



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO

EDUARDO DE MORAES E SOUSA

**POTENCIAL EPIGENÉTICO DO PTEROCARPANO EM COMBINAÇÃO COM
VORINOSTAT: DA MODELAGEM COMPUTACIONAL À BIOLOGIA CELULAR
EM CÂNCER HEMATOLÓGICO E DE PRÓSTATA**

FORTALEZA

2026

EDUARDO DE MORAES E SOUSA

POTENCIAL EPIGENÉTICO DO PTEROCARPANO EM COMBINAÇÃO COM
VORINOSTAT: DA MODELAGEM COMPUTACIONAL À BIOLOGIA CELULAR EM
CÂNCER HEMATOLÓGICO E DE PRÓSTATA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) nucleado na Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cláudia do Ó Pessoa

Coorientadora: Prof^a Dr^a Maria Claudia dos Santos Luciano

Coorientadora: Prof^a Dr^a Cristiana Libardi Miranda Furtado

FORTALEZA

2026

EDUARDO DE MORAES E SOUSA

POTENCIAL EPIGENÉTICO DO PTEROCARPANO EM COMBINAÇÃO COM
VORINOSTAT: DA MODELAGEM COMPUTACIONAL À BIOLOGIA CELULAR EM
CÂNCER HEMATOLÓGICO E DE PRÓSTATA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) nucleado na Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: 26/02/2026

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Cláudia do Ó Pessoa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a Dra. Ivanilza Moreira de Andrade Paiva
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

Prof^a Dra. Maria Francilene Souza Silva
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof^a Dra. Maria Júlia Barbosa Bezerra
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

Prof Dr. Roner Ferreira da Costa
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

Dedico este trabalho a todas as pessoas que um dia acharam que seria impossível, que um dia me desacreditaram me medindo apenas pela sua régua. À vocês, *vide* “Emicida - AmarElo” 4min 00s - 4min 11s no YouTube.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de início, por serem as mais importantes pessoas do meu universo, à minha esposa e meu bem, RYANNE, e meu filhote e meu cheiroso, LUKE. À vocês eu escreveria agradecimentos tão longos que faltaria papel no mundo. À vocês eu devo minha vida, pois foram e são (!) meu suporte, meu farol, minha alegria, meu motivo de acordar e me sentir vivo todos os dias. Com vocês a vida presta! Agora peço licença ao LUKE pra agradecer ainda mais à meu par da vida toda: meu bem, sem você eu teria me perdido nos primeiros momentos desse percurso; suas palavras e atitudes me tiraram de poços profundos e me fizeram continuar; seu olhar me faz ver que a vida é mais que pisar sempre no acelerador, é às vezes, diminuir o ritmo, respirar, observar, acalmar e ir ao mar. Daqui pra frente não te largo jamais. Com a fúria da beleza do Sol, eu vim atrás desse diploma, agora a gente se vê no pódio. Essa vida inteira não será suficiente para demonstrar o quanto sou grato e apaixonado por você, então estarei sempre te esperando nas próximas vidas que nos aguardam. Amo tu!

Agradeço ainda,

À espiritualidade que sempre me protege enquanto ando pelos seus caminhos abertos.

Aos familiares que sempre torceram para que eu chegasse até aqui e comemoraram cada conquista, mesmo que fisicamente distantes: as avós JOSINA e BÁRBARA, a mãe ANA e o pai JOSÉ, os maninhos FERNANDO e PEDRO VÍTOR, a tia JOSY e a prima CAROL, a sogra CARLUZINA e a cunhada RYCHELLE. Obrigado por fazerem parte de muitos momentos dessa estrada.

Às poucas, porém insubstituíveis, amizades que fiz enquanto residente em Fortaleza-CE:

Maria Fernanda Madrid e Eleicy Nathaly, que são duas potências acadêmicas da América Latina; que me mostraram como não devemos nos diminuir para caber em espaços pequenos demais para nós; que para além dos memes, compartilharam comigo experiências e conhecimento. *¡Gracias por todo!*

Gabriel Caetano, que teve a sensibilidade de me incluir em seu ciclo de amizade; que me auxiliou em diversos experimentos, e me fez observar que um bom cientista se mantém firme e metódico em seu processo; e que me emocionou de forma inexplicável quando me deu o cargo de padrinho de sua cria, Dante. Tamo junto, pai!

Renata Pereira, que sentou para tomar uma cerveja comigo e se abriu para uma amizade que pretendo levar pra toda a vida; que me ensinou a não guardar rancores; que é

também inspiração enquanto docente e cientista afrocentrada; que me acolheu e recebeu em seu lar num dos momentos mais desafiadores dessa jornada, talvez você não faça ideia de como isso foi significativo. Por gentileza, dê um abraço em dona Dora, por mim. Que o pai Oxalá te abençoe sempre e te guie pelo teu caminhar! Axé!

Ao Emicida, que através de suas músicas entoadas como mantras, fez este fã anônimo levantar e andar tantas vezes; que me fez crer que somos reis e me mover ao sabor do vento pelo solo onde reinamos, enquanto colocava pontos finais na dor como Doril, Anador; que me fez construir, crer, meter a mão, em meio à escuridão e mostrar que nosso sorriso sereno hoje é o veneno pra quem trouxe tanto ódio pra onde deitamos; meu parceiro Emicida, eu percebo que eu sou o único representante do meu sonho na face da Terra; eu sei que quem costuma vir de onde eu sou, às vezes não tem motivos pra seguir, mas também sei que o sonho nos traz coisas que nos fazem prosseguir; você tava certo, somos maior, nos basta só sonhar, seguir. Obrigado.

Ao secretário, Seu Adil, por todo acompanhamento. Às demais pessoas que compõem a dinâmica do NPDM e o mantém em pleno funcionamento, cito a técnica de laboratório Silvana França, todos os vigilantes do prédio em nome de seu Gleiciano, as zeladoras em nome de dona Dalva e dona Marta, os técnicos de manutenção em nome de seu Caetano.

À Prof^a Dra. Maria Claudia dos Santos Luciano, agradeço pela coorientação, por me acompanhar mais de perto e saber direcionar minhas potencialidades ao objetivo conjunto.

À Prof^a Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado, agradeço pela coorientação e pelo percurso de minha trajetória acadêmica.

À Prof^a Dra. Claudia do Ó Pessoa pela disponibilidade na orientação da tese, pelas contribuições para meu crescimento científico e pela oportunidade de conhecer seu grupo de pesquisa.

À banca examinadora, Prof^a Dra. Ivanilza Moreira de Andrade Paiva, Prof^a Dra. Maria Francilene Souza Silva, Prof^a Dra. Maria Júlia Barbosa Bezerra e Prof Dr. Roner Ferreira da Costa pela leitura atenta, contribuições qualificadas e disponibilidade, registro meu respeito pelo compromisso com que conduziram o processo.

“Quando você compartilha o saber, o saber só cresce.” Nego Bispo

RESUMO

Introdução: As alterações epigenéticas permitem modular a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA. A epigenética tem avançado como área promissora no tratamento do câncer. Os medicamentos epigenéticos atuam em enzimas-chave, reativando genes epigeneticamente silenciados envolvidos na supressão de tumores e no reparo do DNA. No contexto da oncoterapia, compostos de origem natural, como flavonóides, isoflavonóides e pterocarpanos destacam-se pelas suas propriedades pró-apoptóticas, antiproliferativas e reguladoras de alvos epigenéticos, como DNMTs, HDACs e HATs. Diante da necessidade de superar limitações da monoterapia, a combinação do (+)-PTC com o inibidor de HDACs Vorinostat (SAHA), surge como estratégia alternativa para o tratamento do câncer. Esta tese teve como objetivo geral investigar o potencial epigenético do pterocarpano (+)-PTC e sua combinação com o inibidor de HDAC Vorinostat (SAHA) no tratamento dos tumores hematológicos e de próstata. **Metodologia:** Foram aplicadas abordagens *in silico* e *in vitro* de forma complementar. Ferramentas como perfil ADME e *docking* molecular permitiram prever interações entre compostos e alvos epigenéticos, orientando ensaios *in vitro* com mais precisão e economia. A presente tese foi estruturada em dois capítulos: o primeiro inclui o mapeamento literário de flavonóides, isoflavonóides e pterocarpanos com atividade epigenética diante de diferentes tipos de câncer e previsão de suas propriedades farmacocinéticas; o segundo apresenta ensaios de interação por *docking* molecular, avaliação do potencial sinergismo da combinação ((+)-PTC+SAHA), e citotoxicidade de (+)-PTC e SAHA na viabilidade celular e progressão do ciclo celular frente a linhagens de câncer. **Resultados:** O primeiro capítulo ressalta o potencial de flavonóides, isoflavonóides e pterocarpanos na modulação epigenética e de outras vias moleculares, como p19Arf-p53-p21Cip1, PI3K/AKT/mTOR e TRPM3/miR-204, inibindo a proliferação celular, restaurando a homeostase e reprogramando a expressão gênica, tornando-os promissores em pesquisas oncológicas. O modelo BOILED-Egg do SwissADME destacou a molécula de (+)-PTC com boa absorção gastrointestinal (GI) e capacidade de penetração da barreira hematoencefálica (BBB), além de indicá-la como provável substrato da glicoproteína P-gp, todas características valiosas para um candidato a fármaco para tratamentos oncohematológicos. O segundo capítulo destaca o potencial terapêutico da associação ((+)-PTC+SAHA), diante de sua ampliação da resposta antitumoral e indicação de sinergismo entre os compostos. Os resultados do *docking* molecular indicaram que os ligantes escolhidos apresentaram atração ao sítio de interesse na maioria das poses

selecionadas, com destaque para as HDACs 1 e 2, e a HSP90, cujos resultados foram acima de 90% de atração para ambos ligantes (controle e (+)-PTC). Nota-se que o (+)-PTC tende a se ligar de forma espontânea tanto quanto os ligantes controle, como observado pela diferença muito próxima entre valores de ΔG , (-0,549 kcal/mol para HDAC8 e -1,874 kcal/mol para HDAC3 - sítio IOP). Porém, a estabilidade da ligação da maioria dos ligantes controle é mais robusta em relação ao (+)-PTC. Mesmo havendo favorabilidade das reações entre HDACs e (+)-PTC, este possui tendência para maior estabilidade de formar complexos com a proteína HSP90. A simulação de potencial efeito sinérgico no *CompuSyn* sugeriu concentrações inviáveis para efeito prático para os tempos de 24h e 48h (respectivamente, $F_a = 0,5$ (+)-PTC 8,466 μM e SAHA 66,659 μM ; $F_a = 0,5$ (+)-PTC 5,226 μM e SAHA 78,556 μM). Foram observadas alterações morfológicas nas linhagens MOLM-13 e KG-1 causadas pela exposição aos compostos (+)-PTC e SAHA, quando separados ou em combinação. Para células da linhagem MOLM-13 tratadas com o composto (+)-PTC, foram observadas alterações morfológicas como formação de blebs citoplasmáticas, rompimento da membrana plasmática, picnose e cariólise, enquanto que nos grupos tratados com o composto Vorinostat, identificou-se rompimento de membrana e presença de vacúolos de forma mais perceptível. Já para células da linhagem KG-1 tratadas com a combinação ((+)-PTC+SAHA), foram observadas alterações morfológicas mais marcadas para a apoptose, como a vacuolização, a picnose e a cariólise.

Conclusão: Apesar de existirem limitações metodológicas, a combinação ((+)-PTC+SAHA) apresentou efeitos promissores contra linhagens leucêmicas. Estes resultados predizem a redução de efeitos adversos em relação à monoterapias, e sugerem novos caminhos para estratégias terapêuticas epigenéticas. Embora ainda seja necessário estudos complementares abrangendo análises de expressão gênica e proteica, avaliação de toxicidade sistêmica e experimentos *in vivo*, este estudo demonstrou que a integração de abordagens *in silico* e *in vitro* constitui um elemento essencial para o progresso da pesquisa e para a descoberta de novas formas de combater o câncer.

Palavras-chave: produtos naturais; epigenética; terapias combinadas; modelagem computacional; *docking* molecular.

ABSTRACT

Introduction: Epigenetic alterations allow gene expression to be modulated without changing the DNA sequence. Epigenetics has advanced as a promising area in cancer treatment. Epigenetic drugs, or simply epidrugs, act on key enzymes, reactivating epigenetically silenced genes involved in tumor suppression and DNA repair. In the context of cancer therapy, naturally occurring compounds such as flavonoids, isoflavonoids, and pterocarpan stand out for their pro-apoptotic, antiproliferative, and regulatory properties of epigenetic targets, such as DNMTs, HDACs and HATs. Given the need to develop new approaches that overcome the limitations of monotherapy, the combination of pterocarpane (+)-PTC with the HDAC inhibitor Vorinostat (SAHA) emerges as an alternative strategy for cancer treatment. The main objective of this thesis was to investigate the epigenetic potential of (+)-PTC pterocarpane and its combination with the HDAC inhibitor Vorinostat (SAHA) in the treatment of hematological and prostate tumors. **Methodology:** *In silico* and *in vitro* approaches were applied in a complementary manner. ADME profiling and molecular docking tools allowed us to predict interactions between compounds and epigenetic targets, guiding *in vitro* assays with greater precision and economy. This thesis is structured in two chapters: the first includes a literature review of flavonoids, isoflavonoids, and pterocarpanes with epigenetic activity against different types of cancer and a prediction of their pharmacokinetic properties; the second presents molecular docking interaction assays, evaluation of the synergistic potential of the combination ((+)-PTC+SAHA), and cytotoxicity of (+)-PTC and SAHA on cell viability and cell cycle progression in cancer cell lines. **Results:** The first chapter highlights the potential of flavonoids, isoflavonoids, and pterocarpanes in epigenetic modulation and other molecular pathways, such as p19Arf-p53-p21Cip1, PI3K/AKT/mTOR, and TRPM3/miR-204, inhibiting cell proliferation, restoring homeostasis, and reprogramming gene expression, which makes these compounds promising candidates in oncological research. The SwissADME BOILED-Egg model highlighted the (+)-PTC molecule with good gastrointestinal (GI) absorption and blood-brain barrier (BBB) penetration capacity, in addition to indicating it as a likely substrate of P-gp glycoprotein, all valuable characteristics for a drug candidate for oncohematological treatments. The second chapter highlights the therapeutic potential of the ((+)-PTC+SAHA) combination, given its enhanced antitumor response and indication of synergism between the compounds. The molecular docking results indicated that the chosen ligands showed attraction to the site of interest in most of the selected poses, with emphasis on HDACs 1 and 2, and

HSP90, whose results were above 90% attraction for both ligands (control and (+)-PTC). It should be noted that (+)-PTC tends to bind spontaneously as much as the control ligands, as observed by the very close difference between ΔG values (-0.549 kcal/mol for HDAC8 and -1.874 kcal/mol for HDAC3 - site I0P). However, the stability of the binding of most control ligands is more robust than that of (+)-PTC. Even though the reactions between HDACs and (+)-PTC are favorable, the latter tends to form more stable complexes with the HSP90 protein. The simulation of potential synergistic effects in CompuSyn suggested concentrations that were unfeasible for practical effect for 24h and 48h (respectively, $F_a = 0.5$ (+)-PTC 8.466 μM and SAHA 66.659 μM ; $F_a = 0.5$ (+)-PTC 5.226 μM and SAHA 78.556 μM). Morphological changes were observed in the MOLM-13 and KG-1 cell lines caused by exposure to (+)-PTC and SAHA compounds, either separately or in combination. For cells of the MOLM-13 line treated with the compound (+)-PTC, morphological changes such as cytoplasmic bleb formation, plasma membrane rupture, pyknosis, and karyolysis were observed, while in the groups treated with the compound Vorinostat, membrane rupture and the presence of vacuoles were identified in a more noticeable way. For KG-1 cells treated with the combination ((+)-PTC+SAHA), more marked morphological changes for apoptosis were observed, such as vacuolization, pyknosis, and karyolysis. **Conclusion:** Despite methodological limitations, the combination ((+)-PTC+SAHA) showed promising effects against leukemia cell lines. These results predict a reduction in adverse effects compared to monotherapies and suggest new avenues for epigenetic therapeutic strategies. Although further studies covering gene and protein expression analyses, systemic toxicity assessment, and *in vivo* experiments are still needed, this study demonstrated that the integration of *in silico* and *in vitro* approaches is an essential element for research progress and the discovery of new ways to fight cancer.

