

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 10/03/2021.

JULIANA ROMANO LOPES

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE
AGENTES REVERSORES DE LATÊNCIA PARA ELIMINAÇÃO DE
RESERVATÓRIOS CELULARES DO HIV**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química do Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos
Santos

**ARARAQUARA
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

L864p Lopes, Juliana Romano
Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de
agentes reversores de latência para eliminação de
reservatórios celulares do HIV / Juliana Romano Lopes. –
Araraquara : [s.n.], 2020
188 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Jean Leandro dos Santos

1. HIV. 2. Fármacos. 3. Epigenética. 4. AIDS (Doença).
5. Inibidores enzimáticos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de agentes reversores de latência para eliminação de reservatórios celulares do HIV"

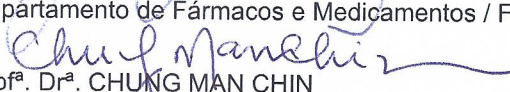
AUTORA: JULIANA ROMANO LOPES

ORIENTADOR: JEAN LEANDRO DOS SANTOS

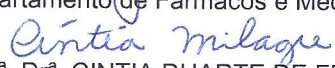
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Profª. Drª. CHUNG MAN CHIN

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Profª. Drª. CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 10 de março de 2020

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Juliana Romano Lopes

Nome em citações bibliográficas: LOPES, J. R.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Graduação em licenciatura em química, pelo Instituto de Química da UNESP de Araraquara – 2018.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos:

LOPES, J. R.; CHIBA, D. E.; CHIN, C.M.; dos SANTOS, J.L. Kick and kill approach: how far are we from HIV cure? **Biochem Pharmacol**, v. 8, ed. 188, 2019.

Apresentação de trabalhos:

Síntese e caracterização estrutural de CI-994 como agente reversor de latência para reservatórios celulares de HIV-1 - XI Congresso Farmacêutico da UNESP e a V Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2019

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- 2ª Escola de Modelagem Molecular (2ª EMMUnesp): 7 a 11 de janeiro de 2019.
- XI Congresso Farmacêutico da UNESP e a V Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2019.
- Comissão avaliadora do XI Congresso Farmacêutico da UNESP e a V Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2019.

ORIENTAÇÕES

Orientação de trabalho de conclusão de curso (TCC) dos alunos: Ana Gabriele de Campos Godoy (bolsista PIBIC-CNPq) e Max Gerlack no ano de 2019-2020.

OUTROS

- Estágio docência na disciplina de “Desenvolvimento de Fármacos” ministrada pelo prof. Dr. Jean Leandro dos Santos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP: 1ª semestre de 2019.
- Estágio docência na disciplina de “Planejamento de Fármacos” ministrada pelo prof. Dr. Jean Leandro dos Santos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP: 2ª semestre de 2019.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – processo: 132203/2018-9

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

A minha família pelo apoio incondicional.

Ao meu noivo Guilherme, pelo apoio e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, por todo o ensinamento, amizade e apoio.

Aos meus amigos do laboratório, Aline, Bárbara, Beatriz, Diego, Guilherme, Igor, João, Maria, pelo companheirismo, apoio e ensinamentos.

Aos meus alunos de TCC que tive o prazer de orientar, Max e Ana, pela amizade e ensinamentos.

Aos meus amigos de graduação Lucas, Ricardo, Ailton e Rafaela, pelos ensinamentos, amizade e apoio durante todo o processo do mestrado.

Resumo

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Estimativas para o ano de 2018 apontavam que cerca 37,9 milhões de pessoas viviam com HIV no mundo naquele ano. Até o presente momento, a infecção pelo vírus HIV-1 se mantém incurável. A terapia antirretroviral altamente ativa (TARV), embora altamente efetiva na redução da carga viral, não implica na eliminação do vírus, uma vez que o HIV permanece em um estado latente em células T CD4⁺ e pode ser reativado com a interrupção do tratamento. A estratégia “*kick-and-kill*” ou “*shock-and-kill*” visa induzir a replicação do vírus nos reservatórios latentes por meio de agentes reversores de latência (LARs). Assim, as células infectadas poderiam ser eliminadas através de efeitos citopáticos decorrentes da infecção e da resposta imunológica, ou por meio da associação de compostos que induzam a eliminação do vírus reativado (“*kill agents*”). A combinação dessa nova estratégia com a TARV impede que o vírus reativado consiga infectar células saudáveis, podendo ser um novo caminho a ser explorado para a eliminação dos reservatórios latentes de HIV. Inibidores de histona deacetilase (HDAC) e bromodomínios (BRD) têm sido relatados como promissores agentes reversores de latência. Neste trabalho, utilizando ferramentas de modificação molecular, oito compostos promissores foram planejados. Dos oito, seis compostos finais foram sintetizados e avaliados frente HDAC classe I e BRD4, destacando-se dois mais promissores por sua atividade dual HDAC/BRD4 que serão posteriormente avaliados dentro da estratégia *kick-and-kill*. Os resultados deste trabalho podem levar ao desenvolvimento de novos agentes reversores de latência e contribuir com a continuidade dos estudos da estratégia.

Palavras chave: HIV, “*kick-and-kill*”, agentes reversores de latência.

Abstract

The human immunodeficiency virus (HIV) is the cause of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Estimates for the 2018 year suggested that about 37,9 millions of people lived with HIV worldwide. Until the present moment, the HIV infection remains incurable. The continuous treatment with Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), although highly effective in reduction of viral load, does not imply in the elimination of virus, once the virus HIV remains in a latent state in CD4⁺ T cells and can be reactivated after interruption of the treatment. The “kick-and-kill” or “shock-and-kill” strategy aims to induce the replication of virus in the latent reservoirs by Latency Reversal Agents (LRAs), for posterior elimination of these infected cells through cytopathic effects due to infection and host immunological response, or through association with compounds that induce the elimination of reactivated virus (kill agents). The combination of this new strategy with HAART prevents the reactivated virus to infected healthy cells and could be a new approach to exhaust and eliminate latent reservoirs of HIV. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) and bromodomain inhibitors (BRDi) have been related as promising LRAs. In this work, using molecular modification tools, eight promising compounds were planned. Of the eight, six final compounds were synthesized and evaluated against HDAC class I and BRD4, with two more promising for their dual HDAC/BRD4 activity, which will later be evaluated within the kick-and-kill strategy. The results of this work can lead to the development of new latency reversal agents and contribute to the continuity of the strategy studies.

Keywords: HIV, “kick-and-kill”, latency reversal agents.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo viral e tratamento com terapia antirretroviral (TARV).....	18
Figura 2. Representação da estratégia "kick-and-kill"	21
Figura 3. Vorinostat e panobinostat.....	23
Figura 4. JQ1.....	25
Figura 5. Modo de ligação do composto isoxazólico em BRD4 obtido por cristalografia de raios-X	27
Figura 6. Otimização do composto CI-994 para obtenção de um inibidor seletivo HDAC-1 e HDAC-2	28
Figura 7. Estrutura do composto BRD3308.....	29
Figura 8. Sobreposição das estruturas cristalinas de HDAC-2 (roxo) e HDAC-3 (marrom) usando o software Maestro.....	29
Figura 9. Planejamento da estrutura geral para inibição dual de BRD-4/HDAC	31
Figura 10. Etapas sintéticas para a obtenção dos compostos finais derivados da série acetamida: (4), (9), (12) e (15).....	35
Figura 11. Etapas sintéticas para a obtenção dos compostos finais derivados da série isoxazol: (20), (23), (25) e (27).....	36
Figura 12. Etapa sintética para a obtenção de (2).....	37
Figura 13. Etapa sintética para obtenção de (6).....	38
Figura 14. Etapa sintética para obtenção de (8), (11), (15) e (27).	39
Figura 15. Etapa sintética para obtenção de (17).....	40
Figura 16. Etapa sintética para obtenção de (19).....	41
Figura 17. Etapa sintética para obtenção de (7), (10), (18), (23) e (25).....	42
Figura 18. Etapa sintética para obtenção de (4), (9), (12), (20), (22) e (24).....	43
Figura 19. Etapa sintética para obtenção de (14) e (26).....	44
Figura 20. Etapa sintética para obtenção de (9), (12), (23) e (25).	45
Figura 21. Substituições bioisostéricas realizadas para estudo por ancoragem molecular	48
Figura 22. Série de compostos e diferentes substituições realizadas no anel aromático na posição p-amino.	49

