

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

INIBIDORES DE HDAC NO TRATAMENTO DO CÂNCER: AVALIAÇÃO
COMPARATIVA DO PERFIL DE POTÊNCIA E SELETIVIDADE DE
DIFERENTES ZBGs

SAMUEL JUNIOR DE MELO

Orientador:
Prof. Dr. Roberto Parise Filho

SÃO PAULO

2024

Samuel Junior de Melo

INBIDORES DE HDAC NO TRATAMENTO DO CANCÊR: AVALIAÇÃO
COMPARATIVA DO PERFIL DE POTÊNCIA E SELETIVIDADE DE
DIFERENTES ZBGs

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Farmácia-
Bioquímica da Universidade de São Paulo
como requisito obtenção do título de
bacharel.

Orientador:

Prof. Dr. Roberto Parise
Filho

SÃO PAULO

2024

À minha avó Hilda (*in memoriam*), por
todo o incentivo e amor ao longo de
todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é reconhecer que não fazemos nada sozinhos, por isso, cito aqui algumas pessoas foram, são e serão essenciais na minha jornada.

De certo, em primeiro lugar, registro minha gratidão ao Deus em quem cremos eu e minha família, sendo Ele criador e provedor presente em todos os momentos, inclusive naqueles que pensei está só.

Aos meus pais Francisco e Alessandra, grandes incentivadores e apoiadores dos meus sonhos além de sempre estarem disponíveis nos momentos difíceis. À minhas irmãs, Tássila e Tamily, companhias fundamentais nos momentos de descanso, lazer e desabafos. E à minha avó que nos deixou depois de muito tempo sendo minha grande companheira de quarto.

Aos amigos que se fizeram presentes ao longo desses seis anos e merecem ser mencionados: Ana Mara, Daniel Amaro, Gabriel Bispo, Kamila Maciel e Victória Crivilari. Obrigado pelo companheirismo e amizade que fizeram esses anos passarem muito rápido de forma leve (apesar da USP).

Ao meu orientador, Roberto Parise, pela orientação acadêmica e pelas conversas que me fizeram refletir sobre minha vida acadêmica e profissional.

Aos professores, colegas e servidores da FCF-USP, que de alguma forma participaram da minha caminhada, deixo aqui meu muito obrigado.

E, claro, a você que está lendo este trabalho, sejam os membros da minha banca ou alguém curioso que por acaso chegou aqui, espero que a leitura seja proveitosa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de desacetilação pela HDAC	19
Figura 2. Representação esquemática do farmacóforo um inibidor de HDAC.	21
Figura 3. Inibidores naturais de HDACs	22
Figura 4. Estruturas de moléculas aprovadas como inibidores de HDACs.	23
Figura 5. Estruturas de inibidores com benzamida como ZBG.....	25
Figura 6. Estruturas de inibidores com ácido carboxílico como ZBG.....	26
Figura 7. Docking molecular do composto 6 no sítio catalítico da HDAC1	31
Figura 8. Estruturas de inibidores com hidrazida como ZBG.....	32
Figura 9. Estruturas de inibidores com amida como ZBG	35
Figura 10. Docking molecular do composto 13 demonstrando as interações no sítio catalítico da HDAC8	37
Figura 11. Esquema visual da quelação bidentada por meio de formação de diol geminal em cetonas	38
Figura 12. Estruturas de inibidores com cetona como ZBG.....	39
Figura 13. Estruturas de inibidores com TFMO e DFMO.....	41
Figura 14. Estruturas de inibidores com TZD como ZBG.	43
Figura 15. <i>Docking</i> molecular demonstrando a quelação monodentada do TZD com o zinco.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das HDACs de acordo com suas isoformas.....	18
Tabela 2 – Valores de IC ₅₀ para compostos contendo hidrazida como ZBG ...	32
Tabela 3 – Valores de IC ₅₀ para compostos contendo amida como ZBG	35
Tabela 4 – Valores de IC ₅₀ para compostos contendo cetona como ZBG	39
Tabela 5 – Valores de IC ₅₀ para compostos contendo TFMO como ZBG	41
Tabela 6 – Valores de IC ₅₀ para compostos contendo TZD como ZBG	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME – Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção)

CFDA – Chinese Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Medicamentos da China)

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

FDA – Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA)

HAT – Histone Acetyltransferase (Acetiltransferase de Histonas)

HDAC – Histone Deacetylase (Desacetilase de Histonas)

HDACi – Histone Deacetylase Inhibitor (Inibidor de Desacetilase de Histonas)

IC50 – Half maximal inhibitory concentration (Concentração inibitória média)

MPT – Mitotic Phase Transition (Transição da Fase Mitótica)

NMPA – National Medical Products Administration (Administração Nacional de Produtos Médicos)

NAD⁺ – Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Dinucleotídeo de Nicotinamida Adenina)

PTCL – Peripheral T-Cell Lymphoma (Linfoma de Células T Periféricas)

SAHA – Suberoylanilide Hydroxamic Acid (Ácido Suberoilânilida Hidroxâmico - Vorinostat)

SIRT – Sirtuin (Sirtuína)

TSA – Trichostatin A (Tricostatina A)

TFMO – Trifluormethyloxadiazole (Trifluormetiloxadiazol)

TZD – Thiazolidinedione (Tiazolidinediona)

ZBG – Zinc Binding Group (Grupo de Ligação ao Zinco)

LISTA DE SÍMBOLOS

Å (Ångström): unidade de comprimento equivalente a 10^{-10} metros. Utilizada principalmente para medir distâncias atômicas e moleculares.

μ (micro): prefixo que indica 10^{-6} (um milionésimo da unidade base).

n (nano): prefixo que indica 10^{-9} (um bilionésimo da unidade base).

M (molaridade): concentração de uma solução, expressa em mol/L (moles por litro de solução).

RESUMO

O câncer, uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células mutantes, representa um desafio significativo, com a previsão de 700 mil novos casos no Brasil entre 2023 e 2025. A modulação epigenética, particularmente por meio da regulação da acetilação e desacetilação de histonas, tem sido foco de estudos para o desenvolvimento de novas terapias. Os inibidores de histonas desacetilases (HDACi), que atuam na expressão gênica, têm mostrado grande potencial no tratamento do câncer, principalmente devido à sua capacidade de modular a transcrição gênica. Este estudo revisa os avanços na obtenção de novos grupos ligantes de zinco (ZBGs), componentes fundamentais da estrutura de inibidores de HDACs, como alternativas aos ZBGs convencionais, incluindo hidroxamatos e benzamidas, que embora eficazes, apresentam desafios como baixa seletividade e efeitos adversos causados pela pan-inibição de outras metaloenzimas. Além disso, o trabalho discute os desafios farmacocinéticos e toxicocinéticos desses inibidores, avaliando suas taxas de inibição, seletividade entre as diferentes isoformas de HDACs, e propriedades de biodisponibilidade e solubilidade. Foram analisadas moléculas promissoras com novos ZBGs, como hidrazidas, amidas, cetonas, e oxadiazóis, comparando-as com os compostos já estabelecidos. Espera-se que esta revisão contribua para a compreensão dos novos ZBGs, oferecendo perspectivas sobre sua aplicabilidade no tratamento do câncer, com ênfase em melhorar a eficácia e reduzir efeitos adversos, incentivando futuras pesquisas na área.

ABSTRACT

Cancer, a disease characterized by the uncontrolled growth of mutant cells, represents a significant challenge, with a projected 700,000 new cases in Brazil between 2023 and 2025. Epigenetic modulation, particularly through the regulation of histone acetylation and deacetylation, has been the focus of studies for the development of new therapies. Histone deacetylase inhibitors (HDACi), which act on gene expression, have shown great potential in cancer treatment, mainly due to their ability to modulate gene transcription. This study reviews the advances in obtaining new zinc binding groups (ZBGs), fundamental components of the structure of HDAC inhibitors, as alternatives to conventional ZBGs, including hydroxamates and benzamides, which, although effective, present challenges such as low selectivity and adverse effects caused by pan-inhibition of other metalloenzymes. Furthermore, the work discusses the pharmacokinetic and toxicokinetic challenges of these inhibitors, evaluating their inhibition rates, selectivity among different isoforms of HDACs, and properties of bioavailability and solubility. Promising molecules with new ZBGs, such as hydrazides, amides, ketones, and oxadiazoles, were analyzed, comparing them to established compounds. It is expected that this review will contribute to the understanding of new ZBGs, offering perspectives on their applicability in cancer treatment, with an emphasis on improving efficacy and reducing adverse effects, encouraging future research in the field.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO	15
3 METODOLOGIA.....	16
4 RELAÇÃO ENTRE AS HDACS E A FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER ..	17
4.1 VISÃO GERAL SOBRE AS HDACS	17
4.2 O MECANISMO DE DESACETILAÇÃO DAS HDACS.....	19
5 INIBIDORES DE HISTONAS DESACETILASES	21
5.1 PRODUTOS NATURAIS COMO INIBIDORES DE HDACS	21
5.2 ASPECTOS ESTRUTURAIS ENTRE OS INIBIDORES DE HDAC.....	21
5.3 ZBGs CLÁSSICOS.....	23
5.3.1 Ácido hidroxâmico	24
5.3.2 Benzamida.....	24
5.3.3 Ácido carboxílico.....	25
5.3.4 Tiol.....	26
5.4 DESAFIOS FARMACOCINÉTICOS DE FÁRMACOS APROVADOS E QUE POSSUEM ZBGs CLÁSSICOS	27
6 NOVOS ZBGs: AVANÇOS NA INIBIÇÃO DE HDAC PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER	30
6.1 HIDRAZIDA.....	30
6.2 AMIDA.....	34
6.3 CETONA	37
6.4 TRIFLUORMETILOXADIAZOL.....	37
6.5 TIAZOLIDINEDIONA.....	42
7 DISCUSSÃO	46
CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

Câncer é um termo que abrange mais de cem doenças, todas relacionadas ao crescimento descontrolado e desordenado de células com mutações que impedem o ciclo celular adequado. O desenvolvimento do câncer resulta de danos à estrutura do DNA e à maquinaria celular encarregada de sua manutenção e reparo (KASHYAP, 2022).

O câncer é uma doença maligna localizada inicialmente em um tecido específico. No entanto, as células mutadas podem migrar para outros locais do corpo em um processo conhecido como metástase e continuar com sua replicação desenfreada nesse novo local (KASHYAP, 2022).

No Brasil, é estimado um número de 700 mil novos casos de câncer entre os anos de 2023 e 2025, sendo os tipos mais comuns o câncer de próstata em homens e o de mama em mulheres, excluindo o câncer de pele não melanoma (SANTOS *et al*, 2023).

O tratamento mais eficaz contra a doença consiste na remoção cirúrgica do tecido tumoral, frequentemente complementada pela radioterapia e quimioterapia. Estas últimas podem ser aplicadas isoladamente ou em conjunto, tanto antes quanto após a cirurgia (BRASIL, 2022).

A quimioterapia faz uso de agentes citotóxicos cujo objetivo é levar as células cancerígenas à morte. Por conta da sua alta taxa de replicação, os mecanismos envolvidos na regulação da síntese e replicação do DNA são alvos da quimioterapia, a saber a própria molécula de DNA e enzimas envolvidas na sua replicação. O uso de agentes citotóxicos que têm como alvos células em intensa replicação e crescimento torna a quimioterapia não seletiva e não específica, ou seja, o fármaco utilizado não fará distinção entre as células cancerígenas que estão em constante replicação e as células de tecidos que também possuem alta taxa de duplicação celular, como as células do sistema imune formadas na medula óssea (ANAND *et al.*, 2023).

Nos últimos anos, percebeu-se que alterações epigenéticas aberrantes também estão relacionadas com o surgimento e a progressão de tumores malignos e, assim, alvos epigenéticos passaram a ser considerados no enfrentamento ao câncer. Modificações pós-traducionais em histonas modulam a transcrição gênica remodelando a cromatina e promovendo a progressão de tumores. A acetilação de histonas é a modificação pós-traducional mais estudada, sendo controlada pela ação das acetiltransferases (HAT) e das histonas desacetilases (HDAC). A remoção de grupos acetila das histonas pelas HDACs interfere na transcrição de oncogenes e genes supressores de tumor (LI & SETO, 2016).

As HDACs são divididas em quatro diferentes classes, sendo as classes I, II e IV metal-dependentes para sua ação catalítica, enquanto a classe III tem o NAD^+ como cofator. As HDACs dependentes de metal, especialmente do íon Zn^{2+} , apresentam sequências conservadas entre suas classes, incluindo um motivo (*motif*) comum que compreende um domínio desacetilase. Este domínio é caracterizado pela presença de um íon divalente de zinco (Zn^{2+}) coordenado por uma tríade de aminoácidos, composta por dois resíduos de aspartato (Asp) e um de histidina (His) (LÓPEZ *et al.*, 2016). A superexpressão ou o recrutamento anormal de HDACs têm importante papel em uma variedade de doenças, incluindo o câncer. Essa característica torna as HDACs um alvo atrativo para o desenvolvimento de inibidores específicos, uma vez que a interação com o íon zinco é essencial para a atividade catalítica da enzima

Os inibidores de HDACs (HDACis) possuem uma estrutura em comum (farmacóforo) sendo formados por um *cap*, um *linker* e um *zinc binding group* (ZBG). Cada região exerce uma função para o efeito inibidor das HDACs. O *cap* e o *linker* interagem com resíduos de aminoácidos no sítio ativo da enzima, contribuindo para a interação entre o ligante e o receptor afetando a seletividade dos HDACis. Por outro lado, o ZBG interage diretamente com o Zn^{2+} e resíduos adjacentes exercendo o papel fundamental na inibição da atividade catalítica da (ROY *et al.*, 2023).