Keywords: natural products; epigenetics; combination therapies; computational modeling; molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Ilustração das ações dos produtos naturais na modulação da maquinaria dos hallmarks epigenéticos no câncer.....	22
Figura 2	– Hallmarks do câncer	28
Figura 3	– Graphical Abstract Venn diagram illustrating the epigenetic roles of three phytochemical groups—Flavonoids, Isoflavonoides, and Pterocarpan.....	56
Figura 4	– Basic flavonoid structure: fifteen-carbon skeleton consisting of two benzene rings (A and B) linked via a heterocyclic pyrane ring (C), forming a three-carbon bridge (C6-C3-C6)	57
Figura 5	– Chemical structure similarity between the general isoflavonoid structure (A), genistein (B), and daidzein (C), and mammalian endogenous hormone β -estradiol (D)	58
Figura 6	– General structure of pterocarpan and their stereochemical possibilities	59
Figura 7	– General formula of 2,3,9-trimethoxypterocarpan (A): R1, R2, R3, and R4 are independently chosen from the group comprising OH; CH ₃ O; and enantiomers (+) (B) and (-) (C)	60
Figura 8	– ADME relevance between in silico, in vitro and in vivo studies.....	61
Figura 9	– Bioavailability Radar criteria and cutoffs for screening candidate compounds	62
Figura 10	– SM ADMET BoiledEGG and radar	66
Figura 11	– Principais etapas de trabalho do desenho experimental. Ilustração dos principais ensaios e experimentos envolvidos neste trabalho.....	70
Figura 12	– Levantamento de possíveis alvos com expressão modulada.....	81
Figura 13	– Rede de interação proteica (PPI) gerada pela plataforma STRING.....	83
Figura 14	– Representação ilustrativa da Gridbox, gerada no software PyMol.....	85
Figura 15	– Complexo resultante entre o docking da molécula (+)-PTC e a estrutura PDBID 4BKX, correspondente à cristalização da proteína HDAC1.....	90

Figura 16	– Complexo resultante entre o docking da molécula (+)-PTC e a estrutura PDBID 4LXZ, correspondente à cristalização da proteína HDAC2.....	91
Figura 17	– Complexo resultante entre o docking da molécula (+)-PTC e a estrutura PDBID 4A69, correspondente à cristalização da proteína HDAC3 (sítio ACT).....	93
Figura 18	– Complexo resultante entre o docking da molécula (+)-PTC e a estrutura PDBID 4A69, correspondente à cristalização da proteína HDAC3 (sítio I0P)	94
Figura 19	– Complexo resultante entre o docking da molécula (+)-PTC e a estrutura PDBID 5B8D, correspondente à cristalização da proteína HDAC6.....	96
Figura 20	– Complexo resultante entre o docking da molécula (+)-PTC e a estrutura PDBID 1T64, correspondente à cristalização da proteína HDAC8.....	97
Figura 21	– Complexo resultante entre o docking da molécula (+)-PTC e a estrutura PDBID 1BYQ, correspondente à cristalização da proteína HSP90.....	99
Figura 22	– Definição do desenho considerando seis grupos experimentais.....	100
Figura 23	– Concentrações inibitórias médias apresentadas pelos compostos (+)-PTC e SAHA para as linhagens celulares PC-3, DU-145 e KG-1 no teste de MTT 72h.....	103
Figura 24	– Análise microscópica de células MOLM-13 coradas com hematoxilina-eosina (HE) após 6 e 12 horas de tratamento.....	105
Figura 25	– Análise microscópica de células KG-1 coradas com hematoxilina-eosina (HE) após 24 e 48 horas de tratamento.....	106
Figura 26	– Ilustração da quantificação número total de células (A) e resultado dos testes de integridade de membrana (IM) realizados pela técnica de citometria de fluxo (B) na linhagem MOLM-13.....	108
Figura 27	– Testes de avaliação do ciclo celular (CC) realizados pela técnica de citometria de fluxo na linhagem MOLM-13.....	110
Figura 28	– Testes de integridade de membrana (IM) realizados pela técnica de citometria de fluxo na linhagem KG-1.....	111
Figura 29	– Testes de avaliação do ciclo celular (CC) realizados pela técnica de citometria de fluxo na linhagem KG-1.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Assessment of flavonoid derivatives and their association to epigenetic mechanisms (in vitro studies) in biological systems.....	53
Tabela 2	– Assessment of flavonoid derivatives and their association to molecular mechanisms (in vitro studies) in biological systems.....	54
Tabela 3	– ADME prediction.....	55
Tabela 4	– SM Molecule structures and SwissADME smiles.....	63
Tabela 5	– Origens das linhagens celulares e concentrações de plaqueamento.....	75
Tabela 6	– Perfil de interações proteicas (PPI) gerado pela plataforma STRING....	83
Tabela 7	– Parâmetros padrão do software DockThor para o procedimento de docking de busca ampla.....	85
Tabela 8	– Alvos e ligantes testados para o procedimento de docking de busca ampla usando a plataforma online DockThor.....	87
Tabela 9	– Concentrações inibitórias mínimas (CI50) em 72h dos compostos quando tratamento ocorreu em separado para as linhagens celulares PC-3, DU-145 e KG-1.....	101
Tabela 10	– Demonstrativo do potencial de sinergismo da combinação ((+)-PTC+SAHA).....	104
Tabela 11	– Síntese dos principais resultados obtidos nas análises in vitro.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
ALL	<i>Acute lymphoid leukemia</i>
AML	<i>Acute myeloid leukemia</i>
ASR	<i>Age Standardised Rate</i>
AVC	<i>Apigenin–Vorinostat-Conjugate</i>
CC	Ciclo Celular
CDDI	<i>Cortellis Drug Discovery Intelligence</i>
CLL	<i>Chronic lymphoid leukemia</i>
CML	<i>Chronic myeloid leukemia</i>
CN	Controle Negativo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMTs	DNA metiltransferases
DRI	Índice de redução de dose
FBS	Soro bovino fetal
HATs	Histona acetiltransferases
HDACs	Histona desacetilases
HE	Hematoxilina-eosina
HMT	<i>Histone methyltransferases</i>

HSP90AA1	<i>Heat shock protein 90</i>
iHDACs	Inibidores de histona desacetilase
IM	Integridade de Membrana
LE	<i>Ligand Efficiency</i>
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
MMFF94	<i>Merck Molecular Force Field 94</i>
ncRNAs	Ácidos ribonucleicos não-codificantes
nTPM	<i>Normalized transcripts per million</i>
OPSL4	<i>Optimized Potentials for Liquid Simulations 4</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PI	Iodeto de propídio
PPI	Interação proteína-proteína
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAHA	Ácido suberoilânilda hidroxâmico
THPA	<i>The Human Protein Atlas</i>
TNBC	Câncer de Mama Triplo Negativo
US-NCI	Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos
BR-BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
μ	Micro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
h	Hora
mg	Miligrama
mL	Mililitro
nm	Nanometro
°	Graus
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	19
1.1	Regulação epigenética mediada por inibidores de histona desacetilases.....	19
1.2	Produtos naturais como reguladores epigenéticos: perspectivas terapêuticas.....	21
1.3	Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de novos fármacos.....	25
2	JUSTIFICATIVA.....	26
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	Objetivo Principal.....	34
3.2	Objetivos Específicos.....	34
4	CAPÍTULO I - EPIGENETIC MODULATION BY NATURAL COMPOUNDS: THERAPEUTIC PERSPECTIVES FOR LEUKEMIA.....	35
1	Introduction.....	37
1.1	The Emerging Epigenetic Role of Flavonoids.....	37
1.2	Isoflavonoids.....	38
1.3	Pterocarpanes.....	39
1.4	Other molecular pathways associated.....	41
1.5	<i>In silico</i> ADME prediction to evaluated flavonoids.....	42
1.6	Targeting Epigenetics in Cancer.....	44
1.7	Conclusions.....	45
5	CAPÍTULO II - <i>IN SILICO</i> “INSIGHTS” DA ASSOCIAÇÃO ((+)-PTC+SAHA) COMO ESTRATÉGIA EPIGENÉTICA ANTITUMORAL...	67
1	INTRODUÇÃO.....	67
1.1	Relevância dos flavonoides em terapias combinadas como estratégia no tratamento do câncer.....	67
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	68
2.1	Desenho experimental.....	68
2.2	Avaliação <i>in silico</i>.....	70
2.2.1	<i>Abordagem computacional de Target Fishing para predição de alvos moleculares.....</i>	70
2.2.2	<i>Mapeamento de alvos com expressão modulada em linhagens de câncer.....</i>	71
2.2.3	<i>Docking molecular.....</i>	72

2.3	Protocolos de cultura de células.....	75
2.3.1	<i>Linhagens celulares.....</i>	75
2.3.2	<i>Manutenção da linhagem celular.....</i>	75
2.4	Avaliação do efeito antiproliferativo de ((+)-PTC+SAHA)	76
2.4.1	<i>Determinação do índice de combinação (CI) de compostos.....</i>	76
2.4.2	<i>Ensaio de viabilidade celular: MTT ((+)-PTC+SAHA).....</i>	76
2.5	Protocolo de coloração com hematoxilina-eosina (HE).....	77
2.5.1	<i>Protocolo de citocentrífuga (Cytospin).....</i>	78
2.5.2	<i>Protocolo de coloração de células.....</i>	78
2.6	Avaliação do ciclo celular e da viabilidade celular por meio de ensaios de citometria de fluxo.....	79
3	RESULTADOS	80
3.1	Predição de alvos moleculares por meio da estratégia de Target Fishing.....	80
3.2	Prospecção de alvos com expressão modulada.....	80
3.3	Rede de interação proteína-proteína (STRING).....	81
3.4	Docking molecular.....	84
3.5	Efeito antiproliferativo da combinação ((+)-PTC+SAHA) em linhagens de tumores sólidos e hematológico in vitro.....	100
3.6	Alterações morfológicas identificadas por coloração HE.....	104
3.7	Avaliação do ciclo celular e da viabilidade celular por meio de ensaios de citometria de fluxo.....	106
4	DISCUSSÃO.....	114
5	CONCLUSÃO.....	121
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
	REFERÊNCIAS	125
	ANEXO A – ARTIGO 1 DERIVADO DA TESE.....	142
	ANEXO B – ARTIGO 2 DERIVADO DA TESE.....	143

1 APRESENTAÇÃO

1.1 Regulação epigenética mediada por inibidores de histona desacetilases

O horizonte epigenético foi descrito pela primeira vez por Waddington (1942) e representa as vias de desenvolvimento que uma célula pode seguir de um estado indiferenciado para um estado diferenciado. A epigenética determina possibilidades de resposta do genótipo de um organismo a estímulos ambientais de maneira coordenada, e que essa resposta pode ser fixada independentemente dos efeitos mutacionais (Furtado et al., 2019).

Nos últimos anos a epigenética tem avançado e ampliado as possibilidades dos tratamentos do câncer, com a modulação de mecanismos que regulam a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA (Dai et al., 2021). Esses processos ativam ou silenciam genes, influenciando como a célula passa a se desenvolver, organizar e apresentar respostas ao ambiente. Assim, os mecanismos epigenéticos têm papel central na expressão gênica ao longo do desenvolvimento e das respostas, influenciando e impactando nos mecanismos biológicos centrais (Dai et al., 2021).

Dessa forma, evidências convincentes demonstraram que a regulação epigenética afeta desde as células cancerosas, as células imunes, e até mesmo as interações entre as células cancerosas e imunes. Como resultado, a modulação epigenética por si só pode provocar imunidade antitumoral robusta, se aplicada como abordagem intervencionista (Dai et al., 2021). Nesse aspecto, as terapias epigenéticas se apresentam como uma possibilidade promissora e estratégica no tratamento do câncer, seja como monoterapia ou em combinação com outros tratamentos, dada a capacidade de reverter o epigenoma do câncer através da inibição dos modificadores epigenéticos (Costa et al., 2023).

Partindo do pressuposto que as estimativas oncológicas mais recentes são alarmantes, pode-se pensar na aplicação da epigenética em tratamentos oncológicos diversos, como contra câncer de próstata e leucemia, que são o foco deste estudo. Essas estimativas indicam que em escala global, entre os tumores sólidos, o câncer de próstata é o quarto tipo mais comumente diagnosticado (7,3% do total de casos), atrás apenas do câncer de mama feminino (11,7%), pulmão (11,4%) e colorretal (10,0%). O câncer de próstata também é um dos cânceres mais frequentes (14,1% dos novos casos, excluindo o carcinoma basocelular) e a quinta causa de morte por câncer (6,8%) em homens (Sung et al., 2021). Nesse contexto, as

taxas padronizadas por idade (*Age Standardised Rate* - ASR) de incidência do câncer de próstata foram mais altas no norte da Europa (82,8), Austrália-Nova Zelândia (78,1) e Caribe (73,9). As taxas de mortalidade mais elevadas foram apresentadas pela África Austral (29,7), África Central (27,2), Caribe (26,4), África Ocidental (23,5) e Polinésia (19,7), segundo a International Agency for Research on Cancer (2025).

Já as leucemias são um grupo de cânceres hematológicos que se originam na medula óssea a partir de uma célula precursora hematopoiética. Embora sua etiologia exata muitas vezes permaneça indefinida, elas resultam na superprodução e acúmulo de glóbulos brancos doentes na corrente sanguínea. Em 2022, houve 487.294 (ASR 5,26) novos casos de leucemia e 305.405 (ASR 3,09) de mortes (Filho et al., 2022). De acordo com Bray et al. (2022), as taxas padronizadas por idade (ASR), independentemente do sexo, variam globalmente. Com relação às taxas de incidência mais altas, estas foram relatadas na Austrália-Nova Zelândia (11,37 por 100.000), América do Norte (11,21), Europa Ocidental (8,71) e Europa Setentrional (8,52). E as taxas de mortalidade mais elevadas foram observadas na Ásia Ocidental (4,51 por 100.000), América Central (3,86) e Sudeste Asiático (3,84).

Nesse cenário, a diversidade de alvos e mecanismos de ação dos produtos naturais serve de incentivo às pesquisas na busca por caminhos para contornar a resistência a medicamentos. A partir desses compostos, pode-se investigar possíveis efeitos sinérgicos de suas combinações para atingir múltiplos biomarcadores na resistência aos medicamentos, ou ainda considerar seu uso como tratamentos adjuvantes às terapias anticancerígenas convencionais (Talib et al., 2021). Su et al., (2018), por exemplo, descrevem como a curcumina atenuou a quimiorresistência e promoveu indução da apoptose, evidências do seu potencial terapêutico como suplemento à quimioterapia convencional em pacientes com câncer colorretal resistente. A investigação de compostos naturais com ação epigenética leva à descoberta de alternativas potenciais que superam a resistência aos medicamentos tradicionais, a exemplo da hispidulina, que tem papel crucial na superação da resistência ao SAHA (Balaji et al., 2025).

Desde o final dos anos 1950 sabe-se que a reprogramação epigenética pode ser afetada criticamente por fatores ambientais que atuam de maneira crucial na conservação de marcadores epigenéticos (Waddington, 1959). Perturbações de mecanismos epigenéticos impacta fortemente na expressão gênica e estabilidade cromossômica, promovendo consequências fisiológicas e patológicas que podem conduzir o organismo a distúrbios epigenéticos como instabilidade cromossômica, retardo mental e outras condições cognitivas, e não menos importante, desenvolvimento de cânceres (Sahafnejad et al., 2023).

Desse modo, as alterações na metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA), nas histonas, na expressão de ácido ribonucleico (RNA) não-codificantes (ncRNAs), além da alteração epigenética da expressão gênica são características de células cancerosas (Costa et al., 2023). Essas alterações epigenéticas determinam um fenótipo específico às células cancerosas, como o aumento da invasividade e/ou disseminação para outras partes do corpo, o crescimento descontrolado e a resistência à processos de morte celular (Ilango et al., 2020).

Diante desse panorama, os medicamentos epigenéticos, ou apenas epidrugs, são compostos que atuam nas enzimas responsáveis pela manutenção e estabelecimento de alterações epigenéticas, principalmente por meio da inibição das DNA metiltransferases (DNMTs) e das histonas desacetilases (HDACs), resultando na reativação de genes epigeneticamente silenciados envolvidos na supressão de tumores e no reparo do DNA (Yang et al., 2021; Suraweera et al., 2025). O uso de epidrogas com tratamento do câncer surge então como uma estratégia terapêutica promissora, diante da possibilidade de modificação do destino celular por meio de reprogramação epigenética (Furtado et al., 2019).

1.2 Produtos naturais como reguladores epigenéticos: perspectivas terapêuticas

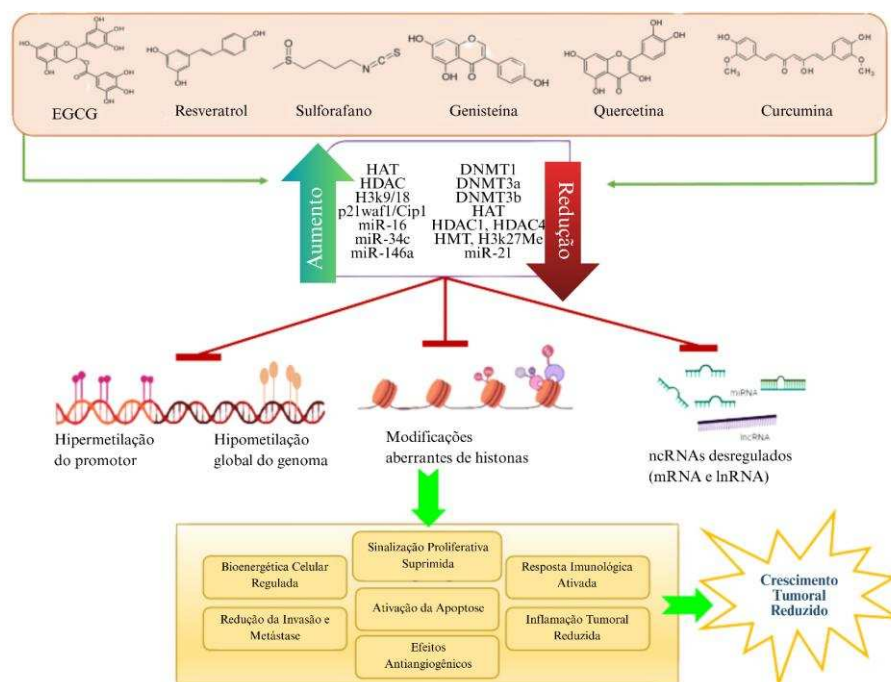
Produtos naturais de diferentes fontes podem apresentar compostos que atuam como reguladores diretos da maquinaria epigenética. Em diferentes tipos de cânceres os mecanismos epigenéticos podem regular as vias de apoptose, oncogenes, supressores tumorais e atuar na regulação do ciclo celular a partir de metabólitos secundários. Assim, os marcadores epigenéticos são considerados alvos na busca de novas moléculas terapêuticas, e portanto, é possível considerar a importância de investigar estratégias, usando compostos naturais na modulação epigenética (Irshad; Husain, 2021).

Ao longo dos últimos anos, vários compostos de fontes naturais têm sido identificados por desempenhar papel importante na reversão de alterações epigenéticas no câncer. Compostos como resveratrol, genisteína, quercetina, curcumina e outros, estão em fase de estudos clínicos, como apontam Irshad e Husain (2021). A curcumina, por exemplo, foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) e é usada como suplemento alimentar, tendo demonstrado inúmeros benefícios terapêuticos, principalmente devido seus efeitos antioxidantes e antiinflamatórios (Hewlings; Kalman, 2017).

Desse modo, o estudo de compostos bioativos têm impulsionado a prospecção de moléculas com ação quimiopreventivas ou terapêuticas, contribuindo como novas epidrogas clinicamente importantes. A Figura 1 abaixo, demonstra a ação de diferentes compostos de

fontes naturais nas enzimas reguladoras dos principais mecanismos epigenéticos que levam a alterações na metilação do DNA, configuração distorcida na estrutura da cromatina e modulação de RNAs não-codificantes. Tais alterações epigenéticas modificam as principais vias e processos do câncer, resultando em inibição do crescimento e da progressão de células cancerosas.

Figura 1 Ilustração das ações dos produtos naturais na modulação da maquinária dos hallmarks epigenéticos no câncer, reduzindo o processo de crescimento e progressão tumoral.



Fonte: adaptado de Irshad; Husain (2021).

Além dos produtos naturais acima mencionados, outros compostos de fontes naturais têm apresentado potencial regulatório da maquinária epigenética. Estudos têm mostrado que o flavonóide Casticina, isolado do *Fructus viticis*, foi capaz de inibir o carcinoma hepatocelular por regular a DNA metiltransferase 1 (DNMT1) e o microRNA miR-148a-3p (Li et al., 2020). Em outro exemplo, a Baicaleína inibiu as enzimas HDACs isoformas HDAC1 e HDAC8 (Yu et al., 2020). Assim como, o Garcinol que inibiu HDAC11, única HDAC de classe IV e que disponibiliza número reduzido de inibidores (Son et al., 2020). Portanto, se torna imperativo, investir esforços nas buscas de novas moléculas oriundas de fontes naturais que possam servir de templates como reguladores epigenéticos.

Nesse contexto, os produtos naturais especialmente os pertencentes às classes químicas dos flavonóides e isoflavonóides destacam-se como fontes promissoras de moléculas com potencial de modulação epigenética. Diversos compostos dessas classes apresentam propriedades pró-apoptóticas, antiproliferativas e capacidade de regular mecanismos epigenéticos, atuando sobre enzimas-chave como as DNMTs, histona acetiltransferases (HATs) e HDACs (Casari et al., 2025). Dessa forma, esses compostos naturais podem funcionar como epidrogas, oferecendo uma perspectiva promissora para o desenvolvimento abordagens terapêuticas específicas voltadas a pacientes com maior responsividade ao tratamento (Yang et al., 2021).