Figura 23. Interações dos substituintes tiofeno (a) e 3,5-dimetil-isoxazol (b) na posição p-amino do anel aromático ocupando a cavidade adicional de 14 Å de HDAC-2.....	51
Figura 24. Ancoragem molecular do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida contra HDAC-2.....	52
Figura 25. Interações com o BRD4 entre duas moléculas derivadas da série isoxazol (a) e série acetamida (b).....	53
Figura 26. Esquema das etapas sintéticas para os compostos (4), (9), (12) e (14). ...	56
Figura 27. Reação de formação de amida com uso de agente acoplante (EDC)	58
Figura 28. Reação de formação de amida com uso de acoplante (HATU)	59
Figura 29. Esquema das etapas sintéticas para os compostos finais (20) e (26).	67
Figura 30. Esquema das etapas sintéticas para os compostos finais (23) e (25).	68
Figura 31. Mecanismo do acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura.....	72
Figura 32. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto terc-butil (4-bromo-2-nitrofenil)carbamato	89
Figura 33. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto terc-butil (4-bromo-2-nitrofenil)carbamato.	90
Figura 34. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto terc-butil-2-nitro-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato	92
Figura 35. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto terc-butil-2-nitro-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato	93
Figura 36. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto terc-butil-2-amino-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato.	95
Figura 37. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto terc-butil-2-amino-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato.	96
Figura 38. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto terc-butil-2-amino-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato.....	97
Figura 39. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto terc-butil-2-amino-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato.....	98
Figura 40. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto ácido 4-acetamidobenzóico.	100
Figura 41. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto ácido 4-acetamidobenzóico.	101
Figura 42. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto metil-4-iodobenzoato. ...	103
Figura 43. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto metil-4-iodobenzoato.	104

Figura 44. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzoato de metila.	106
Figura 45. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzoato de metila.....	107
Figura 46. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto ácido-4(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzóico	109
Figura 47. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto ácido-4(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzóico.	110
Figura 48. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto tert-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-nitrofenil)carbamato.....	112
Figura 49. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-nitrofenil)carbamato.	113
Figura 50. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto tert-butil (2-amino-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato	115
Figura 51. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto tert-butil (2-amino-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato.....	116
Figura 52. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto tert-butil(2-(4-bromobenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol)4il)fenil)carbamato	118
Figura 53. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto tert-butil(2-(4-bromobenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol)4il)fenil)carbamato	119
Figura 54. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto tert-butil(2-(4-bromobenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol)4il)fenil)carbamato.....	120
Figura 55. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto tert-butil(2-(4-bromobenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol)4il)fenil)carbamato	121
Figura 56. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 2-(4-bromobenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	123
Figura 57. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto2-(4-bromobenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	124
Figura 58. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 2-(4-bromobenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	125
Figura 59. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 2-(4-bromobenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato	126
Figura 60. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) do composto 4-acetamida-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida	128
Figura 61. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-acetamida-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida.	129

Figura 62. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida.	130
Figura 63. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) 4-acetamida-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida.	131
Figura 64. RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 300 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida	133
Figura 65. RMN de ¹³ C (APT) (DMSO-d ₆ , 150 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida	134
Figura 66. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida	135
Figura 67. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida	136
Figura 68. RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	138
Figura 69. RMN de ¹³ C (DMSO-d ₆ , 150 MHz) do composto tert-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	139
Figura 70. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	140
Figura 71. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	141
Figura 72. RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato.	143
Figura 73. RMN de ¹³ C (APT) (DMSO-d ₆ , 150 MHz) do composto tert-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato.	144
Figura 74. RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	146
Figura 75. RMN de ¹³ C (APT) (DMSO-d ₆ , 150 MHz) do composto tert-butil (2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	147
Figura 76. RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)fenil)carbamato.	149
Figura 77. RMN de ¹³ C (APT) (DMSO-d ₆ , 150 MHz) do composto tert-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)fenil)carbamato.	150
Figura 78. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)fenil)carbamato. ..	151
Figura 79. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)fenil)carbamato. ..	152

Figura 80. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida (4)	154
Figura 81. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida (4)	155
Figura 82. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida (4)	156
Figura 83. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida (4)	157
Figura 84. Espectro de IV (KBr) do composto 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida (4)	158
Figura 85. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (9)	160
Figura 86. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (9)	161
Figura 87. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (9)	162
Figura 88. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (9)	163
Figura 89. Espectro de IV (KBr) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (9)	164
Figura 90. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (12)	166
Figura 91. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (12)	167
Figura 92. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (12)	168
Figura 93. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (12)	169
Figura 94. Espectro de IV (KBr) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (12)	170
Figura 95. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (20)	172
Figura 96. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (20)	173
Figura 97. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (20)	174

Figura 98. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (20).....	175
Figura 99. Espectro de IV (KBr) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (20).	176
Figura 100. Espectro de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).....	178
Figura 101. RMN de ¹³ C (APT) (DMSO-d ₆ , 150 MHz) do composto N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).....	179
Figura 102. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).....	180
Figura 103. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).....	181
Figura 104. Espectro de IV (KBr) do composto composto N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).	182
Figura 105. Espectro de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (25)	184
Figura 106. RMN de ¹³ C (APT) (DMSO-d ₆ , 150 MHz) do composto N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (25).....	185
Figura 107. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (25)	186
Figura 108. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (25)	187
Figura 109. Espectro de IV (KBr) do composto N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).....	188

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 HIV e AIDS: epidemiologia	16
1.2 A Infecção por HIV e o tratamento atual	17
1.3 Reservatório latente de HIV e a estratégia de “kick-and-kill”	19
1.4 Inibidores de histona deacetilase (HDACi) como ARLs	21
1.5 Inibidores de bromodomínios como ARL	24
1.6 Efeitos sinérgicos entre ARLs	25
1.7 Planejamento estrutural dos compostos	26
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Planejamento estrutural	31
3.2 Modelagem molecular	32
3.3 Métodos de purificação	33
Biotage® Isolera™	33
Coluna de bancada	33
3.4 Identificação e Caracterização estrutural	33
3.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	33
3.4.2 Determinação da faixa de fusão	33
3.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	33
3.4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	34
3.5 Metodologia sintética	34
3.4.1 Síntese do ácido-4-acetamidobenzóico - (2)	37
3.4.2 Síntese do terc-butil (4-bromo-2-nitrofenil)carbamato - (6)	37
3.4.3 Síntese dos compostos (8), (11), (15) e (27)	38
3.4.4 Síntese do 4-metil-iodo benzoato (17)	40
3.4.5 Síntese do ácido-4(-3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzóico - (19)	40
3.4.6 Síntese dos compostos (7), (10), (18), (23) e (25) (adaptado de GAO <i>et al.</i> , 2017)	41
3.4.7 Síntese dos compostos (4), (9), (12), (20), (22) e (24) (adaptado de (THOMAS <i>et al.</i> , 2008; HOLSON <i>et al.</i> , 2013)	43
3.4.8 Síntese dos compostos (14) e (26) (adaptado de WAGNER <i>et al.</i> , 2016)	44
3.4.9	45
Síntese dos compostos (9), (12), (23) e (25)	45