Atualmente, existem quatro HDACis aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do câncer: ácido hidroxâmico

suberoilânilda (SAHA) ou vorinostat (Zolinza®), romidepsina (Istodax®) belinostat (Beleodaq®) e panobinostat (Farydak®) (DENG, *et al.*, 2023). No que tange ao planejamento e desenvolvimento de novos HDACis, a grande maioria das modificações é realizada no *cap* e no *linker* desses inibidores. No entanto, modificações no ZBG têm grande potencial para introduzir novas moléculas ao mercado.

Os ZBGs mais utilizados nos HDACis, chamados de ZBGs clássicos, abrangem os hidroxamatos, as benzamidas e ácidos carboxílicos. O ácido hidroxâmico é o ZBG mais utilizado devido à sua alta afinidade de ligação ao íon Zn^{2+} , realizando uma quelação, geralmente, bidentada ao íon. A alta capacidade de quelação do ácido hidroxâmico está relacionada à sua pan-inibição pela falta de seletividade entre as classes de HDACs, refletindo na alta potência desse ZBG e a provável ocorrência de efeitos adversos. Ademais, podem ocorrer efeitos indesejáveis causados pela ligação do ácido hidroxâmico com outras enzimas zinco-dependentes como, aminopeptidases, metaloproteases de matriz e anidrase carbônica. Já a benzamida possui alta seletividade pela classe I da HDAC em comparação ao ácido hidroxâmico, provocando menos efeitos adversos, contudo, facilitando o surgimento de células tumorais resistentes ao fármaco. Os ácidos carboxílicos, devido à sua baixa afinidade pelo íon zinco, têm recebido menos atenção como inibidores de HDAC em comparação com compostos contendo ácido hidroxâmico ou benzamida. Ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido valpróico, mostraram eficácia limitada em ensaios *in vitro*, no entanto seu potencial terapêutico no tratamento de tumores ainda está sendo avaliado (ZHANG *et al.*, 2018).

2 OBJETIVO

Esse trabalho tem como objetivo revisar os avanços na descoberta, planejamento e desenvolvimento de novos ZBGs para uso em HDACis. Essa revisão teve foco nas propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicocinéticas demonstradas pela taxa de inibição das HDCAs, os efeitos adversos decorrentes da inibição inespecífica e otimização dos perfis de solubilidade e biodisponibilidade dessas novas moléculas.

3 METODOLOGIA

Essa revisão de literatura baseia-se na pesquisa em banco de dados como ScienceDirect, Scielo, Pubmed, Portal de Periódicos Capes e no Banco de Teses e Dissertações USP, buscando artigos e materiais publicados nos últimos 10 anos com dados e informações sobre pesquisa e desenvolvimento de novos ZBGs e informações comparativas dos ZBGs já existentes.

Os critérios de inclusão são: artigos, teses e livros publicados nos últimos 10 anos; disponíveis na íntegra ou gratuitamente ou pelo acesso ao VPN da USP; encontrados nas bases de dados citadas; cujo idioma seja ou o inglês ou o português. Para pesquisa nos bancos de dados foram utilizados os seguintes termos: “cancer treatment”, “epigenetic targets”, “ZBG”, “zinc binding group”, “novel ZBG”, “HDAC inhibitors” e “HDACi in cancer treatment”.

Os critérios de exclusão são: artigos, teses e livros com mais de 10 desde a sua publicação; artigos não disponíveis de forma gratuita em bases abertas ou pelo VPN USP; artigos em idioma diferente do inglês e do português.

4 RELAÇÃO ENTRE AS HDACS E A FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER

4.1 Visão geral sobre as HDACs

A regulação da expressão gênica é de suma importância para a manutenção dos seres vivos. Por outro lado, dentre as regulações gênicas, as modificações pós-traducionais (MPTs) desempenham papel relevante no surgimento de doenças, como o câncer. Algumas dessas modificações são dinâmicas e reversíveis, como a metilação, fosforilação, acetilação e ubiquitinação. A metilação e a acetilação foram originalmente identificadas como modificações nas caudas de histonas nucleossomais regulando o acesso ao DNA por meio de alterações na estrutura da cromatina (PARBIN *et al.*, 2014).

O DNA dos organismos eucarióticos possui elaboradas formas de compactação em cromossomos. Essa compactação envolve proteínas histonas e proteínas cromossômicas não-histonas formando um complexo dessas classes de proteínas com o DNA chamado de cromatina. O acesso à molécula de DNA depende do grau de compactação da cromatina, logo a regulação desse acesso define se determinado trecho do genoma será acessível para a transcrição e posterior tradução (ALBERTS *et al.*, 2017).

A acetilação é uma MPT reversível, enzimaticamente catalisada, na qual um grupo acetil é ligado a posição Nε de uma lisina de cadeia lateral. As lisina acetil transferases catalisam a acetilação de lisinas usando acetil-CoA como cofator, e as histonas desacetilases metal-dependentes (HDACs) catalisam a hidrólise do grupo acetil para regenerar lisina e acetato livre. As HDACs têm sido descritas como repressores transcricionais uma vez que a desacetilação de histonas aumenta o grau de compactação da cromatina, impedindo o acesso da maquinaria de replicação celular ao DNA (LÓPEZ *et al.*, 2016).

Os processos de acetilação e desacetilação não são exclusivos das proteínas histonas, muitas outras proteínas como fatores de transcrição, enzimas de reparo de DNA, mediadores de sinais e proteínas estruturais também

são reguladas por esse mecanismo. Assim, as HDACs se envolvem na regulação gênica, estrutura da cromatina, interação DNA-proteínas e na transcrição gênica influenciando diversos outros processos fisiológicos e patológicos (HO *et al.*, 2020).

As HDACs abrangem grande número de enzimas, dividido em quatro famílias baseadas na sua homologia primária com HDACs de leveduras, localização celular e atividade enzimática. A classe I (43-45 kDa) possui o fator regulatório de transcrição Rpd3 semelhante ao de leveduras e inclui as isoformas de HDAC 1, 2, 3 e 8. A estrutura da classe II (120-130 kDa) possui similaridade com outra desacetilase presente em leveduras, sendo dividida em duas isoformas, IIa (HDACs 4, 5, 7 e 9) e IIb (HDACs 6 e 10). A classe IV possui apenas a isoforma da HDAC 11. As classes I, II e IV são enzimas dependentes de íon zinco para sua ação catalítica, sendo também chamadas de metaloproteínas. Por outro lado, as HDACs da classe III, conhecidas como sirtuínas (SIRT1-SIRT7), são enzimas que dependem de NAD⁺ para sua atividade catalítica. Essas sete isoformas diferem das HDACs das outras classes em termos de localização celular e funções enzimáticas (tabela 1). Além disso, apesar de estarem envolvidas em vários processos biológicos, como regulação metabólica e envelhecimento, sua relação com a fisiopatologia do câncer é distinta das HDACs clássicas, não sendo diretamente associadas à oncogênese em muitos contextos (DENG *et al.*, 2023). Por esse motivo, a classe III não é abordada nesta revisão.

Tabela 1 – Classificação das HDACs de acordo com suas isoformas.

Classes de HDAC e suas isoformas				
I	IIa	IIb	IV	III
HDAC1	HDAC4	HDAC6	HDAC11	SIRT1
HDAC2	HDAC5	HDAC10		SIRT2
HDAC3	HDAC7			SIRT3
HDAC8	HDAC9			SIRT4
				SIRT5
				SIRT6
				SIRT7

4.2 O mecanismo de desacetilação das HDACs

O mecanismo de desacetilação de histonas pelas HDACs metal-dependentes se inicia a partir da entrada da cadeia lateral de acetil-lisina no canal hidrofóbico do sítio catalítico da enzima, em vez do reconhecimento da estrutura principal da proteína. A natureza compacta da ligação ao substrato é uma vantagem para o planejamento de inibidores, pois podem ser pequenas moléculas que mimetizam o resíduo de acetil-lisina, em vez de uma sequência de peptídeo mais longa.

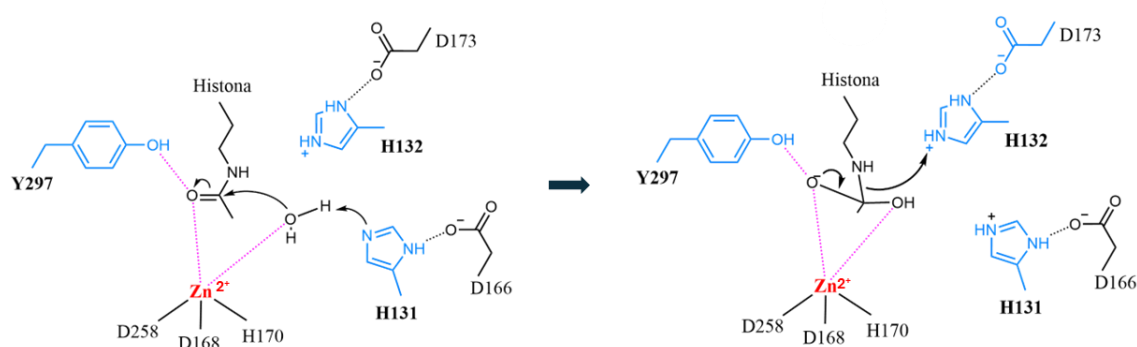


Figura 1. Mecanismo de desacetilação pela HDAC. Os resíduos de aminoácidos envolvidos na reação estão em azul, o íon zinco em vermelho e o resíduo N-terminal da histona em preto. A carbonila do grupo acetil sofre ataque nucleofílico da água no sítio catalítico, restituindo a carbonila e liberando a cadeia N-terminal com um grupo amina e uma molécula de acetato (SETO e YOSHIDA, 2014).

A coordenação entre o cátion zinco (Zn^{2+}) do sítio ativo da enzima e a acetil-lisina é de extrema importância para a ligação do substrato e a catálise (Figura 1). O núcleo catalítico das HDACs consiste de um bolsão contendo o íon Zn^{2+} e resíduos de tirosina (Y297) e de histidina (H131 e H132) que participam do processo catalítico. O grupo acetil da cadeia N-terminal da histona ao se acomoda no bolsão ao interagir com o resíduo de tirosina Y297 por ligação de hidrogênio e com o íon zinco por quelatação. Em seguida, uma molécula de água ativada pela histidina H131 realiza um ataque nucleofílico à carbonila do grupo acetil. Esse ataque resulta na movimentação dos elétrons da dupla ligação da carbonila e na formação de um intermediário oxianion tetraédrico, que se liga de forma bidentada ao íon zinco. Por fim, ocorre um

rearranjo eletrônico no oxiânion, restituindo a carbonila e rompendo a ligação amídica, enquanto a histidina H132 captura um próton, completando a restituição da cauda N-terminal da histona.

De forma geral, todos os inibidores de HDAC de alta afinidade, exceto os modificadores covalentes, alcançam sua potência por meio da coordenação com o zinco, funcionando como ligantes monodentados ou bidentados imitando o intermediário oxiânion tetraédrico. Esse intermediário é essencial para a eficiência catalítica da reação de desacetilação (HO *et al.*, 2020).

5 INIBIDORES DE HISTONAS DESACETILASES

Levando em consideração as características do mecanismo de desacetilação das HDACs, uma molécula capaz de inibir a enzima pode ser planejada considerando mimetizar o intermediário oxiânion tetraédrico formado no sítio catalítico e as interações no canal de ligação do substrato. Assim sendo, o farmacóforo (Figura 2) de um inibidor de HDACs pode ser composto de um grupo ligante de zinco (ZBG), um conector hidrofóbico (*linker*) e um *cap* com interações adicionais a borda do bolsão catalítico (HO *et al.*, 2020).



Figura 2. Representação esquemática do farmacóforo um inibidor de HDAC. Adaptado de: ZHANG *et al*, 2018.

5.1 Produtos naturais como inibidores de HDACs: o surgimento da classe

A tricostatina A (TSA) foi o primeiro inibidor natural de HDAC identificado, descoberta a partir de culturas de cepas de *Streptomyces*, a TSA é um metabólito secundário que se destacou pela capacidade única de inibir a atividade das HDACs (YOSHIDA *et al.*, 1990). A descoberta de Yoshida há três décadas, teve um importante papel na pesquisa e no desenvolvimento de inibidores de HDAC devido à sua estrutura e mecanismo de ação posteriormente bem caracterizados.