Vários produtos naturais isolados de plantas medicinais, tais como flavonóides, ácidos fenólicos, estilbenos e cetonas, exercem diferentes efeitos sobre modificadores epigenéticos, por exemplo, através de propriedades inibitórias contra DNMTs, HATs e HMT (histona metiltransferases), garantindo atuação epigenética contra o câncer (Arora et al., 2021; Kluska et al., 2021). Alguns metabólitos secundários derivados de plantas, principalmente compostos fenólicos, incluindo isoflavonóides, flavonóides, estilbenos e outros, podem funcionar no organismo humano por meio de mecanismos epigenéticos independentes dos receptores de estrogênio. Pesquisas indicam que esses compostos oferecem efeitos protetores contra doenças dependentes de estrogênio e benefícios potenciais na osteoporose, doença de Parkinson e certos tipos de câncer (Chavda et al., 2023). O potencial terapêutico de produtos naturais fica historicamente evidente quando notamos que desde meados dos anos 1940 mais de 50% dos medicamentos utilizados na quimioterapia foram obtidos a partir de produtos naturais e/ou variações sintéticas usando suas novas estruturas, incluindo isoflavonóides (Newman; Cragg, 2020).

Os isoflavonóides (IFs) são um subgrupo de flavonóides encontrados principalmente na soja e em outras plantas leguminosas e apresentam um potencial terapêutico notável (Mutha et al., 2021; Gajender et al. 2023). Tal potencial está relacionado, entre outros mecanismos, às alterações epigenéticas que podem ser moduladas por moléculas que fazem parte da nossa alimentação diária. Isoflavonóides como gliciteína, daidzeína e genisteína são mais estudados em ensaios pré-clínicos e clínicos e apresentaram a maior atividade anticancerígena direcionada a proteínas relacionadas à invasão, como MMP-2 e MMP-9 (Cayetano-Salazar et al., 2020). A genisteína, presente nos derivados de soja, demonstrou ter efeitos anticancerígenos há mais de uma década e meia, com estudos indicando ligação entre

uma baixa incidência de câncer de próstata e uma dieta rica em genisteína (Molinié; Georgel, 2009).

Na subclasse de isoflavonóides, os pterocarpanos têm atraído um interesse crescente devido a sua diversificada atividade biológica, embora considerando o seu papel específico enquanto moduladores epigenéticos, ainda seja um composto pouco explorado na literatura científica. O composto (+)-PTC, pertencente ao grupo dos pterocarpanos, e possui características estruturais que sugerem possível atividade epigenética e efeito antitumoral (Falcão et al., 2005; Militão et al., 2007; Pessoa et al., 2013; Paier et al., 2018; Farias et al., 2020; Farias et al., 2022).

Entre os estudos e investigações nesse campo, destacam-se os trabalhos de Falcão et al. (2005) no qual isolaram compostos de *Platymiscium floribundum* Vogel, incluindo o pterocarpano (+)-PTC, que foi testado contra linhagens leucêmicas humanas (HL-60 e CEM), adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), adenocarcinoma do cólon humano (HCT-8) e melanoma murino (B16), e apresentou forte atividade contra as linhagens celulares humanas e atividade moderada contra o melanoma murino. Militão et al. (2007), que testaram o (+)-PTC frente a um painel de quatro linhagens celulares de leucemia (HL-60, Molt-4, Jurkat e K562) e em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC), e obtiveram resultados que sugerem citotoxicidade seletiva desse composto em linhagens celulares tumorais.

Além desses achados, outras pesquisas apresentam contribuições como Paier et al. (2018), que observaram uma proteína específica da mitose como alvo do (+)-PTC e, portanto, a ação desse composto poderia ser restrita às células em mitose, potencialmente prevenindo a neurotoxicidade, uma vez que se poupariam células normais quiescentes e em interfase durante o tratamento clínico. Farias et al. (2020), avaliaram a ação citotóxica dos enantiômeros (+)-PTC e (-)-PTC contra linhagens celulares tumorais (HL-60, HCT-116, OVCAR-8 e SF-295), observando que o (+)-PTC foi particularmente ativo com as células OVCAR-8, alterações morfológicas induzidas pelo fármaco e causando apoptose, e que o (+)-PTC poderá se ligar ao receptor da cinesina Eg5 com maior afinidade e de maneira semelhante ao monastrol, um inibidor da mitose estabelecido. E na pesquisa de Farias et al. (2022), no qual apresentaram resultados que revelam atividade antiproliferativa do (+)-PTC contra a linhagem celular PC-3, pela regulação da progressão do ciclo celular com a mitose sendo interrompida na prófase ou prometáfase. Além disso, o tratamento resultou na formação de fusos monopolares, centrossomas desorganizados e distribuições de γ -tubulina amplamente perturbadas, enquanto a replicação dos centríolos permaneceu inalterada.

Nesse contexto, a combinação do (+)-PTC com o ácido suberoilânilida hidroxâmico (SAHA) conhecido como Vorinostat, pode representar uma estratégia inovadora na investigação de potenciais efeitos sinérgicos na modulação de vias epigenéticas que estão envolvidas no desenvolvimento das leucemias. Portanto, considerando a necessidade de ampliar o conhecimento sobre essa associação e a relevância científica nesse campo, a presente tese propõe uma investigação integrada de seus efeitos, tanto do ponto de vista computacional quanto experimental, com objetivos para a identificação de novas abordagens terapêuticas epigenéticas.

1.2 Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de novos fármacos

A aplicação de ferramentas *in silico*, como o perfil de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET) e o *docking* molecular, fornecem informações rápidas, econômicas e confiáveis que permitem prever interações entre compostos bioativos e alvos epigenéticos sem a necessidade de dados experimentais, propiciando melhor direcionamento teórico para a condução de ensaios *in vitro* (Sohlenius-Sternbeck et al., 2022; Sardar et al., 2023). No contexto desta pesquisa, a aplicação de técnicas *in silico* auxilia a compreensão do potencial epigenético do (+)-PTC isoladamente e em associação com SAHA, explorando cenários de interações alvo-proteína/proteína-proteína, e avaliando possibilidades de combinações que amplifiquem o efeito antineoplásico de compostos.

Essas análises permitem integrar metodologias *in silico* com o conhecimento sobre a epigenética como ferramentas de prospecção de novas abordagens terapêuticas. A modelagem computacional prévia à prática de bancada direciona a investigação experimental, ligando a previsão da dinâmica molecular dos compostos com a condução da prática laboratorial.

Certos compostos atuam como inibidores de histona desacetilase (iHDACs), a exemplo do SAHA, tendo sido aprovados para uso clínico em certos tipos de câncer, incluindo leucemias, e sendo considerados referência para a terapia epigenética do câncer (Nepali et al., 2020; Zhang et al., 2021; Nimal et al., 2024). Entretanto, evidências sugerem que sua eficácia pode ser ampliada quando utilizados em combinação com outras moléculas bioativas, o que motivou diversas pesquisas a se voltarem à identificação de associações sinérgicas e menos tóxicas, que visem suprimir a resistência aos medicamentos e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (Okem et al., 2023).

Desse modo, a produção científica sobre o tema revela lacunas existentes no campo do desenvolvimento de novos fármacos com potencial antineoplásico. Uma delas consiste no entendimento integrado dos efeitos epigenéticos da associação entre compostos bioativos de origem natural com inibidores de histonadesacetilases comumente utilizados na clínica, como é o caso do Vorinostat (SAHA). Outra lacuna diz respeito à integração de abordagens *in silico* - como a predição de características ADME, análise de redes de interação proteína-proteína e modelagem molecular - com estratégias *in vitro* - como avaliação de citotoxicidade, alterações morfológicas em linhagens de câncer.

A monoterapia com Vorinostat apresenta limitações, como toxicidade e desenvolvimento de resistência tumoral, que podem ser evitados por meio da aplicação de terapias combinadas. Assim, considerando os desafios existentes na elucidação de possíveis efeitos sinérgicos em terapias combinatórias, torna-se imprescindível o fomento a busca por novas abordagens que ampliem o repertório de moléculas com atuação epigenética para potencializar a consolidação de novos tratamentos antineoplásicos.

Propomos, portanto, a hipótese geral de que o composto (+)-PTC é capaz de promover modulação epigenética sinérgica quando associado ao Vorinostat, culminando em maior citotoxicidade e menor produção de efeitos adversos em tratamentos oncohematológicos e podendo representar uma estratégia inovadora na modulação de vias epigenéticas relacionadas ao desenvolvimento das leucemias.

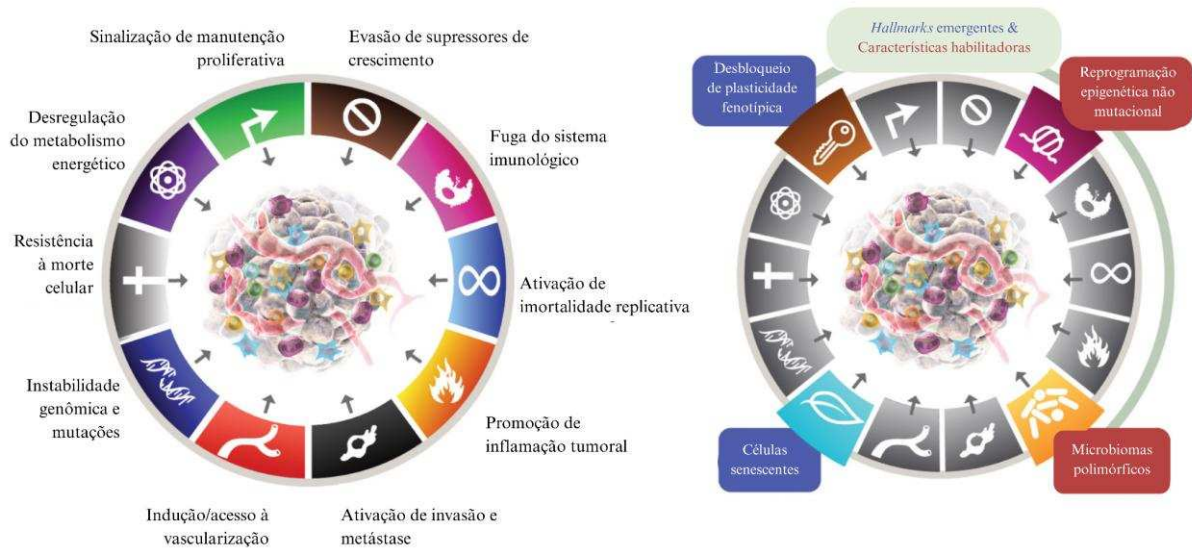
Diante desse contexto, esta tese teve como objetivo geral investigar o potencial epigenético do pterocarpano (+)-PTC e sua combinação com o inibidor de HDAC Vorinostat (SAHA) no tratamento dos tumores hematológicos e de próstata. Para isso, foram conduzidos estudos no Capítulo I que incluem: o mapeamento literário de compostos naturais com atividade epigenética diante de diferentes tipos de câncer, investigação da ação de flavonóides, isoflavonóides e pterocarpanos na reprogramação epigenética e tratamento de leucemias, e previsão das propriedades farmacocinéticas de diferentes compostos derivados das classes dos flavonóides, isoflavonóides e pterocarpanos. E no Capítulo II: ensaios *in silico* de interação por *docking* molecular, avaliação de potencial efeito sinérgico da combinação ((+)-PTC+SAHA), e caracterização da ação citotóxica dos compostos (+)-PTC e SAHA na viabilidade celular e progressão do ciclo celular.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer consiste em um dos principais desafios da saúde pública no mundo, mesmo diante dos avanços científicos e terapêuticos. Por ser uma doença multifatorial, fica evidente a importância de serem consideradas estratégias mais eficazes em seu tratamento. Células cancerígenas apresentam diversas alterações funcionais que as diferenciam fortemente de células não tumorais. A partir dos anos 2000 uma série de mudanças no metabolismo celular foram sistematizadas por Hanahan e Weinberg (2000) a fim de descrever essas alterações como marcas registradas do câncer, funcionando como uma referência central na pesquisa oncológica a partir de então.

Em “Hallmarks of Cancer”, Hanahan e Weinberg (2000) descreveram seis marcas, e após essa publicação, houve uma atualização com o acréscimo de duas novas marcas (reprogramação do metabolismo energético e evasão da resposta imune) e duas características potenciais (instabilidade genômica e inflamação tumoral) em novo trabalho publicado pelos mesmos autores, (Hanahan; Weinberg, 2011). Já em 2022, Hanahan revisou seus modelos anteriores, sugerindo a incorporação de outras duas marcas, além da potencialidade para novas duas características (influência de microbiomas polimórficos e desenvolvimento de fenótipo senescente) concluindo em 12 marcas registradas, conforme apresentado na (Figura 2): 1) sinalização de manutenção proliferativa, 2) evasão de supressores de crescimento, 3) reprogramação epigenética não mutacional, 4) fuga do sistema imunológico, 5) ativação de imortalidade replicativa, 6) promoção de inflamação tumoral, 7) ativação de invasão e metástase, 8) indução/acesso à vascularização, 9) instabilidade genômica e mutações, 10) resistência à morte celular, 11) desregulação do metabolismo energético e 12) desbloqueio de plasticidade fenotípica.

Figura 2 *Hallmarks* do câncer.



Fonte: adaptado de Hanahan, (2022).

Desse modo, relacionada com um dos *hallmarks*, a epigenética tem se destacado nos últimos anos, como campo vasto e de grande potencial para a compreensão e manejo do câncer, uma vez que as alterações epigenéticas são capazes de produzir expressões gênicas diferenciadas sem, no entanto, alterar a sequência do material genético. Essa característica está diretamente associada a processos de diferenciação, proliferação e morte celular. Nesse aspecto, há registro da aplicação de compostos moduladores da epigenética no tratamento de certos tipos de câncer, como é o caso do Vorinostat (SAHA), um inibidor de histonas desacetilases comumente utilizado na clínica, mas que apresenta limitações como toxicidade e desenvolvimento de resistência tumoral.

Tais limitações podem ser contornadas ao aplicar a terapia combinada como alternativa de tratamento do câncer. A combinação de epidrogas com compostos naturais pode apresentar efeitos sinérgicos, potencializando o efeito antitumoral e reduzindo efeitos adversos. O pterocarpano (+)-PTC, composto de origem natural, surge como molécula candidata a atuação em tratamentos oncológicos por apresentar um potencial bioativo relacionado à modulação epigenética e indução à morte celular em células tumorais. Ainda assim, há escassez

de estudos que investiguem a atuação do (+)-PTC associado a agentes epigenéticos consolidados, como o SAHA.

Nesse contexto, o uso de estratégias *in silico*, a exemplo do *docking* molecular, juntamente com ensaios *in vitro* é fundamental para manutenção do princípio da economicidade, visto que tais abordagens podem prever interações entre compostos quando associados, antes de sua aplicação em tratamento clínico. Dessa forma, investigar o potencial epigenético do (+)-PTC em associação com o SAHA, por meio de abordagens integrativas *in silico* e *in vitro*, contribui para desvendar e compreender os mecanismos de morte celular ao mesmo tempo que magnifica o espectro de perspectivas terapêuticas mais eficazes no combate ao câncer. Portanto, esta pesquisa se justifica pela necessidade de identificar novas interações moleculares benéficas ao tratamento oncológico, pela contribuição no avanço científico da aplicação de terapias combinadas e pela produção de estratégias alternativas cujo impacto social e na qualidade de vida é aplicável a pacientes oncológicos.

REFERÊNCIAS

- ARORA, I.; SHARMA, M.; TOLLEFSBOL, T. O. Combinatorial Epigenetics Impact of Polyphenols and Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4567, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20184567>
- BALAJI, S.; ANBARASU, S.; RAMAIAH, S.; ANBARASU, A. Hispidulin: a potential alternative to vorinostat against HDAC1 for acute myeloid leukemia. **Discover oncology**, v. 16, n. 1, p. 1389, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12672-025-03182-y>
- BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- CASARI, G.; ROMALDI, B.; SCIRÈ, A.; MINNELLI, C.; MARZIONI, D.; FERRETTI, G.; ARMENI, T. Epigenetic Properties of Compounds Contained in Functional Foods Against Cancer. **Biomolecules**, v. 15, n. 1, p. 15, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom15010015>
- CAYETANO-SALAZAR, L.; OLEA-FLORES, M.; ZUÑIGA-EULOGIO, M. D.; WEINSTEIN-OPPENHEIMER, C.; FERNÁNDEZ-TILAPA, G.; MENDOZA-CATALÁN, M. A.; ZACAPALA-GÓMEZ, A. E.; ORTIZ-ORTIZ, J.; ORTUÑO-PINEDA, C.; NAVARRO-TITO, N. Natural isoflavonoids in invasive cancer therapy: From bench to bedside. **Phytotherapy Research**. v. 35, n. 8, p. 4092-4110, 2021. DOI: [10.1002/ptr.7072](https://doi.org/10.1002/ptr.7072)
- CHAVDA, V. P.; CHAUDHARI, A. Z.; BALAR, P. C.; GHOLAP, A.; VORA, L. K. Phytoestrogens: Chemistry, potential health benefits, and their medicinal importance. **Phytotherapy Research**, v. 38, n. 6, p. 3060-3079, 2024. DOI: [10.1002/ptr.8196](https://doi.org/10.1002/ptr.8196)
- COSTA, P. M. D. S. *et al.* Epigenetic reprogramming in cancer: From diagnosis to treatment. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 11, 1116805, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1116805>
- DAI, E. *et al.* Epigenetic modulation of antitumor immunity for improved cancer immunotherapy. **Molecular cancer**, v. 20, n. 171, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01464-x>
- FALCÃO, M. J. *et al.* Cytotoxic flavonoids from *Platymiscium floribundum*. **Journal of natural products**, v. 68, n. 3, p. 423–426, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/np049854d>
- FARIAS, K. *et al.* Antitumor Potential of the Isoflavonoids (+)- and (-)-2,3,9-Trimethoxypterocarpan: Mechanism-of-Action Studies. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 11, n. 6, p. 1274–1280, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00097>

- FARIAS, K. M. *et al.* The Isoflavanoid (+)-PTC Regulates Cell-Cycle Progression and Mitotic Spindle Assembly in a Prostate Cancer Cell Line. **Chemistry & biodiversity**, v. 19, n. 5, e202200102, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200102>
- FILHO, A. M.; LAVERSANNE, M.; FERLAY, J.; COLOMBET, M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; PARKIN, D. M.; SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. The GLOBOCAN 2022 cancer estimates: Data sources, methods, and a snapshot of the cancer burden worldwide. **International journal of cancer**, v. 156, n. 7, p. 1336–1346, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.35278>
- FURTADO, C. L. M.; LUCIANO, M. C. S.; SANTOS, R. S.; FURTADO, G. P.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Ó. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. **Epigenetics**, v. 14, n. 12, p. 1164–1176, 2019. DOI:10.1080/15592294.2019.1640546
- GAJENDER, A. M.; SHARMA, A.; AZAD, A. K. A comprehensive review of the pharmacological importance of dietary flavonoids as hepatoprotective agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2023, n. 1, p. 4139117, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/4139117>
- HANAHAN D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- HEWLINGS, S. J.; KALMAN, D. S. Curcumin: A review of its effects on human health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, 2017. DOI: 10.3390/foods6100092
- ILANGO, S.; PAITAL, B.; JAYACHANDRAN, P.; PADMA, P. R.; NIRMALADEVI, R. Epigenetic alterations in cancer. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 25, n. 6, p. 1058–1109, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2741/4847>
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Cancer Today**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/en>. Acesso em: 21 set. 2025.
- IRSHAD, R.; HUSAIN, M. Natural products in the reprogramming of cancer epigenetics. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 417, p. 115467, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115467>
- KLUSKA, M.; WOŹNIAK, K. Natural polyphenols as modulators of etoposide anti-cancer activity. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 12, p. 6602, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22126602>
- LI, T. *et al.* SIRT1/2 orchestrate acquisition of DNA methylation and loss of histone H3 activating marks to prevent premature activation of inflammatory genes in macrophages. **Nucleic acids research**, v. 48, n. 2, p. 665–681, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1127>