3.6 Ensaios de inibição enzimática	46
3.5.1 Condições experimentais e análise dos dados para o ensaio de inibição de HDAC	46
3.5.2 Condições experimentais e análise dos dados para o ensaio de inibição de bromodomínio-4 (BRD-4)	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Ancoragem molecular	48
4.2.1 Estudo de ancoragem molecular frente HDAC	50
4.2.2 Estudo de ancoragem molecular frente BRD-4	52
4.2 Síntese e caracterização dos compostos finais	55
4.3.1 Síntese e caracterização dos compostos finais série acetamida (4), (9), (12)	56
4.3.2 Síntese e caracterização dos compostos finais da série isoxazol (20), (23), (25). ...	67
4.4 Avaliação enzimática dos compostos finais.....	78
5. CONCLUSÃO	83
6. REFERÊNCIAS	84
APÊNDICE A - CARACTERIZAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS SINTÉTICOS.....	88
i) terc-butil (4-bromo-2-nitrofenil)carbamato	88
ii) Terc-butil-2-nitro-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato	91
iii) Terc-butil-2-amino-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato	94
iv) Ácido-4-acetamidobenzóico	99
v) 4-metil-iodo benzoato	102
vi) 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzoato de metila.....	105
vii) ácido-4(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzóico	108
viii) tert-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-nitrofenil)carbamato	111
ix) tert-butil (2-amino-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato	114
x) Tert-butil(2-(4-bromobenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato	117
xi) Tert-butil (2-(4-bromobenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato	122
xii) 4-acetamida-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida	127
xiii) 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida.....	132
xix) tert-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato	137
xx) tert-butil(2-(4-acetamidabenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-(3,5 dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato	142
xxi) tert-butil(2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato	145
xxii) tert-butil(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)fenil)carbamato	148
APÊNDICE B - CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FINAIS	153
i) 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida - (4)	153
ii) 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida - (9)	159
iii) 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida - (12).....	165
iv) 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida - (20).....	171
N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida - (23).....	177
v)	177
vi) N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida - (25)	183

1. INTRODUÇÃO

1.1 HIV e AIDS: epidemiologia

A infecção pelo vírus HIV-1, agente causador da síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS), é ainda uma epidemia mundial de grande preocupação para a Saúde Pública. De acordo com os dados da UNAIDS (2019), estimou-se que em 2018, cerca de 37,9 milhões de pessoas viviam com o vírus e 1,7 milhões de novos casos de infecção tenham ocorrido. Desde o início da epidemia até o ano de 2018, aproximadamente 32 milhões de pessoas morreram em decorrência de causas relacionadas à AIDS. Com o advento da terapia antirretroviral altamente ativa (TARV) as mortes diminuíram em 55% desde 2004, mas somente no ano de 2018, 770 mil pessoas morreram por causas associadas à AIDS (UNAIDS, 2019).

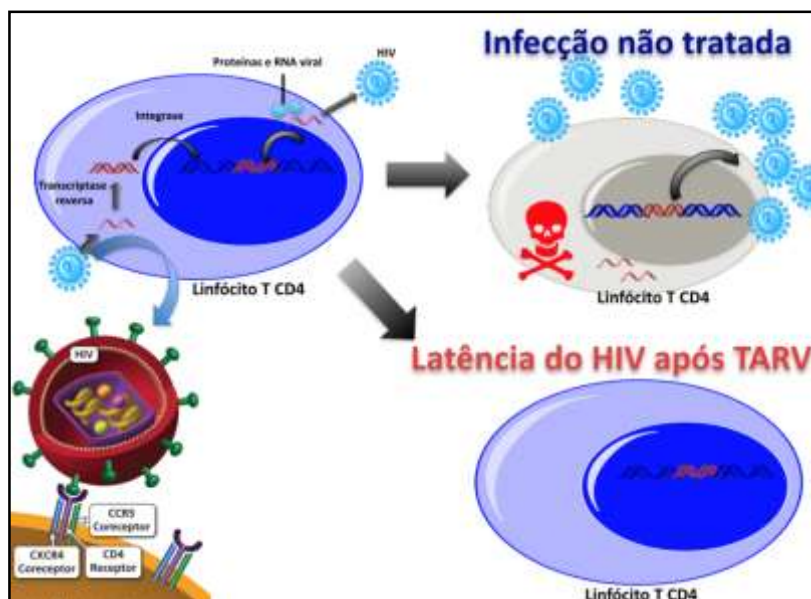
De 2007 até junho de 2019, foram notificados no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) 300.496 casos de infecção por HIV no Brasil e apenas em 2018, foram notificados 43.941 novos casos de infecção e 37.161 casos de AIDS. Ainda em 2018, foram registrados no SIM (Sistema de Informação sobre Mortalidade) 10.990 mortes por causas decorrentes à AIDS no Brasil. A maioria dos casos de infecção (52,7 %) encontram-se na faixa etária de 20 a 34 anos. (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019).

Os dados epidemiológicos mostram que a infecção por HIV ainda é numerosa em todo o mundo. Em países subdesenvolvidos como os do leste e sul da África existem aproximadamente 20,6 milhões de pessoas vivendo com HIV, representando mais da metade dos casos mundiais de infecção pelo vírus (UNAIDS, 2019). Ao redor do globo, estima-se que exista 8,1 milhões de pessoas que desconhecem que são infectadas pelo vírus HIV. Apesar da eficácia do tratamento no controle da infecção, no ano de 2018 apenas 23,3 milhões de pessoas tiveram acesso a TARV, um número ainda muito baixo perto do atual cenário de casos mundiais (UNAIDS, 2019).

1.2 A Infecção por HIV e o tratamento atual

O vírus HIV é um retrovírus capaz de infectar preferencialmente linfócitos T CD4+, uma vez que essas células apresentam um receptor primário CD4 capaz de ser reconhecido através de interações moleculares pelas glicoproteínas do envelope viral, como a gp120 e gp41 (DEEKS *et al.*, 2015). Através de co-receptores, denominados de CXCR4, expresso em células T e/ou CCR5 expresso em células como macrófagos e dendríticas, o vírus consegue entrar na célula hospedeira por um processo de fusão. Após esse processo, todo o conteúdo do envelope viral é inserido na célula hospedeira, incluindo o material genético do vírus e as proteínas necessárias para sua replicação. Após adentrar a célula hospedeira, o processo de transcrição reversa é iniciado pela enzima viral transcriptase reversa, que transforma a fita simples de RNA viral em uma fita simples de DNA, posteriormente convertida em uma fita dupla. A fita dupla de DNA pró-viral é transportada até o núcleo celular e inserida ao DNA da célula hospedeira através da enzima viral integrase (Figura 1). O DNA pró-viral é convertido em RNA mensageiro e RNA genômico pela ação da enzima humana RNA polimerase. O RNA mensageiro é traduzido gerando uma cadeia polipeptídica de alta massa molecular, que sofre um processo de clivagem pela enzima viral denominada protease levando a formação de proteínas menores e funcionais (DEEKS *et al.*, 2015). Com a formação das proteínas essenciais e do RNA genômico viral, a formação da membrana lipídica do vírus (envelope) ocorre na superfície da membrana da célula hospedeira. Com isso, novos vírions são formados e liberados da célula através de brotamento (DEEKS *et al.*, 2015) e a infecção pelo vírus se sustenta até uma possível intervenção terapêutica futura.

Figura 1. Ciclo viral e tratamento com terapia antirretroviral (TARV).



Fonte: autoria própria.

Até o presente momento não há cura para os indivíduos infectados pelo vírus. A TARV é capaz de inibir diferentes etapas do ciclo de vida do vírus impedindo a propagação da infecção, mas não apresenta capacidade de eliminar o vírus. O tratamento medicamentoso é altamente eficaz uma vez que seja realizado de maneira interrupta, ao longo de toda a vida do paciente (DEEKS *et al.*, 2015; DAVEY *et al.*, 1999).

Com a comprovação da eficácia no tratamento do HIV-1 pela zidovudina (AZT) (FISCHL *et al.*, 1987), um potente inibidor de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo, outros antirretrovirais foram desenvolvidos. Até o presente momento é estimado cerca de trinta tipos de fármacos aprovados que atuam em diferentes etapas do ciclo de vida do vírus (ZHAN, 2016; DEEKS *et al.*, 2015). Os inibidores de transcriptase reversa atuam bloqueando a etapa de transcriptase reversa do vírus e impedindo a síntese de DNA viral, sendo constituídos por duas classes: os análogos de nucleosídeo, como tenofovir e lamivudina e não-nucleosídicos como nevirapina e rilpivirina (DEEKS *et al.*, 2015). Os não-nucleosídicos inibem a enzima transcriptase reversa, enquanto os nucleosídicos são incorporados ao genoma do vírus e bloqueiam a síntese de DNA viral (DEEKS *et al.*, 2015). Apesar da grande importância do AZT para o desenvolvimento de novos inibidores de transcriptase reversa, seu uso foi

associado a diferentes e severas complicações como anemia, esteatose hepática e lipoatrofia, não sendo mais utilizado para o tratamento de HIV (DEEKS *et al.*, 2015).

