

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 24/07/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA
DE NOVOS DERIVADOS FTALIMÍDICOS INIBIDORES DE
HISTONA DEACETILASE PARA ANEMIA FALCIFORME

ALINE RENATA PAVAN

ORIENTADOR: Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS

ARARAQUARA – SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos
derivados ftalimídicos inibidores de histona deacetilase para anemia
falciforme

ALINE RENATA PAVAN

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e
Medicamentos, para obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS

ARARAQUARA – SP

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P338p

Pavan, Aline Renata
Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos derivados
ftalimídicos inibidores de histona deacetilase para anemia falciforme / Aline Renata
Pavan. – Araraquara, 2018
XII + 133 f. : il.

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

Orientador: Jean Leandro dos Santos.

1. Anemia falciforme. 2. Histona deacetilase. 3. Hemoglobina fetal. I. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

ALINE RENATA PAVAN

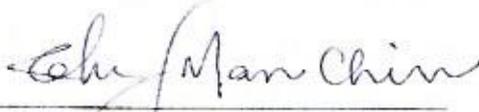
PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS DERIVADOS
FTALIMÍDICOS INIBIDORES DE HISTONA DEACETILASE PARA ANEMIA FALCIFORME

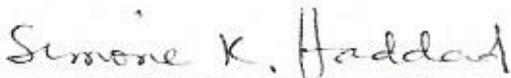
Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP,
Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título
de Mestre (a) em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 24 de julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA


JEAN LEANDRO DOS SANTOS
Orientador


CHUNG MAN CHIN
Titular


SIMONE KASHIMA HADDAD
Titular

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Nadir e Nelson, que sempre me acompanharam em todas as minhas jornadas e sonhos. Que desde o início lutaram incansavelmente pelo bem estar dos filhos, e para que estes conseguissem crescer, estudar e ter a oportunidade que eles, meus pais, não tiveram. Sem a bravura e coragem deles nada seria possível. E sem o apoio e amor incondicional eu não teria chegado até aqui. Palavras nunca serão suficientes para agradecer por tudo isso, mas espero um dia conseguir demonstrar que toda luta valeu à pena e que sempre estejam orgulhosos de tudo que conquistaremos juntos.

Aos meus irmãos, Paulo e Fernando, pelo apoio incondicional, conselhos e conversas que fizeram muita diferença em todo meu caminho. Eu tive de vocês o carinho de um amigo, o amor de irmão, os conselhos e puxões de orelha de pessoas que se importam. Vocês foram meu suporte nos momentos que mais precisei. Encontrei em vocês o apoio e amor incondicional sem o qual eu não teria conseguido seguir em frente sozinha. Vocês foram mais que irmãos, e dizer apenas 'obrigada' seria muito pouco.

Aos meus sobrinhos, Gabriel e Valentina, que me apresentaram o amor incondicional de tia. Aprendi que é possível amar alguém de forma inexplicável e sem tamanho. É possível ter o instinto de proteção de mãe e a vontade de mimar de vó. A alegria que vocês me trazem é um dos suportes que me fazem querer ser melhor e ajudá-los a serem melhores e crescerem fortes. Ser madrinha de vocês é uma honra e uma responsabilidade que carrego com muito orgulho.

Aos amigos e companheiros de laboratório: Thais, Daniela, Rafael (Mobília), Diego (Chibinha s2), Gabriel, Beatriz, Gabriela, Guilherme (Gui), Marcella, Karina, Juliana (Ju), Luiz, Cauê, Johnny, Tânia e Juliana e todos os outros por todos os momentos que passamos juntos dentro e fora da faculdade. Por todas as conversas que resolveram inúmeros problemas sintéticos e pessoais. Por todo apoio e carinho nos momentos difíceis, que todos nós passamos, e que o suporte de vocês foi essencial. Que o futuro nos reserve muito sucesso!