- MILITÃO, G. C. *et al.* Comparative cytotoxicity of 2, 3, 9-trimethoxypterocarpan in leukemia cell lines (HL-60, Jurkat, Molt-4, and K562) and human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of natural medicines**, v. 61, p. 196-199, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11418-006-0118-3>
- MOLINIÉ, B.; GEORGEL, P. Genetic and epigenetic regulations of prostate cancer by genistein. **Drug news & perspectives**, v. 22, n. 5, p. 247-254, 2009. DOI: [10.1358/dnp.2009.22.5.1378633](https://doi.org/10.1358/dnp.2009.22.5.1378633)
- MUTHA, R. E.; TATIYA, A. U.; SURANA, S. J. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: An overview. **Future journal of pharmaceutical sciences**, v. 7, n. 1, p. 25, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00161-8>
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- NEPALI, K. *et al.* Purine/purine isoster based scaffolds as new derivatives of benzamide class of HDAC inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 196, 112291, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112291>
- NIMAL, S. *et al.* Apigenin and its combination with Vorinostat induces apoptotic-mediated cell death in TNBC by modulating the epigenetic and apoptotic regulators and related miRNAs. **Scientific reports**, v. 14, n. 1, p. 9540, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60395-x>
- OKEM, A.; HENSTRA, C.; LAMBERT, M.; HAYESHI, R. A review of the pharmacodynamic effect of chemo-herbal drug combinations therapy for cancer treatment. **Medicine in Drug Discovery**, v. 17, 100147, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2022.100147>
- PAIER, C. R. K. *et al.* Natural products as new antimitotic compounds for anticancer drug development. **Clinics (São Paulo, Brazil)**, v. 73(suppl 1), e813s, 2018. DOI: <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e813s>
- PESSOA, C. DO Ó. *et al.* **Method for producing pterocarpan, cytomodulating composition containing pterocarpan, and use of pterocarpan.** WO2013000054A1. 3 jan. 2013. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/047360565/publication/WO2013000054A1>. Acesso em: 12 jan 2024.
- SAHAFNEJAD, Z.; RAMAZI, S.; ALLAHVERDI, A. An update of epigenetic drugs for the treatment of cancers and brain diseases: a comprehensive review. **Genes**, v. 14, n. 4, p. 873, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes14040873>
- SARDAR, H. Drug likepotential of Daidzein usingSwissADME: In silico approaches. **PHYTONutrients**, v. 2, 2023. DOI: <https://doi.org/10.62368/pn.vi.19>
- SOHLENIUS-STERNBECK, A. K.; TERELIUS, Y. Evaluation of ADMET Predictor in Early Discovery Drug Metabolism and Pharmacokinetics Project Work. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 50, n. 2, p. 95–104, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.121.000552>

- SON, S. I.; SU, D.; HO, T. T.; LIN, H. Garcinol is an HDAC11 inhibitor. **ACS chemical biology**, v. 15, n. 11, p. 2866-2871, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/acscchembio.0c00719>
- SU, P.; YANG, Y.; WANG, G.; CHEN, X.; JU, Y. Curcumin attenuates resistance to irinotecan via induction of apoptosis of cancer stem cells in chemoresistant colon cancer cells. **International journal of oncology**, v. 53, n. 3, p. 1343–1353, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4461>
- SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- SURAWEERA, A.; O'BYRNE, K. J.; RICHARD, D. J. Epigenetic drugs in cancer therapy. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 44, n. 1, p. 37, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10555-025-10253-7>
- TALIB, W. H.; ALSAYED, A. R.; BARAKAT, M.; ABU-TAHA, M. I.; MAHMOD, A. I. Targeting Drug Chemo-Resistance in Cancer Using Natural Products. **Biomedicines**, v. 9, n. 10, p. 1353, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101353>
- YU, X.; LI, H.; HU, P.; QING, Y.; WANG, X.; ZHU, M.; WANG, H.; WANG, Z.; XU, J.; GUO, Q.; HUI, H. Natural HDAC-1/8 inhibitor baicalein exerts therapeutic effect in CBF-AML. **Clinical and translational medicine**, v. 10, n. 4, p. e154, 2020. DOI: [10.1002/ctm2.154](https://doi.org/10.1002/ctm2.154)
- YANG, T.; YANG, Y.; WANG, Y. Predictive biomarkers and potential drug combinations of epi-drugs in cancer therapy. **Clin Epigenet**, v. 13, n. 113, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01098-2>
- WADDINGTON, C. H. Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. **Nature**, v. 183, n. 4676, p. 1654-1655, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1038/1831654a0>
- WADDINGTON, C. H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. **Nature**, v. 150, p. 563–565, 1942. DOI: <https://doi.org/10.1038/150563a0>
- ZHANG, J. *et al.* A novel epigenetic drug conjugating flavonoid and HDAC inhibitor confer suppression of acute myeloid leukemogenesis. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 135, n. 14, p. 1751–1765, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1042/CS20210571>

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

- Investigar o potencial epigenético do pterocarpano (+)-PTC, isoladamente e em combinação com Vorinostat (SAHA), integrando abordagens *in silico* e *in vitro* para compreender mecanismos de morte celular e perspectivas terapêuticas em modelos de câncer hematológico e de próstata.

3.2 Objetivos Específicos

- Mapear compostos de produtos naturais de flavonóides, isoflavonóides e pterocarpanos com atividade epigenética em modelos de câncer, enfatizando seus mecanismos moleculares e potencial para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.
- Investigar o efeito sinérgico da associação do pterocarpano (+)-PTC com o Vorinostat (SAHA), frente às diferentes linhagens celulares de câncer.
- Investigar o efeito modulador do (+)-PTC relacionado à regulação do ciclo celular da linhagem celular MOLM-13 após 6 e 12 horas de incubação.
- Explorar a aplicação de ferramentas *in silico* na predição e caracterização do potencial epigenético do pterocarpano (+)-PTC como alternativa terapêutica no tratamento das leucemias.
- Análise de *docking* molecular, usando interações entre os compostos (+)-PTC e SAHA em alvos moleculares, tanto separadamente quanto em combinação, para análise dos mecanismos de ação.
- Determinar a CI50 da combinação ((+)-PTC+SAHA) para linhagens celulares de câncer de próstata (PC-3, DU-145) e leucemia (KG-1).
- Determinar a progressão do ciclo celular das células KG-1 tratadas com a combinação ((+)-PTC+SAHA).

4 CAPÍTULO I - EPIGENETIC MODULATION BY NATURAL COMPOUNDS: THERAPEUTIC PERSPECTIVES FOR LEUKEMIA

RUNNING TITLE: EPIGENOME WITH ISOFLAVONOIDS

Eduardo de Moraes e Sousa^{1,2,#}; Maria Claudia dos Santos Luciano^{3,#}; Gabriel Caetano de Souza^{2,#} Sarah Sant'Anna Maranhão²; Maria Francilene Souza Silva²; Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira²; Felipe Vasconcelos²; Cristiana Libardi Miranda Furtado^{2,4,*}; Claudia do Ó Pessoa^{2,*}

#Equal contribution

*Corresponding Authors

¹Northeast Biotechnology Network - RENORBIO, Graduate Program in Biotechnology

²Drug Research and Development Center, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil;

³Ceará Cancer Institute – ICC;

⁴Genetics, Ecology and Evolution Department, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

*Corresponding Authors: clibardim@gmail.com/claudia.luciano@icc.org.br

Abstract

The flavonoids, isoflavonoids, and pterocarpan influence critical molecular pathways and restore cell homeostasis, including modulation of epigenetic mechanisms. This feature indicates a crucial therapeutic potential that could be better explored to attend cancer treatment. Isoflavonoids, acting as epigenetic modulators, could contribute to the development of new therapeutic approaches in cancer, especially in onco-hematological diseases. Pterocarpan are a subgroup of isoflavonoids have been extensively studied for their biological properties. The molecule (+)-2,3,9-Trimethoxypterocarpan demonstrates high gastrointestinal absorption (GI) and the ability to cross the blood-brain barrier (BBB) *in silico* without violating Lipinski's rule, making it a desirable candidate in leukemia treatment. Synthesis of this molecule dates back more than a decade. *In silico* models such as SwissADME corroborate the idea of good intestinal absorption and the capability to cross the BBB. Also, it's suggested likelihood for P-glycoprotein substrate, which is related to its potential for active efflux from both the BBB and GI. This finding, along with the biological mechanisms indicated, places this class of natural products in an essential category for current therapeutic possibilities, especially in blood cancer.

Key words: Natural products; genetics; epidrugs; flavonoids; epigenome.

1 Introduction

The flavonoids are related to diverse roles, specifically targeting the epigenome of tumor cells in Human Cancers[1] including effects in important epigenetic modifications such as histone deacetylases [2,3] and methylation[3].

In silico evaluations consider multiple parameters that help to optimize the screening of potential therapeutic agents. The therapeutic potential of a compound is strongly determined by its ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) properties [4].

Leukemias are a group of hematological malignancies of blood in which the clonal expansion of aberrant hematopoietic stem cells causes malignant disorders of the blood and bone marrow [5].

Disorders caused by defects in chromatin modifiers and remodelers have been described for hematological malignancies, corroborating and strengthening the role of epigenetic aberrations in the etiology of cancer. Compounds targeting epigenetic enzymes (epidrugs) are the next-generation models that have been considered in our understanding and use in different cancer epigenetics approaches [6,7].

The application of predictive software in the early stages of drug discovery enables in silico analysis of new molecules. This strategy has several advantages, including low cost and reliability in obtaining ADMET data. These predictions make the process more efficient, as they support decisions about which compounds should advance in the development stages. For this reason, we chose to evaluate the pharmacokinetic properties of the molecules described in this review study.

1.1. The Emerging Epigenetic Role of Flavonoids

Several natural compounds isolated from medicinal plants, such as flavonoids, phenolic acids, stilbenes, and ketones, have demonstrated the ability to prevent and treat a wide range of human diseases, including cancer. These effects are, in part, mediated through their action on epigenetic modifiers, e.g., inhibitory properties against DNMTs, HATs (histone acetyltransferases), and HMT (histone methyltransferases) [8,9]. Flavonoids are plant-derived secondary metabolites commonly found in the Fabaceae Lindl. (Leguminosae) family[10].

They are synthesized in response to environmental stressors such as pathogen attack, insect herbivory, extreme temperature fluctuations, droughts, salinity, floods, and heavy metals. These metabolites play a vital role in plant protection and are distributed throughout various plant tissues, including fruits, grains, bark, and stems [11–13].

Flavonoids represent the most prominent subclass of polyphenolic compounds, notable for their structural diversity and secondary metabolites, with a wide range of biological activities[14]. The basic structure of flavonoids is based on a C₆–C₃–C₆ skeleton typically occurring as an aglycone with a benzo- γ -pyrone core (Figure 4). Based on the position of the phenyl group on the central pyrone ring, flavonoids can be classified into two major groups: flavonoids at the 2-position and isoflavonoids at the 3-position.

Flavonoids are associated with a variety of health-promoting benefits and are used as ingredients in various pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic, and medicinal products. In addition, flavonoids exhibit a broad spectrum of pharmacological activities: antiviral, hepatoprotective, antibacterial, analgesic, cytostatic, anti-allergic, anti-estrogenic, estrogenic, and apoptotic properties[11,15,16]. Since the 2010, flavonoids have been repeatedly recognized as important chemopreventive phytochemicals for age-related diseases [17–19].

Some reports suggest that flavonoids have the potential to restore the altered epigenetic marks that are altered during the carcinogenesis process [20–22]. They also show anticancer effects against various cancer cell lines, making them a remarkable candidate for epidrugs[23]. Ganai et al.[22] have reviewed scientific reports since the 1990s on the antiproliferative effects of luteolin and its use in epigenetic therapeutic directions. Zhu et al. [24] have emphasized the potential of quercetin for epigenetic regulation, including its effects on various DNMTs (DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B inhibition) and enhancement of histone acetylation (H3 and H4). It is estimated that there are approximately 5,000 known flavonoid structures, which can be categorized into several groups based on their chemical structure, degree of unsaturation, and oxidation state of the C-ring, including flavanones, flavones, flavonols, chalcones, flavanols, anthocyanidins, and isoflavonoids [10,11,16,25]

1.2 Isoflavonoids

Isoflavonoids (IFs) are a subgroup of flavonoids predominantly found in soybeans and other legumes that exhibit great therapeutic potential against numerous diseases [14,26].

This subclass comprises about 1,000 known structures and is found among species of the subfamily Papilionoideae DC, which is considered a chemotaxonomic feature for this group[25]. Most IFs have structural similarities to endogenous mammalian β -estradiol (estrogen)[14,26] (Figure 5). Due to this similarity, IFs can selectively bind to estrogen receptors (ER), conferring estrogen-like activity that contributes to anticancer activity in hormone-dependent cancers.

IFs have been used to treat and prevent several types of cancer due to their antiproliferative properties [25]. Over the past two decades, growing evidence has demonstrated that IFs modulate epigenetic mechanisms, thereby altering gene expression [27,28]. These compounds influence epigenetic regulation through multiple interconnected mechanisms. One of the key mechanisms involves the promotion of receptor dimerization and subsequent recruitment of nuclear co-activator (NCoA) or co-repressor (NCoR) complexes associated with HATs or HDACs. Additionally, IFs modulate transcriptional activity through the regulation of DNA methylation patterns, which control the accessibility of the transcriptional machinery to specific genomic loci. They also participate in the activation and repression of histone marks by dynamically influencing chromatin-modifying complexes at gene promoter regions. Furthermore, IFs affect the expression of tumor suppressor or oncogenic microRNAs (miRNAs) and have been shown to downregulate the long non-coding RNA (lncRNA) HOTAIR, which is frequently overexpressed in cancer cells through miRNA-mediated pathways [27,29]. Collectively, these mechanisms highlight the multifaceted epigenetic potential of IFs in modulating gene expression programs involved in cancer development and progression.

1.3 Pterocarpans

Pterocarpans represent the second largest group of isoflavonoids. The structure presents a tetracyclic nucleus derived from the basic isoflavonoids scaffold and are characterized by a fused heterocyclic benzo-pyran-furan-benzene system that can be formed from isoflavones [30,31]. The general structure of a pterocarpan and its possible stereochemical forms is presented in Figure 6. These compounds have a tetracyclic benzofuran-benzopyran ring system with two chiral centers at positions 6a and 11a, which determines the

stereochemical configuration of the molecule, although it is known that only naturally occurring compounds exhibit cis-fusion of the B/C rings [31].

Pterocarpan are frequently used in traditional medicine as alternative and complementary therapies and have been extensively studied due to their numerous biological properties. A pterocarpan derivative isolated from the roots of *Sophora flavescens* Ait has been reported to have anti-inflammatory properties[32]. A pterocarpan derived from *Erythrina subumbrans* (Hassk.) Merr. showed promising antidiabetic activity by inhibiting α -amylase, as well as a potent antimicrobial activity against Gram-positive bacterial strains, including *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* DMST 15503, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* NPRC 001R, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) and antifungal activity against *Candida albicans* ATCC 10231 [33]. Several other studies highlight that different pterocarpan molecules have demonstrated cytotoxic potential in various cancers, such as leukemia (HL-60, Molt-4, Jurkat, K562), breast (MCF-7, BT-549), colon (HCT-116), melanoma (B16), prostate (DU 145, PC3) and ovarian cancer (OVCAR-8, A2780) [34–38]. Like other flavonoids, pterocarpan have also been reported as epigenetic agents, with different signaling pathways involved. Pure total flavonoids from Citrus (PTFC) modulate epigenetic effects by negatively regulating the expression of the lncRNA RNA H19 in exosomes derived from intestinal tissue. Regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway induces autophagy and influences gene expression related to Atg5 and cellular cross-talk proteins, thereby enhancing intestinal barrier protection against NSAID-induced injury [39]. Irirogenin upregulates the expression of miR-425, which negatively regulates the expression of the receptor-interacting protein kinase 1 (*RIPK1*) gene. This epigenetic modification leads to cardioprotection and cellular outcomes that favor cardiomyocyte survival and function [40]. Puerarin stimulates epigenetic effects by downregulating the TRPM3/miR-204 signaling pathway, which contributes to increased expression of *RUNX2*, an *MC3T3-E1* osteoblast protective factor, thus affecting osteogenic cell fate [41].

Genistein, an isoflavonoid, exerts epigenetic effects via the PI3K/AKT signaling pathway by downregulating oncoproteins such as pAKT, p-PI3K, DNMT3B, and MCL1. Genistein promotes apoptosis and inhibits proliferation in A549 lung cancer cells[42]. In MCF-7 breast cancer cells, genistein significantly upregulates the expression of miR-23b, leading to oncogenic gene repression, apoptosis induction, and antitumor response support [43]. Medicarpin, a natural pterocarpan, negatively regulates miR-542-3p, which inhibits bone

morphogenetic protein 7 (BMP-7) and PI3K/survivin signaling. This suggests that miR-542-3p suppresses osteogenic differentiation and promotes osteoblast apoptosis by repressing BMP-7 and its downstream signaling [44]. Additionally, Medicarpin upregulates lipolytic gene expression of hormone-sensitive lipase (HSL) and adipose triglyceride lipase (ATGL) by activating the cAMP/PKA/HSL signaling pathway activation in brown adipocytes, thereby stimulating protein phosphorylation and promoting lipolysis [45].

Over the past two decades, the Brazilian group focused on the identification and characterization of pterocarpan (Figure 7A), especially (+)2,3,9-trimetoxipterocarpan ((+)-PTC) (Figure 7B and C), a natural enantiomer isolated from *Platymiscium floribundum* Vogel [46] that was first synthesized in 2012. The (+)-PTC molecule has shown cytotoxic activity against four leukemia cell lines (HL-60, MOLM-4, JURKAT, K562) and also appeared to be selective for tumor cell lines after showing a small reduction in the number of viable peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (19% after 72 h)[47]. (+)-PTC acts as an antimetabolic agent by blocking the separation of duplicated centrosomes, a critical process in the formation of normal mitotic spindles, leading to cell cycle arrest during the transition to G2/M phase in leukemic cells. This cytostatic activity of (+)-PTC in leukemic cells was confirmed by immunocytochemical experiments on the MCF-7, T47D, and HS58T (human breast adenocarcinoma) cell lines[34,47]. All of these findings support the use of (+)-PTC as a valid drug option based on an epigenetic approach. Table 1 summarizes the association between flavonoid derivatives and epigenetic modifications. All the studied structures are described in chemical aspects in Supplementary Table 4.