Os inibidores de fusão impedem a entrada do vírus na célula hospedeira, tendo como exemplo o fármaco maraviroc que atua interagindo com o receptor CCR5 evitando o processo de fusão por vírus que reconhecem esse co-receptor (DEEKS *et al.*, 2015). Os inibidores de integrase impedem que o genoma do vírus integre o DNA da célula hospedeira, como os fármacos dolutegravir, raltegravir e eltegravir (DEEKS *et al.*, 2015). Os inibidores de protease bloqueiam a etapa final do ciclo de vida do vírus impedindo a formação de proteínas essenciais para os novos vírions, como os fármacos darunavir e atazanavir (DEEKS *et al.*, 2015).

A TARV utiliza um esquema terapêutico combinado (em inglês highly active antiretroviral combination therapy – HAART), geralmente consistindo na associação de dois inibidores de transcriptase reversa e um inibidor de protease ou dois inibidores de transcriptase reversa e um inibidor de integrase (DEEKS *et al.*, 2015; CIHLAR; FORDYCE, 2016; YENI, 2006). A associação de fármacos é potente frente a infecção por HIV e permite uma melhor recuperação do sistema imune (DEEKS *et al.*, 2015; YENI, 2006). A TARV leva à supressão do vírus e reduz sua quantidade no plasma abaixo do limite de detecção, mas a interrupção do tratamento leva ao ressurgimento da replicação viral detectável, uma vez que esses fármacos não afetam o reservatório latente de HIV que persiste em algumas células (DEEKS *et al.*, 2012; SILICIANO *et al.*, 2003). Além disso, as implicações resultantes do uso prolongado desses medicamentos, como o surgimento de cepas de HIV resistentes aos fármacos disponíveis e os efeitos adversos provocados nos pacientes (ZHAN *et al.*, 2016), reforçam a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias mais efetivas e duradouras contra o vírus.

1.3 Reservatório latente de HIV e a estratégia de “kick-and-kill”

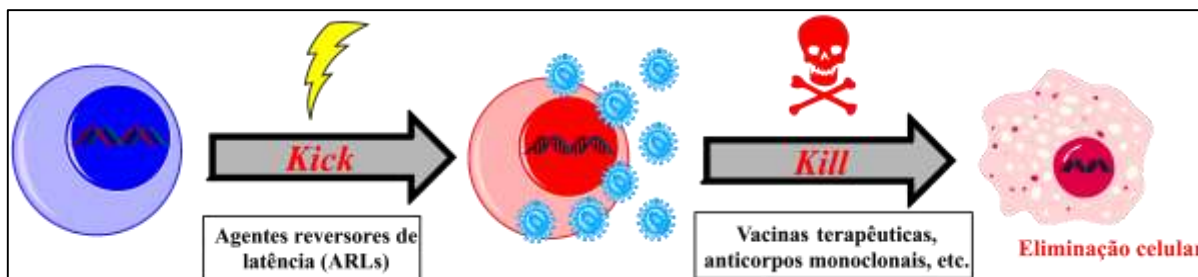
Células T CD4+ ativadas infectadas pelo vírus HIV sofrem processos apoptóticos associados aos efeitos citopáticos do HIV. Dessa forma, a maioria dessas células acabam sendo eliminadas no decorrer da infecção. Mas, uma pequena quantidade de células T CD4+ infectadas que não foram eliminadas se reverterem a um estado desativado persistindo como células de memória, um mecanismo natural pelo

qual os linfócitos T ativados passam (DEEKS, 2012; SILICIANO, 2011). As células T CD4+ de memória carregam o genoma do vírus integrado e contribuem com o estado de latência do HIV, uma vez que o vírus latente não consegue expressar suas proteínas virais e permanece transcricionalmente silenciado (DEEKS, 2012; SILICIANO, 2011). Desta forma, o HIV latente se encontra invisível frente ao sistema imune e nenhuma abordagem terapêutica disponível comercialmente é capaz de reconhecer e eliminar seletivamente células que abrigam o vírus latente (SILICIANO, 2011). Uma vez que o reservatório latente foi estabelecido, essas células podem tornar-se uma nova fonte de infecção viral caso o paciente pare de fazer o tratamento com os medicamentos antirretrovirais. Além disso, células T CD4+ de memória podem perdurar como células de longa duração ou expandirem-se através de mecanismos homeostáticos (DEEKS *et al.*, 2012; FINZI *et al.*, 1999), levando a uma taxa de decaimento muito lenta, estimando-se que sejam necessários mais de 60 anos de tratamento com antirretrovirais para que as células do reservatório sejam erradicadas naturalmente (FINZI *et al.*, 1999; SILICIANO, 2003). Dessa forma, o reservatório latente é estabelecido mesmo em pacientes que fazem tratamento contínuo com a TARV (FINZI *et al.*, 1997) sendo, portanto, a principal barreira para promover a total eliminação do vírus e erradicar a infecção (SILICIANO, 2011).

A latência do vírus HIV é mantida através da contribuição individual de complexos mecanismos, sendo o mais bem compreendidos: a) interferência e/ou repressão transcricional, b) silenciamento epigenético e c) níveis insuficientes de fatores de transcrição (CARY *et al.*, 2016; SILICIANO, 2011). Compostos capazes de interferir nos mecanismos de manutenção da latência de HIV podem levar a reativação do vírus nessas células, fazendo com que o estado de latência seja rompido. Novas estratégias que visam a erradicação do vírus HIV têm como objetivo o esgotamento do reservatório latente nas células, como a estratégia denominada “*kick-and-kill*” ou “*shock-and-kill*”. Nessa abordagem, compostos chamados de Agentes Reversores de Latência (ARLs), são capazes de reativar o vírus do estado latente e promover a replicação viral. Uma vez reativado, o vírus se torna um alvo potencial de reconhecimento e eliminação. Com a reativação total do reservatório, a segunda etapa da estratégia, “*kill*”, objetiva a eliminação das células ou por efeitos citopáticos causados pelo HIV, ou através da ativação do sistema imunológico do indivíduo ou pelo uso de abordagens como anticorpos monoclonais e/ou vacinas terapêuticas

(DEEKS, 2012; CILLO; MELLORS, 2016; KIM *et al.*, 2018). O uso contínuo da TARV em combinação com a abordagem de “kick-and-kill” impede que as células saudáveis do paciente sejam infectadas com o HIV reativado.

Figura 2. Representação da estratégia “kick-and-kill”. Na ilustração, o vírus HIV-1 latente é reativado por agentes reversores de latência. As células reativadas são destruídas: a) pelo próprio sistema imune do paciente; b) pela TARV para eliminação da forma livre, ou; c) por ação citotóxica da infecção; d) por ação de abordagens como vacinas terapêuticas, anticorpos neutralizantes, entre outros.



Fonte: autoria própria.

A combinação de agentes citotóxicos, atuando especificamente como “kill agents”, na presença de agentes reversores de latência potentes pode ser uma melhor estratégia para a eliminação do reservatório latente, uma vez que para a abordagem ser eficiente, não apenas a reativação dos reservatórios deve ser levada em consideração, mas também, a depleção total dessas células que agora possuem o vírus reativado (THORLUND, 2017).

Diferentes compostos com capacidade de reativar o HIV latente já foram relatados na literatura, sendo as classes de compostos mais bem estabelecidas os: inibidores de histona deacetilase (HDACi), inibidores de bromodomínio (BRDi) e agonistas de proteína quinase C (PKC) (XING; SILICIANO, 2013).