No contexto da pesquisa sobre inibidores de HDAC para o tratamento do câncer, a tricostatina A é de particular relevância. Sua estrutura química serviu como um modelo de como os elementos do farmacóforo de HDAC podem ser otimizados para o desenvolvimento de novas moléculas. A TSA contém um ácido hidroxâmico como ZBG, atuando como um quelante de zinco bidentado, essencial para a inibição da HDAC. Essa característica foi confirmada por

estudos de cristalografia de raios X, que demonstraram a ligação da TSA ao sítio ativo da HDAC (SCHUETZ, 2008).

Além disso, a TSA possui um dieno rígido como *linker*, que se ajusta precisamente ao canal de ligação do substrato da enzima. Esse *linker* é essencial para a orientação adequada da molécula dentro do sítio ativo da HDAC, assegurando sua eficácia. A estrutura da TSA é complementada por um anel fenil substituído, que atua como o *cap* do farmacóforo. O substituinte de amina terciária presente no cap não apenas favorece a interação com a enzima, mas também contribui para a solvatação do fármaco em ambiente aquoso, aumentando sua solubilidade e biodisponibilidade (Figura 3).

Outro inibidor de HDAC de origem natural, a *psammaphin A*, é um pró-fármaco inicialmente isolado de uma esponja marinha. Essa molécula tem uma estrutura simétrica que passa por redução *in vivo* do grupo dissulfeto para formar a molécula ativa, que possui o farmacóforo de três pontos composto pelo ZBG, *linker* e *cap*. Como os tióis apresentam baixa biodisponibilidade, a proteção por dissulfeto garante maior estabilidade e permeabilidade celular antes da ativação metabólica. O pró-fármaco de tiol também aparece em outra família de depsipeptídeos com capacidade de inibição de HDACs, seja como um dissulfeto redutível nos produtos naturais derivados de bactérias, como a romidepsina e a espirocostatina A, ou como um tioéster lábil, como no largazol, produzido por cianobactérias. Após o metabolismo, o tiol livre presente em todos os três produtos naturais atua como o grupo ligante de zinco (Figura 3 (KIM *et al.*, 2007).

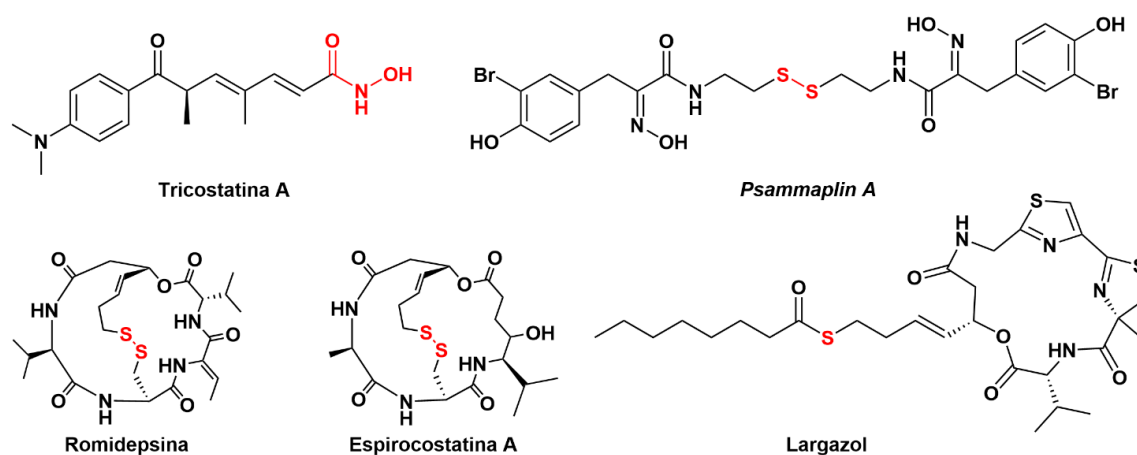


Figura 3. Inibidores naturais de HDACs. Os ZBGs estão destacados em vermelho.

5.2 Aspectos estruturais entre os inibidores de HDAC

Levando em consideração o aspecto estrutural, particularmente seus ZBGs, pode-se organizar os inibidores de HDACs em diferentes classes, como ácidos hidroxâmicos, benzamidas, ácidos graxos de cadeia curta, peptídeos macrocíclicos, entre outros. Como relatado anteriormente, esses inibidores de HDACs dependentes de Zn^{2+} compartilham uma estrutura farmacofórica em comum como já vista: um *cap* (geralmente um grupo hidrofóbico aromático que interage com resíduo adjacentes ao sítio de ligação), um *linker* saturado ou insaturado de cadeia linear ou cíclica, fazendo a união entre *cap* e ZBG) e o ZBG ou grupo quelante ao zinco (mais comumente ácidos hidroxâmicos, ácidos carboxílicos ou benzamidas) (MANAL *et al.*, 2016).

Modificações estruturais têm sido testadas com êxito em todos os grupos do farmacóforo dos inibidores de HDACs, mas, de modo geral, alterações no *cap* e no *linker* estão relacionadas a maior especificidade por uma isoforma específica de HDAC e alterações no ZBG representam maior afinidade refletindo em menores valor de IC_{50} . Atualmente, há quatro moléculas aprovadas pelo FDA para uso como inibidores de HDACs no tratamento de linfomas de células T cutâneos e periféricos, além de mieloma múltiplo, em regime combinado com outros fármacos. Três dessas moléculas possuem o ácido hidroxâmico como ZBG, enquanto uma apresenta o tiol como ZBG, gerado a partir da quebra de uma ligação dissulfeto (Figura 4).

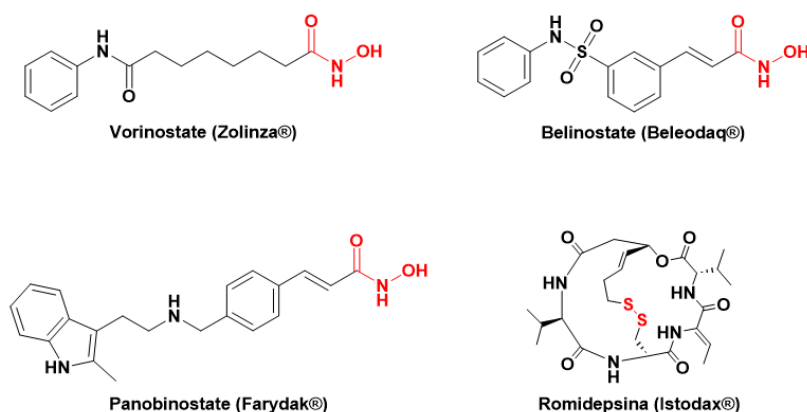


Figura 4. Estruturas químicas de moléculas aprovadas como inibidores de HDACs.

5.3 ZBGs Clássicos

Os grupos ligantes de zinco mais utilizados, ácido hidroxâmico, benzamida, ácido carboxílico e tiol, são chamados de ZBGs clássicos. Algumas moléculas contendo esses grupos em suas estruturas já foram aprovadas pela FDA ou se encontram em ensaios clínicos, conforme apresentado na Figura 5 (HO *et al.*, 2020). A seguir, a classificação dos fármacos baseando-se no tipo de ZBG é apresentada.

5.3.1 Ácido hidroxâmico

O primeiro inibidor de HDAC aprovado pelo FDA, o vorinostate (Zolinza®), possui o ácido hidroxâmico como ZBG. Outros compostos já aprovados e em fase de testes clínicos mantêm similaridade com o vorinostate e o produto natural tricostatina A (Figura 5).

A preferência pelo uso do ácido hidroxâmico como grupo quelante de zinco (ZBG) deve-se às suas vantagens em relação a outros ZBGs, como a capacidade superior de se ligar ao íon zinco, resultando em maior potência. Além disso, apresenta estabilidade razoável *in vitro*, boa solubilidade e é relativamente fácil de sintetizar. Essas características desejáveis guiam a pesquisa de novos grupos que possam atuar como ligantes de zinco em inibidores. No entanto, algumas desvantagens também precisam ser consideradas. Devido à sua alta afinidade por metais, a seletividade dos hidroxamatos é questionada, sendo classificados como pan-inibidores, o que significa que sua ação não se restringe apenas às HDACs, mas também abrange outras metaloproteases. Essa pan-inibição é um dos fatores responsáveis por efeitos adversos, resultantes da inibição de aminopeptidases, metaloproteases de matriz e outras enzimas dependentes de zinco. Para superar esses desafios de seletividade e melhorar as propriedades farmacocinéticas dessas moléculas são comumente realizadas

alterações estruturais nas regiões de *cap* e *linker* dos inibidores de HDACs que possuem o ácido hidroxâmico como ZBG (ZHANG *et al.*, 2018).

5.3.2 Benzamida

Os derivados de benzamida (Figura 5) compõem uma importante classe de inibidores de HDACs e em relação aos compostos que fazem uso do ácido hidroxâmico, têm maior seletividade pelas HDACs da classe I, sendo o diferencial desse grupo como ZBG. Geralmente, as benzamidas demonstram valores de IC₅₀ variando de nanomolar a micromolar (FRÜHAUF *et al.*, 2021).

A principal molécula dessa classe é a chidamida (Epidaza®), aprovado pela *National Medical Products Administration* (NMPA) para o tratamento de Linfoma de Células T Periférico (XU *et al.*, 2017). Outras moléculas contendo benzamida como ZBG têm sido desenvolvidas e testadas como inibidores de HDACs, é o caso do entinostate e do mocetinostate que têm sido objeto de diversos ensaios clínicos em cânceres hematológicos (FRACZEK *et al.*, 2013). A tacedinalida aparece em estudos clínicos para mielomas múltiplos, câncer de pulmão e câncer pancreático, no entanto sem resultados publicados.

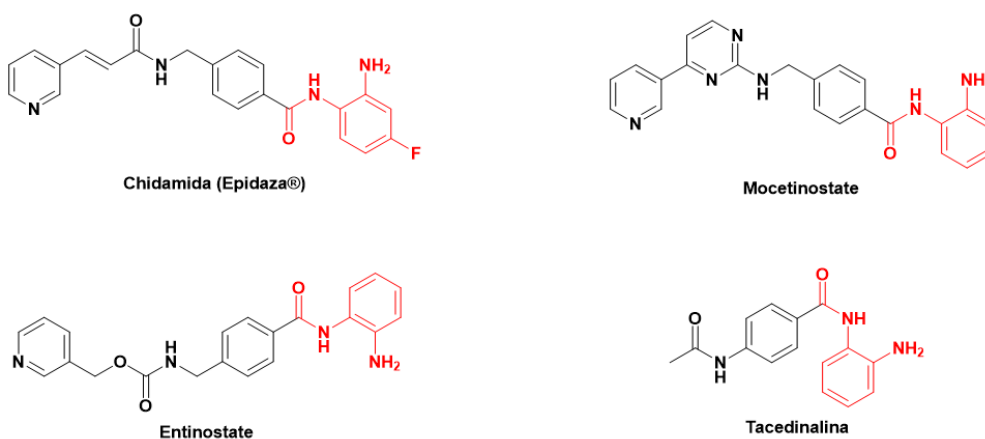


Figura 5. Estruturas químicas de moléculas inibidoras de HDACs com benzamida como ZBG.

5.3.3 Ácido carboxílico

Os inibidores de HDACs derivados de ácidos carboxílicos englobam um pequeno grupo devido à sua fraca capacidade de ligação ao Zn^{2+} (Figura 6), logo pouca atenção é dada à essa classe. Os representantes mais importantes que apresentam IC_{50} na faixa de μM são os ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido valpróico, o ácido butírico (KRAUZE *et al.*, 2015; KUENDGEN *et al.*, 2004) e o fenilbutirato (AVIRAM *et al.*, 1994).

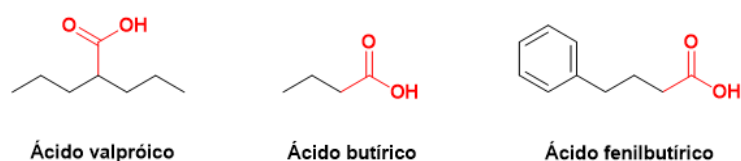


Figura 6. Estruturas de química de moléculas inibidoras de HDACs com ácido carboxílico como ZBG.

5.3.4 Tiol

O grupo tiol é frequentemente utilizado para se ligar a metais no desenvolvimento de fármacos, sendo o captopril um exemplo clássico. Os inibidores contendo tiol como ZBG compõe a maioria dos inibidores de origem natural discutidos anteriormente e apresentados na Figura 3 (HO *et al.*, 2020).

5.4 Desafios farmacocinéticos de fármacos aprovados e que possuem ZBGs clássicos

Um dos maiores desafios, senão o maior, no planejamento e desenvolvimento de novos fármacos se encontra durante a fase de estudos pré-clínicos, especialmente nos testes farmacocinéticos e de toxicidade.