Agradeço especialmente à Giovana, por todo suporte computacional e emocional. Por todas às vezes que me socorreu quando precisei, e por toda paciência que teve com meus surtos em época de entrega de projeto, relatório artigo. Às comemorações quando algo dava certo, ou o ombro amigo pra me consolar quando dava errado. Tudo isso me impulsionou a querer cada vez mais. Me fez querer correr atrás pra conquistar cada vez mais. Obrigado por assistir meus seminários e me ouvir explicando todas as sínteses. Obrigada por me ouvir, mesmo quando não entendia nada do que eu tava falando e, ainda assim, se demonstrar interessada. Obrigada pelo suporte na defesa e por tudo que fez e faz por mim sempre!

Ao meu incrível orientador e incentivador, prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, que confiou em meu trabalho e potencial desde o início, e me deu a oportunidade de realizar este trabalho. Seu exemplo de dedicação e amor pela profissão me incentivam a continuar nessa árdua carreira.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) por todo conhecimento oferecido desde minha graduação.

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho: processos nº 2015/21252-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

A reativação da expressão gênica de gama-globina e consequente produção de hemoglobina fetal (HbF) por mecanismos epigenéticos é uma valiosa intervenção terapêutica na anemia falciforme. Estudos recentes mostram que a inibição da enzima Histona Deacetilase (HDAC), principalmente HDAC-1 e HDAC-2, mostrou ser uma estratégia promissora em promover o aumento da expressão gênica de gama-globina e a produção de HbF sem causar alteração no ciclo e proliferação celular. Neste trabalho foram planejadas por modelagem molecular novos compostos inibidores de HDAC 1 e 2. Os estudos de ancoragem molecular revelaram a forma como estes compostos interagem com a HDAC-2, sendo a subunidade *N*-(2-aminofenil)benzamida responsável por interagir com o átomo de zinco presente no sítio ativo. Durante o processo de otimização das estruturas, os valores de *docking score* passaram de -9,8 para -12,3, indicando melhores interações com o receptor. Onze compostos inéditos foram sintetizados e caracterizados por métodos analíticos. Os estudos enzimáticos mostraram atividade inibitória dos novos compostos variaram de 83 à 96% para HDAC-1, 83 à 94% para HDAC-2 e 82 à 89% para HDAC-3. O composto **(22)** (4-(4-aminofenetil)-*N*-(2-aminofenil)benzamida) foi um dos mais ativos apresentando, na concentração de 10 µM, atividade inibitória contra as HDACs 1 e 2 com valores superiores a 90%. Estes resultados mostram que os compostos planejados neste trabalho são potenciais inibidores de HDAC, sendo a molécula **(22)** a mais promissora da série, podendo constituir uma nova alternativa à hidroxiréia para aumento de HbF.

Palavras chave: anemia falciforme, histona deacetilase, hemoglobina fetal

ABSTRACT

Reactivation of gamma-globin gene expression and fetal hemoglobin (HbF) production through epigenetic mechanisms are valuable strategy to sickle cell anemia treatment. Early studies have demonstrated that histone deacetylase inhibition, especially HDAC-1 and HDAC-2, is a promising strategy to increase gamma-globin gene expression and HbF production without alteration in cell cycle or cell proliferation. At this work it was designed, by molecular modeling, new compounds HDAC 1 and 2 inhibitors. The molecular modeling studies has demonstrated how these compounds interacts with HDAC-2, being the subunit N-(2-aminophenyl)benzamide responsible for interact with the zinc atom of active site. During the optimization process, the docking score values have changed from -9,8 to -12,3, which indicates better interactions with the receptor. It was synthesized and characterized eleven new compounds. Enzymatic assays have demonstrated that the enzymatic inhibition of the compounds varied from 83 to 96% against HDAC 1, 83-94% against HDAC 2 and 82-89% of HDAC 3. Compound (22) (4-(4-aminophenetyl)-N-(2-aminophenyl) benzamide was one of the most promisor among all compounds. At 10uM it was able to inhibit HDAC 1 and 2 more than 90%. These data has demonstrated that the design compounds in this work are potencial inhibitors of HDAC, being molecule (22) the most promisor and useful as an alternative fo HbF induction.

