

Doenças Falciformes, identificando potenciais alvos-terapêuticos a serem explorados em futuros ensaios clínicos.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.063>

POTENTE REATIVAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL POR NOVO INIBIDOR SELETIVO DE HISTONA DEACETILASE 1 E 2

VGF Pastre ^a, AR Pavan ^a, C Lanaro ^a,
DM Albuquerque ^a, RC Chelucci ^b, LLG Ferreira ^b,
AD Andricopulo ^b, JLD Santos ^c, FF Costa ^a

^a Centro de Hematologia e Hemoterapia
(Hemocentro), Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^b Instituto de Física de São Carlos, Universidade de
São Paulo (USP), São Carlos, SP, Brasil

^c Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara,
SP, Brasil

Introdução: A reativação dos genes da γ -globina (HBG1/2), que resultam na produção de hemoglobina fetal (HbF), é uma estratégia terapêutica validada para o tratamento da doença falciforme (DF) e talassemia β . **Objetivo:** Investigar o Composto 2, um derivado de 2-aminobenzamida, quanto à sua capacidade de induzir a produção de HbF em células HUDEP-2, através da inibição das Histonas Deacetilases (HDACs) 1 e 2. **Métodos:** O Composto 2 foi ensaiado em células HUDEP-2, uma linhagem derivada de progenitores eritróides. As culturas foram submetidas a tratamento com o composto durante 72 e 96 horas, nas concentrações de 0,8 μ M e 1 μ M. Após o tratamento, as células foram coletadas e a expressão dos genes HBG12 foi quantificada através de qPCR e porcentagem de células HbF-positivas foi avaliada por citometria de fluxo. Para efeitos comparativos, foi utilizado o tratamento com 100 μ M de hidroxiuréia (HU). Ainda, foi realizado ensaio de inibição da atividade das HDACs 1 e 2 pelo Composto 2, assim como, caracterização de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). **Resultados:** O Composto 2 aumentou significativamente os níveis de RNAm de HBG1/2. Em 72 horas, as concentrações de 0,8 μ M e 1 μ M elevaram os níveis de RNAm de HBG1/2 em 58 e 63 vezes, respectivamente (CTRL = 0,012 $\pm$ 0,002 A.U vs. 0,8 μ M = 0,68 $\pm$ 0,16 A.U e 1 μ M = 0,73 $\pm$ 0,17 A.U, $p < 0,0001$, $n = 4$). Em 96 horas, os aumentos foram de 49 e 52 vezes (CTRL = 0,022 $\pm$ 0,014 A.U vs. 0,8 μ M = 1,1 $\pm$ 0,19 A.U e 1 μ M = 1,17 $\pm$ 0,28 A.U, $p < 0,0001$, $n = 4$). Em contraste, HU a 100 μ M resultou em um aumento máximo de 10 vezes na expressão de mRNA de HBG1/2 em 72 horas ($n = 2$). A citometria de fluxo mostrou um aumento significativo em células HbF-positivas. Após 72 horas, houve um aumento para 7,06 $\pm$ 0,92% com 0,8 μ M e para 7,48 $\pm$ 0,55% com 1 μ M, comparado a 0,83 $\pm$ 0,12% nos controles ($p < 0,0001$, $n = 4$). Em 96 horas, os aumentos foram para 11,35 $\pm$ 1,15% e 12,78 $\pm$ 0,34%, comparado a 0,91 $\pm$ 0,12% ($p < 0,0001$, $n = 4$). HU induziu um aumento em células HbF-positivas para 5,65 $\pm$ 0,59% em 72 horas e 5,73 $\pm$ 0,52% em 96 horas ($p < 0,0001$, $n = 2$). Ainda, o Composto 2 inibiu 91% da atividade de HDAC1 e 71% de HDAC2 a 1 μ M. Os estudos de ADME

revelaram logD de 2,51 em pH 7,4, alta permeabilidade (Pe 14,61 $\times 10^{-6}$ cm/s), alta estabilidade metabólica ($t = 266,6$ minutos) e depuração de 10,4 μ L/min/mg. **Discussão:** As HDACs 1 e 2 desempenham um papel crítico na regulação da expressão gênica das globinas, removendo grupos acetil e compactando a cromatina, o que silencia os genes HBG. A inibição dessas enzimas promove o aumento da acetilação de histonas, abrindo a cromatina e permitindo a reativação dos genes HBG1/2. O Composto 2, ao inibir seletivamente HDAC1 e HDAC2, demonstrou uma capacidade superior de aumentar a expressão de HBG1/2 e a produção de HbF em comparação com a HU, principal fármaco aprovado para o tratamento da DF e talassemia β . **Conclusão:** A potente reativação da produção de HbF e as propriedades farmacocinéticas favoráveis (alta estabilidade metabólica e boa permeabilidade) destacam o Composto 2 como um candidato promissor para desenvolvimento como uma terapia oral, possivelmente oferecendo uma alternativa para o tratamento da DF e talassemia β .