O primeiro inibidor de HDAC aprovado pela FDA para tratamento de Linfoma Cutâneo de Células T refratário, o vorinostate (Zolinza®) possui um perfil metabólico e farmacocinético não muito desejado. A solubilidade aquosa da molécula é em torno de 190 µg/mL (CAI *et al.*, 2010) com permeabilidade celular de 2×10^{-6} cm/s em células Caco-2 (KANTHARAJ *et al.*, 2011). Essas características da molécula a classifica como um medicamento da classe IV no sistema de classificação biofarmacêutica.

Em estudos realizados em cães e ratos, o vorinostate exibiu uma alta taxa de depuração plasmática, isto é, a eficiência com qual o fármaco é metabolizado e eliminado do organismo com uma meia de apenas 12 minutos apresentando uma biodisponibilidade oral de 11% em cães e 2% em ratos (SANDHU *et al.*, 2007). Em termos de metabolismo, o vorinostate apresentou rápida e extensa metabolização por O-glucoronidação, metabolização que facilita a excreção do fármaco e impede a sua interação com a HDAC alvo. O fármaco ainda pode sofrer β -oxidação e seu metabólito pode ser hidrolisado. No entanto não exibiu indução ou inibição de CYPs (KANTHARAJ *et al.*, 2011).

Aprovado pela FDA em 2014, o belinostate (Beleodaq®) é o segundo inibidor de HDAC baseado em ácido hidroxâmico aprovado, indicado para o tratamento de linfoma periférico de células T refratário (PTCL). Em relação ao vorinostate, o belinostate apresenta menor solubilidade em água, com uma solubilidade aquosa de 140 µg/mL e dados sobre sua permeabilidade celular encontram-se indisponíveis sendo assim somente estimar sua classe no sistema de classificação biofarmacêutica como classe II ou IV. Dados pré-clínicos de ADME para o belinostate são limitados e a maioria dos estudos realizados utiliza administração intravenosa (IV) ou intraperitoneal (IP) (MARQUARD *et al.*, 2008;

PLUMB *et al.*, 2003; WARREN *et al.*, 2008), possivelmente devido à sua baixa solubilidade aquosa ou biodisponibilidade limitada. Apesar disso, foi realizado pelo menos um estudo com administração oral em cães, que indicou uma biodisponibilidade de 30% a 35% (STEELE *et al.*, 2011). A taxa de depuração também é elevada, no entanto, o belinostate apresenta meia-vida de aproximadamente 60 minutos em cães, enquanto em camundongos a meia-vida foi de 24 minutos (MARQUARD *et al.*, 2008). Similar ao vorinostate, a glucuronidação, predominantemente mediada pela UDP-glicuronosiltransferase 1A1, é a principal via metabólica, sendo a inativação tão significativa que a FDA recomenda a redução da dose em indivíduos com alelos mutantes dessa enzima, conforme indicado na bula do medicamento (WANG *et al.*, 2013).

O inibidor de HDAC aprovado mais recentemente é o panobinostate (Farydak®) que, além da indicação de tratamento para linfomas de células T, também é indicado para mielomas múltiplos refratários. Os dados de ADME disponíveis para o panobinostate são tão limitados quanto os dados para o belinostate. O panobinostate é apenas ligeiramente solúvel em água. Estudos pré-clínicos em ratos e cães demonstraram uma baixa biodisponibilidade oral, sendo de aproximadamente 6% em ratos e 30% em cães, respectivamente. Esses dados indicam uma absorção limitada do fármaco após administração oral. (KONSOULA *et al.*, 2009). Por sua vez, a meia vida da molécula é mais longa quando comparada ao vorinostate ou belinostate, 174 minutos em camundongos e consideráveis 30 horas em ratos, quando administrado por via intravenosa (KANTHARAJ *et al.*, 2011). A metabolização do panobinostate é semelhante aos seus dois antecessores, o fármaco é extensivamente metabolizado por glicuronidases. Assim, os principais metabólitos encontrados são o fármaco O-glucoronídeos e os produtos de β -oxidação ou hidrólise resultantes dessa glucuronidação (MCCLURE *et al.*, 2018).

A romidepsina, um ciclotetrapeptídeo utilizado no tratamento de Linfoma Cutâneo de Células T refratário, é insolúvel em água podendo ser administrado somente por via intravenosa. Sua meia vida é relativamente longa em camundongos, 348 minutos (GRAHAM *et al.*, 2006). Não há dados sobre administração oral dessa molécula por conta da sua baixa solubilidade em água e assim não há dados relevantes sobre biodisponibilidade. A romidepsina é

altamente ligada às proteínas plasmáticas em humanos, é substrato da glicoproteína P (XIAO *et al.*, 2005) e, além disso, é extensivamente metabolizada no fígado pela CYP3A4 (SHIRAGA *et al.*, 2005).

A chidamida (Epidaza®) é um inibidor de HDAC contendo benzamida como ZBG aprovado pela NMPA. Estudos farmacocinéticos mostraram que a chidamida alcança sua concentração plasmática máxima entre 0,5 e 2 h, dependendo da dose, sendo quantificável por até 72h. A meia vida de eliminação variou entre 16 e 18 h e o fármaco demonstrou alta capacidade de ligação às proteínas plasmáticas. A metabolização ocorre por ação da monoxigenase e por hidrólise da ligação amídica, sendo a maior parte da chidamida excretada na forma de seus metabólitos tanto nas fezes quanto na urina (XU *et al.*, 2017).

6 NOVOS ZBGs: AVANÇOS NA INIBIÇÃO DE HDAC PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER

A procura por inibidores mais potentes e seletivos entre as isoformas de HDACs é uma área de interesse. De modo geral, o desenvolvimento desses inibidores foca em modificações moleculares nas regiões do *cap* e do *linker* mantendo o ZBG, na maioria dos casos, o ácido hidroxâmico. A prevalência do ácido hidroxâmico deve-se à sua alta afinidade de ligação às enzimas dependentes de zinco, como as HDACs. Devido a essa alta afinidade, o ácido hidroxâmico não possui preferência por isoforma de HDACs sendo assim um pan-inibidor. Essa característica não é apreciável pois a pan-inibição pode levar a efeitos adversos quando enzimas em função normal, tanto HDACs quanto outras metaloenzimas, são inibidas indiscriminadamente. Outro obstáculo enfrentado pelos hidroxamatos é sua farmacocinética pobre que se evidencia pela curta meia-vida e baixa biodisponibilidade oral dos HDACs com base no ácido hidroxâmico.

Desse modo, a pesquisa e o desenvolvimento de novos ZBGs com potência similar ou melhor em relação ao ácido hidroxâmico e com seletividades distintas entre as isoformas é desejável.

6.1 Hidrazida

Dentre os ZBGs descobertos mais recentemente, destacam-se as hidrazidas. As hidrazidas constituem um grupo funcional caracterizado pela presença de uma amida N-substituída com um grupo amino. A porção hidrazina ($-NHNH_2$) do grupo confere particular reatividade, permitindo sua participação em reações de acoplamento e na formação de complexos com metais. Essa propriedade torna as hidrazidas particularmente valiosas no desenvolvimento de fármacos, especialmente como inibidores enzimáticos (WANG *et al.*, 2015).

O uso de hidrazidas já é realizado no planejamento de fármacos há mais de 70 anos. O fármaco isoniazida, amplamente utilizado em tuberculose, possui perfis de toxicidade e segurança bem conhecidos, com baixa taxa de hepatotoxicidade e poucos eventos adversos. Estudos farmacocinéticos demonstraram maior biodisponibilidade oral e valores de área sob a curva (AUC) duas vezes maiores em comparação com o ácido hidroxâmico (LI *et al.*, 2020).

Estudos de *docking* molecular indicaram que a hidrazida interage com o íon zinco por meio de uma quelação bidentada, onde a carbonila e a amina da porção hidrazina são as responsáveis (Figura 7). Os estudos utilizaram estruturas com hidrazidas substituídas por grupos alquil na amina terminal e, provavelmente, os resultados se aplicam a hidrazidas substituídas (LI *et al.*, 2018).

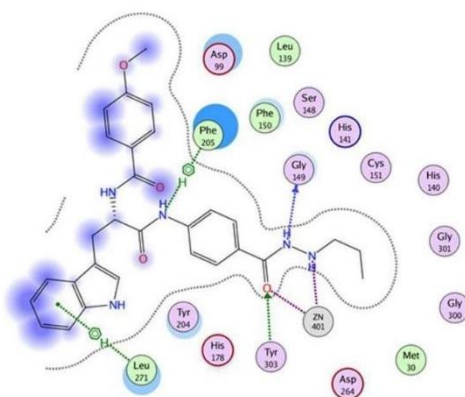


Figura 7. Docking molecular do composto 6 no sítio catalítico da HDAC1. Nota-se a quelação bidentada na qual a hidrazida interage com o zinco com dois pontos de ligação, o oxigênio da carbonila e o nitrogênio da amina (LI *et al.*, 2018).

A cadeia carbônica ligada à amina do grupo hidrazina possui relação provável com a seletividade da molécula. Na Figura 8, é possível observar a hidrazida não-substituída **1**, a qual apresentou atividade somente para as HDACs 1 e 2. Já as moléculas com o nitrogênio da hidrazida substituído por cadeias carbônicas longas (C15-16), compostos **2** e **3**, inibiram somente a HDAC11 em uma baixa concentração. Por outro lado, as moléculas com substituição por grupos alquil menores, como propil e butil, exibiram seletividade pelas HDACs da classe I, com IC₅₀ na faixa de picomolar para a HDAC3. Os compostos **4**, **5**, **6**, **7** e **8** apresentaram todos IC₅₀ abaixo de 100 nM para as

HDACs da classe I (LI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2015; MCCLURE *et al.*, 2016), apresentando resultados semelhantes aos observados com hidrazidas não-substituídas (AL-SANEA *et al.*, 2020), conforme a Tabela 2.

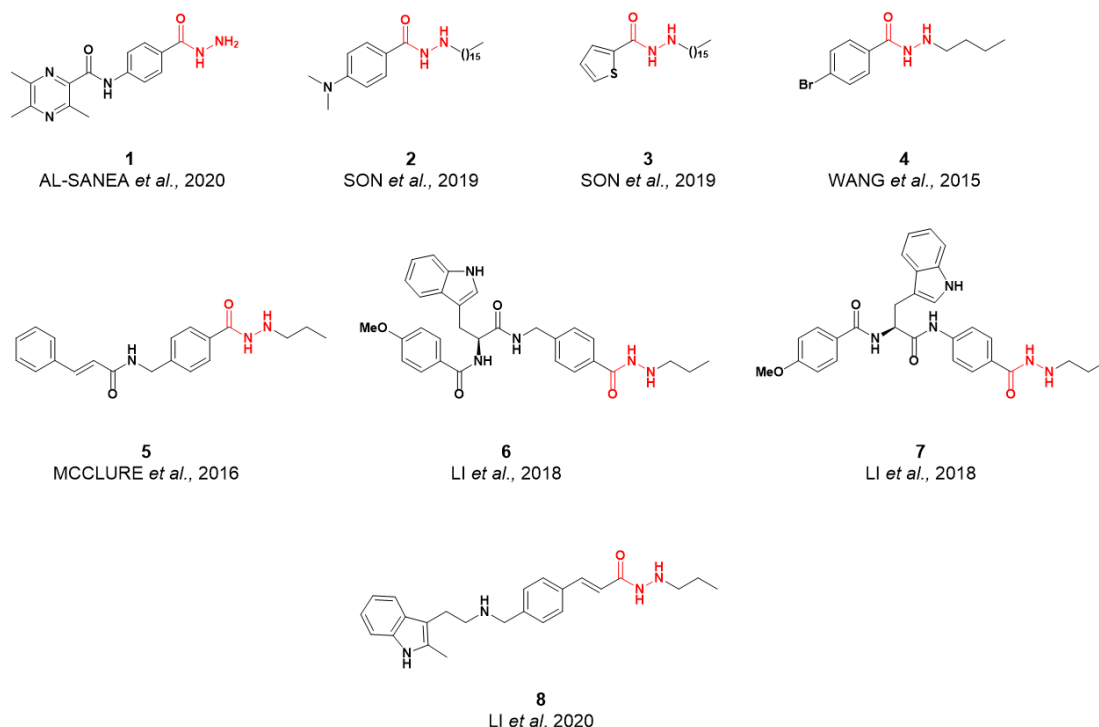


Figura 8. Estruturas químicas de moléculas inibidoras de HDAC em potencial contendo hidrazida como ZBG. A porção hidrazida está destacada em vermelho.

Tabela 2 – Valores de IC₅₀ para compostos contendo hidrazida como ZBG

Comp.	Isoformas de HDAC (IC ₅₀ em nM ou µM)						
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC4	HDAC6	HDAC8	HDAC11
1	114,3 nM	53,7 nM	-	-	-	-	-
2	> 100 µM	-	-	> 100 µM	-	> 100 µM	910 nM
3	> 100 µM	-	-	> 100 µM	-	> 100 µM	830 nM
4	460 nM	133 nM	190 nM	-	9,09 µM	2,83 µM	44,5 µM
5	11,8 nM	95,45 nM	0,95 nM	-	-	-	-
6	63,3 nM	287,1 nM	5,7 nM	-	10 µM	-	-
7	9,54 nM	28,04 nM	1,41 nM	-	-	557 nM	-
8	4,69 nM	46,0 nM	0,28 nM	> 10 µM	> 10 µM	1,75 µM	-

As células destacadas em verde apresentam valores de IC₅₀ excelentes (inferior a 100 nM), em azul, valores bons (inferior a 1µM) e em vermelho valores ruins (superior a 1µM).