Key-words: sickle cell anemia, histone deacetylase, fetal hemoglobin

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF – Anemia falciforme
DMF - Dimetilformamida
FDA – *Food and Drug Administration*
HAT – Histona acetiltransferase
HbF – Hemoglobina fetal
HDAC – Histona deacetilase
HU – Hidroxiureia
NF- κ B - Fator nuclear- κ B
NO – Óxido nítrico
PGE2 – Prostaglandina E2
ROS – Espécies reativas de oxigênio
THF - Tetrahydrofurano
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de docking score e glide Emodel dos inibidores de HDAC das compostos planejadas.	47
Tabela 2. Resíduos de interação das moléculas do Bloco B.....	51
Tabela 3. Resíduos de interação das moléculas do Bloco C	53
Tabela 4. Fórmula e massa molecular, rendimento e aspecto das moléculas (5), (6), (9), (10) e (13), componentes do Bloco A.....	55
Tabela 5. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos das moléculas (5), (6), (9), (10) e (13) (DMSOd6).....	56
Tabela 6. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos das moléculas (16), (17), (18), (21) e (22) (DMSOd6).....	59
Tabela 7. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos das moléculas (26), (27) e (32) (DMSOd6)	62
Tabela 8. Porcentagem de inibição das moléculas (5), (6), (9), (10) e (13) frente às enzimas HDAC-1, HDAC-2 e HDAC-3.	63
Tabela 9. Porcentagem de inibição das moléculas (18), (21) e (22) frente às enzimas HDAC-1 e HDAC-2	64
Tabela 10. Porcentagem de inibição da molécula (22) frente às enzimas HDAC-3-11.	65
Tabela 11. Porcentagem de inibição das moléculas (26), (27) e (32) frente às enzimas HDAC-1 e HDAC-2.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos inibidores de HDAC: butirato de sódio e fenil butirato.....	13
Figura 2. Eventos relacionados à patofisiologia da anemia falciforme (9).....	16
Figura 3. Síntese de globinas durante a gestação e desenvolvimento do neonato (Adaptado de (25)).....	19
Figura 4. Estrutura química da hidroxiureia.....	21
Figura 5. Estrutura química da glutamina.....	22
Figura 6. Distribuição global de hemoglobinopatias, em termos de nascidos afetados a cada 1000 nascimentos (Adaptado de (37)).....	23
Figura 7. A) Estrutura do nucleossomo; B) Cromatina condensada devido à deacetilação das histonas (Figura adaptada de: (43)).....	26
Figura 8. Papel dos fatores de transcrição e das HDACs na regulação da expressão de γ -globina [Adaptado de (51)]. (KLF1 - Kruppel Like Factor 1; BCL11A - B cell lymphoma/leukemia 11A; FOG-1- Friend of GATA-1; HDAC – Histona deacetylase). 28	
Figura 9. Estrutura dos inibidores CI-994, MGCD-0103 e MS-275.....	29
Figura 10. Estrutura do inibidor seletivo de HDAC 1 e 2, ACY-957.....	30
Figura 11. A) Sobreposição HDAC-1 (azul claro), HDAC-2 (ciano), HDAC-3 (amarelo) e HDAC-8 (azul escuro). B) Visão superior do canal de 11 Å da HDAC-1 e C) HDAC-2 [Figuras retiradas e adaptadas de (57)]	32
Figura 12. Estrutura da talidomida e suas subunidades.....	33
Figura 13. A) Expressão gênica in vitro de gama globina após 72 horas expressa em U.A. na presença de C1 a 5 μ M e hidroxiuréia (HU) a 30 μ M (Ctrl – controle salina). B) Doseamento de hemoglobina fetal in vivo de animais transgênicos portadores de anemia falciforme (expresso em porcentagem) após 4 semanas de tratamento com as moléculas (C1, C2 e C3) na concentração de 100 μ mol/kg.....	34
Figura 14. Planejamento estrutural das moléculas inibidoras de histona deacetilase. 39	
Figura 15. Metodologia sintética de obtenção das moléculas (5), (6), (9), (10) e (13) pertencentes ao bloco A	42
Figura 16. Metodologia sintética de obtenção das moléculas (18), (21) e (22)	43
Figura 17. Metodologia sintética de obtenção das moléculas (26) a (28), (32) a (34) e (39) a (41).....	44
Figura 18. Representação da pose da molécula (6) dentro do sítio ativo da HDAC-2, demonstrando os resíduos de aminoácidos com os quais a molécula interage.....	50
Figura 19. Aminoácidos de interação da molécula (21) no sítio ativo da HDAC 2	52
Figura 20. Aminoácidos de interação da molécula (22) no sítio ativo da HDAC 2.....	52
Figura 21. Interações entre a molécula (41) e os resíduos de aminoácido do sítio ativo da enzima HDAC 2.....	54