1.4 Inibidores de histona deacetilase (HDACi) como ARLs

Um dos mecanismos responsáveis pela manutenção da latência do HIV está envolvido com modificações epigenéticas na cromatina. A unidade básica da cromatina, as histonas, podem sofrer processos de remodelamento através de diferentes proteínas como: a) “escritoras”, capazes de realizar modificações covalentes nas histonas; b) “apagadoras”, responsáveis por removerem as modificações covalentes realizadas pelos “escritores”; e c) “leitoras”, proteínas

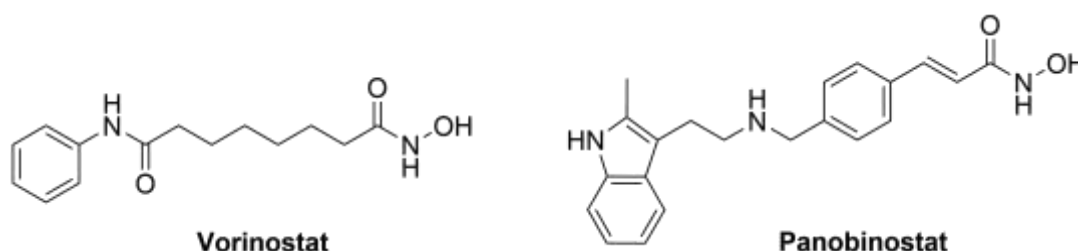
capazes de reconhecer as histonas, sem causar nenhuma modificação em sua estrutura (CARLINO; RASTELLI, 2016). As histonas deacetilases (HDAC), caracterizadas como “apagadoras”, são enzimas que atuam através da remoção do grupo acetil dos resíduos de lisina acetilados na cauda das histonas. As HDAC estão divididas em grupos baseados em sua homologia, e são classificados em: classe I (HDAC 1, 2, 3 e 8), classe II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 e 10), classe III (SIRT1-7) e classe IV (HDAC 11). Estas classes se diferem essencialmente por apresentarem zinco-dependência (HDAC de classe 1, 2 e 4) ou NAD-dependência (HDAC de classe III) (ANNEMIEKE *et al.*, 2003). A hiperacetilação das histonas é relatada como sendo um fator fundamental para a reativação do HIV latente, uma vez que a presença das HDACs contribui para a repressão transcricional. Com a inibição das HDAC, as histonas acetiltransferases (HATs) responsáveis por acetilar resíduos de lisinas específicos nas histonas promovem um estado relaxado da cromatina e levam a ativação da transcrição do HIV latente, permitindo sua reativação (VAN LINT *et al.*, 1996; XING, SILICIANO, 2013).

Diferentes estudos foram realizados com o objetivo de investigar a capacidade de inibidores de HDAC em reativar o vírus HIV latente em modelos celulares de latência e células T CD4+ isoladas de pacientes infectados por HIV e em tratamento contínuo com a TARV (XING, SILICIANO, 2013). Vorinostat e panobinostat, dois HDACi comercialmente disponíveis para o tratamento de tipos linhagens de câncer, foram estudados *in vivo* para avaliação da capacidade de reativação do HIV latente em pacientes infectados. Archin e colaboradores (2017), demonstraram a capacidade do vorinostat (Figura 3), um inibidor de HDAC classe I, II e IV, em induzir a expressão de RNA viral quando testado em células T CD4+ latentes de pacientes com HIV. Durante o estudo, 16 participantes foram selecionados para a etapa de estudo *ex vivo* e posteriormente 12 participantes do grupo original foram selecionados para o estudo clínico, inicialmente recebendo uma dose única de vorinostat (400mg). Nos estudos posteriores, os participantes selecionados foram submetidos a duas doses de vorinostat em intervalos de tempo de 48 ou 72 horas e ao final do estudo foram submetidos a 10 doses de vorinostat em intervalos de 72 horas. Apesar dos resultados positivos quanto a reversão da latência do vírus HIV-1 na maioria dos pacientes, os autores não relataram a eliminação de células do reservatório latente sugerindo que

estratégias adicionais de “kill” podem ser necessárias para a depleção de HIV latente. (ARCHIN *et al.*, 2017).

Panobinostat (Figura 3), um inibidor não seletivo de HDAC, foi testado em 15 pacientes sem a interrupção da terapia antirretroviral (RASMUSSEN *et al.*, 2014). Após 8 semanas de tratamento, os pesquisadores demonstraram um aumento na transcrição do HIV e detecção de RNA-HIV no plasma, confirmando a eficácia do composto em ativar o vírus latente. A eliminação de células do reservatório latente também não foi relatada nesse estudo, sugerindo que apenas a reativação do vírus não foi suficiente para provocar sua morte por reconhecimento imune de células CD8. Os pesquisadores ainda sugerem que uma reativação mais potente do vírus latente poderia, possivelmente, auxiliar em uma melhor resposta imunológica para eliminação do reservatório latente (RASMUSSEN *et al.*, 2014).

Figura 3. Vorinostat e panobinostat inibidores não seletivos de HDAC testados *in vivo* frente a estratégia de “kick-and-kill”



Archin e colaboradores (2009) investigaram a capacidade de inibidores seletivos de HDAC em reativar o HIV latente em modelos celulares de latência e em células T CD4⁺ isoladas de pacientes infectados por HIV. Os inibidores de HDAC classe I, especificamente, HDACs 1, 2, e 3 são capazes de induzir a reativação da latência de maneira eficiente quando comparados aos inibidores de HDAC classe II (ARCHIN *et al.*, 2009). A contribuição isolada de HDAC 1, 2 e 3 na regulação da transcrição de HIV foi estudada em modelos celulares de latência (BARTON *et al.*, 2014; KEEDY *et al.*, 2009). Inibidores seletivos de HDAC 1 e 2 demonstraram uma fraca capacidade em induzir a expressão de HIV latente, enquanto a combinação de inibidores de HDAC 2 e 3 favorecem uma potente reativação dos reservatórios (BARTON *et al.*, 2014; KEEDY *et al.*, 2009). A importância da definição de um alvo terapêutico na estratégia de “kick-and-kill” é de grande relevância, uma vez que uma inibição não seletiva das enzimas HDACs pode acarretar em citotoxicidade para a

célula hospedeira e efeitos adversos para o paciente (KEEDY *et al.*, 2009), o que justifica a importância do estudo de potentes inibidores de HDAC classe I com maior seletividade para HDAC 2 e 3, para aplicação como novos ARL.

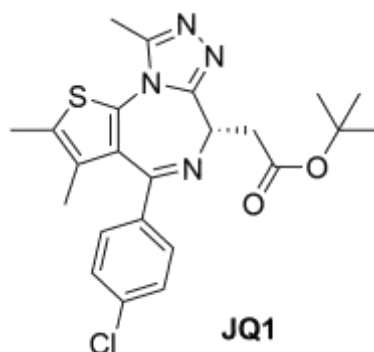
1.5 Inibidores de bromodomínios como ARL

Bromodomínios são uma família de domínios proteicos identificados no gene *brahma* de *Drosophila melanogaster*, sendo agrupados dentro de oito famílias contendo 61 bromodomínios de 46 proteínas diferentes. Proteínas que contêm bromodomínios são capazes de reconhecer resíduos *N*-acetilados de lisina, como os presentes nas caudas das histonas, atuando no remodelamento e no controle transcricional da cromatina; e possuem relação com o desenvolvimento de diferentes doenças como câncer, inflamações e infecções virais (FILLIPAKOPOULOS; KNAPP, 2014). O bromodomínio 4 (BRD4) pertence à família de bromodomínios extra-terminais (BET), composta por BRD2, BRD3, BRD4 e BRDT, e atua recrutando um fator de alongamento positivo, do inglês “*positive transcriptional elongation factor complex*” (PTEF-b), responsável por promover a regulação do processo de transcrição pela RNA Polimerase II (RNA Pol II) (LIU *et al.*, 2017). A presença de BRD4 está diretamente relacionada com a manutenção da latência do vírus HIV, uma vez que BRD4 compete com a proteína viral Tat pela ligação com o P-TEFb. A interação BRD4-P-TEFb resulta na repressão da transativação mediada por Tat. A proteína Tat é responsável por recrutar um complexo de super alongamento (SEC) para estimular a RNA polimerase II e gerar a produção de transcritos completos de HIV. P-TEFb e ELL2 são os dois fatores de alongamento presentes no SEC, que atuam por mecanismos diferentes. A interação de BRD4 com P-TEFb é necessária para a expressão de vários genes celulares e bloqueia de forma competitiva a interação Tat-SEC, impedindo a reativação da latência do vírus (YANG *et al.*, 2005); LI *et al.*, 2013). Inibidores de BRD4 podem atuar como agentes reversores de latência uma vez que favorecem a interação Tat-P-TEFb, contribuindo com a reativação do vírus latente.

