tessa C.; MAGGIRWAR, Nishad S.; MARSDEN, Matthew D. HIV Persistence, Latency, and Cure Approaches: Where Are We Now? **Viruses**, v. 16, n. 7, p. 1163, jul. 2024.
- CILLO, Anthony R.; MELLORS, John W. Which therapeutic strategy will achieve a cure for HIV-1? **Current Opinion in Virology**, Antiviral strategies • Virus structure and expression. v. 18, p. 14–19, 1 jun. 2016.
- DEEKS, Steven G. Shock and kill. **Nature**, v. 487, n. 7408, p. 439–440, jul. 2012.
- DEEKS, Steven G. *et al.* Research priorities for an HIV cure: International AIDS Society Global Scientific Strategy 2021. **Nature Medicine**, v. 27, n. 12, p. 2085–2098, dez. 2021.
- DRYLEWICZ, Julia *et al.* Comparison of viro-immunological marker changes

between HIV-1 and HIV-2-infected patients in France. **AIDS**, v. 22, n. 4, p. 457, 19 fev. 2008.

FIDLER, Sarah *et al.* **A Randomized Comparison of Antiretroviral Therapy Alone Versus Antiretroviral Therapy with a “Kick-and-Kill” Approach, on Measures of the HIV Reservoir Amongst Participants with Recent HIV Infection: The RIVER Trial**. Rochester, NY Social Science Research Network, , 15 ago. 2019. Disponível em: <https://papers.ssrn.com/abstract=3439560>. Acesso em: 12 out. 2025

JÓNA, Ádám *et al.* The histone deacetylase inhibitor entinostat (SNDX-275) induces apoptosis in Hodgkin lymphoma cells and synergizes with Bcl-2 family inhibitors. **Experimental Hematology**, v. 39, n. 10, p. 1007–1017.e1, 1 out. 2011.

KHAN, Nagma *et al.* Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. **The Biochemical Journal**, v. 409, n. 2, p. 581–589, 15 jan. 2008.

KILBY, J. Michael; ERON, Joseph J. Novel Therapies Based on Mechanisms of HIV-1 Cell Entry. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 22, p. 2228–2238, 29 maio 2003.

KULPA, Deanna A.; CHOMONT, Nicolas. HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? **Journal of Virus Eradication**, v. 1, n. 2, p. 59–66, abr. 2015.

LANDOVITZ, Raphael J.; SCOTT, Hyman; DEEKS, Steven G. Prevention, treatment and cure of HIV infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 10, p. 657–670, out. 2023.

MARSDEN, Matthew D. *et al.* Characterization of designed, synthetically accessible bryostatin analog HIV latency reversing agents. **Virology**, v. 520, p. 83–93, 1 jul. 2018.

MCLAREN, Paul J.; FELLAY, Jacques. HIV-1 and human genetic variation. **Nature Reviews Genetics**, v. 22, n. 10, p. 645–657, out. 2021.

NAIF, Hassan M. Pathogenesis of HIV Infection. **Infectious Disease Reports**, v. 5, n. Suppl 1, p. e6, 6 jun. 2013.

NGAMPHAIBOON, Nuttapong *et al.* A phase I study of the histone deacetylase (HDAC) inhibitor entinostat, in combination with sorafenib in patients with advanced solid tumors. **Investigational New Drugs**, v. 33, n. 1, p. 225–232, fev. 2015.

PIRES, Gustavo Salgado *et al.* Drug Discovery for Histone Deacetylase Inhibition: Past, Present and Future of Zinc-Binding Groups. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 4, p. 577, abr. 2025.

SÁEZ-CIRIÓN, Asier *et al.* Sustained HIV remission after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with wild-type CCR5 donor cells. **Nature Medicine**, v. 30, n. 12, p. 3544–3554, dez. 2024.

SARKAR, Rajat *et al.* Histone deacetylase 3 (HDAC3) inhibitors as anticancer

agents: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 192, p. 112171, 15 abr. 2020.

SCHOLZ, Erin M. B.; KASHUBA, Angela D. M. The Lymph Node Reservoir: Physiology, HIV Infection, and Antiretroviral Therapy. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 109, n. 4, p. 918–927, abr. 2021.

SCOCA, Viviana; DI NUNZIO, Francesca. The HIV-1 Capsid: From Structural Component to Key Factor for Host Nuclear Invasion. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 273, fev. 2021.

STEVENSON, Mario. HIV nuclear import: What's the flap? **Nature Medicine**, v. 6, n. 6, p. 626–628, jun. 2000.

UNAIDS. Global HIV Target Setting for 2030. **UNAIDS 2025**, 28 mar. 2025.

WIGHTMAN, Fiona *et al.* Entinostat is a histone deacetylase inhibitor selective for class 1 histone deacetylases and activates HIV production from latently infected primary T cells. **AIDS**, v. 27, n. 18, p. 2853, 28 nov. 2013.

YU, Fei; JIANG, Shibo. Small-Molecule HIV Entry Inhibitors Targeting gp120 and gp41. *In*: JIANG, Shibo; LU, Lu (Orgs.). **Virus Entry Inhibitors: Stopping the Enemy at the Gate**. Singapore: Springer, 2022. p. 27–43.