Figura 22. Interação da molécula (32) com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima HDAC-2, demonstrando que não há interação com o átomo de zinco	54
Figura 23. Estrutura e deslocamentos de RMN ^1H dos intermediários (5) e (6)	68
Figura 24. Estrutura e deslocamentos de RMN ^1H dos intermediários (9) e (10)	69
Figura 25. Estrutura do intermediário (13) e os deslocamentos de RMN de ^1H	70
Figura 26. Estrutura das moléculas (21) e (22)	71
Figura 27. Estrutura da molécula (18)	72
Figura 28. Estrutura das moléculas (26) e (27)	73

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
INTRODUÇÃO.....	13
REVISÃO DA LITERATURA.....	17
OBJETIVOS.....	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
RESULTADOS.....	49
DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICES.....	89

1. INTRODUÇÃO

O termo epigenética refere-se a modificações genéticas que dão origem a alterações reversíveis de função e expressão dos genes, sem modificar sua sequência. Os mecanismos epigenéticos que regem essas modificações podem ser de dois tipos: a) aqueles que modificam diretamente o DNA e; b) aqueles que modificam a cromatina (1,2).

Entre as modificações da cromatina, aquelas envolvendo alterações nas estruturas das histonas apresentam papel importante na regulação do processo de transcrição gênica. A cauda das histonas é rica em aminoácidos básicos que conseguem interagir com o DNA, mantendo-o assim condensado na estrutura do nucleossomo. Quando as enzimas histona acetiltransferases (HATs) acetilam os resíduos de lisinas presentes na cauda das histonas, a carga positiva desse aminoácido é neutralizada e a interação entre a cauda e o DNA fica enfraquecida, tornando o material genético mais relaxado (3). Dessa forma, as enzimas de transcrição conseguem acessar o DNA e promover a transcrição gênica. De forma contrária, as histonas deacetilases (HDACs) são as responsáveis por retirar os grupamentos acetil da cauda da histona, restabelecendo a carga positiva do nitrogênio da lisina em pH fisiológico e, assim, promovendo a interação entre a cauda e o DNA. Essa interação promove o enovelamento do material genético tornando-o inacessível aos fatores de transcrição (3).

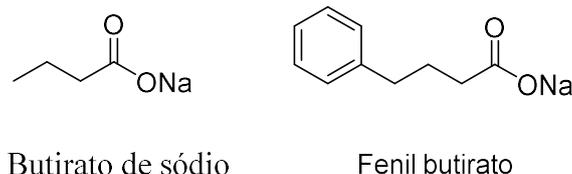
Estruturalmente, a HbF é constituída de duas cadeias alfa e duas cadeia gama ($\alpha_2\gamma_2$). O gene da cadeia alfa estão localizados no cromossomo 16, enquanto os genes da cadeia gama estão localizados no cromossomo 11. A regulação da expressão desses genes, cujo silenciamento se inicia logo após o nascimento,

ocorre por diversos fatores de transcrição incluindo BCL11A, SOX- 6, FOG, MYB, KLF1 entre outros (4). Dessa forma, a inibição destes fatores de transcrição poderiam, em teoria, aumentar a expressão de gama-globina, e conseqüentemente de HbF. . Entretanto, a inibição de fatores de transcrição é uma tarefa complicada, sendo que muitos destes fatores são essências para o desenvolvimento. Um exemplo é o fator BCL11A. Camundongos *knock-out* para BCL11A não mostraram viabilidade de desenvolvimento, morrendo na vida fetal. Por outro lado, a regulação de enzimas envolvidas nos mecanismos epigenéticos, a exemplo da HAT, HDAC e Lisina Demetilase-1 (LSD-1) mostrou-se mais promissora no aumento de gama-globina e HbF, sendo portanto, alvos interessantes a serem investigados.