Pesquisas iniciais (BANERJEE *et al.*, 2012; BOEHM *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013) demonstram o potencial de inibidores de BRD4 em induzir a expressão de HIV latente, como em estudos envolvendo o uso do composto JQ1 (Figura 4), um inibidor de BET, que apresentou resultados positivos quanto a capacidade em induzir o vírus latente

em modelos de células T primárias latentes. (BANERJEE *et al.*, 2012; BOEHM *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013).

Figura 4. JQ1, um inibidor de bromdomínios extra-terminais avaliado em modelos celulares frente a estratégia de “kick-and-kill”.



Fonte: autoria própria.

1.6 Efeitos sinérgicos entre ARLs

A combinação de classes diferentes de ARL é uma estratégia explorada em alguns estudos com o objetivo de alcançar efeitos sinérgicos entre compostos que atuam por mecanismo distintos na reativação da latência, contribuindo para potencializar sua ação e apresentando uma maior capacidade de reativação do vírus HIV. Combinações entre agonistas de PKC e JQ1 ou inibidores de HDAC são relatadas na literatura e sua atuação conjunta apresenta sinergia, exibindo um maior aumento na capacidade de reativação do vírus latente do que quando os compostos foram testados separadamente *ex vivo* (LAIRD *et al.*, 2015). Sabendo da importância do planejamento de novos ARL potentes, utilizou-se da proposta de sinergia entre classes de reversores de latência para desenvolver moléculas híbridas, inibidoras duais de HDAC e BRD4.

A hibridação é um processo de modificação molecular caracterizado pela conjugação de características estruturais definidas entre dois compostos bioativos distintos em uma única molécula. Essa estratégia tem sido empregada para obtenção de diversos fármacos disponíveis no mercado e mostra-se atraente e promissora para identificação de novos protótipos (MORPHY; RANKOVIC, 2005; MORPHY; RANKOVIC, 2009). O desenho estrutural, baseado no mecanismo de ação, deve

assegurar à mesma molécula planejada o reconhecimento molecular por dois ou mais alvos terapêuticos, simultaneamente, aumentando a eficiência terapêutica. Uma das vantagens da hibridação molecular, comparada a administração concomitante dos fármacos, é que os compostos híbridos gerados não apresentam as diferenças farmacocinéticas da administração individual, tampouco desencadeiam interações medicamentosas provenientes da associação. Outra vantagem, é que o uso de um único composto minimiza o número de fármacos já utilizados pelo paciente, aspecto extremamente relevante ao paciente vivendo com HIV, já que este se encontra polimedicado e está mais sujeito a interações medicamentosas, reações adversas a medicamentos e a falta de adesão à terapia (BRASIL, 2019).

Considerando a possibilidade de atuação em duas vias distintas de reativação do vírus latente, estruturas duais frente a inibição de HDAC classe I e BRD-4 foram planejadas para posterior síntese e avaliação da capacidade de inibição e reversão de latência em ensaios de avaliação farmacológica.

1.7 Planejamento estrutural dos compostos

Inibidores de Bromodomínio

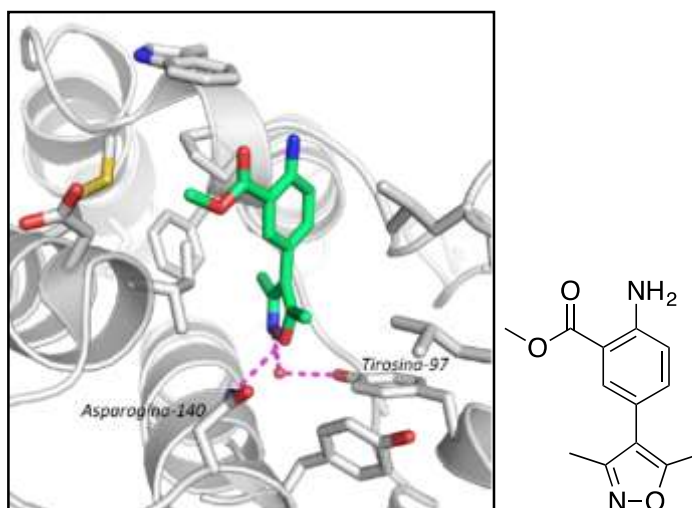
Para o planejamento da série de compostos a serem sintetizados, foi avaliado as possibilidades estruturais que levariam a melhor interação com os alvos desejados: HDAC classe I (HDAC-2 e HDAC-3) e BRD4.

Nos inibidores de BRD4 descritos na literatura, é comum observar subunidades capazes de reconhecer resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima a exemplo da asparagina-140 (ASP-140) e tirosina-97 (TYR-97). Ainda no sítio ativo, também é possível observar moléculas de água conservadas que contribuem com a formação de ligação hidrogênio em seu interior (LIU *et al.*, 2017; HEWINGS *et al.*, 2011).

Derivados contendo a subunidade 3,5-dimetil-isoxazol foram explorados como inibidores de BET em estudos prévios na literatura (HEWINGS *et al.*, 2011). Estudos de triagem virtual realizados em nosso grupo de pesquisa com a colaboração do grupo de Química Medicinal da Universidade de Minnesota levaram a identificação do derivado isoxazólico como padrão estrutural promissor na inibição de BRD4 (resultados não publicados). O derivado foi sintetizado e posteriormente cristalizado

com o BRD-4. Assim, o complexo deste derivado com BRD-4 obtido por cristalografia de raios-X mostrou que a subunidade isoxazol é capaz de realizar ligação de hidrogênio com a asparagina-140 e tirosina-97 (). Posteriormente, a interação com BRD-4 foi avaliada por Fluorimetria de Varredura Diferencial (do inglês: *Differential Scanning Fluorimetry* - DSF) e calorimetria de titulação isotérmica (ITC). No ensaio de DSF, o derivado isoxazólico foi testado na concentração de 20 μM contra os domínios 1 e 2 presentes nos bromodomínios 3 e 4. Os valores de ΔT_m encontrados foram: 0.8; 0.4; 0.9 e 1.4 para BRD-3(D1), BRD-4(D1), BRD-3(D2) e BRD-4(D2), respectivamente. A constante de dissociação em BRD-4(D1) foi determinada por ITC e mostrou valores de 2.1 μM . A pose obtida apresentou excelente correlação com os dados computacionais apresentando valores de RMSD inferiores a 0,6, validando o modelo computacional. Esses resultados preliminares mostraram que o derivado isoxazólico é um protótipo promissor para o desenvolvimento de novos inibidores de BRD4.

Figura 5. Modo de ligação do composto isoxazólico em BRD4 obtido por cristalografia de raios-X, (resolução de 1,4 Å; Resultados não publicados).



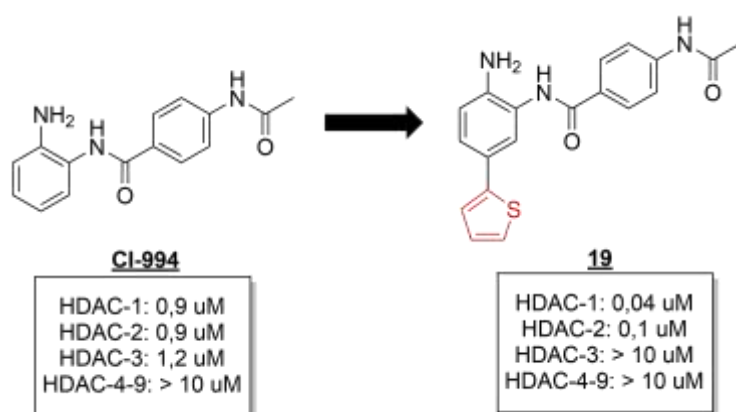
Fonte: autoria própria.