1.4 Other molecular pathways associated with flavonoids, isoflavonoids and pterocarpan

In addition to their epigenetic role, flavonoids, isoflavonoids, and pterocarpan also act on other molecular regulation (Table 2). This is also important considering that different signaling mechanisms contribute to the development of different types of cancer. Several studies have reported multiple effects, such as morphological differentiation, cell cycle arrest, cytotoxic effect with apoptosis/necrosis induction, cell proliferation, and cell viability reduction. Ganai et al.[22], and Maugeri et al.[48] discussed the potential of flavonoids to affect a variety of molecular targets, leading to DNA fragmentation, cell cycle arrest, and apoptosis induction.

Among isoflavonoids, Genistein has been associated with both mRNA expression and protein expression, as well as tumor suppressor gene expression, leading to the Wnt Signaling Pathway regulation[49]. Genistein also has molecular effects on the CXCR-4 and VEGF pathway by decreasing the surface expression levels of CXCR-4 and increasing VEGF secretion levels[50]. Another isoflavonoid, β -estradiol, exerts its effects on Jurkat cells via the PI3K/Akt pathway and decreases cell proliferation. This mechanism involves interactions with metabolic enzymes, cytokines, nitric oxide and signaling molecules[51].

Pterocarpan can also play a decisive role in molecular mechanisms. Sarno et al.[51] observed that Medicarpin extracted from *Trifolium repens* L. causes inhibition of cell growth associated with complete inhibition of BCR-ABL/STAT5 and activation of the P38 signaling pathway. Hancio et al.[52] described the LQB-118 compound potential to induce cell death in cytarabine-resistant cells by reducing the expression of the XIAP protein. Additionally, it was also observed that *AURKB* downregulation led to morphological changes typical of the cell death process, as well as the cell cycle arrest in the G2/M phase and apoptosis induction[53].

1.5 *In silico* ADME prediction to evaluated flavonoids

Given the pharmacological potential of the molecules previously described in this study, their predicted ADME values were used to determine their pharmacokinetic properties (Table 3). These properties were calculated using SwissADME. The designs of the molecules were created using the MolView application (see Supplementary Material 1 for chemical structures and SMILES results). The potential of a compound as a drug is strongly influenced by its ADME properties[54]. The use of software capable of predicting ADME of new drug candidate molecules is a practical advantage in early drug development as it enables *in silico* evaluation without the need for experimental data[55]. ADME predictions aid in the rational selection of viable candidates prior to synthesis by providing rapid, cost-effective, and reliable insights[56].

In silico ADME predictions evaluate different parameters to assess the performance of a molecule (Figure 8). Pharmacokinetics refers to absorption, distribution, metabolism, and excretion without toxic effects. A promising candidate must have a predictable metabolism without causing toxic metabolites. Physicochemical properties such as molecular weight, number of heavy atoms, and polarity influence the ability of a molecule to cross biological membranes and be orally absorbed[57], which is crucial for AML therapies targeting the bone marrow and hematopoietic system. Good solubility, usually expressed as the logarithm of molar

solubility (logS), is essential for gastrointestinal absorption and systemic bioavailability and can be predicted by different models (ESOL, Ali, Silicos-IT). Druglikeness parameters, including PAINS alerts and Lipinski violations, are based on efficacy/safety comparisons with thousands of known drugs[57,58]. A candidate molecule that violates many of these parameters must be avoided. Additionally, promising molecules must be chemically stable and commercially viable (synthetic accessibility).

The bioavailability radar criteria[57] were considered most relevant for screening candidate compounds for AML treatment (see Supplementary Material 2 for radar evaluation results). In this context, Daina et al.[57] and Martin[59] established the following criteria shown in Figure 9: a) Lipophilicity refers to the affinity of the compound for non-polar environments. Values in the optimal range indicate favorable oral absorption and systemic bioavailability. b) Size refers to the molecular weight of a compound (g/mol), corresponding to a range that supports membrane permeability and oral activity, defined by the bioavailability radar and the Lipinski's Rule of Five; c) Polarity refers to the surface area occupied by polar atoms (oxygen and nitrogen). The values are related to the permeability of the gastrointestinal tract and the blood-brain barrier; d) Solubility refers to the solubility of a compound in water, a critical parameter for orally administered drugs; e) Saturation refers to the amount of sp³-hybridized carbon atoms in the molecule; higher saturation values may reduce non-specific interactions; f) Flexibility refers to the number of single bonds that confer conformational adaptability to the molecule, an important parameter for absorption and ligand binding specificity; g) Molecular weight, in accordance with the Lipinski rule, when below 500 g/mol, favors both permeability and solubility; h) ESOL classes (log S scale) categorize aqueous solubility, which is useful for preliminary screening based on less complex formulation and more likely absorption; i) Synthetic Accessibility (SA score) estimates the difficulty of synthesizing a molecule, taking into account structural complexity; and finally j) A Bioavailability Score (ABS) is a measure to estimate the higher probability of oral bioavailability of molecules in vivo. ABS ranges from 0.11 (very low probability), 0.17 (low probability), 0.55 (moderate probability) if the molecule fulfills the Lipinski rule of five, 0.56 (moderate probability) to 0.85 (high probability of oral bioavailability).

In table 3 Medicarpin, LQB-118, and (+)-2, 3, 9-Trimethoxypterocarpan stand out for their high gastrointestinal absorption and ability to cross the blood-brain barrier without violating Lipinski's rule, which is desirable in drug candidates for the treatment of leukemia. (+)-2, 3, 9-Trimethoxypterocarpan, in particular, has good solubility and molecular weight,

similar to the other molecules, and accessibility for synthesis within expectations. In fact, the first record of the synthesis of this molecule dates back more than a decade.

In Supplementary Figure 10, the molecule (+)-2, 3, 9-Trimethoxypterocarpan is identified as number 17. Its graph overlaps with the pink area, suggesting a strong likelihood as drug-like properties. The BOILED-Egg model in SwissADME supports the prediction for good intestinal absorption and BBB crossing. The blue dot indicates a probable substrate for P-glycoprotein, which is related to its potential for active efflux from both the BBB and GI. These parameters all together suggest that (+)-2, 3, 9-Trimethoxypterocarpan is promising as an epigenetic drug.

1.6 Targeting Epigenetics in Cancer

Epigenetic regulation refers to a reversible mechanism that modulates gene expression and chromatin structure without altering the underlying DNA sequence. This process primarily involves several covalent modifications to nucleic acids and histone proteins[60]. The main epigenetic regulatory mechanisms include DNA methylation, histone modification—such as acetylation, methylation, ADP-ribosylation, ubiquitination, and phosphorylation—and the regulation mediated by non-coding RNA (ncRNA)[61–63].

Environmental factors are well-recognized epigenetic modifiers that influence epigenetic reprogramming and play an essential role in both the establishment and maintenance of epigenetic markers[64]. Given their critical role in modulating gene expression and maintaining chromosomal stability, disruption of epigenetic mechanisms has significant consequences for numerous physiological and pathological processes. Such disturbances are associated with epigenetic disorders, including neurodevelopmental syndromes and cognitive impairments[65]. Epigenetic alterations are more flexible than genetic mutations. This enables them to play crucial roles in immune surveillance and drug resistance development[65].

Epigenetic reprogramming is the most important event in the process of cell differentiation. Once established, epigenetic patterns of genomic function must be maintained during cell division and DNA replication at the expense of cell fate. Disruption of the epigenetic landscape in differentiated cells can lead to altered cell fate that promotes the development of carcinogenesis and enhances tumor progression[66].

The identification of the cell of derivation of leukemia remains a longstanding query and a challenge in cancer research over the last few decades. Oncogene-induced reprogramming and the mixed lineage leukemia gene (MLL), including chimeric fusion, partial tandem duplication (PTD), amplification and internal exonic deletion, represent one of the most common recurring oncogenic events[67,68].

Given the possibility of reprogramming the epigenome and using it to alter the cellular landscape, it could prove to be a promising and up-to-date therapeutic strategy[69], especially in leukemia treatment. Epigenetic drugs, or simply epidrugs, are chemical compounds that cause changes in DNA and chromatin structure. They act on the enzymes responsible for the maintenance and establishment of epigenetic modifications, primarily by inhibiting DNA methyltransferases (DNMTs) and histone deacetylases (HDACs), resulting in the reactivation of epigenetically silenced genes involved in tumor suppression and DNA repair[70,71]. Although the development, research, and application of epidrugs is extensive, they have a compelling anti-tumor effect that underscores their utility in cancer treatment. The development and research of biomarkers for epidrugs offers a promising direction for the screening of new promising antineoplastic agents.

1.7 Conclusions

This review highlights the potential of flavonoids, isoflavonoids and pterocarpanes in modulating epigenetic mechanisms that affect gene expression. These small molecules have the potential to affect a variety of molecular targets by influencing critical molecular pathways, including the p19Arf-p53-p21Cip1 signaling pathway, PI3K/AKT/mTOR, TRPM3/miR-204, cAMP/PKA/HSL, ERK and JNK pathways activation, Caspase cascade activation, and regulation of several miRNAs such as miR-23b, miR-425, and miR-542-3p. These mechanisms inhibit uncontrolled cell proliferation, promote modulation of gene expression and restore cell homeostasis, representing a relevant therapeutic potential for leukemia treatment. The investigation of the underlying mechanisms has so far led to a better understanding of how these compounds can potentially be integrated into anti-leukemic research. Thus, isoflavonoids stand out as an alternative strategy based on epigenetic modulation, contributing to the development of new therapeutic approaches in the fight against oncological diseases with major background observed into leukemia.

REFERENCES

1. Bouyahya, A., Mechchate, H., Oumeslakht, L., Zeouk, I., Aboulaghras, S., Balahbib, A., Zengin, G., Kamal, M. A., Gallo, M., Montesano, D., & El Omari, N. (2022). The Role of Epigenetic Modifications in Human Cancers and the Use of Natural Compounds as Epidrugs: Mechanistic Pathways and Pharmacodynamic Actions. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/biom12030367>
2. Bouyahya, A., El Hachlafi, N., Aanniz, T., Bourais, I., Mechchate, H., Benali, T., Shariati, M. A., Burkov, P., Lorenzo, J. M., Wilairatana, P., Mubarak, M. S., & El Omari, N. (2022). Natural Bioactive Compounds Targeting Histone Deacetylases in Human Cancers: Recent Updates. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/molecules27082568>
3. Mukherjee, N., Kumar, A. P., & Ghosh, R. (2015). DNA Methylation and Flavonoids in Genitourinary Cancers. In *Current Pharmacology Reports* (Vol. 1, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s40495-014-0004-8>
4. Valerio, L. G. (2009). In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. In *Toxicology and Applied Pharmacology* (Vol. 241, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.08.022>
5. Juliusson, G., & Hough, R. (2016). Leukemia. *Progress in Tumor Research*, 43. <https://doi.org/10.1159/000447076>
6. Nebbioso, A., Tambaro, F. P., Dell'Aversana, C., & Altucci, L. (2018). Cancer epigenetics: Moving forward. In *PLoS Genetics* (Vol. 14, Issue 6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007362>
7. Miranda Furtado, C. L., Dos Santos Luciano, M. C., Silva Santos, R. Da, Furtado, G. P., Moraes, M. O., & Pessoa, C. (2019). Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. In *Epigenetics* (Vol. 14, Issue 12). <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1640546>
8. Akone, S. H., Ntie-Kang, F., Stuhldreier, F., Ewonkem, M. B., Noah, A. M., Mouelle, S. E. M., & Müller, R. (2020). Natural Products Impacting DNA Methyltransferases and Histone Deacetylases. *Frontiers in pharmacology*, (vol. 11, Issue, 992). <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00992>
9. Kluska, M., & Woźniak, K. (2021). Natural polyphenols as modulators of etoposide anti-cancer activity. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126602>
10. Noviany, N., Hadi, S., Nofiani, R., Lotulung, P. D., & Osman, H. (2023). Fabaceae: A significant flavonoid source for plant and human health. *Physical Sciences Reviews*, 8(11). <https://doi.org/10.1515/psr-2021-0224>
11. Roy, A., Khan, A., Ahmad, I., Alghamdi, S., Rajab, B. S., Babalghith, A. O., Alshahrani, M. Y., Islam, S., & Islam, M. R. (2022). Flavonoids a Bioactive Compound from Medicinal Plants and Its Therapeutic Applications. In *BioMed Research International* (Vol. 2022). <https://doi.org/10.1155/2022/5445291>

12. Chen, S., Wang, X., Cheng, Y., Gao, H., & Chen, X. (2023). A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 13). <https://doi.org/10.3390/molecules28134982>
13. Al-Khayri, J. M., Rashmi, R., Toppo, V., Chole, P. B., Banadka, A., Sudheer, W. N., Nagella, P., Shehata, W. F., Al-Mssallem, M. Q., Alessa, F. M., Almaghasla, M. I., & Rezk, A. A. S. (2023). Plant Secondary Metabolites: The Weapons for Biotic Stress Management. In *Metabolites* (Vol. 13, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/metabo13060716>
14. Mutha, R. E., Tatiya, A. U., & Surana, S. J. (2021). Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00161-8>
15. Jain, S., & Vaidya, A. (2023). Comprehensive review on pharmacological effects and mechanism of actions of taxifolin: A bioactive flavonoid. In *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100240>
16. Dixon, R. A., & Pasinetti, G. M. (2010). Flavonoids and isoflavonoids: From plant biology to agriculture and neuroscience. *Plant Physiology*, 154(2). <https://doi.org/10.1104/pp.110.161430>
17. Torello, C. O., Alvarez, M. C., & Olalla Saad, S. T. (2021). Polyphenolic flavonoid compound quercetin effects in the treatment of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 19). <https://doi.org/10.3390/molecules26195781>
18. Ki, M.-R., Youn, S., Kim, D. H., & Pack, S. P. (2024). Natural Compounds for Preventing Age-Related Diseases and Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(14), 7530. <https://doi.org/10.3390/ijms25147530>
19. Carlos-Reyes, Á., López-González, J. S., Meneses-Flores, M., Gallardo-Rincón, D., Ruíz-García, E., Marchat, L. A., Astudillo-De La Vega, H., Hernández De La Cruz, O. N., & López-Camarillo, C. (2019). Dietary compounds as epigenetic modulating agents in cancer. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 10, Issue MAR). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00079>
20. Jiang, W., Xia, T., Liu, C., Li, J., Zhang, W., & Sun, C. (2021). Remodeling the Epigenetic Landscape of Cancer—Application Potential of Flavonoids in the Prevention and Treatment of Cancer. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.705903>
21. Khan, H., Belwal, T., Efferth, T., Farooqi, A. A., Sanches-Silva, A., Vacca, R. A., Nabavi, S. F., Khan, F., Prasad Devkota, H., Barreca, D., Sureda, A., Tejada, S., Dacrema, M., Daglia, M., Suntar, Í., Xu, S., Ullah, H., Battino, M., Giampieri, F., & Nabavi, S. M. (2021). Targeting epigenetics in cancer: therapeutic potential of flavonoids. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 61, Issue 10). <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1763910>
22. Ganai, S. A., Sheikh, F. A., Baba, Z. A., Mir, M. A., Mantoo, M. A., & Yattoo, M. A. (2021). Anticancer activity of the plant flavonoid luteolin against preclinical models of various cancers and insights on different signalling mechanisms modulated. In *Phytotherapy Research* (Vol. 35, Issue 7). <https://doi.org/10.1002/ptr.7044>

23. Bouyahya, A., El Hachlafi, N., Aanniz, T., Bourais, I., Mechchate, H., Benali, T., Shariati, M. A., Burkov, P., Lorenzo, J. M., Wilairatana, P., Mubarak, M. S., & El Omari, N. (2022). Natural Bioactive Compounds Targeting Histone Deacetylases in Human Cancers: Recent Updates. *Molecules*, 27(8), 2568. <https://doi.org/10.3390/molecules27082568>
24. Zhu, J., Cheng, X., Naumovski, N., Hu, L., & Wang, K. (2025). Epigenetic regulation by quercetin: a comprehensive review focused on its biological mechanisms. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 65, Issue 4). <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2278760>
25. Carvalho, A., Santos, L., Freitas, J., & Chaves, M. (2020). Isoflavonoides da tribo dalbergieae: uma contribuição quimiosistemática para a subfamília papilionoideae. *Química Nova*. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170588>
26. Gajender, Mazumder, A., Sharma, A., & Azad, M. A. K. (2023). A Comprehensive Review of the Pharmacological Importance of Dietary Flavonoids as Hepatoprotective Agents. In *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (Vol. 2023). <https://doi.org/10.1155/2023/4139117>
27. Pudenz, M., Roth, K., & Gerhauser, C. (2014). Impact of soy isoflavones on the epigenome in cancer prevention. In *Nutrients* (Vol. 6, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/nu6104218>
28. Kaufman-Szymczyk, A., Jalmuzna, J., & Lubecka-Gajewska, K. (2025). Soy-derived isoflavones as chemo-preventive agents targeting multiple signalling pathways for cancer prevention and therapy. *British Journal of Pharmacology*, 182(10), 2259–2286. <https://doi.org/10.1111/bph.16353>
29. Sajid, M., Stone, S. R., & Kaur, P. (2021). Recent Advances in Heterologous Synthesis Paving Way for Future Green-Modular Bioindustries: A Review With Special Reference to Isoflavonoids. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.673270>
30. Carvalho, G. G. C. De. (2021). *Identificação De Biomarcadores Na Síndrome Mielodisplásica E Predição In Silico Com Caracterização In Vitro Da Farmacocinética De Um Novo Fármaco Antitumoral Candidato A Molécula Lead* [Universidade Federal do Ceará]. https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/60515/1/2021_tese_ggccarvalho.pdf
31. Perez Rojo, F., Pillow, J. J., & Kaur, P. (2023). Bioprospecting microbes and enzymes for the production of pterocarpan and coumestans. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1154779>
32. Lu, K. Z., Feng, Z. M., Yuan, X., Yang, Y. N., Jiang, J. S., Zhang, X., & Zhang, P. C. (2021). Five Novel Pterocarpan Derivatives from *Sophora flavescens*. *Chinese Journal of Chemistry*, 39(10). <https://doi.org/10.1002/cjoc.202100357>
33. Phukhatmuen, P., Meesakul, P., Suthiphasilp, V., Charoensup, R., Maneerat, T., Cheenpracha, S., Limtharakul, T., Pyne, S. G., & Laphookhieo, S. (2021). Antidiabetic and antimicrobial flavonoids from the twigs and roots of *Erythrina subumbrans* (Hassk.) Merr. *Heliyon*, 7(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06904>
34. Militão, G. C. G., Prado, M. P., Pessoa, C., De Moraes, M. O., Silveira, E. R., Lima, M. A. S., Veloso, P. A., Costa-Lotuf, L. V., & MacHado-Santelli, G. M. (2014). Pterocarpan