Especificamente, a inibição da enzima HDAC, tem sido explorada na A.F., pois esta estratégia promove o aumento dos níveis de gama-globina e HbF em humanos, sem que haja alteração do ciclo ou proliferação celular. Os butiratos, por exemplo, foram os primeiros inibidores de HDAC desenvolvidos, o fenil butirato e o butirato de sódio (Figura 1) como os protótipos da classe e inibidores fracos das HDACs de classe I.

Atualmente, os butiratos são usados na clínica em pacientes falciformes não responsivos (ou com contra-indicação) a HU. Entretanto, a baixa biodisponibilidade e a variabilidade nas respostas ao tratamento com esses compostos limitam seu uso na prática clínica.

Figura 1 - Estrutura dos inibidores de HDAC: butirato de sódio e fenil butirato de sódio.



Fonte: Próprio autor.

Por isso, o desenvolvimento de novos inibidores de HDAC podem constituir uma alternativa mais efetiva e segura ao tratamento da AF. Um interessante estudo avaliando a correlação entre a inibição de diversas HDACs e o aumento de HbF demonstraram que as isoformas HDAC-1 e HDAC-2 parecem ser as principais envolvidas na regulação do gene de gama-globina. Dessa forma, a inibição seletiva dessas enzimas poderia aumentar a atividade e diminuir a toxicidade dos compostos (5).

Considerando este contexto, o objetivo deste trabalho foi planejar, sintetizar e avaliar uma série de compostos desenhados como inibidores de histona deacetilase (HDACs). Estruturalmente, os inibidores de HDAC apresentam: a) uma subunidade responsável pela coordenação com o zinco (Zn^{+2}) que esta presente no sítio ativo da enzima; b) uma 'cabeça' (*cap*) responsável pela interação com a superfície externa da HDAC; e c) um agente espaçador (*linker*) unindo as duas subunidades – geralmente de caráter hidrofóbico (6). Neste trabalho, selecionamos a subunidade *N*-(2-aminofenil)benzamida como aquela responsável pela interação com o zinco presente no sitio ativo da enzima. Estudos de relação-estrutura atividade demonstraram que a subunidade *N*-(2-aminofenil)benzamida confere maior seletividade às HDACs de classe 1, onde se encontram HDAC 1-3 e -8. Em nosso estudo, utilizamos na região 'cap' a

subunidade ftalimídica e/ou 2-aminoftalimídica a fim de contribuir com as interações da superfície externa da HDAC .

A seleção das subunidades ftalimídica e/ou 2-aminoftalimídica levou em consideração dois aspectos: a) boa interação desses grupos com a superfície externa, efeito avaliado através de estudos de modelagem molecular; b) atividade antiinflamatória dos derivados ftalimídicos devido a inibição do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) conferido pela presença dessa subunidade; e c) contribuição dessas subunidades com o efeito de fármacos como a talidomida e pomalidomida, reconhecidamente, capazes de aumentar os níveis de HbF. Já os espaçadores foram explorados visando conferir a distância adequada entre ambas subunidades.

Esperou-se assim, a partir deste planejamento, obter novos candidatos à fármacos para tratamento da anemia falciforme (AF) que constituíssem uma alternativa terapêutica ao tratamento atual com HU.