Inibidores de HDAC

Quanto à inibição seletiva de HDAC classe I, do ponto de vista estrutural a classe das o-amino-benzamidas são relatadas como estruturas privilegiadas capazes de interagir com o átomo de zinco (Zn^{2+}) presente no sítio ativo das HDAC-1, 2 e 3 (WAGNER *et al.*, 2013). No estudo de Moradei e colaboradores (2007), os autores

otimizaram a estrutura de um inibidor de HDAC classe I (HDAC-1, 2 e 3), CI-994 (HOLSON; WAGNER; STAHL; 2013) produzindo o composto **19** que contém um substituinte tiofeno na posição *para* em relação ao grupo amino da subunidade 2-amino-benzamida (Figura 6), conferindo assim, maior seletividade para HDAC-1 e 2. A presença do tiofeno permite a ocupação de uma cavidade adicional de 14 Å presente nestas duas isoformas, o que confere seletividade à HDAC -1 e -2 (MORADEI *et al.*, 2007).

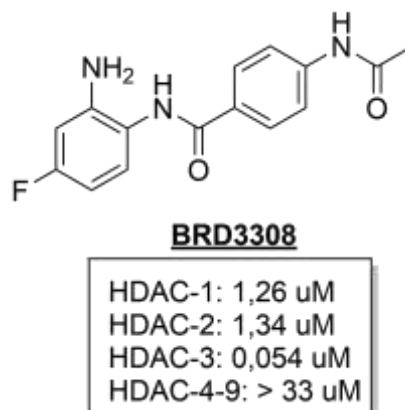
Figura 6. Otimização do composto CI-994 para obtenção de um inibidor seletivo HDAC-1 e HDAC-2. Os valores de IC_{50} obtidos frente a inibição de HDAC são apresentados no quadro em destaque.



Fonte: Autoria própria (Adaptado de MORADEI *et al.*, 2007).

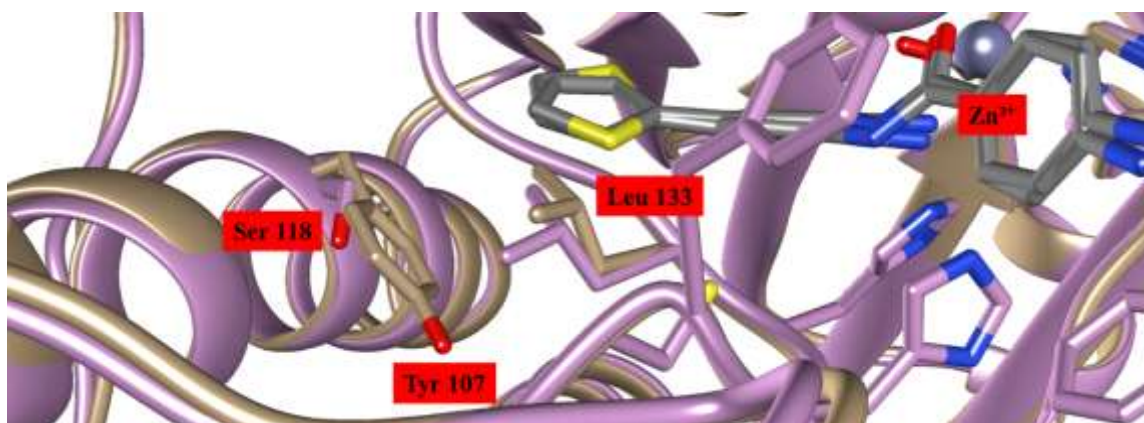
Para a inibição seletiva de HDAC-3, estudos demonstram que substituições por grupos volumosos na posição *p*-amino dificultam uma interação favorável com o sítio da enzima. As HDACs 1, 2 e 3 apresentam 95% de similaridade no sítio ativo, sendo a principal diferença a presença de uma tirosina-107 na HDAC-3 enquanto as HDACs 1 e 2 apresentam uma serina-118 (WAGNER *et al.*, 2015; CAO, ZWINDERMAN, DEKKER, 2018). Essa mudança modifica a cavidade interna de HDAC-3 por impedimento estérico entre os resíduos de aminoácidos, o que faz com que inibidores seletivos de HDAC-3 se limitem a conter em sua estrutura átomos pequenos, como hidrogênio ou flúor nas posições *p*-amino ou *o*-amino (Figura 8) (WAGNER *et al.*, 2015) (CAO, ZWINDERMAN, DEKKER, 2018). Um estudo realizado por Barton e colaboradores (2014) demonstrou a capacidade do composto BRD3308 (Figura 7), um inibidor de HDAC classe I com maior seletividade para HDAC-3, em induzir a expressão de vírus HIV latente em modelos celulares (BARTON *et al.*, 2014).

Figura 7. Estrutura do composto BRD3308 da classe das o-aminoanilidas, um inibidor seletivo de HDAC classe I, com atividade de inibição de HDAC-3.



Fonte: autoria própria.

Figura 8. Sobreposição das estruturas cristalinas de HDAC-2 (roxo) e HDAC-3 (marrom) usando o software Maestro. A mudança de aminoácidos faz com que o sítio ativo de HDAC-3 perca a cavidade de 14 Å presente na HDAC-2 por um efeito de repulsão ocasionado pela Tyr107 e Leu133, tornando o sítio ativo de HDAC-3 mais fechado. Inibidores da classe das o-aminoanilida com grupamentos volumosos na posição p-amino não conseguem ocupar a cavidade de HDAC-3 por uma questão estérica.



Fonte: Autoria própria.

Desta forma, tendo em vista a obtenção de compostos duais a estratégia de hibridação molecular foi empregada combinando fragmentos estruturais capazes de interagir com BRD4 e HDAC classe I, tendo como base inibidores relatados na literatura como a classe das o-amino-benzamidas objetivando explorar uma inibição seletiva para HDAC classe I e a estrutura do 3,5-dimetil-isoxazol para reconhecimento de BRD4.

5. CONCLUSÃO

O planejamento estrutural com o uso da estratégia de modelagem molecular levou a oito compostos, que de acordo com o modelo, foram capazes de interagir com os sítios de HDAC-2 e BRD4.

Dos oito compostos planejados, seis foram sintetizados com rendimentos globais entre 58 a 46%; e dois intermediários sintéticos com rendimentos entre 61 a 72%. A caracterização estrutural realizada por meio de RMN uni e bidimensional e espectroscopia de infravermelho, sugere a obtenção das moléculas.

As avaliações enzimáticas demonstraram que os compostos da série isoxazol apresentaram as maiores inibições frente a BRD4 quando comparado com a série acetamida. Os compostos **(12)** e **(25)** também demonstraram que o grupo 3,5-dimetil-isoxazol não é capaz de ocupar a cavidade de HDAC-1, 2 e 3 por apresentar porcentagem de inibição de 8, 10, 3%; e 2, 5, 0%, respectivamente para essas enzimas. Esses compostos também apresentaram a maior porcentagem de inibição frente BRD4 (25%), indicando que a posição em que o anel 3,5-dimetil-isoxazol foi substituído na molécula foi a mais favorecida em relação ao reconhecimento do sítio de BRD4.

Os compostos **(20)** e **(23)** obtiveram resultados potenciais quanto sua capacidade de inibir HDAC-1, 2 e 3 e BRD4, sendo o composto **(23)** mais seletivo para HDAC- 1 e 2 com porcentagem de inibição de 92 e 88% respectivamente. O composto **(20)** foi capaz de inibir HDAC-1,2 e 3 com porcentagem de inibição de 75, 72 e 57% respectivamente. Os compostos também apresentaram porcentagem de inibição de 21 e 17% frente BRD4.