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.064>

EFFECTS OF BCL11A SNPS ON INTERINDIVIDUAL VARIABILITY OF FETAL HEMOGLOBIN INDUCTION IN PATIENTS WITH SICKLE CELL DISEASE TREATED WITH HYDROXYUREA AT THE CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE GOVERNADOR VALADARES

L Nascimento ^a, NF Silva ^a, KA Boy ^b,
R Tognon-Ribeiro ^c, LM Mendonça ^b,
APP Santos ^d, CV Rodrigues ^b, RR Sales ^a,
PSAS Gerheim ^b, MR Luizson ^a

^a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG),
Belo Horizonte, Brazil

^b Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de
Fora, Brazil

^c Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas,
Brazil

^d Hemocentro Regional de Governador Valadares,
Governador Valadares, MG, Brasil

Sickle cell disease (SCD) is an autosomal recessive monogenic disorder that modifies the adult hemoglobin and results in multiple clinical phenotypes. Increases in fetal hemoglobin (HbF) has clinical benefits by reducing the clinical severity of SCD. Hydroxyurea (HU) is a drug used to treat SCD that induces HbF expression, thereby ameliorating hematological and clinical profile. However, HbF response to HU treatment is highly variable among patients. A systematic review indicated that SNPs rs4671393 (A>G) and rs766432 (A>C) of BCL11A gene may help to explain interindividual variability in HbF induction in response to HU. We examined the changes in hematological profile, focused on HbF levels (%) after HU therapy. Next, we examined whether variation in BCL11A SNPs rs4671393 and rs766432 affects HbF levels in patients with SCD before and after HU therapy. We studied 93 patients

with SCD (89.3% with SCA HbSS genotype: 10.7% with HbSC genotype) with a mean age of 17.9 ± 11.5 y and 51.61% of the cohort were women. We measured the levels of total hemoglobin, hematocrit, global leukometry, reticulocytes (%) and HbF during 18 months of HU therapy (range, 5-32 mg/kg) at the Hematology and Hemotherapy Center of Governador Valadares, Minas Gerais. Genotypes for BCL11A SNPs were determined by TaqMan® allele discrimination assays, and HbF levels were measured by HPLC. We observed an increase in hemoglobin (7.6-9.4 g/dL, $p < 0.0001$), hematocrit (23.0-28.0%, $p < 0.0001$), and especially HbF concentration (5.3-15%, $p < 0.0001$) during the 18 months, of HU therapy. In addition, reticulocytes and overall leukocyte count showed a decrease over the 18 months (3.65-1.9% and 13300-7200 mm^3 , respectively). Patients carrying genotypes with the minor alleles for both BCL11A SNPs (AG+AA for rs4671393 and AC+CC for rs766432) did not show differences in HbF concentration before and after HU therapy compared to genotypes with wild-type alleles (GG for rs4671393 and AA for rs766432). However, the mean ($\pm$ S.D.) for HbF concentration was numerically higher for AC+CC genotypes ($16.69 \pm 8.86\%$; $n = 33$) than the AA genotype ($13.62 \pm 6.96\%$; $n = 60$) for the rs766432, and for patients carrying the GA+AA genotypes ($16.55 \pm 8.77\%$; $n = 34$) than the GG genotype ($13.65 \pm 7.02\%$; $n = 59$), although these differences did not reach significant level (rs766432, $p = 0.068$; and rs4671393, $P = 0.0832$). For rs4671393, median for HbF levels were higher after than before HU therapy both in GG genotype (5.0 vs. 13.0%; $p < 0.0001$) and AG+AA genotypes (5.5% vs. 15.85; $p < 0.0001$). For rs766432, HbF concentration was higher in carriers with AA genotype (5.0 vs. 12.65%; $p < 0.0001$) and AC+CC genotypes (5.4 vs. 16.0%; $p < 0.0001$). Our findings do not support the role of BCL11A SNPs rs4671393 and rs766432 in the increase of HbF concentration in response to HU therapy, which may be explained by the small number of patients with SCD analyzed. However, our findings are in line with a systematic review showing that BCL11A SNPs may partially explain the interindividual variability in the increase in HbF expression upon HU therapy. Replication studies should consider increasing the number of patients with SCD analyzed.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.065>