8. REFERÊNCIAS

1. D'alessio AC, Szyf M. Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem Cell Biol.* 2006;84:463–76.
2. Lund AH, Lohuizen M V. Epigenetics and cancer. *Genes Dev.* 2004;18:2315–35.
3. Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P, Bradbury EM. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. *J Biol Chem Biol Chem.* 1993;268:305–14.
4. Lohani N, Bhargava N, Munshi A, Ramalingam S. Pharmacological and molecular approaches for the treatment of β - hemoglobin disorders. *J Cell Phys.* 2018; 233:4563-77.
5. Bradner JE, Mak R, Tanguturi SK, Mazitschek R, Haggarty SJ, Ross K, et al. Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:12617–22.
6. Hamblett CL, Methot JL, Mampreian DM, Sloman DL, Stanton MG, Kral AM, et al. The discovery of 6-amino nicotinamides as potent and selective histone deacetylase inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2007;17:5300–9.
7. Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC. Sickle cell anemia: a molecular disease. *Science.* 1949;110:543–8.
8. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet.* 2004;364:1343–60.
9. Melo T, Ercolin LR, Chelucci RC, Melchior ACB, Lanaro C, Chung MC, et al. Sickle Cell Disease: Current Treatment and New Therapeutical Approaches. *InTech Publ.* 2015;1–27. DOI: 10.5772/60515.
10. Costa D, Capuano M, Sommese L, Napoli C. Impact of epigenetic mechanisms on therapeutic approaches of hemoglobinopathies. *Blood Cells, Mol Dis.* 2015;55:95–100.
11. Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *N Engl J Med.* 1999;340:1021–30.
12. Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Sci World J.* 2008;8:1295–324.
13. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle cell disease. *Nat Med.* 2002;8:1383–9.

14. Hoppe CC. Inflammatory mediators of endothelial injury in sickle cell disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014;28:265–86.
15. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA.* 2005;293:1653–62.
16. Hebbel RP. Adhesion of sickle red cells to endothelium: myths and future directions. *Soc Fr Transfus Sang.* 2008;15:8–14.
17. Johnson C, Telen MJ. Adhesion molecules and hydroxyurea in the pathophysiology of sickle cell disease. *Haematologica.* 2008;93:481–5.
18. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev.* 2007;21:37–47.
19. Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q, Wyszynski DF, et al. Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. *Br J Haematol.* 2006;133:570–8.
20. Croizat H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. *Br J Haematol.* 1994;87:592–7.
21. Francis RB, Haywood LJ. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc.* 1992;84:611–5.
22. Wagner MC, Eckman JR, Wick TM. Sickle cell adhesion depends on hemodynamics and endothelial activation. *J Lab Clin Med.* 2004;144:260–7.
23. Inglis JJ, Nissim A, Lees DM, Hunt SP, Chernajovsky Y, Kidd B. The differential contribution of tumor necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(807–816).
24. Malavé I, Perdomo Y, Escalona E, Rodriguez, E. Anchustegui, M. Malavé H, Arends T. Levels of tumor necrosis factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. *Acta Haematol.* 1993;90:172–6.
25. Sankaran VG, Orkin SH. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3:a011643.
26. Peschle C, Mavilio F, Caré A, Migliaccio AR, Salvo G, Samoggia P, et al. Haemoglobin switching in human embryos: asynchrony of zeta----alpha and epsilon-gamma-globin switches in primitive and definite erythropoietic lineage. *Nature.* 1985;313:235–8.

27. Sankaran VG, Xu J, Orkin SH. Advances in the understanding of haemoglobin switching. *Brit J Haematol*. 2010;149:181–94.
28. Michlitsch JG, Walters MC. Recent advances in bone marrow transplantation in hemoglobinopathies. *Curr Mol Med*. 2008;8:675–89.
29. Persons DA. Hematopoietic stem cell gene transfer for the treatment of hemoglobin disorders. *Hematology*. 2009;690–7.
30. Dever DP, Bak RO, Reinisch A, Camarena J, Washington G, Nicolas CE, et al. CRISPR/Cas9 B-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*. 2016;539:384–9.
31. Porter JB, Shah FT. Iron overload in thalassemia and related conditions: Therapeutic goals and assessment of response to chelation therapies. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24:1109–30.
32. Cançado RD. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29:316–26.
33. Steinberg MH. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(4):204–10.
34. Conran N, Oresco-santos C, Acosta HC, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. *Br J Haematol*. 2004;124:547–54.
35. Nahavandi M, Perlin E, Kassim O, WychE MO, Castro O, Tavakkoli F. Upregulation of TNF by hydroxyurea in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2000;96:14.
36. Food and Drug Administration. FDA approves new treatment for sickle cell disease [Internet]. 2017 [cited 2018 Jan 15]. Available from: <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm566084.htm>
37. Genes and human disease [Internet]. World Health Organization. [cited 2018 Jan 13]. Available from: <http://www.who.int/genomics/public/Mapphaemoglobin.pdf>
38. Ministério da Saúde. Doenças Falciformes (DF) e outras Hemoglobinopatias [Internet]. 2017 [cited 2018 Jan 15]. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-da-triagem-neonatal/doencas-falciformes-df-e-outras-hemoglobinopatias>.
39. Piel FB, Hay SI, Gupta S, Weatherall DJ, Williams TN. Global Burden of Sickle Cell Anaemia in Children under Five, 2010–2050: Modelling Based on Demographics, Excess Mortality, and Interventions. *PLoS Med*. 2013;10.