- induce tumor cell death through persistent mitotic arrest during prometaphase. *Biochimie*, *104*(1). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.06.005>
35. Harinantenaina, L., Brodie, P. J., Slebodnick, C., Callmender, M. W., Rakotobe, E., Randrianasolo, S., Randrianaivo, R., Rasamison, V. E., Tendyke, K., Shen, Y., Suh, E. M., & Kingston, D. G. I. (2010). Antiproliferative compounds from *Pongamiopsis pervilleana* from the madagascar dry forest (1). *Journal of Natural Products*, *73*(9). <https://doi.org/10.1021/np100430r>
36. Farias, K., da Costa, R. F., Meira, A. S., Diniz-Filho, J., Bezerra, E. M., Freire, V. N., Guest, P., Nikahd, M., Ma, X., Gardiner, M. G., Banwell, M. G., de Oliveira, M. da C. F., de Moraes, M. O., & do Ó Pessoa, C. (2020). Antitumor Potential of the Isoflavonoids (+)- and (-)-2,3,9-Trimethoxypterocarpan: Mechanism-of-Action Studies. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *11*(6), 1274–1280. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00097>
37. Gaspar, F. V., Marques Ribeiro, S., Barcellos, J. C. F., Monteiro, S., Domingos, J. L. O., Claudia dos Santos Luciano, M., Paier, C. R. K., Pessoa, C., & Costa, P. R. R. (2021). New 5-carba-pterocarpan: Synthesis and preliminary antiproliferative activity on a panel of human cancer cells. *Bioorganic Chemistry*, *107*. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104584>
38. Moraes de Farias, K., Rosa-Ribeiro, R., Souza, E. E., Kobarg, J., Banwell, M. G., de Brito Vieira Neto, J., Leyenne Alves Sales, S., Roberto Ribeiro Costa, P., Cavalcante dos Santos, R., Vilaça Gaspar, F., Gomes Barreto Junior, A., da Conceição Ferreira Oliveira, M., Odorico de Moraes, M., Libardi M. Furtado, C., Carvalho, H. F., & Pessoa, C. (2022). The Isoflavanoid (+)-PTC Regulates Cell-Cycle Progression and Mitotic Spindle Assembly in a Prostate Cancer Cell Line. *Chemistry and Biodiversity*, *19*(5). <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200102>
39. Chen, S., He, R., Li, Y., & Zhang, S. (2024). Pure total flavonoids from *Citrus ameliorate* NSAIDs-induced intestinal mucosal injury via regulation of exosomal LncRNA H19 and protective autophagy. *Heliyon*, *10*(9), e29797. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29797>
40. Guo, L., Zheng, X., Wang, E., Jia, X., Wang, G., & Wen, J. (2020). Iriogenin treatment alleviates doxorubicin (DOX)-induced cardiotoxicity by suppressing apoptosis, inflammation and oxidative stress via the increase of miR-425. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *125*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109784>
41. Zeng, X., Feng, Q., Zhao, F., Sun, C., Zhou, T., Yang, J., & Zhan, X. (2018). Puerarin inhibits TRPM3/miR-204 to promote MC3T3-E1 cells proliferation, differentiation and mineralization. *Phytotherapy Research*, *32*(6). <https://doi.org/10.1002/ptr.6034>
42. Sacko, K., Thangavel, K., & Shoyele, S. A. (2019). Codelivery of genistein and miRNA-29b to a549 cells using aptamer-hybrid nanoparticle bioconjugates. *Nanomaterials*, *9*(7). <https://doi.org/10.3390/nano9071052>
43. Avci, C. B., Susluer, S. Y., Caglar, H. O., Balci, T., Aygunes, D., Dodurga, Y., & Gunduz, C. (2015). Genistein-induced mir-23b expression inhibits the growth of breast cancer cells. *Wspolczesna Onkologia*, *19*(1). <https://doi.org/10.5114/wo.2014.44121>

44. Kureel, J., Dixit, M., Tyagi, A. M., Mansoori, M. N., Srivastava, K., Raghuvanshi, A., Maurya, R., Trivedi, R., Goel, A., & Singh, D. (2014). MiR-542-3p suppresses osteoblast cell proliferation and differentiation, targets BMP-7 signaling and inhibits bone formation. *Cell Death and Disease*, 5(2). <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.4>
45. Imran, K. M., Yoon, D., Lee, T. J., & Kim, Y. S. (2018). Medicarpin induces lipolysis via activation of Protein Kinase A in brown adipocytes. *BMB Reports*, 51(5). <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.5.228>
46. Falcão, M. J. C., Pouliquem, Y. B. M., Lima, M. A. S., Gramosa, N. V., Costa-Lotufo, L. V., Militão, G. C. G., Pessoa, C., Odorico De Moraes, M., & Silveira, E. R. (2005). Cytotoxic flavonoids from *Platymiscium floribundum*. *Journal of Natural Products*, 68(3). <https://doi.org/10.1021/np049854d>
47. Paier, C. R. K., Maranhão, S. S., Carneiro, T. R., Lima, L. M., Rocha, D. D., Santos, R. da S., de Farias, K. M., de Moraes-Filho, M. O., & Pessoa, C. (2018). Natural products as new antimitotic compounds for anticancer drug development. In *Clinics* (Vol. 73). <https://doi.org/10.6061/CLINICS/2018/E813S>
48. Maugeri, A., Russo, C., Musumeci, L., Lombardo, G. E., De Sarro, G., Barreca, D., Cirimi, S., & Navarra, M. (2022). The Anticancer Effect of a Flavonoid-Rich Extract of Bergamot Juice in THP-1 Cells Engages the SIRT2/AKT/p53 Pathway. *Pharmaceutics*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102168>
49. Zhou, H. rong, Shen, J. zhen, Fu, H. ying, & Zhang, F. (2021). Genistein-induced Anticancer Effects on Acute Leukemia Cells Involve the Regulation of Wnt Signaling Pathway Through H4K20me1 Rather Than DNA Demethylation. *Current Medical Science*, 41(5). <https://doi.org/10.1007/s11596-021-2445-8>
50. Shahmoradi, M., Banisharif-Dehkordi, F., kouhihabibidehkordi, M., GhatrehSamani, M., Jami, M. S., Shirzad, H., & Pourgheysari, B. (2022). Molecular effects of genistein, as a potential anticancer agent, on CXCR-4 and VEGF pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Molecular Biology Reports*, 49(6). <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07163-0>
51. Sarno, F., Pepe, G., Termolino, P., Carafa, V., Massaro, C., Merciai, F., Campiglia, P., Nebbioso, A., & Altucci, L. (2020). *Trifolium Repens* blocks proliferation in chronic myelogenous leukemia via the BCR-ABL/STAT5 pathway. *Cells*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/cells9020379>
52. Hancio, T., Mazzoccoli, L., Guimarães, G., Robaina, M., Mendonça, B. D. S., Nestal De Moraes, G., Monte-Mor, B. D. C. R., Mayumi Gutiyama, L., De Carvalho, L. O., Netto, C. D., Costa, P. R. R., De Faria, F. C. C., & Maia, R. C. (2021). The pterocarpanquinone LQB-118 compound induces apoptosis of cytarabine-resistant acute myeloid leukemia cells. *International Journal of Oncology*, 58(6). <https://doi.org/10.3892/ijo.2021.5204>
53. Sarah Leyenne Alves Sales. (2022). *Regulation of cell cycle control gene expression in acute myeloid leukemia (kg-1) cell line: target characterization of a new drug*. Universidade Federal do Ceará.
54. Divya Rajaselvi, N., Jida, M. D., Nair, D. B., Sujith, S., Beegum, N., & Nisha, A. R. (2023). Toxicity prediction and analysis of flavonoid apigenin as a histone deacetylase inhibitor:

- an in-silico approach. *In Silico Pharmacology*, 11(1). <https://doi.org/10.1007/s40203-023-00170-4>
55. Sohlenius-Sternbeck, A. K., & Terelius, Y. (2022). Evaluation of ADMET Predictor in Early Discovery Drug Metabolism and Pharmacokinetics Project Work. *Drug Metabolism and Disposition*, 50(2). <https://doi.org/10.1124/dmd.121.000552>
56. Sardar, Haseeba. (2023). Drug like potential of Daidzein using SwissADME prediction: In silico Approaches. *PHYTONutrients*. <https://doi.org/10.62368/pn.vi.18>
57. Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
58. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>
59. Martin, Y. C. (2005). A bioavailability score. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(9). <https://doi.org/10.1021/jm0492002>
60. Dai, E., Zhu, Z., Wahed, S., Qu, Z., Storkus, W. J., & Guo, Z. S. (2021). Epigenetic modulation of antitumor immunity for improved cancer immunotherapy. In *Molecular Cancer* (Vol. 20, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01464-x>
61. Bouyahya, A., Mechchate, H., Oumeslakht, L., Zeouk, I., Aboulaghras, S., Balahbib, A., Zengin, G., Kamal, M. A., Gallo, M., Montesano, D., & El Omari, N. (2022). The Role of Epigenetic Modifications in Human Cancers and the Use of Natural Compounds as Epidrugs: Mechanistic Pathways and Pharmacodynamic Actions. *Biomolecules*, 12(3), 367. <https://doi.org/10.3390/biom12030367>
62. Wang, K., Liu, H., Hu, Q., Wang, L., Liu, J., Zheng, Z., Zhang, W., Ren, J., Zhu, F., & Liu, G. H. (2022). Epigenetic regulation of aging: implications for interventions of aging and diseases. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01211-8>
63. Lossi, L., Castagna, C., & Merighi, A. (2024). An Overview of the Epigenetic Modifications in the Brain under Normal and Pathological Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3881. <https://doi.org/10.3390/ijms25073881>
64. Waddington, C. H. (1959). Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature*, 183(4676). <https://doi.org/10.1038/1831654a0>
65. Sahafnejad, Z., Ramazi, S., & Allahverdi, A. (2023). An Update of Epigenetic Drugs for the Treatment of Cancers and Brain Diseases: A Comprehensive Review. In *Genes* (Vol. 14, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/genes14040873>
66. Costa, P. M. da S., Sales, S. L. A., Pinheiro, D. P., Pontes, L. Q., Maranhão, S. S., Pessoa, C. do Ó., Furtado, G. P., & Furtado, C. L. M. (2023). Epigenetic reprogramming in cancer: From diagnosis to treatment. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1116805>

67. Yip, B. H., & So, C. W. E. (2013). Mixed lineage leukemia protein in normal and leukemic stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 238(3), 315–323. <https://doi.org/10.1177/1535370213480717>
68. Fregona, V., Bayet, M., & Gerby, B. (2021). Oncogene-Induced Reprogramming in Acute Lymphoblastic Leukemia: Towards Targeted Therapy of Leukemia-Initiating Cells. *Cancers*, 13(21), 5511. <https://doi.org/10.3390/cancers13215511>
69. Miranda Furtado, C. L., Dos Santos Luciano, M. C., Silva Santos, R. Da, Furtado, G. P., Moraes, M. O., & Pessoa, C. (2019). Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. *Epigenetics*, 14(12), 1164–1176. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1640546>
70. Yang, T., Yang, Y., & Wang, Y. (2021). Predictive biomarkers and potential drug combinations of epi-drugs in cancer therapy. In *Clinical Epigenetics* (Vol. 13, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01098-2>
71. Suraweera, A., O’Byrne, K. J., & Richard, D. J. (2025). Epigenetic drugs in cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, 44(1), 37. <https://doi.org/10.1007/s10555-025-10253-7>

LIST OF TABLES

Table 1 Assessment of flavonoid derivatives and their association to epigenetic mechanisms (*in vitro* studies) in biological systems.

Chemical class	Pathway alteration	Epigenetic alteration	Cytological alteration	Reference
Epigallocatechin gallate (EGCG)	p19 ^{Arf} -p53-p21 ^{Cip1} signaling pathway	DNMT1 downregulation, and p19 ^{Arf} , p53 and p21 ^{Cip1} upregulation	Cell cycle arrest in G1 phase, increase in apoptosis	Wu et al. (2020)
Apigenin-Vorinostat-Conjugate (AVC)	Caspase cascade activation	HDACs 1, 2, 3, and 6 inhibition, p21 ^{Cip1} up-regulation, increase in H3 acetylation	Apoptosis at the early and late phases	Zhang et al. (2021)
Flavonoids	Evaluation of exosomes and autophagosomes pathways by the expression of light chain 3 (LC3)-I, LC3-II, ZO-1, Occludin and Claudin-1	Downregulating exosomal lncRNA H19	Protective effect on the intestinal mucosal barrier and an autophagy inducer.	Chen et al. (2024)
Quercetin	ERK and JNK pathways activation, increase in histone acetylation	DNMT1 and DNMT3a downregulation, increase in H3 and H4 acetylation	Apoptosis induction	Zhu et al. (2023)
Baicalein	JAK2/STAT5 signaling pathway	DNMT1 downregulation, SHP-1 demethylation	Apoptosis induction	Xu et al. (2023)
Genistein	miR-23b regulation	Up-regulation of miR-23b	Inhibits cell growth	Avcı et al. (2015)
Puerarin	TRPM3/miR-204/Runx2	Downregulation of TRPM3/miR-204 and activation of Runx2.	Cell proliferation, differentiation and mineralization,	Zeng et al. (2018)
Isoflavonoids	Genistein-miRNA-29b-loaded hybrid nanoparticles (GMLHN)	Downregulation of DNMT3B	Antiproliferative effect and apoptosis initiation (pAKT and p-PI3K pathway)	Sacko et al. (2019)
Irigenin	miR-425 regulation/RIPK1	Up-regulation of miR-425	Suppress apoptosis, inflammation and oxidative stress	Guo et al. (2020)
Medicarpin	Protein Kinase A (PKA)	Interference RNA	Regulate the levels of hormone-sensitive lipase (Hsl) and adipose triglyceride lipase (Agtl)	Imran et al. (2018)
Pterocarpan	BMP-7/PI3K-survivin signaling	miR-542-3p	Tumor repressor and inhibition of osteogenesis by BMP-7-mediated.	Kureel et al. (2014)

Table 2 Assessment of flavonoid derivatives and their association to molecular mechanisms (*in vitro* studies) in biological systems.

	Chemical class	Pathway alteration	Molecular alteration	Cytological alteration	Reference
Flavonoids	Luteolin	Apoptosis induction by the mitochondrial pathway	Bax upregulation, Bcl2 downregulation	Induction of morphological differentiation into granulocytes and DNA fragmentation	Ganai et al. (2021)
	Daidzein	Reduction of ANXA1 levels	Downregulation of COX-2 activity	Cell cycle arrest, apoptosis, and phagocytosis	Sabran et al. (2021)
	Flavonoid-Rich Extract of Bergamot Juice (Ble)	SIRT2/AKT/p53 pathway	AKT phosphorylation reduction, SIRT2 downregulation, p53 upregulation	Cell cycle arrest in S phase and apoptosis induction	Maugeri et al. (2022)
Isoflavonoids	Genistein	Wnt Signaling Pathway	Wnt5a upregulation, β -catenina downregulation, KMT5A upregulation, H4K20me1 enrichment rather than DNA demethylation	Cell cycle arrest in G2/M phase	Zhou et al. (2021)
	Genistein	VEGF/CXCL12/CXCR4	CXCR4 downregulation and enhancement of VEGF expression and secretion	Decrease cell viability in a time- and dose-dependent manner	Shahmoradi et al. (2022)
	β -estradiol	PI3K/Akt pathway	Downregulation of hexokinase activity, upregulation of IL-6, NO, p-Akt/Total Akt	Decrease cell proliferation	Nair et al. (2025)
Pterocarpan	Medicarpin	BCR-ABL/STAT5 pathway	BCR/Abl downregulation	Strong cytotoxic effect with apoptosis/ necrosis induction	Sarno et al (2020)
	LQB-118	NF- κ B pathway	XIAP downregulation	Apoptosis induction	Hancio et al. (2021)
	(+)-2, 3, 9-Trimethoxypterocarpan	CEP55, AURKB, MAD2, CDC20, ATM pathways	Downregulation of AURKB expression	Morphological alterations, cell cycle arrest, and apoptosis induction	Sales (2022)

Table 3 ADME prediction of different flavonoid, isoflavonoid, and pterocarpan molecules. *according to Lipinski et al. [80] and Danai et al. [79].

Molecule name	Physicochemical Properties			Water Solubility		Pharmacokinetics			Druglikeness			Medicinal Chemistry		
	Formula	Molecular Weight (g/mol)	ESOL Log S (mol/L)	ESOL Class	GI absorption	BBB permeant	Lipinski violations (Ideal = 0*)	ABS	Pains alerts (Ideal = 0*)	Bren alerts (Ideal = 0*)	Synthetic Accessibility			
Luteolin	C15H10O6	286.24	-3.71	Soluble	High	No	0.00	0.55	1.00	1.00	3.02			
Quercetin	C15H10O7	302.24	-3.16	Soluble	High	No	0.00	0.55	1.00	1.00	3.23			
Genistein	C15H10O5	270.24	-3.72	Soluble	High	No	0.00	0.55	0.00	0.00	2.87			
Daidzein	C15H10O4	254.24	-3.53	Soluble	High	Yes	0.00	0.55	0.00	0.00	2.79			
β -estradiol	C18H24O2	272.38	-4.28	Moderately soluble	High	Yes	0.00	0.55	0.00	0.00	3.49			
Medicarpin	C15H12O4	256.25	-3.43	Soluble	High	Yes	0.00	0.55	0.00	0.00	3.43			
LQB-118	C19H12O4	304.30	-3.84	Soluble	High	Yes	0.00	0.85	1.00	0.00	4.12			
(+)-2,3,9-Trimethoxypterocarpan	C18H18O5	314.33	-3.91	Soluble	High	Yes	0.00	0.55	0.00	0.00	3.88			

LIST OF FIGURES

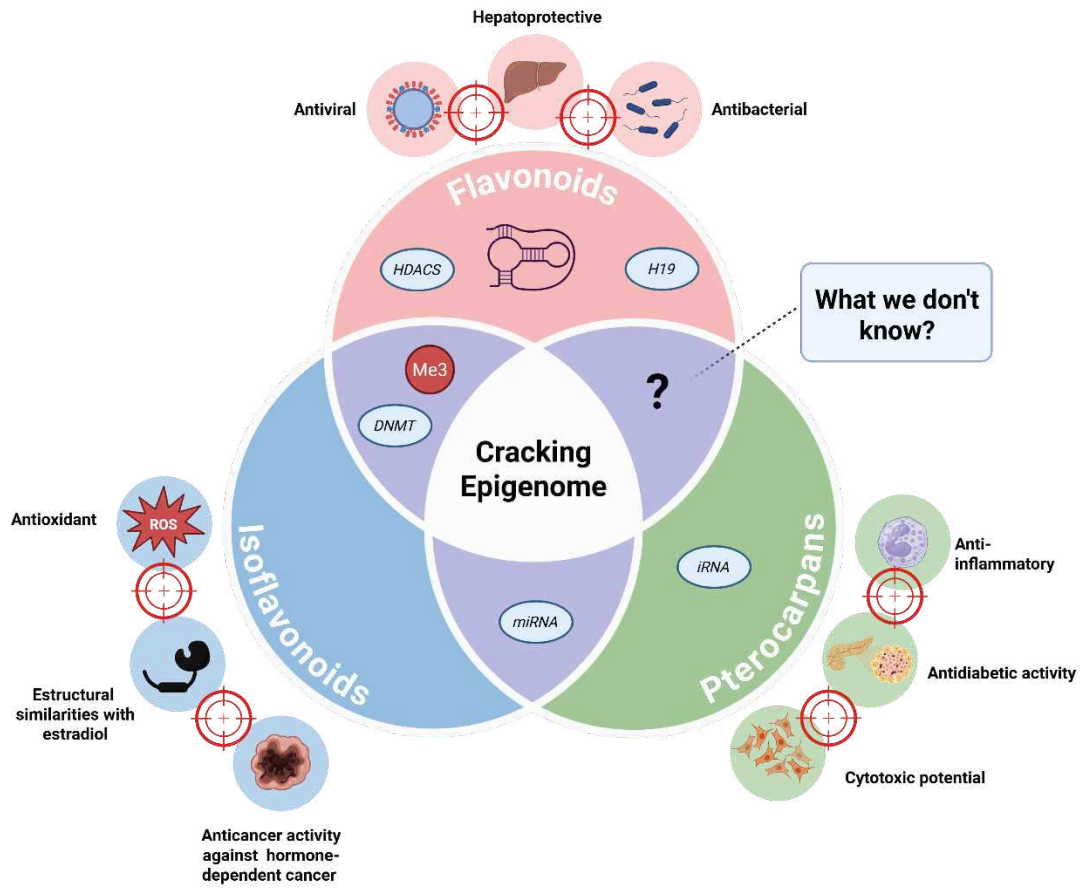


Figure 3 Graphical Abstract Venn diagram illustrating the epigenetic roles of three phytochemical groups—Flavonoids, Isoflavonoids, and Pterocarpanes.