Os inibidores de HDAC podem ser classificados de acordo com sua velocidade de indução de acetilação pela ligação às HDACs e pelo tempo até a liberação da enzima. Os ácidos hidroxâmicos são classificados como inibidores de HDAC de ação rápida (*fast-on*) e liberação rápida (*fast-off*), enquanto as

benzamidas são considerados de ação lenta (*slow-on*) e liberação lenta (*slow-off*) (BECONI *et al.*, 2012; CHOU *et al.*, 2008; SCARPELLI *et al.*, 2013).

A interação entre inibidores, como o vorinostate (ácido hidroxâmico), entinostate (benzamida), romidepsina (tiol) e a molécula **4** (hidrazida), com HDACs foi testada *in vitro*, expondo células de uma linhagem celular de câncer de cólon humano (HCT1160). Diferentes culturas de células foram expostas a uma das moléculas citadas para se avaliar a indução de acetilação de histonas. O vorinostate e a romidepsina induziram acetilação dentro do período de 6 horas de exposição. No entanto, após a remoção dos compostos, observou-se um declínio rápido na acetilação nas células expostas ao vorinostate, enquanto nas expostas à romidepsina, o efeito durou cerca de 24 horas. O entinostate apresentou um efeito diferente, com a indução de acetilação sendo notada apenas 18 horas após a remoção da molécula da cultura celular, persistindo por 48 horas. Já para o composto com hidrazida como ZBG, a indução da acetilação durante o período de incubação manteve-se estável por 96 horas, podendo ser classificado como um inibidor de ligação rápida e liberação lenta (WANG, 2015).

Estudos farmacocinéticos e mutagênicos foram feitos com a molécula **8** em comparação com o panobinostate (HDACi hidroxamato). O composto foi administrado via intravenosa (IV) e oral e apresentando meia-vida ($t_{1/2}$) de 15,2 horas por via IV e 7,5 horas por via oral, significativamente que a do panobinostate que possui $t_{1/2}$ de 3 horas por via oral. O valor de área sob a curva (AUC, do inglês *Area Under the Curve*), uma medida que representa a exposição total do organismo a um fármaco ao longo do tempo, e que se relaciona com a eficácia e a duração da ação, para o composto o **8** administrado via oral em uma dose de 20 mg/kg é de 265 ng/mL, o que é duas vezes maior que o valor observado para o panobinostat (126 ng/mL), mesmo administrado em uma dose superior de 50 mg/kg. A biodisponibilidade da hidrazida **8** é consideravelmente maior que a do fármaco comparado: 19,8% e 4,62%, respectivamente (LI *et al.*, 2020).

Tendo em vista as observações farmacocinéticas das hidrazidas, principalmente em relação a outros fármacos com diferentes tipos de ZBGs, sua aplicação nos inibidores de HDAC aparenta ser promissora. A Tabela 1 apresenta os valores de IC₅₀ para a série de moléculas da Figura 9, nota-se que

inibidores contendo hidrazida têm efeito contra boa parte das isoformas de HDACs, com taxa de inibição na faixa de nM e pM. Essas características podem permitir uma melhor relação risco/benefício na aplicação de fármacos contendo hidrazidas, com doses otimizadas em regimes de administração mais eficazes, especificidade na inibição enzimática, menos efeitos adversos e maior probabilidade de desfecho positivo no tratamento do câncer.

6.2 Amida

Inibidores contendo amidas com diferentes padrões de substituição foram propostos como grupos quelantes de zinco (ZBG), e observou-se uma capacidade promissora para essa função em algumas moléculas (FRÜHAUF *et al.*, 2021).

A molécula **9** (Figura 9) foi identificada e selecionada como um potencial inibidor seletivo de HDAC8 em um extenso estudo *in silico* conduzido por Debnath e colaboradores (2019). Os autores propuseram cinco hipóteses farmacofóricas geradas a partir de 32 inibidores já conhecidos e construíram um modelo 3D QSAR, que apresentou um excelente coeficiente de correlação e capacidade preditiva. Este modelo foi utilizado em uma triagem virtual de uma base de dados contendo aproximadamente 4,3 milhões de moléculas, resultando na identificação de várias moléculas protótipo (*hits*). Os *hits* foram otimizados por meio de estudos de *docking* e de um *software* de predição de propriedades farmacocinéticas. Nos ensaios *in vitro*, a molécula **9** demonstrou um valor de IC₅₀ de 9 nM (Tabela 3), estabelecendo-se como uma excelente candidata para futuros ensaios *in vivo* (DEBNATH *et al.*, 2019).

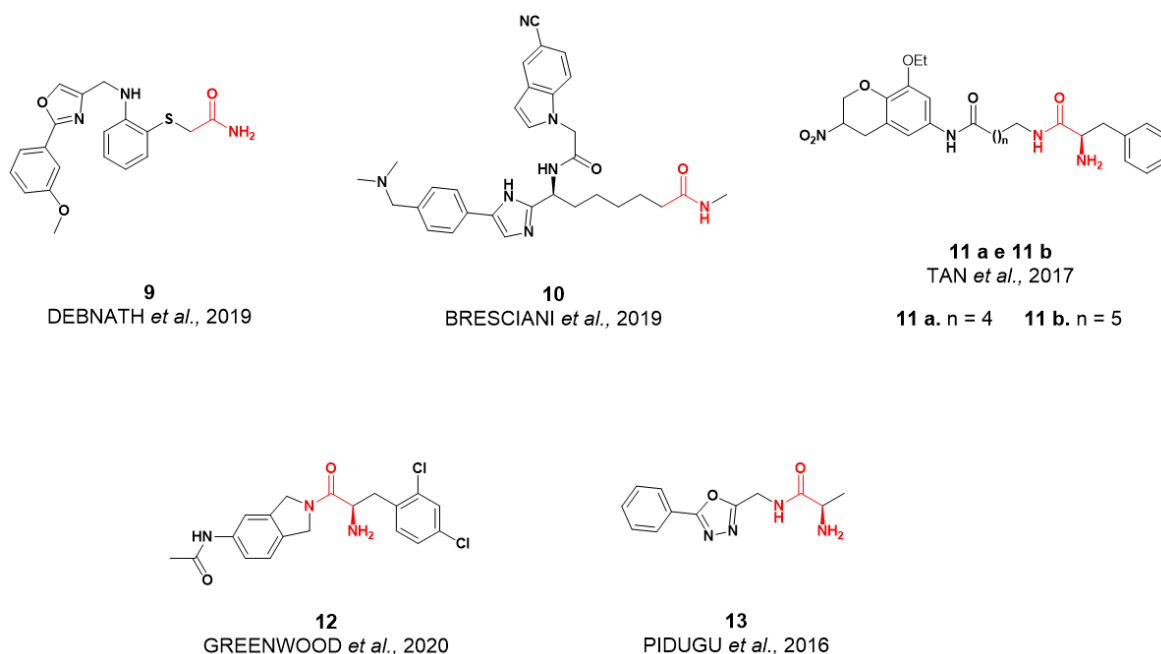


Figura 9. Estruturas químicas de moléculas contendo amida como ZBG, este encontra-se destacado em vermelho.

Tabela 3 – Valores de IC ₅₀ para compostos contendo amida como ZBG					
Comp.	Isoformas de HDAC (IC ₅₀ em nM ou µM)				
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC6	HDAC8
9	-	-	-	> 100 µM	9,0 nM
10	1,3 µM	-	26 nM	-	-
11a	742 nM	2,9 µM	-	-	-
11b	449 nM	1,3 µM	-	-	-
12	-	-	-	-	101 nM
13	260 nM	135 nM	> 10 µM	-	98 nM

As células destacadas em verde apresentam valores de IC₅₀ excelentes (inferior a 100 nM), em azul, valores bons (inferior a 1µM) e em vermelho valores ruins (superior a 1µM).

Com o objetivo de desenvolver um inibidor seletivo para HDAC3, Bresciani e colaboradores (BRESCIANI *et al.*, 2019) planejaram uma série de compostos baseados em amidas N-substituídas e etilcetonas. O estudo utilizou variações nas estruturas do *cap* e do *linker*, chegando na estrutura da molécula **10** (Figura 9), uma etilamida que apresentou valor de IC₅₀ de 26 nM para HDAC3, em comparação a 1,3 µM para HDAC1 (Tabela 3). O composto ainda apresentou boa estabilidade *in vitro*, com tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) superior a 4 horas, tanto em plasma quanto em hepatócitos de camundongos e humanos, apesar da ausência de mais dados farmacocinéticos, essa molécula aparenta ser promissora (BRESCIANI *et al.*, 2019).

Um novo padrão de substituição foi identificado em estudos de novos inibidores de HDAC contendo amida como grupo de ligação a metal (ZBG), especificamente nas α -amino amidas. Três pesquisas resultaram em moléculas com capacidade de inibição *in vitro* promissora, com valores de IC₅₀ na faixa de nanomolar (Figura 9).

A busca por compostos derivados de cumarina como agentes anticancerígenos levou ao planejamento e à síntese de algumas moléculas capazes de atuar como inibidor de HDACs. Os autores propuseram o uso do derivado de cumarina como *cap* e α -amino amidas como ZBG espaçados por um *linker* hidrocarboneto. Na série de compostos sintetizados e testados, as moléculas **11a** e **11b** apresentaram IC₅₀ de 742 nM e 448 nM (Tabela 3), respectivamente, frente à HDAC1 (TAN *et al.* 2017).

Greenwood e colaboradores (2019) também planejaram e desenvolveram uma série de compostos contendo α -amino amidas como grupo ligante de zinco para novos inibidores de HDACs. Entre os compostos estudados, o composto **12** (Figura 9) se destacou, apresentando um IC₅₀ de 101 nM para a isoforma HDAC8 (Tabela 3), enquanto os demais compostos exibiram IC₅₀ na faixa micromolar (GREENWOOD *et al.*, 2019).

Pidugu e colaboradores sintetizaram e testaram uma série de compostos a partir do oxadiazol di-substituído contendo híbridos de glicina e alanina como ZBG. Um dos derivados, a α -amina amida **13** (Figura 9), apresentou resultados promissores na inibição da classe I das HDACs, inibindo as HDACs 1, 2 e 8 com IC₅₀ na faixa de nanomolar (Tabela 3). Estudos *in silico* sugerem que a quelação seja monodentada com importante participação da carbonila na interação com o zinco e dos nitrogênios da amida e da amina interagindo com resíduos de aminoácidos vizinhos adjacentes no sítio de ligação (PIDUGU *et al.*, 2016).

A Figura 10 gerada a partir do *docking* da molécula **13** no sítio catalítico da HDAC8 ilustra as interações intermoleculares que ocorre entre o inibidor de HDAC e enzima. Nota-se que a carbonila do ZBG α -amina amida é a responsável por quelar o zinco, enquanto os nitrogênios restantes interagem com um resíduo de glicina. Vale destacar a importância do *cap* e do *linker* que interagem por meio

de ligações π -stacking com resíduos de fenilalanina, garantindo melhor acomodação da molécula dentro do sítio catalítico.

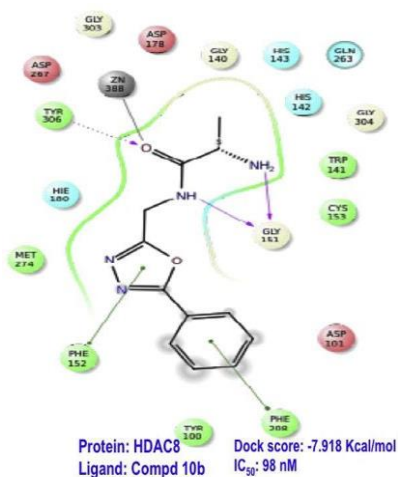


Figura 10. Docking molecular do composto 13 demonstrando as interações no sítio catalítico da HDAC8, é possível notar a quelação monodentada feita pela carbonila no íon zinco (PIDUGU *et al.*, 2019).

Os compostos contendo amida como ZBG aparentam ser promissores para o tratamento de neoplasias, no entanto ainda carecem de ensaios farmacocinéticos de forma para que essas moléculas possam ser melhoradas e seguir para ensaios clínicos.

6.3 Cetona

As cetonas exibem um alto potencial inibitório das HDACs devido à sua capacidade de quelar o íon zinco. O fenômeno ocorre principalmente pela formação de um diol geminal em meio aquoso, em equilíbrio com a forma cetônica. A formação desse diol é influenciada pela substituição nos carbonos adjacentes à carbonila; grupos retiradores de elétrons, como flúor e outros haletos, aumentam a eletrofilicidade da carbonila, facilitando a hidratação. Assim, mesmo em pH fisiológico, a formação do diol geminal intermediário pode ocorrer durante a quelação do íon zinco, no entanto os compostos que

apresentaram melhores resultados como inibidores não apresentam haletos em sua composição (Figura 11), potencializando a atividade inibitória das cetonas sobre as HDACs (MADSEN *et al.*, 2014).