40. WHO. Sickle-cell disease and other haemoglobin disorders [Internet]. 2011 [cited 2018 Jan 15]. Available from: Sickle-cell disease and other haemoglobin disorders.
41. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CAMJ*. 2006;174:341–8.
42. Ausió J, Levin DB, De Amorim GV, Bakker S, Macleod PM. Syndromes of disordered chromatin remodeling. *Clin Genet*. 2003;64:83–95.
43. Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1:287–99.
44. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:769–84.
45. Sankaran VG, Menne TF, Xu J, Akie TE, Lettre G, Van Handel B, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science* (80-). 2008;322:1839–42.
46. Zuber J, Rappaport AR, Luo W, Wang E, Chen C, Vaseva A V., et al. An integrated approach to dissecting oncogene addiction implicates a Myb-coordinated self-renewal program as essential for leukemia maintenance. *Genes Dev*. 2011;25:1628–40.
47. Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nat Genet*. 2010;42:742–4.
48. Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:12355–8.
49. Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, White JG, Orkin SH, Maris JM, et al. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet*. 2000;24:266–70.
50. Miccio A, Blobel GA. Role of the GATA-1/FOG-1/NuRD pathway in the expression of human beta-like globin genes. *Mol Cell Biol*. 2010;30:3460–70.
51. Sankaran VG, Weiss MJ. Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies. *Nat Medicine*. 2015;21:221–30.
52. Perrine SP, Greene MF, Faller D V. Delay in the fetal globin switch in infants of diabetic mothers. *N Engl J Med*. 1985;312:334–8.

53. Dover GJ, Brusilow S, Charache S. Induction of fetal hemoglobin production in subjects with sickle cell anemia by oral sodium phenylbutyrate. *Blood*. 1994;84:339–43.
54. Kutlar A, Reid ME, Inati A, Taher AT, Abboud MR, EL- Beshlawy A, et al. A dose-escalation phase IIa study of 2,2- dimethylbutyrate (HQB-1001), an oral fetal globin inducer, in sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2013;88:255–60.
55. Esrick EB, Mcconkey M, Lin K, Frisbee A, Ebert BL. Inactivation of HDAC1 or HDAC2 induces gamma globin expression without altering cell cycle or proliferation. *Am J Hematol*. 2015;90:624–8.
56. Shearstone JR, Golonzhka O, Chonkar A, Tamang D, van Duzer JH, Jones SS, et al. Chemical Inhibition of Histone Deacetylases 1 and 2 Induces Fetal Hemoglobin through Activation of GATA2. *PLoS One*. 2016;11.
57. DI Micco S, Chinl MG, Terracciano S, Bruno I, Riccio R, Bifulco G. Structural basis for the design and synthesis of selective HDAC inhibitors. *Bioorganic Med Chem*. 2013;21:3795–807.
58. Estiu G, Greenberg E, Harrison CB, Kwiatkowski NP, Mazitschek R, Bradner JE, et al. Structural origin of selectivity in class II-selective histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem*. 2008;51:2898–906.
59. Butler KV, Kozikowski AP. Chemical origins of isoform selectivity in histone deacetylase inhibitors. *Curr Pharm Des*. 2008;14:505–28.
60. Itoh Y, Suzuki T, Miyata N. Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *Curr Pharm Des*. 2008;14:529–44.
61. Methot JL, Hamblett CL, Mampreian DM, Jung J, Harsch A, Szewczak AA, et al. SAR profiles of spirocyclic nicotinamide derived selective HDAC1/HDAC2 inhibitors (SHI-1:2). *Bioorganic Med Chem Lett*. 2008;18:6104–9.
62. Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, et al. A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:4592–7.
63. Cai J, Wei H, Hong KH, Wu X, Cao M, Zong X, et al. Discovery and preliminary evaluation of 2-aminobenzamide and hydroxamate derivatives containing 1,2,4-oxadiazole moiety as potent histone deacetylase inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2015;96:1–13.