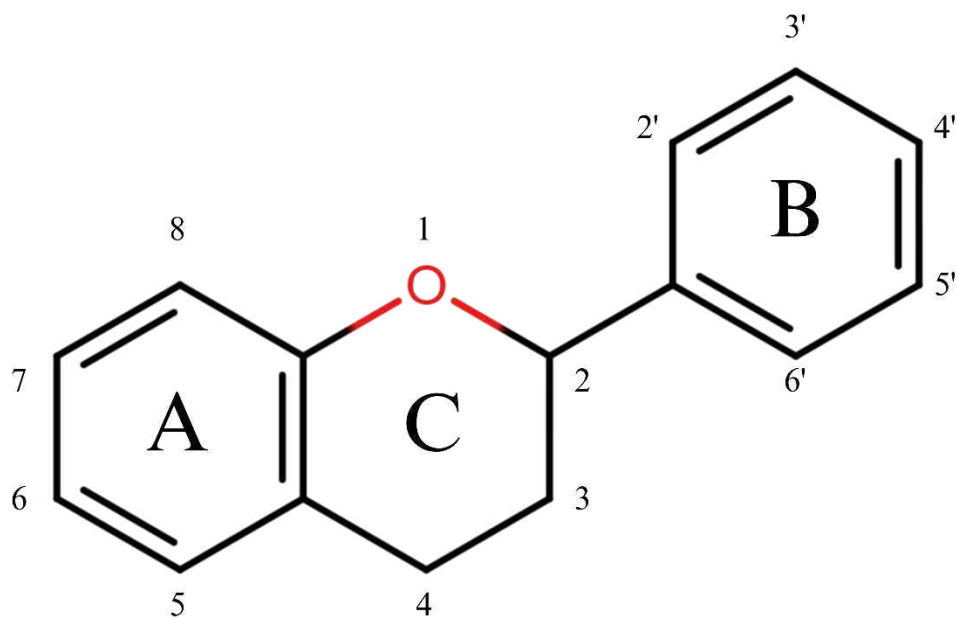


Figure 4 Basic flavonoid structure: fifteen-carbon skeleton consisting of two benzene rings (A and B) linked via a heterocyclic pyrane ring (C), forming a three-carbon bridge (C6-C3-C6).

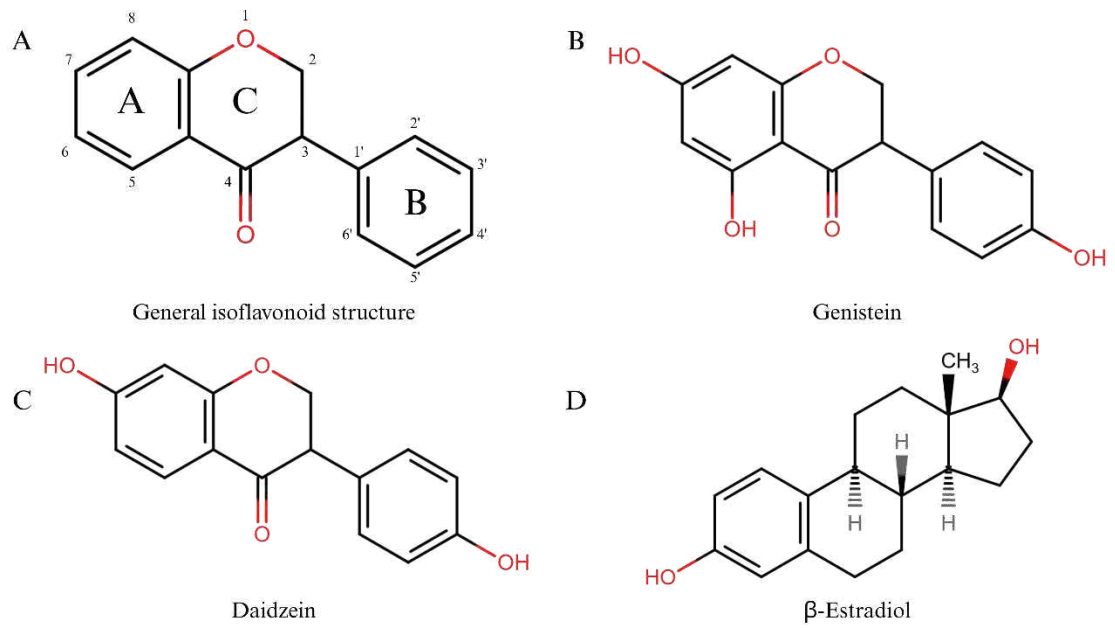


Figure 5 Chemical structure similarity between the general isoflavonoid structure (A), genistein (B), and daidzein (C), and mammalian endogenous hormone β -estradiol (D). The only chemical structural difference between isoflavonoids and other flavonoids is their B ring at the C3 position of the heterocyclic C ring of the diphenylpropane structure (C6-C3-C6).

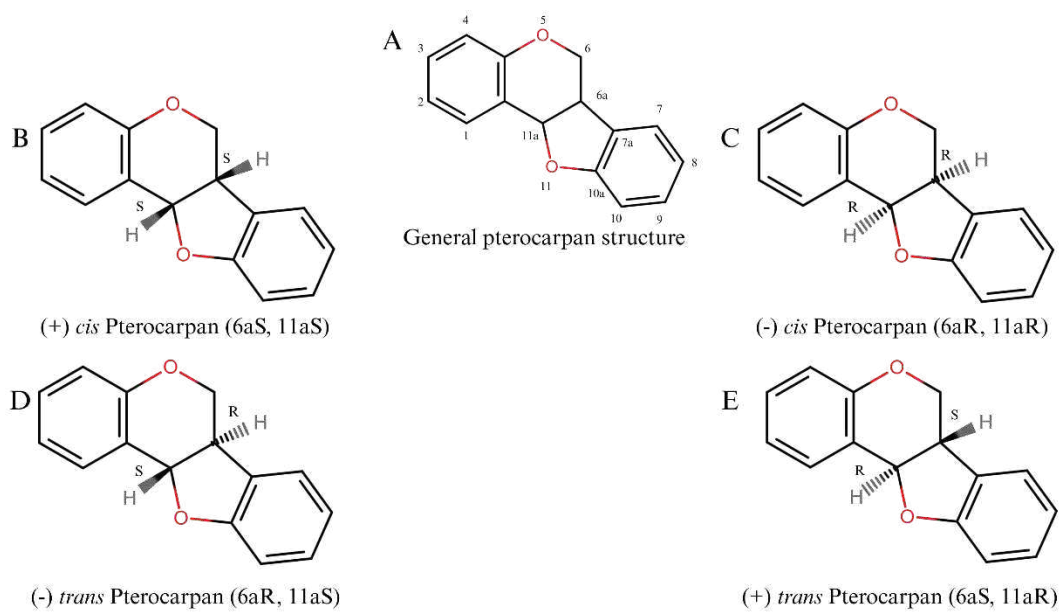


Figure 6 General structure of pterocarpan and their stereochemical possibilities.

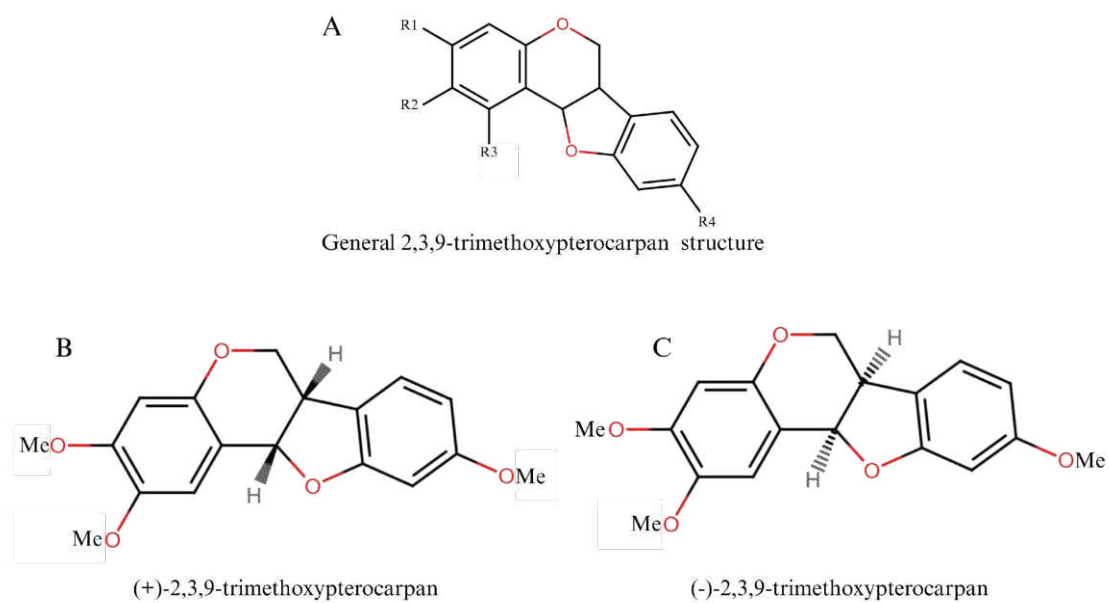


Figure 7 General formula of 2,3,9-trimethoxypterocarpan (A): R1, R2, R3, and R4 are independently chosen from the group comprising OH; CH₃O; and enantiomers (+) (B) and (-) (C).

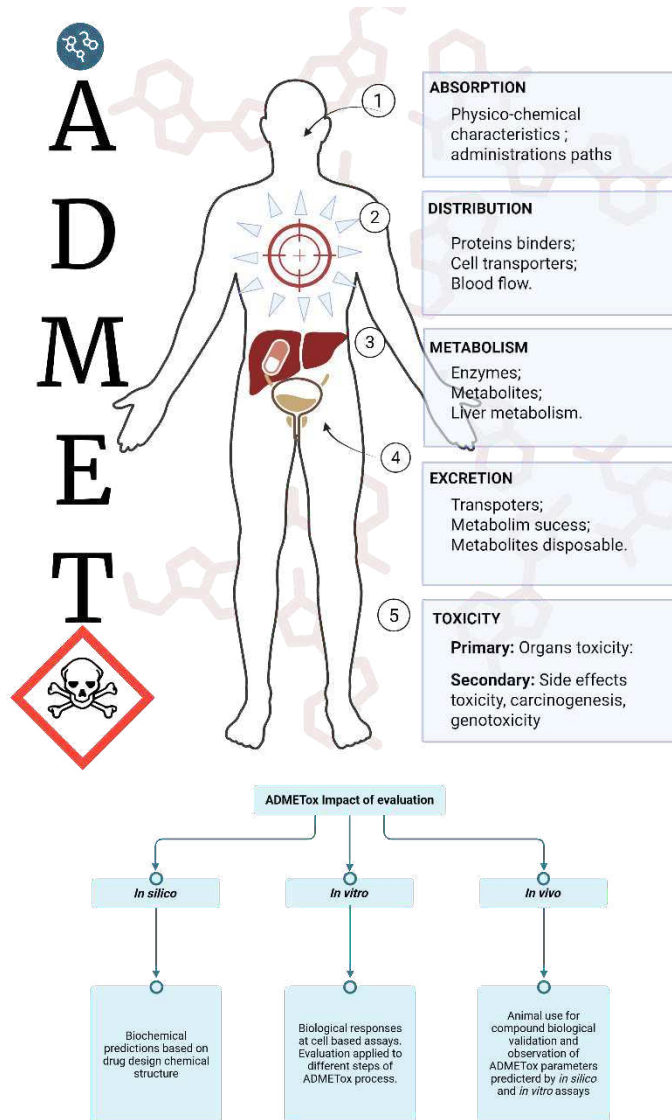


Figure 8 ADME relevance between *in silico*, *in vitro* and *in vivo* studies.

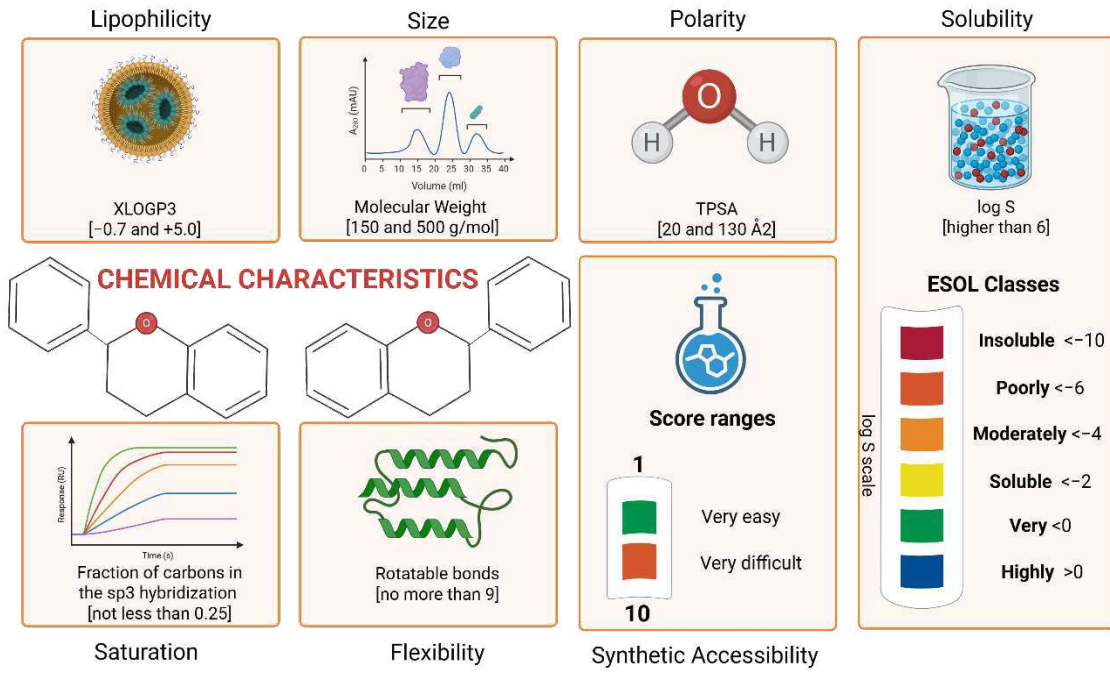
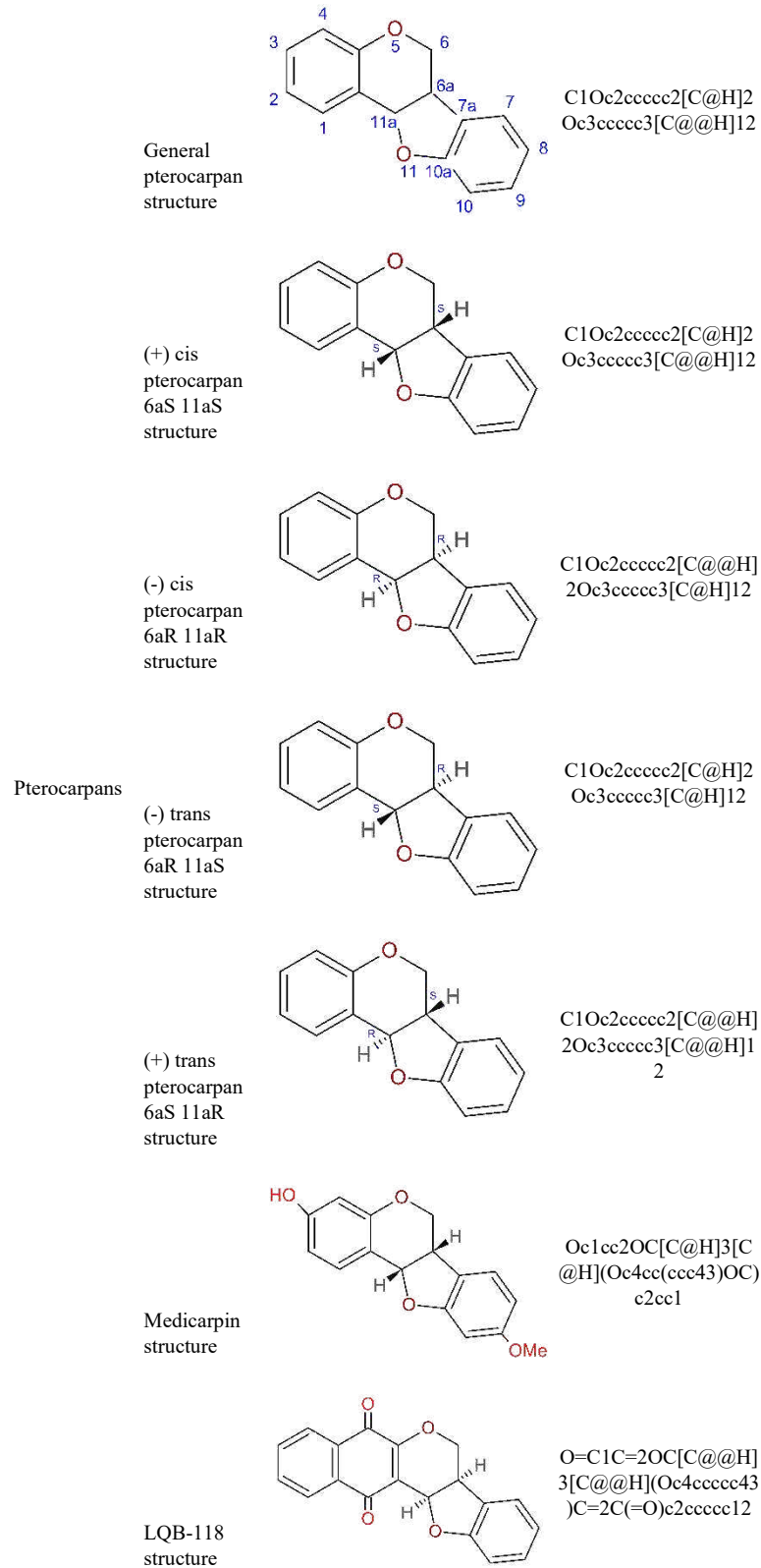


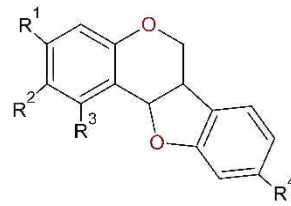
Figure 9 Bioavailability Radar criteria and cutoffs for screening candidate compounds.