DEGRADADORES DE HISTONA DEACETILASE PARA INDUÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL

AR Pavan^a, VGF Pastre^a, C Lanaro^a,
DM Albuquerque^a, JP Smalley^b, U Patel^b,
JWR Schwabe^c, SM Cowley^d, JT Hodgkinson^b,
JLD Santos^e, FF Costa^a

^a Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^b Leicester Institute of Structural and Chemical Biology and School of Chemistry, University of Leicester, Leicester, Reino Unido

^c Leicester Institute of Structural and Chemical Biology and Department of Molecular and Cell Biology, University of Leicester, Leicester, Reino Unido

^d Department of Molecular and Cell Biology, University of Leicester, Leicester, Reino Unido

^e Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP, Brasil

A indução da produção de hemoglobina fetal (HbF) é capaz de inibir a polimerização da hemoglobina S (HbS) presente na anemia falciforme e minimizar as manifestações clínicas da doença. A modulação de enzimas epigenéticas responsáveis pela repressão do gene HBG1/2, como as histonas deacetilases 1 e 2, apresentam-se como uma estratégia promissora para indução de HbF. Os objetivos do trabalho foram a avaliação farmacológica de moléculas degradadoras de HDAC 1 e 2 para indução de HbF. As células utilizadas para quantificação de degradação de HDACs 1 e 2 foi a HCT-116 e o ensaio foi realizado através de western blot quantitativo. As células utilizadas para indução de HbF foi a HUDEP-2, em que se utilizou qPCR para quantificação de mRNA de HBG1/2 e citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de células positivas para HbF. Foram planejadas e sintetizadas novas moléculas capazes de promover a degradação seletiva das HDACs 1 e 2 através da formação de um complexo ternário entre HDACs-1/2 e a enzima E3-ligase denominada cereblon. A formação desse complexo leva a ubiquitinação das enzimas alvo e posterior degradação via proteossoma. Treze moléculas foram sintetizadas e avaliadas em células HCT-116 em relação à degradação das HDACs 1, 2 e 3, resultando em três promissores compostos (I, II e III) com diminuição seletiva dos níveis de HDAC-1 e valor de DC_{50} de 2,5 μM . O composto III foi então selecionado para avaliação em células HUDEP-2, nas concentrações de 500nM e 750nM, e tempo de tratamento de 72h e 96h. A análise de qPCR mostrou um aumento significativo nos níveis de mRNA de HBG1/2, sendo este de 26,9x e 35,5x nas concentrações de 500nM e 750nM, respectivamente, em 72h quando comparados com o controle (CTRL = $0,027 \pm 0,006$ unidades arbitrárias (u.a.) vs 500nM = $0,73 \pm 0,25$ u.a. e 750nM = $0,96 \pm 0,11$ u.a., $p < 0,0001$, $n = 4$). Em 96h, o aumento foi de 34x e 44,5x, respectivamente, (CTRL = $0,034 \pm 0,012$ u.a. vs 500nM = $1,12 \pm 0,35$ u.a. e 750nM = $1,52 \pm 0,37$ u.a., $p < 0,0001$, $n = 4$). Após o tratamento, as células foram marcadas utilizando-se anticorpos anti-HbF para quantificação da porcentagem de células positivas para HbF, onde foi observado um aumento de 7,5x e 9x nas concentrações de 500nM e 750nM, respectivamente, em 72h (CTRL = $0,58 \pm 0,15$ % vs 500nM = $4,43 \pm 0,88$ % e 750nM = $5,29 \pm 1,52$ %, $p < 0,0001$, $n = 4$), enquanto que o aumento em 96h foi de 8,3x e 10,6x, respectivamente (CTRL = $0,65 \pm 0,15$ % vs 500nM = $5,44 \pm 0,79$ % e 750nM = $6,89 \pm 1,05$ %, $p < 0,0001$, $n = 4$). O tratamento realizado com hidroxiuréia, fármaco padrão, à 100 μM , resultou num aumento máximo dos níveis de mRNA de HBG1/2 de, aproximadamente, 10x em 72h e num aumento na porcentagem de células HbF-positivas de 8,5x e 8,9x em 72h e 96h, respectivamente (CTRL 72h = $0,66 \pm 0,23\%$ vs HU 72h = $5,65 \pm 0,59\%$, CTRL 96h = $0,64 \pm 0,15\%$ vs HU 96h = $5,73 \pm 0,52\%$; $p < 0,0001$, $n = 2$). Os dados obtidos demonstram que as moléculas sintetizadas apresentam seletividade de degradação contra HDAC-1, o que ainda não havia sido descrito na literatura. Além disso, a molécula III demonstrou ser mais efetiva quando comparada a HU, com atividade de indução da