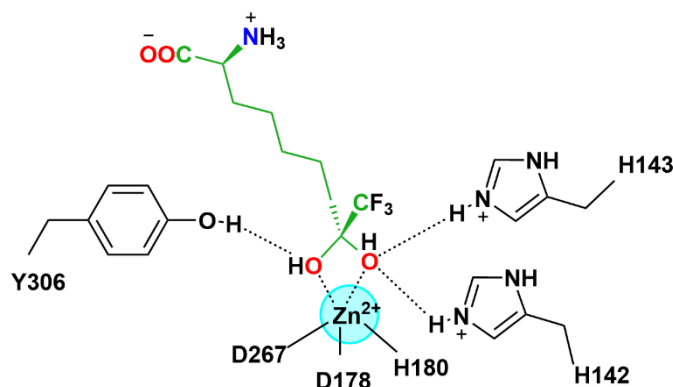


Figura 11. Esquema visual da quelação bidentada por meio de formação de diol geminal em cetonas. A molécula em questão possui um grupo retirador de elétrons vizinho à cetona o que facilita a formação do diol (ILIES *et al.*, 2011).

Moléculas que possuem o grupo cetona como ZBG exibem menor seletividade em comparação com outras classes, inibindo HDACs das classes I, IIa e IIb com concentração na faixa de nanomolar. A falta de seletividade pode ser contornada por alterações nos outros componentes do farmacóforo da HDAC, como o *cap* e o *linker*, e também da substituição adjacente à cetona (YU *et al.*, 2020).

Compostos cetônicos apresentam problemas farmacocinéticos do ponto de vista terapêutico. Esse grupo é caracterizado pela instabilidade no plasma com curtas meia-vidas inferiores a 15 minutos sendo rapidamente reduzidos ao seu álcool correspondente por carbonil redutases (SCARPELLI *et al.*, 2008).

Diante dos desafios e possibilidades ao se usar uma cetona como ZBG, algumas moléculas foram propostas e sintetizadas com objetivo de inibir as HDACs (Figura 12). Bresciani e colaboradores propuseram o uso de etil cetonas como ZBG com *linker* alceno e *cap* composto por grupos aromáticos com algumas variações. Os compostos **14a**, **14b**, **15a** e **15b** exibiram alta potência, mas baixa seletividade, inibindo concomitantemente as HDACs 1, 2 e 3 com a mesma faixa concentração em torno de 1 a 2 nM (Tabela 4). Nota-se a significativa influência dos grupos presentes no *linker* e no *cap* no aumento da potência desses inibidores (BRESICIANI *et al.*, 2019).

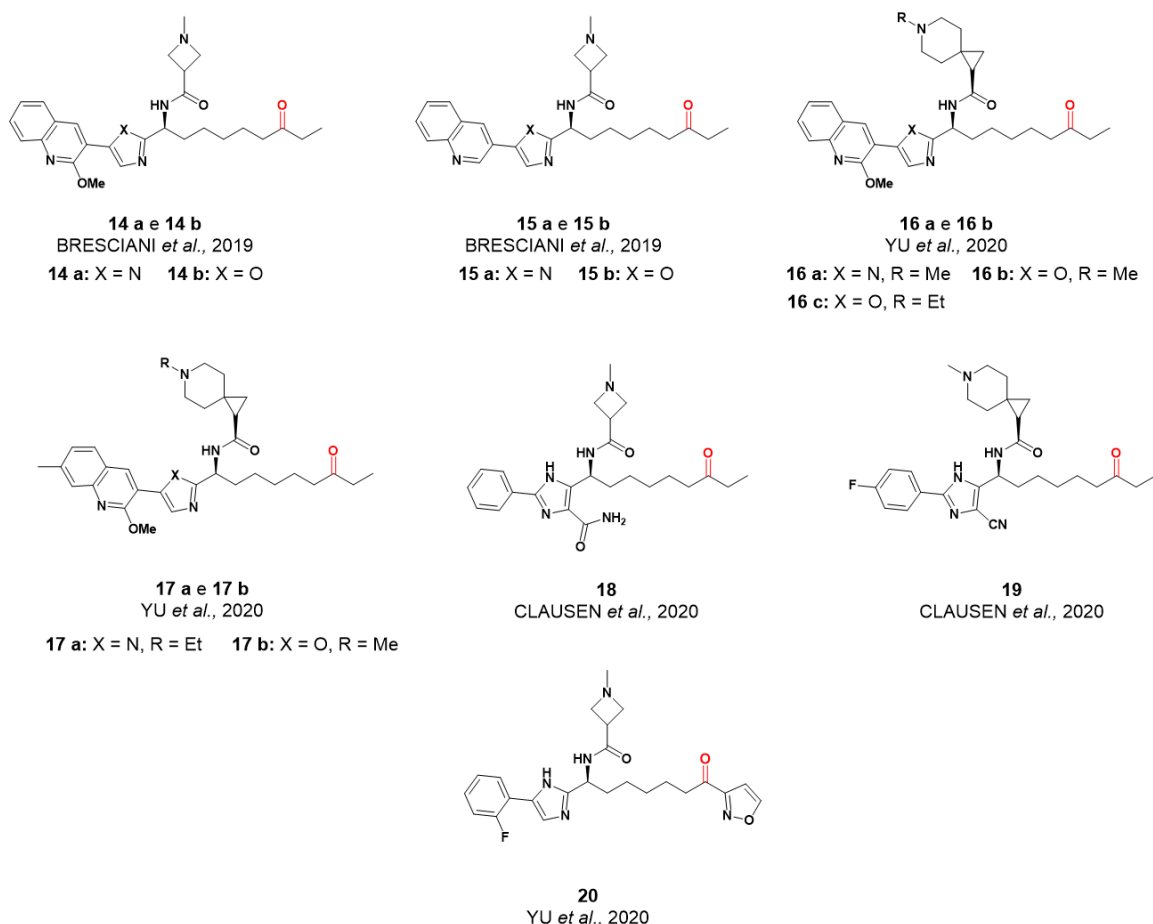


Figura 12. Estruturas químicas de moléculas contendo cetona como ZBG. A cetona está destacada em vermelho.

Tabela 4 – Valores de IC₅₀ para compostos contendo cetona como ZBG

Comp.	Isoformas de HDAC (IC ₅₀ em nM ou µM)							
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC4	HDAC5	HDAC6	HDAC7	HDAC8
14a	13 nM	18 nM	13 nM	>10 µM	> 1 µM	680 nM	> 10 µM	> 10 µM
14b	1,7 nM	2,8 nM	1,1 nM	> 5 µM	> 5 µM	177 nM	> 5 µM	-
15a	1,5 nM	-	-	-	-	-	-	-
15b	12,2 nM	-	-	-	-	-	-	-
16a	0,19 nM	1,40 nM	0,19 nM	-	-	157 nM	-	> 1 µM
16b	1,5 nM	4,7 nM	1,5 nM	-	-	197 nM	-	>10 µM
16c	0,9 nM	4,5 nM	0,6 nM	-	-	137 nM	-	>10 µM
17a	0,3 nM	0,4 nM	0,3 nM	-	-	350 nM	-	> 5 µM
17b	0,35 nM	1,3 nM	0,3 nM	-	-	460 nM	-	> 20 µM
18	1,9 nM	18,1 nM	2,5 nM	-	-	> 5 µM	-	> 5 µM
19	3,8 nM	19,7 nM	2,9 nM	-	-	>20 µM	-	> 10 µM
20	0,08 nM	0,47 nM	0,09 nM	-	-	-	-	3,0 nM

As células destacadas em verde apresentam valores de IC₅₀ excelentes (inferior a 100 nM), em azul, valores bons (inferior a 1µM) e em vermelho valores ruins (superior a 1µM).

Moléculas contendo etilcetona como ZBG foram propostas também por Yu (2020) e Clausen (2020). As principais modificações foram feitas em relação às moléculas anteriormente propostas se deram nos grupos aromáticos heterocíclicos presentes no *linker* dos compostos e na troca do grupo volumoso lateral dos compostos (CLAUSEN *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2020).

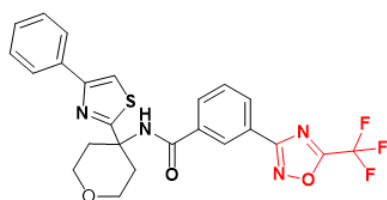
As moléculas **16a**, **16b** e **16c** foram modificadas nos heteroátomos do anel de cinco membros, com imidazol em **16a** e oxazol em **16b** e **16c**. O anel piperidínico também foi alterado, com metilpiperidina em **16a** e **16b**, e etilpiperidina em **16c**. As moléculas **17a** e **17b** sofreram modificações semelhantes, exceto pela conversão do anel quinolina em 7-metilquinolina (YU *et al.*, 2020). Tais modificações afetaram o valor de IC₅₀ dessas moléculas e sua seletividade frente as isoformas de HDACs (Tabela 4).

Clausen (2020) propôs moléculas preservando o ZBG etilcetona e o *linker* com cinco carbonos, com base nas propostas de Bresciani (2019) e Yu (2020), mesclando as modificações nos grupos volumosos feitas por esses autores e sugerindo um novo grupo como *cap*. As moléculas projetadas incluíram metilazetidina (**18**) e metilpiperidina (**19**) na cadeia lateral, com o cap de fenil (**18**) e flúorfenil (**19**). Em ambas, o anel imidazol foi mantido, mas com substituintes diferentes: amida na molécula **18** e ciano na molécula **19** (CLAUSEN *et al.*, 2020). Essas moléculas apresentaram excelentes valores de IC₅₀ abaixo de 20nM mantendo considerável seletividade pelas HDACs de 1 a 3 (Tabela 4).

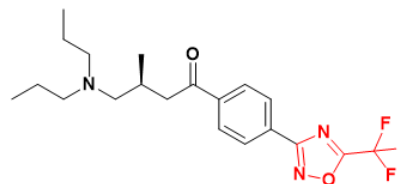
Yu (2020) também propôs a molécula **20**, que apresentou valores de IC₅₀ abaixo de 0,5 nM para HDACs 1 a 3 e 3 nM para HDAC8 (Tabela 4). A principal modificação em relação às outras moléculas foi a troca do ZBG etilcetona por metilisoxazolcetona, o que resultou em maior taxa de inibição enzimática e surgimento de efeito sobre HDAC8 (YU *et al.*, 2020).

6.4 Trifluormetiloxadiazol e difluormetiloxadiazol

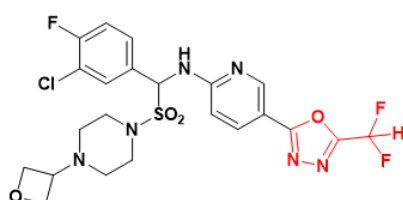
Duas classes interessantes e similares de ZBGs é a dos trifluormetiloxadiazóis (TFMO) e dos difluormetiloxadiazóis (DFMO), compostos heterocíclicos que aparentam realizar uma interação não quelante com o íon zinco, com taxa inibitória na faixa nanomolar (Figura 13). Os grupos TFMO interage com o Zn²⁺ por meio do oxigênio do grupo oxazol e do átomo de flúor do grupo trifluormetil, com distâncias de 3,0 Å e 2,7 Å, respectivamente (LOBERA *et al.*, 2013).



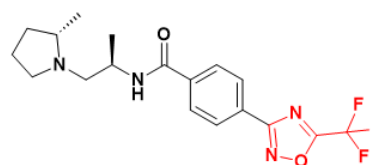
21
LOBERA *et al.*, 2013



22
HEBACH *et al.*, 2013



23
LEE *et al.*, 2017



24
STOTT *et al.*, 2021

Figura 13. Estruturas químicas de moléculas contendo TFMO e DFMO (destacados em vermelho) como ZBGs.

Tabela 5 – Valores de IC₅₀ para compostos contendo TFMO como ZBG

Comp.	Isoformas de HDAC (IC ₅₀ em nM ou µM)				
	HDAC4	HDAC5	HDAC6	HDAC7	HDAC9
21	157 nM	97 nM	> 5 µM	43 nM	23 nM
22	3 nM	10 nM	> 5 µM	10 nM	10 nM
23	-	-	14 nM	-	-
24	10 nM	20 nM	> 20 µM	20 nM	30 nM

As células destacadas em verde apresentam valores de IC₅₀ excelentes (inferior a 100 nM), em azul, valores bons (inferior a 1µM) e em vermelho valores ruins (superior a 1µM).

O composto **21** foi identificado por Lobera e colaboradores (2013) como um inibidor seletivo de histonas desacetilases (HDACs) da classe IIa, apresentando atividade inibitória de 23 nM (HDAC9), 43 nM (HDAC7), 97 nM (HDAC5) e 157 nM (HDAC4) (Tabela 5). O composto **22**, patenteado em 2013, apresentou IC₅₀ abaixo de 10 nM, menor que o composto **21**, mas com seletividade semelhante (Hebach *et al.*, 2013).