64. Wang DF, Wiest O, Helquist P, Lan-Hargest HY, Wiech NL. On the function of the 14 A long internal cavity of histone deacetylase-like protein: implications for the design of histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem.* 2004;47:3409–17.
65. Lima LM, Fraga CAM, Barreiro EJ. O renascimento de um fármaco: talidomida. *Quim Nova.* 2001;24:683–8.
66. Shibata Y, Shichita M, Sasaki K, Nishimura K, Hashimoto Y, Iwasaki S. N-Alkylphthalimides: structural requirement of thalidomidal action on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor necrosis factor alpha production by human leukemia HL-60 cells. *Chem Pharm Bull.* 1995;43:177–9.
67. Aerbajinai W, Zhu J, Gao Z, Chin K, Rodgers GP. Thalidomide induces gamma-globin gene expression through increased reactive oxygen species-mediated p38 MAPK signaling and histone H4 acetylation in adult erythropoiesis. *Blood.* 2007;110:2864–71.
68. Moutouh-de Parseval LA, Verhelle D, Glezer E, Jensen- Pergakes K, Ferguson GD, Corral LG, et al. Pomalidomide and lenalidomide regulate erythropoiesis and fetal hemoglobin production in human CD34+ cells. *J Clin Investig.* 2008;118:248–58.
69. Meiler SE, Wade M, Kutlar F, Yerigenahally SD, Xue Y, Moutouh-De Parseval LA, et al. Pomalidomide augments fetal hemoglobin production without the myelosuppressive effects of hydroxyurea in transgenic sickle cell mice. *Blood.* 2011;118:1109–12.
70. Chaulet C, Croix C, Alagille D, Normand S, Delwail A, Favot L, et al. Design, synthesis and biological evaluation of new thalidomide analogues as TNF- α and IL-6 production inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2011;21:1019–22.
71. Dos Santos JL, Lanaro C, Lima LM, Gambero S, Franco- Penteado CF, Alexandre-Moreira MS, et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. *J Med Chem.* 2011;54:5811–9.
72. Dos Santos JL, Lanaro C, Chelucci RC, Gambero S, Bosquesi PL, Reis JS, et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. part II: furoxan derivatives. *J Med Chem.* 2012;55:7583–92.
73. Hashimoto Y. Novel biological response modifiers derived from thalidomide. *Curr Med Chem.* 1998;5:163–78.
74. Zhou S, Wang F, Hsieh TC, Wu JM, Wu E. Thalidomide-a notorious sedative to a wonder anticancer drug. *Curr Med Chem.* 2013;20:4102–8.

75. Dos Santos JL, Lanaro C, Chelucci RC, Gambero S, Bosquesi PL, Reis JS, Lima LM, et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. part II: furoxan derivatives. *J Med Chem*. 2012;55:7583–92.
76. PDB. Protein Data Bank [Internet]. [cited 2018 Jan 1]. Available from: <https://www.rcsb.org/pdb/>.
77. Schrödinger. Maestro. New York: Schrödinger, LLC; 2017.
78. Schrödinger. Glide. New York: Schrödinger, LLC ; 2017.
79. Schrödinger. LigPrep. New York: Schrödinger, LLC; 2017.
80. Dastmalchi S, Hamzeh-Mivehroud, M, Sokouti B. *Applied Case Studies and Solutions in Molecular Docking-Based Drug Design*. Hershey PA Med Inf Sci Ref. 2016. (Advances in Medical Technologies and Clinical Practice).