Os intermediários **(14)** e **(26)** não apresentaram bons resultados de inibição frente aos alvos HDAC -1,2,3 e BRD4, indicando que o grupo nitro nas estruturas não é adequado para gerar as interações necessárias no sítio dessas enzima e proteína.

Com os resultados da avaliação enzimática, de maneira geral, destaca-se que os compostos **(20)** e **(23)** são protótipos adequados para otimização estrutural visando um aumento na porcentagem de inibição frente aos alvos definidos e futuramente serem avaliadas quanto sua capacidade em atuar como agentes reversores de latência para HIV.

6. REFERÊNCIAS

- ARCHIN, N. M. *et al.*, Expression of latent human immunodeficiency type 1 is induced by novel and selective histone deacetylase inhibitors. **AIDS**, v. 23, n. 14, p. 1799-1806, 2009.
- ARCHIN, N. M. *et al.*, Interval dosing with the HDAC inhibitor vorinostat effectively reverses HIV latency. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 8, p. 3126-3135, 2017.
- BANERJEE, C. *et al.*, BET bromodomain inhibition as a novel strategy for reactivation of HIV-1. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, p. 1147-1154, 2012.
- BARREIRO, E. J. *et al.*, Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v. 20, n. 1, 1997
- BARTON, K. M. *et al.*, Selective HDAC Inhibition for the Disruption of Latent HIV-1 Infection. **PLOS One**. v. 9, n. 8, 2014.
- BOEHM, D. *et al.*, BET bromodomain-targeting compounds reactivate HIV from latency via a Tat-independent mechanism. **Cell Cycle**, v. 12, n. 3, p. 452-462, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais**. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/gestores/painel-de-indicadores-epidemiologicos>. Acesso em: 10 jan. 2019
- CAO, F.; ZWINDERMAN, M. R. H.; DEKKER, F. J. The process and strategy for developing selective histone deacetylase 3 inhibitors. **Molecules**, v. 23, n. 551, 2018.
- CARY, D. C.; FUJINAGA, K.; PETERLIN, M. Molecular mechanisms of HIV latency. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 126, n. 2, p. 448-454, 2016.
- CARLINO, L.; RASTELLI, G.; Dual kinase-bromodomain inhibitors in anticancer drug discovery: a structural and pharmacological perspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, n. 59, p. 9305-9320, 2016.
- CIHLAR, T.; FORDYCE, M. Current status and prospects of HIV treatment. **Current Opinion in Virology**, v.18; p. 50-56, 2016.
- CILLO, A. R.; MELLORS, J. W.; Which therapeutic strategy will achieve a cure for HIV-1? **Current Opinion in Virology**, v. 18, p. 14-19, 2016.
- DAVEY JR, R. T. *et al.*, HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 26, p. 15109-15114, 1999.

DOUEK, D. C. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. **Nature**. v. 417, p. 95-98, 2002.

DEEKS, S. G. *et al.*, Towards an HIV cure: a global scientific strategy. **Nature Reviews Immunology**. v. 12, n.8, p. 607-614, 2012.

DEEKS, S. G. *et al.*, HIV infection. **Nature Reviews**, v. 1, n. 15035, 2015.

FISCHL, M. A. *et al.*, The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. **New England Journal of Medicine**. v. 317, n. 4, 1987.

FINZI, D. *et al.*, Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. **Science**, v. 278, p. 1295-1300, 1997.

FINZI, D. *et al.*, Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. **Nature Medicine**. n. 5, p. 512-517, 1999.

FRIESNER, R. A. *et al.*, Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. **The Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 6177-6196, 2006

GAO, S. *et al.*, Design, synthesis and anti-tumor activity study of novel histone deacetylase inhibitors containing isatin-based caps and o-phenylenediamine-based zinc binding groups. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, cap. 12, v. 25, p. 2981-2994, 2017.

HEWINGS, D. S. 3,5-Dimethylisoxazoles act as acetyl-lysine-mimetic bromodomain ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 6761-6770, 2011.

HOLSON, E.; WAGNER, F. F.; STAHL, G. P. **Solid forms of tacedinaline**. Broad Institute, Inc. Cambridge, MA (US). no.US8691875B2. Depósito: 15 Set. 2012. Concessão: 25 Abr. 2013.

KEEDY, K. S. *et al.*, A limited group of class I histone deacetylases acts to repress human immunodeficiency virus type 1 expression. **Journal of Virology**. v. 83, n. 10, p. 4749-4756, 2009.

LAUFFER, B. E. *et al.*, Histone deacetylase (HDAC) inhibitor kinetic rate constants correlate with cellular histone acetylation but not transcription and cell viability. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 26926-26943, 2013.

LI, Z. *et al.*, The BET bromodomain inhibitor JQ1 activates HIV latency through antagonizing BRD4 inhibition of Tat-transactivation. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 277-287, 2013.

LIU, Z. *et al.*, **Drug discovery targeting bromodomain-containing protein 4**. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 60, p. 4533-4558, 2017.

MCKEOWN, M. R. *et al.*, Biased multicomponent reactions to develop novel bromodomain inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 9019-9027, 2014.

MORADEI, O. M. *et al.*, Novel aminophenyl benzamide-type histone deacetylase inhibitors with enhanced potency and selectivity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 5543-5546, 2007.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 21, p. 6523-6543, 2005

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands – medicinal chemistry strategies and challenges. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 6, p. 587-600, 2009.

MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, p. 10827-10852, 2005.

RASMUSSEN, T. A. *et al.*, Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. **Lancet HIV**, v. 1, p.13-21, 2014.

SANT'ANNA, C. M. R.; Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2009.

Secretaria da Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde - Brasil. Boletim epidemiológico. HIV AIDS 2018. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-hivaids-2018>. Acesso em: 6 de nov. 2019.

SILICIANO, J. D. *et al.*, Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 727-728, 2003.

SILICIANO, R. F.; GREENE, W. C. HIV Latency. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v. 1, n. 1, 2011.

Schrödinger, **LigPrep**, New York, 2017

Schrödinger, **Maestro**, New York; 2017

Schrödinger, **Glide**, New York, 2017

MIYAURA, N.; SUZUKI, Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. **American Chemical Society**, v. 95, p. 2457-2483, 1995.

THORLUND, K. *et al.*, Landscape review of current HIV 'kick-and-kill' cure research – some kicking, not enough killing. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 595, 2017.

THOMAS, M. *et al.*, Synthesis and biological evaluation of glucuronide prodrugs of the histone deacetylase inhibitor CI-994 for application in selective cancer chemotherapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 8109-8116, 2008.

UNAIDS. Fact sheet – Latest global and regional statistics on the status of the AIDS epidemic. Disponível em: <http://www.unaids.org/en/resources/documents/2018/UNAIDS_FactSheet>. Acesso em: 6 nov. 2019

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

VAN LINT, C. *et al.*, Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 5, p. 1112-1120, 1996.

YANG, Z. *et al.*, Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. **Molecular Cell**, v. 19, n. 4, p. 535-545, 2005.

YENI, P. Update on HAART in HIV. **Journal of Hepatology**, v. 44, p. 100-103, 2006.

YUSUF, D. *et al.*, An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, p. 1411-422.

XING, S.; SILICIANO, R. F.; Targeting HIV latency: pharmacologic strategies toward eradication, **Drug Discovery Today**, v. 18, p. 541-551, 2003.

WATSON, P. J.; FAIRALL, L.; SANTOS, G. M.; SCHWABE, J. W. Structure of HDAC3 bound to co-repressor and inositol tetrakisphosphate. **Nature**, v. 481, p. 335-340, 2012.

WAGNER, F. F. *et al.*, An isochemogenic set of inhibitors to define the therapeutic potential of histone deacetylases in β -cell protection. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 2, p. 363-374, 2015.

WAGNER, F. F.; WEIWER, M.; LEWIS, M. C.; HOLSON, E. B. Small molecule inhibitors of zinc-dependent histone deacetylases. **Neurotherapeutics**, v. 10, p. 589-604, 2013.

ZHAN, P. *et al.*, Anti-HIV drug discovery and development: current innovations and future trends. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 2849-287