Os bons resultados obtidos por Lobera e colaboradores (2013) e Hebach e colaboradores (2013) inspiraram os trabalhos de Lee (2017) e Stott (2021). A molécula **23** foi desenvolvida a partir da modificação do grupo

trifluormetiloxadiazol, com a troca de um átomo de flúor por um átomo de hidrogênio, resultando no ZBG difluormetiloxadiazol. Curiosamente, essa simples modificação alterou completamente a seletividade e a taxa de inibição das isoformas de HDACs. O composto **23** foi patenteado como um inibidor seletivo de HDAC6, com taxa de inibição de apenas 14 nM (LEE *et al.*, 2017).

Para superar a instabilidade metabólica do composto **22**, devido à presença de uma amina lipofílica básica, foi proposto o composto **24**, no qual a amina foi substituída por um anel de pirrolidina substituído com um grupo metila. Essa troca alterou a taxa de inibição das isoformas de HDACs, mas manteve os valores de IC₅₀ na faixa nanomolar. Apesar disso, a seletividade permaneceu, inibindo as HDACs 4, 5, 7 e 9 (STOTT, 2021). Do ponto de vista farmacocinético, o composto **24** demonstrou propriedades satisfatórias, sendo estável tanto no plasma de camundongos quanto no plasma humano, além de em fluido gástrico simulado. A molécula distribuiu-se preferencialmente no sangue em relação ao plasma (proporção de 3:1), com uma fração não ligada de 0,73 no sangue, determinada por diálise de equilíbrio. Nos estudos de farmacocinética, o composto foi administrado por via intravenosa e oral em camundongos, apresentando 100% de biodisponibilidade oral, alto volume de distribuição (3,8 L/kg) e alta depuração plasmática (4,2 L/h/kg), alcançando a concentração máxima no sangue em 0,5 horas.

6.5 Tiazolidinodiona

Historicamente, as tiazolidinodionas (TZDs) foram avaliadas por Mohan e colaboradores (MOHAN *et al.*, 2012) por seu potencial como grupo de ligação ao zinco (ZBG), em estudos que investigaram sua eficácia contra células cancerígenas do fígado. Nesse estudo, as TZDs foram planejadas, sintetizadas e testadas *in vitro*, resultando em aproximadamente 50% de morte celular após 48 horas de incubação com concentrações na faixa de micromolar. Essas descobertas ajudaram impulsionar as TZDs como uma classe promissora de ZBGs.

Essa constatação estimulou novas tentativas de planejamento e síntese de compostos que incorporassem a estrutura TZD como grupos quelantes de zinco em inibidores de histona desacetilases (HDACs). Recentemente, foram desenvolvidas moléculas promissoras, como os compostos **25**, **26**, **27** e **28** (Figura 14), que apresentaram valores de IC_{50} na ordem de micromolar para a maioria das isoformas de HDACs, com alguns alcançando IC_{50} na faixa de nanomolar (Tabela 6) (TILEKAR *et al.*, 2021).

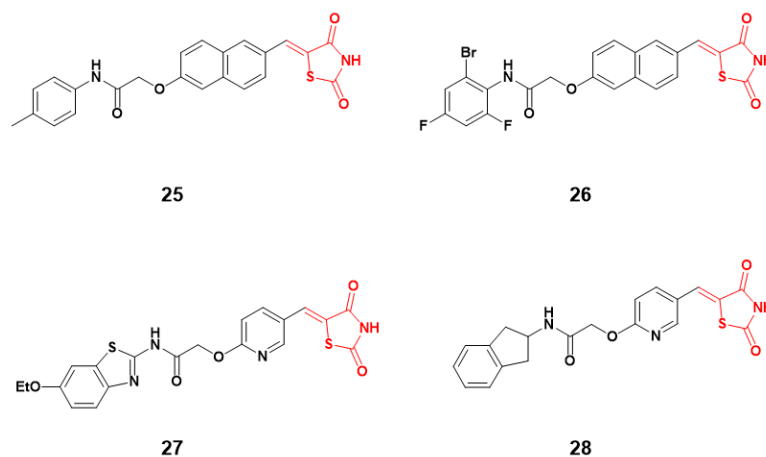


Figura 14. Estruturas químicas de moléculas contendo TZD como ZBG, destacado em vermelho. Todas estruturas propostas por TILEKAR *et al.*, 2021.

Tabela 6 – Valores de IC₅₀ para compostos contendo TZD como ZBG

Comp.	Isoformas de HDAC (IC ₅₀ em nM ou µM)					
	HDAC 1	HDAC 3	HDAC 4	HDAC 6	HDAC 7	HDAC 8
25	-	-	1,7 µM	-	-	9,0 µM
26	-	-	1,1 µM	-	-	50 µM
27	18 µM	20 µM	4,9 µM	15 µM	> 50 µM	> 50 µM
28	7,4 µM	3,1 µM	750 nM	15 µM	13 µM	12 µM

As células destacadas em verde apresentam valores de IC₅₀ excelentes (inferior a 100 nM), em azul, valores bons (inferior a 1µM) e em vermelho valores ruins (superior a 1µM).

As moléculas **27** e **28** apresentam como principal modificação estrutural a substituição do grupo naftil por um grupo piridínico. Essa alteração resultou em uma mudança no perfil de seletividade, uma vez que esses compostos demonstraram atividade inibitória para as isoformas HDAC1, HDAC3, HDAC4, HDAC6, HDAC7 e HDAC8, diferentemente dos compostos **25** e **26**, que são mais seletivos para HDAC4 e HDAC8, apresentando valores de IC₅₀ predominantemente na faixa de micromolar. Notavelmente, o composto **28** inibiu a atividade da HDAC4 com uma concentração de 750 nM (Tabela 6). Estudos *in silico* corroboram a quelação do Zn²⁺ pela carbonila do TZD (TILEKAR *et al.*, 2021). Estudo realizado por Tilekar e colaboradores (2021) demonstrou a partir de resultados de *docking* molecular que a quelação do zinco pelo TZD é monodentada e que tanto o *linker* quanto o *cap* possuem papel fundamental na acomodação da molécula dentro do sítio catalítico da HDAC (Figura 15).

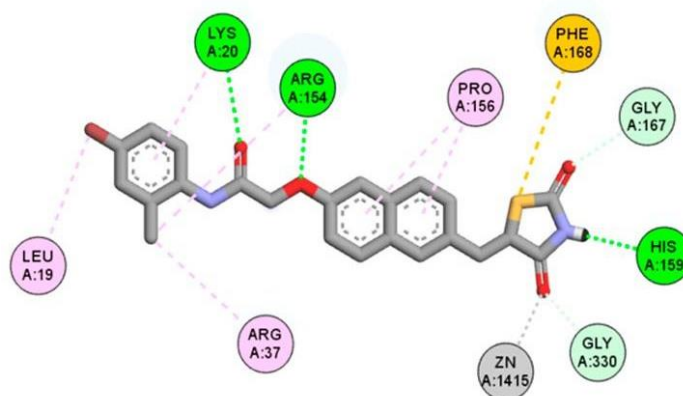


Figura 15. *Docking* molecular demonstrando a quelação monodentada do TZD com o zinco. Molécula proposta por Tilekar (2021) não selecionada para este trabalho (TILEKAR *et al.* 2021).

A farmacocinética dessas moléculas ainda não foi publicada na literatura, no entanto, considerando o *status* promissor do uso de tiazolidinediona (TZD) como grupo de ligação de zinco (ZBG), é provável que esses estudos sejam

realizados em breve. A realização de pesquisas farmacocinéticas poderá ampliar o entendimento sobre as aplicações terapêuticas de compostos existentes ou até mesmo contribuir para o desenvolvimento de novas moléculas, abordando os desafios farmacocinéticos que possam surgir. Essa perspectiva encoraja um aprofundamento nas investigações e potencializa a exploração das propriedades desses compostos no contexto clínico.

7 DISCUSSÃO

A inibição da atividade das histonas desacetilases é uma estratégia promissora no tratamento de neoplasias e tem recebido maior atenção nos últimos anos. Os inibidores de HDACs utilizados nessa abordagem têm seu desempenho diretamente relacionado com sua capacidade de se ligar ao íon zinco no centro catalítico da enzima e a especificidade com a qual inibe diferentes isoformas de HDAC. A potência dessas moléculas é um fator de relevada importância, pois muitas outras enzimas existentes na nossa espécie são metaloproteínas e podem ter sua atividade comprometida por essas moléculas a depender da concentração administrada. Os aspectos farmacocinéticos são determinantes na escolha da via de administração, concentração e da determinação da relação custo-benefício ao se adotar o uso de alguma nova medicação. De modo geral, essas características se misturam e precisam ser vistas em conjunto para se propor novos fármacos ou, neste caso, novos grupos ligantes de zinco para compor um futuro tratamento clínico.

Os ácidos hidroxâmicos são os ZBGs mais utilizados em inibidores de HDAC com algumas moléculas já a provadas para uso na terapêutica. Sua alta potência devida à alta afinidade pelo Zn^{2+} é um dos fatores fundamentais para seu uso, no entanto tal potência é acompanhada pela baixa seletividade entre as diferentes isoformas de HDAC e outras metaloenzimas, sendo assim conhecidos como pan-inibidores que culmina com o surgimento de efeitos adversos significativos. Do ponto de vista farmacocinético apresenta baixa biodisponibilidade oral e curta meia vida causa a necessidade de administrações mais frequentes e por via intravenosa, limitando sua aplicação clínica.

Por outro lado, as benzamidas destacam-se pela alta seletividade para HDACs da classe I (HDAC1, 2, 3 e 8) sendo uma alternativa que causa menos efeitos adversos, mas também limitada ao tratamento de neoplasias relacionadas a outras isoformas da HDAC. Apesar disso, possui potência aceitável na faixa de nanomolar permitindo menores doses e com um perfil de segurança superior aos hidroxamatos. O perfil farmacocinético das benzamidas

se mostra interessante, apesar da baixa disponibilidade oral possui um tempo de meia vida relativamente longo.

Os tíóis, por sua vez, se apresenta como um pró-fármaco no único inibidor aprovado pela FDA que contém um ZBG diferente do ácido hidroxâmico até o momento. Demonstra uma alta potência, mas com grandes desafios farmacocinéticos, não podendo ser administrado por via oral devido à sua insolubilidade em água e necessita de ação enzimática para metabolização do pró-fármaco para forma ativa da molécula.

Os desafios apresentados por essas moléculas servem como um norte para o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos com capacidade de inibir HDACs. Atualmente, existem diversos novos grupos químicos sendo propostos e testados quando sua capacidade de inibição com maior potência, seletividade e farmacocinética mais favorável e viável.

Nesse contexto, uma das classes mais promissoras é a das hidrazidas. Sua aplicação como ZBG apresenta alta seletividade para isoformas da classe I e para HDAC11 (classe IV), potência elevada com IC_{50} na faixa de nanomolar e picomolar e com perfil farmacocinético melhorado, quando comparado com o ácido hidroxâmico, exibindo maior biodisponibilidade oral e maior meia-vida. Tais características são desejáveis do ponto de vista clínico, pois podem significar menos administrações em menores doses e com menos efeitos adversos.

Moléculas usando cetona demonstraram altíssima potência, com diversas moléculas atingindo valores de IC_{50} na faixa de nanomolar e picomolar. Porém, sua baixa seletividade, inibindo concomitantemente HDACs da classe I e IIa com potência similares, e ainda instabilidade farmacocinética (meia-vida inferior a 15 minutos) limitam sua aplicação clínica. No entanto, otimizações estruturais no *linker* e *cap* de moléculas contendo cetona como ZBG podem viabilizar a o desenvolvimento e aplicação desses compostos na terapêutica.

Uma classe interessante, tanto pelo seu potencial quanto pelo seu mecanismo de inibição, é a dos trifluormetiloxadiazóis (TFMO), que apresenta seletividade pela classe IIa das HDACs, com potência na faixa de nanomolar. Diferentemente dos outros ZBGs presentes nesta revisão, o TFMO interage com o zinco de forma não-quelante, o que pode significar menor inibição de outras

metaloproteínas. Contudo, existe a carência de estudos para melhor definição de seu estudo farmacocinéticos, os ensaios feitos até o momento são empolgantes, os compostos apresentaram alta biodisponibilidade oral e estabilidade plasmática. A maioria dos estudos englobou o perfil de inibição *in vitro*, indicando que modificações estruturais feitas nos compostos podem melhorar a seletividade sem comprometimento da potência, sendo um futuro candidato a terapias mais seletivas e menos tóxicas.

A classe das tiazolidinodionas (TZD) apresentou seletividade para HDAC8 e HDAC4, com inibição na faixa de nanomolar para uma das moléculas frente à HDAC8 (9nM) e HDAC4 (750 nM). As modificações propostas demonstraram a capacidade de variar a seletividade desse ZBG e direcionar a inibição. Há carência de estudos farmacocinéticos dessas moléculas, porém pode ser uma alternativa interessante para tratamentos específicos e mais seguros em futuro próximo.

CONCLUSÃO

A diversidade dos grupos ligantes de zinco (ZBGs) tem o potencial de trazer avanços significativos para a terapêutica do câncer. A relação direta entre a superexpressão de isoformas específicas de HDAC e determinados tipos de neoplasias ressalta a importância de desenvolver tratamentos mais seletivos, capazes de atuar de forma direcionada em diferentes tipos de câncer e com menor risco de efeitos adversos. Isso é especialmente relevante considerando a agressividade dos tratamentos quimioterápicos convencionais e os graves efeitos colaterais, muitas vezes decorrentes da falta de especificidade dos alvos terapêuticos.

Este trabalho de revisão proporcionou uma ampla compreensão dos avanços recentes no planejamento e desenvolvimento de novos ZBGs aplicados aos inibidores de HDACs. Identificou-se um vasto conjunto de novos ZBGs que apresentam propriedades farmacocinéticas superiores às dos ligantes atuais, seletividades aprimoradas entre as isoformas de HDAC e menores valores de IC₅₀. Tais inibidores demonstram grande potencial para aprimorar a eficácia terapêutica e despontam como candidatos promissores para ensaios clínicos.

Espera-se que esta revisão contribua para o direcionamento de futuras pesquisas voltadas ao desenvolvimento de inibidores de HDACs baseados nos novos ZBGs apresentados, com vistas à sua aplicação terapêutica no tratamento de diferentes neoplasias.

REFERÊNCIAS

- AL SANEH, M., *et al.* Design, Synthesis and Biological Evaluation of New HDAC1 and HDAC2 Inhibitors Endowed with Ligustrazine as a Novel Cap Moiety. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 14, 497–508, fev. 2020.
- ALBERTS, B. *et al.* DNA, cromossomos e genomas. *In*: ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. Cap. 4. p.173 – 236.
- ANAND, U., *et al.* Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. **Genes & Diseases**, v. 10, p. 1367-1401, jul. 2023.
- AVIRAM, A., *et al.* Comparison between the effect of butyric-acid and its prodrug pivaloyloxymethylbutyrate on histones hyperacetylation in an HL-60 leukemic cell line. **International Journal of Cancer**, v. 56, p. 906-909, mar. 1994.
- BECONI, M. *et al.* Oral Administration of the Pimelic Diphenylamide HDAC Inhibitor HDACi 4b Is Unsuitable for Chronic Inhibition of HDAC Activity in the CNS In Vivo. **Plos One**, v. 7, p. 1-16, set. 2012.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Tratamento do câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2022.
- BRESCIANI, A. *et al.* Improved Selective Class I HDAC and Novel Selective HDAC3 Inhibitors: Beyond Hydroxamic Acids and Benzamides. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 481–486, abr. 2019.
- CAI, Y. *et al.* Solubilization of vorinostat by cyclodextrins. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 35, p. 521-526, set. 2010.
- CHOU, C. J.; HERMAN, D.; GOTTESFELD, J. M. Pimelic Diphenylamide 106 Is a Slow, Tight-binding Inhibitor of Class I Histone Deacetylases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 35402 – 35409, dez. 2008.

CLAUSEN, D. J, *et al.* Development of a Selective HDAC Inhibitor Aimed at Reactivating the HIV Latent Reservoir. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, p. 1-7, set. 2020.

DEBNATH, S., *et al.* Discovery of Novel Potential Selective HDAC8 Inhibitors by Combine Ligand-Based, Structure-Based Virtual Screening and in-Vitro Biological Evaluation. **Scientific Reports**. V. 9, p. 1–14, nov. 2019.

DENG, Y.; CHENG, Q.; HE, J. HDAC inhibitors: Promising agents for leukemia treatment. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 680, p. 61-72, set. 2023.

FRACZEK, J.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, V. Toxicological and metabolic considerations for histone deacetylase inhibitors. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 9, p. 441-457, abr. 2013.

FRÜHAUF, A.; MEYER-ALMES, F. J. Non-Hydroxamate Zinc-Binding Groups as Warheads for Histone Deacetylases. **Molecules**. v. 26, p. 1-39, ago. 2021.

GRAHAM, C., *et al.* Evaluation of the Antitumor Efficacy, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of the Histone Deacetylase Inhibitor Depsipeptide in Childhood Cancer Models In vivo. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 223-234, jan. 2006.

GREENWOOD, S., *et al.* Potent Non-Hydroxamate Inhibitors of Histone Deacetylase-8: Role and Scope of an Isoindolin-2-Yl Linker with an α -Amino Amide as the Zinc-Binding Unit. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, p. 1-7, mar. 2020.

HEBACH, C., Novel Trifluoromethyl-Oxadiazole Derivatives and Their Use in the Treatment of Disease. WO 2013080120 A1, jun. 2013.

HO, T. C. S.; CHAN, A. H. Y; GANESAN, A. Thirty Years of HDAC Inhibitors: 2020 Insight and Hindsight. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 12460-12484, jul. 2020.

KANTHARAJ, E.; JAYARAMAN, R. Histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents for cancer therapy: Drug metabolism and pharmacokinetic properties. In: RUNDFELDT, C. (org.), **Drug development—A case study**

based insight into modern strategies, 1 ed, Rijeka: IntechOpen, 2011. cap. 5, p. 101-120.

KASHYAP, A. K., DUBEY, S. K. Molecular mechanisms in cancer development. *Understanding Cancer: From Basics to Therapeutics*, 1^a Ed. Cambridge: Academic Press, 2022.

KIM, D.; SHIN, J.; KWON, H. J. Psammaplin A is a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylase. **Experimental & Molecular Medicine**, 39, p. 47-55, fev. 2007.

KONSOULA, Z., *et al.* Pharmacokinetics-pharmacodynamics and antitumor activity of mercaptoacetamide-based histone deacetylase inhibitors. **Molecular Cancer Therapeutics**, vv. 8, p. 2844-2851, out. 2009.

KRAUZE, A., *et al.* A phase 2 study of concurrent radiation therapy, temozolomide, and the histone deacetylase inhibitor valproic acid for patients with glioblastoma. **International Journal of Radiation Oncology**, v. 92, p. 986–992, abr. 2015.

KUENDGEN, A. *et al.* Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. **Blood**, v. 104, p. 1266-1269, set. 2004.

LEE, J., 1,3,4-Oxadiazole Sulfamide Derivative Compounds as Histone Deacetylase 6 Inhibitor, and the Pharmaceutical Composition Comprising the Same. WO 2017018805 A1, jun. 2017.

LI, Y; SETO, E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 10, p. 1-34, out. 2016.

LI, X. *et al.* Class I HDAC Inhibitors Display Different Antitumor Mechanism in Leukemia and Prostatic Cancer Cells Depending on Their P53 Status. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, p. 2589-2603, mar. 2018

LI, X. *et al.* Design of Hydrazide Bearing HDACIs Based on Panobinostat and Their P53 and FLT3-ITD Dependency in Antileukemia Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 5501–5525, mai. 2020.

LOBERA, M., *et al.* Selective Class IIa Histone Deacetylase Inhibition via a Nonchelating Zinc-Binding Group. **Nature Chemical Biology**, v. 9, p. 319–325, mar. 2013.

LÓPEZ, J. E.; SILUVAN, E. D; FIERKE, C. A. Metal-dependent Deacetylases: Cancer and Epigenetic Regulators. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 3, p. 706-716, fev. 2016.

MADSEN, A. S., *et al.* The effect of various zinc binding groups on inhibition of histone deacetylases 1-11. **ChemMedChem**, v. 9, p.614-626, mar. 2014.

MANAL, M., *et al.* Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review. **Bioorganic Chemistry**, v. 67, p. 18-42, mai. 2016.

MARQUARD, L., *et al.* Monitoring the effect of belinostat in solid tumors by H4 acetylation. **APMIS**, v. 116, p. 382-392, jan. 2008.

MCCLURE, J. *et al.* Development of Allosteric Hydrazide-Containing Class I Histone Deacetylase Inhibitors for Use in Acute Myeloid Leukemia. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 9942–9959, out. 2016.

MCCLURE, J.; LI, X.; CHOU, C. J. Advances and Challenges of HDAC Inhibitors in Cancer Therapeutics. **Advances in Cancer Research**, v. 138, p. 183-211, 2018.

MOHAN, R. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel 2,4-Thiazolidinedione. **Medicinal Chemistry Research.**, v. 21, p. 1156–1165, mar. 2012

PARBIN *et al.* Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62, p. 11-33, jan. 2014.

PIDUGU, V., *et al.* Design and Synthesis of Novel HDAC8 Inhibitory 2,5-Disubstituted-1,3,4-Oxadiazoles Containing Glycine and Alanine Hybrids with Anti Cancer Activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 5611–5617, nov. 2016.

PLUMB, J., *et al.* Pharmacodynamic response and inhibition of growth of human tumor xenografts by the novel histone deacetylase inhibitor PXD101. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 2, p. 721-728, ago. 2003.

ROY, R., *et al.* Single Inhibitors versus Dual Inhibitors: Role of HDAC in Cancer. **ACS Omega**, v. 8, p. 16532-16544, mai. 2023.

SANDHU, P. *et al.* Disposition of Vorinostat, A Novel Histone Deacetylase Inhibitor and Anticancer Agent, in Preclinical Species. **Drug Metabolism Letters**, v. 1, p. 153-151, 2007.

SANTOS, M. O. *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, p. 1-12, jan. 2023.

SCARPELLI, R. *et al.* Studies of the metabolic stability in cells of 5-(trifluoroacetyl)thiophene-2-carboxamides and identification of more stable class II histone deacetylase (HDAC) inhibitors. **Bioorganic & medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 6078-6082, dez. 2008.

SCHUETZ, A., *et al.* Human HDAC7 harbors a class IIa histone deacetylase-specific zinc binding motif and cryptic deacetylase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 17, p. 11355-11363, abr. 2008.

SETO, E.; YOSHIDA, M. Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, p.1-26, abr. 2014.

SHIRAGA, T., *et al.* Identification of Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of FK228, a Potent Histone Deacetylase Inhibitor, in Human Liver Microsomes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 124-129, set. 2005.

SON, S., *et al.* Activity-Guided Design of HDAC11-Specific Inhibitors. **ACS Chemical Biology**, v. 14, p. 1393–1397, jul. 2019.

STEELE, N., *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of an oral formulation of the histone deacetylase inhibitor Belinostat (PXD101). **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 67, p. 1273-1279, ago. 2011.

STOTT, A., *et al.* Evaluation of 5-(Trifluoromethyl)-1,2,4-Oxadiazole-Based Class IIa HDAC Inhibitors for Huntington's Disease. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 380–388, mar. 2021.

TAN, S., *et al.* Design, Synthesis and Tumor Cell Growth Inhibitory Activity of 3-Nitro-2 H-Cheromene Derivatives as Histone Deacetylases Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 4123–4132, ago. 2016.

TILEKAR, K., *et al.* Thiazolidinedione “Magic Bullets” Simultaneously Targeting PPAR γ and HDACs: Design, Synthesis, and Investigations of Their In Vitro and In Vivo Antitumor Effects. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 6949–6971, mai. 2021.

WANG, L., *et al.* Glucuronidation by UGT1A1 Is the Dominant Pathway of the Metabolic Disposition of Belinostat in Liver Cancer Patients. **Plos One**, v. 9, p. 1–10, jan. 2013.

WANG, Y. *et al.* Identification of Histone Deacetylase Inhibitors with Benzoylhydrazide Scaffold That Selectively Inhibit Class I Histone Deacetylases. **Chemistry & Biology**, v. 22, p. 273–284, fev. 2015.

WARREN, K., *et al.* Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of the histone deacetylase inhibitor, belinostat (PXD101), in non-human primates. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 62, p. 433–437, ago. 2008.

XIAO, J., *et al.* Efflux of Depsipeptide FK228 (FR901228, NSC-630176) Is Mediated by P-Glycoprotein and Multidrug Resistance-Associated Protein 1. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 390, p. 268–276, abr. 2005.

XU, Y.; ZHANG, P.; LIU, Y. Chidamide tablets: HDAC inhibition to treat lymphoma. **Drugs of Today**, v. 53, p. 167–176, 2017.

YOSHIDA, M.; KIJIMA, M. AKITA, M; BEPPU, T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 17174–17179, out. 1990.

YU, W., *et al.* Discovery of Ethyl Ketone-Based HDACs 1, 2, and 3 Selective Inhibitors for HIV Latency Reactivation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, p. 1-8, jul. 2020.

ZHANG, L. *et al.* Zinc binding groups for histone deacetylase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 33, n. 1, p. 714-721, dez. 2018.



Documento assinado digitalmente
SAMUEL JUNIOR DE MELO
Data: 14/10/2024 10:23:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Samuel Junior de Melo

A handwritten signature in blue ink, reading "Roberto Parise Filho".

Prof. Dr. Roberto Parise Filho