Table 4 SM Molecule structures and SwissADME smiles

Class	Molecule	2D structure	Canonical SMILES
General flavonoid structure			<chem>c1cccc2CCC(Oc12)c1ccccc1</chem>
Flavonoids	Luteolin structure		<chem>O=C1CC(Oc2cc(O)cc(O)c21)c1cc(O)c(O)cc1</chem>
	Quercetin structure		<chem>OC1C(Oc2cc(O)cc(O)c2C1=O)c1cc(O)c(O)cc1</chem>
General isoflavonoid structure			<chem>O=C1C(COc2ccccc12)c1ccccc1</chem>
Isoflavonoids	Genistein structure		<chem>O=C1c2c(cc(O)cc2O)OCC1c1ccc(O)cc1</chem>
	Daidzein structure		<chem>O=C1C(COc2cc(O)ccc12)c1ccc(O)cc1</chem>
	β-estradiol structure		<chem>O[C@H]1CC[C@H]2[C@@H]3CCc4cc(O)ccc4[C@H]3CC[C@]12C</chem>

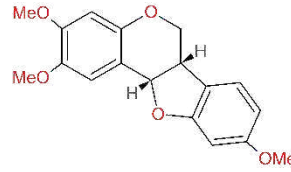


General
2,3,9-
trimethoxypt
erocarpan
structure



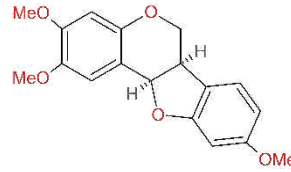
[*]c1cc2OC3c4c([*])c([*])c([*])cc4OCC3c2cc1

(+)-2,3,9-
trimethoxypt
erocarpan
structure



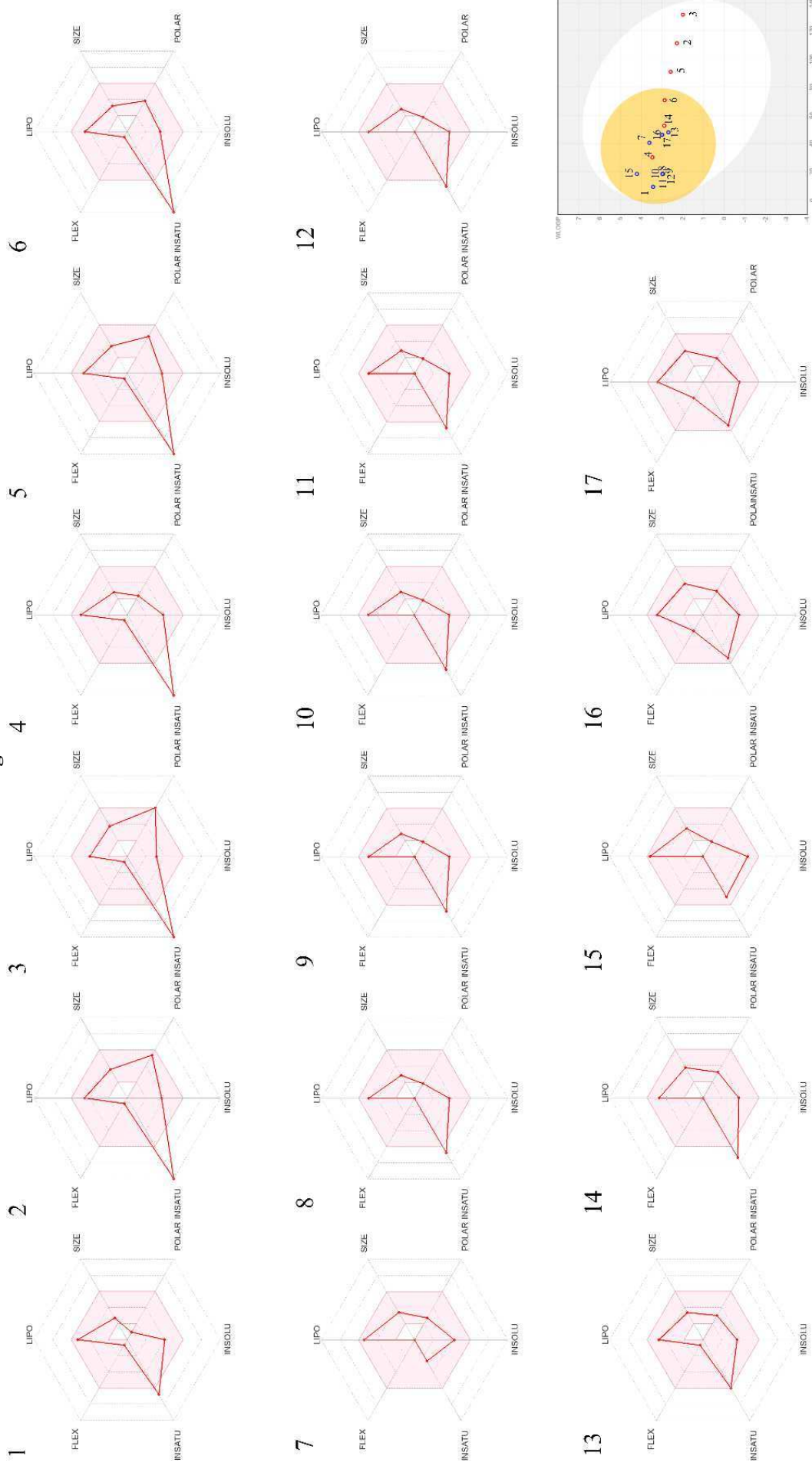
COc1cc2OC[C@H]3[C@@H](Oc4cc(ccc43)OC)c2cc1OC

(-)-2,3,9-
trimethoxypt
erocarpan
structure



COc1cc2OC[C@@H]3[C@H](Oc4cc(ccc43)OC)c2cc1OC

Figure 10 SM ADMET BoiledEGG and radar.



Actions

- Show Molecule Name
- Legend
- SSS
- HSA
- PGP+
- PGP-
- Remarks
- None

5 CAPÍTULO II - *IN SILICO* “INSIGHTS” DA ASSOCIAÇÃO ((+)-PTC+SAHA) COMO ESTRATÉGIA EPIGENÉTICA ANTITUMORAL

***IN SILICO* INSIGHTS OF THE ((+)-PTC+SAHA) ASSOCIATION AS AN ANTITUMOR EPIGENETIC STRATEGY**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Relevância dos flavonoides em terapias combinadas como estratégia no tratamento do câncer

A integração de duas ou mais abordagens anticâncer representa um aspecto fundamental da terapia combinada no tratamento do câncer. Os avanços terapêuticos podem ser alcançados por meio da combinação de várias estratégias anticâncer. Nos últimos 25 anos, a inovação nas abordagens terapêuticas oncológicas tem aumentado. Blagosklonny (2004) relata abordagem combinada como forma de aumentar a seletividade dos agentes citotóxicos, seja preservando as células normais, ampliando a toxicidade nas células cancerosas ou até mesmo ambas. O uso de biomarcadores em indicações oncológicas tem crescido constantemente desde 2009, e as terapias combinadas representaram 34% das aprovações em oncologia (Scott et al., 2023). Esse avanço reforça a tendência de investigação de efeitos epigenéticos da associação entre moléculas naturais, como o flavonóide apigenina, e epidrogas clinicamente aprovadas, como o vorinostat (SAHA) num contexto de novas estratégias terapêuticas (Nimal et al., 2024).

A terapia combinada foi conceituada pela primeira vez por Frei III et al. (1965), que determinaram as combinações de agentes quimioterápicos mais eficazes para melhorar as taxas de remissão completa em crianças com Leucemia Linfocítica Aguda. Embora as técnicas monoterápicas convencionais ainda sejam comumente aplicadas no tratamento do câncer, elas apresentam vários efeitos colaterais e agem sobre células afetadas e não afetadas, devido à sua falta de seletividade (Mokhtari et al., 2017). Assim, o uso da terapia combinada pode levar a um melhor entendimento da heterogeneidade da resposta terapêutica e revelar biomarcadores preditivos para uma aplicação mais precisa dos medicamentos existentes. Essa abordagem é mais eficaz na prevenção de riscos, permitindo previsões mais precisas dos benefícios de novas combinações (Plana et al., 2022).

No campo das terapias combinadas, a continuidade de pesquisas desenvolvidas nos últimos anos destaca o potencial dos flavonóides para aumentar a eficácia e/ou a sensibilidade dos compostos quimioterápicos. A quercetina demonstrou reverter a resistência ao Docetaxel *in vitro* em células de câncer de próstata (linhagens LNCaP/R e PC-3/R), bem como no modelo de xenoenxerto de câncer de próstata *in vivo*. Além disso, a administração combinada de quercetina e docetaxel desacelerou efetivamente o crescimento do tumor e inibiu significativamente a proliferação *in vivo* (Lu et al., 2020). Nas células PC-3 de câncer de próstata, a eficácia terapêutica do Paclitaxel foi melhorada pela quercetina por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essa combinação de dois compostos também revelou efeitos positivos em um modelo murino portador de câncer PC-3 (Zhang et al., 2020).

Destacam-se também os trabalhos de Nimal et al. (2024) onde descreveram o efeito sinérgico da coadministração de SAHA e apigenina contra células de Câncer de Mama Triplo Negativo (TNBC). Essa combinação induziu alterações morfológicas adversas, inibiu a migração celular, promoveu a parada do ciclo celular e apoptose, e ainda modulou a expressão de reguladores epigenéticos (HDACs e DNMTs), marcadores pró-apoptóticos e antiapoptóticos nas células MDA-MB-231. E no contexto do desenvolvimento de novas terapias que combinem iHDACs com compostos naturais, a pesquisa de Zhang et al. (2021) descreve resultados positivos de um conjugado epigenético. Denominado AVC (Apigenin–Vorinostat-Conjugate), o conjugado inibe a atividade de HDACs e apresenta uma supressão significativa da leucemogênese, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, apresenta seletividade frente a células e tecidos humanos normais, característica de viabilidade e segurança no tratamento da Leucemia Mieloide Aguda (LMA).

Diante do exposto, o potencial de sinergismo advindo da combinação de compostos naturais, como os flavonóides, isoflavonóides e pterocarpanos, a exemplo do ((+)-PTC), com inibidores de HDAC, como o Vorinostat, no tratamento de tumores hematológicos e sólidos confere um caráter promissor e desperta a investigação para o uso dessa combinação como estratégia terapêutica.

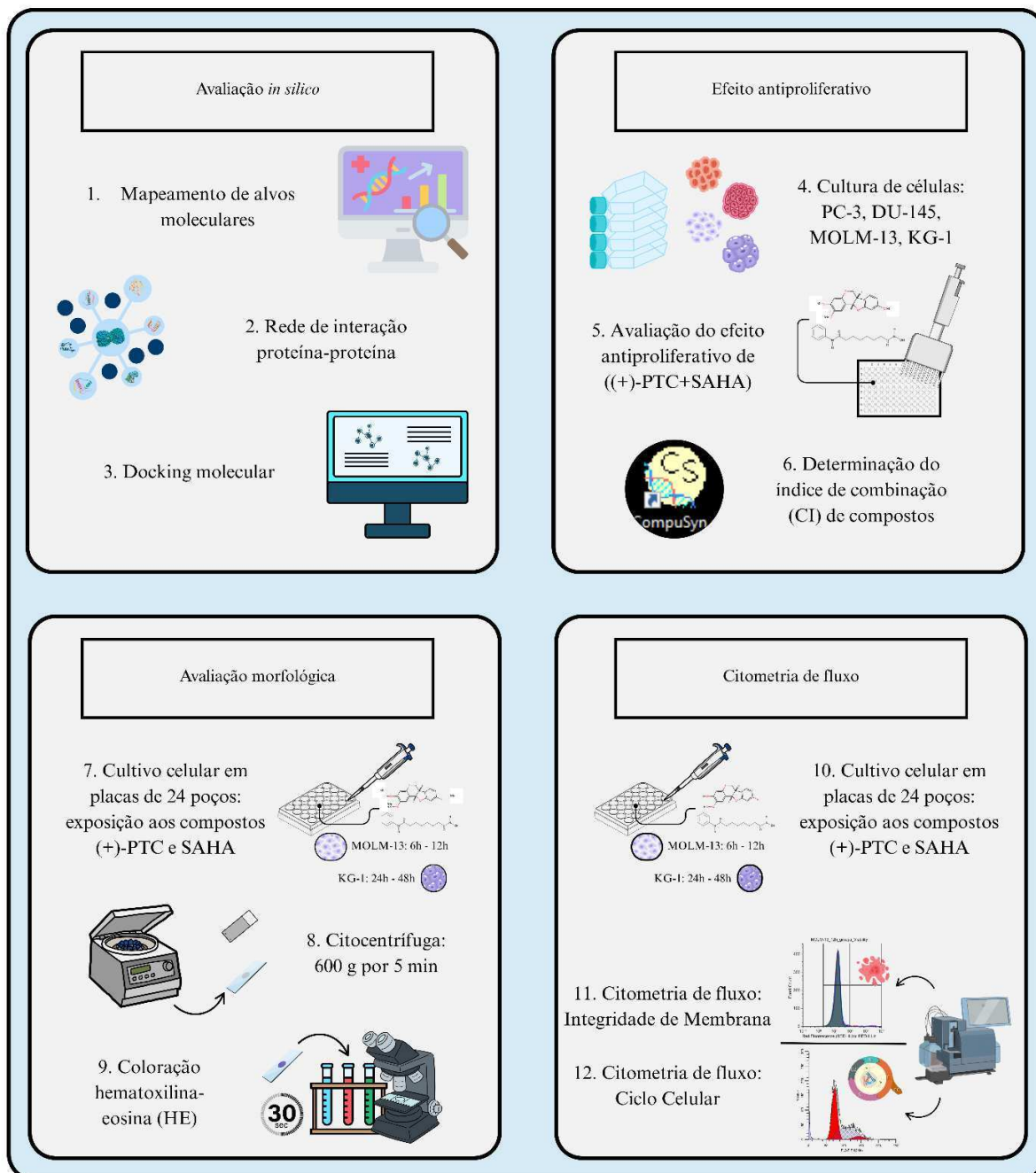
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenho experimental

A investigação do potencial terapêutico do (+)-2,3,9-trimetoxipterocarpano ((+)-PTC) frente a linhagens celulares prostáticas e leucêmicas iniciou-se pela experimentação *in silico* com o mapeamento de possíveis alvos moleculares, construção de rede de interação proteína-proteína, interação molécula-alvo e avaliação do potencial sinérgico com o composto Vorinostat.

Em seguida, as linhagens celulares PC-3, DU-145, KG-1 e MOLM-13 foram cultivadas para experimentos de viabilidade e citotoxicidade. A atividade citotóxica do (+)-PTC frente à linhagem MOLM-13 foi determinada pelo ensaio de MTT 24h. O impacto da combinação ((+)-PTC+SAHA) foi determinado usando o ensaio MTT 72h para três linhagens celulares: PC-3, DU-145 e KG-1. Após a constatação de melhor resposta antiproliferativa nas linhagens leucêmicas (KG-1 e MOLM-13), procedeu-se à caracterização dos mecanismos de morte celular envolvidos nesse processo, por meio de: a) análise morfológica pelo protocolo de coloração de hematoxilina-eosina, b) avaliação da integridade de membrana e c) caracterização do ciclo celular por citometria de fluxo. A Figura 11 representa as etapas resumidas do trabalho de planejamento experimental, que serão detalhadas adiante.

Figura 11 Principais etapas de trabalho do desenho experimental. Ilustração dos principais ensaios e experimentos envolvidos neste trabalho.



Fonte: Autoria própria.

2.2 Avaliação *in silico*

2.2.1 Abordagem computacional de *Target Fishing* para predição de alvos moleculares

Entre as diversas estratégias tecnológicas aplicadas durante prospecções farmacológicas em larga escala, destacam-se os experimentos *in silico*, como *virtual screening*, *target fishing* e *docking* molecular. Esses refinamentos tecnológicos possibilitam que, a partir de informações já conhecidas e relatadas na literatura, novas sejam preditas, ao mesmo tempo em que se otimiza o tempo de pesquisa e se economizam recursos materiais. O processo de *target fishing* consiste em uma busca direcionada a potenciais alvos protéicos a partir da estrutura molecular do composto em estudo (Galati et al., 2021). Assim, na presente pesquisa optou-se por combinar as abordagens de *target fishing* e *docking* molecular, a fim de, tendo como ponto de partida o composto com potencial farmacológico previamente selecionado, avaliar seus potenciais alvos terapêuticos e, posteriormente, refinar as predições com experimentos de *docking* molecular.

Para o *target fishing* foram considerados os critérios de exclusão: 1) “alvos únicos”, direcionando a triagem à remoção das repetições entre as bases; 2) “proteínas não humanas”, cujo refinamento promove a permanência apenas de proteínas da espécie *Homo sapiens*. Como critério de inclusão foi considerada a atuação epigenética das proteínas. Todos os alvos foram mapeados por meio de triagem das colunas “Biological Process” e “Molecular Function”, buscando pelos termos específicos relacionados a processos epigenéticos (“chromatin”, “histone”, “methylation”, “acetylation” e “epigenetic”).

Cabe ressaltar que o mapeamento de alvos moleculares com expressão modulada representa um estágio crítico no desenvolvimento de terapias direcionadas, uma vez que oferece uma abordagem preditiva na identificação de biomarcadores e caminhos de personalização do tratamento com base no perfil genético de cada paciente (Prado et al., 2024). Dessa forma, após as predições realizadas neste estudo e as análises dos dados obtidos, formulou-se a hipótese de que o composto em estudo potencialmente agiria de maneira sinérgica quando aplicado conjuntamente à epidroga Vorinostat.

2.2.2 Mapeamento de alvos com expressão modulada em linhagens de câncer

Primeiramente, foi consultado o banco de dados da plataforma *The Human Protein Atlas (THPA)*, que fornece informações detalhadas sobre a expressão de proteínas em diferentes tecidos e linhagens celulares. Em seguida, realizou-se uma pesquisa semelhante no banco de dados *Cortellis Drug Discovery Intelligence (CDDI)*, uma ferramenta poderosa para pesquisar

informações sobre desenvolvimento de medicamentos e biomarcadores. Essa etapa incluiu a pesquisa de publicações, dados de patentes e estudos clínicos que destacam alvos modulados.

O banco de dados *PubMed* serviu de base para localizar estudos que investigaram o efeito modulatório dos compostos (+)-PTC e SAHA na expressão de genes ou proteínas nas diferentes linhagens. Portanto, prosseguiu-se com a identificação de alvos com expressão modulada nas linhagens celulares PC-3, DU-145, KG-1 e MOLM-13.

Procedeu-se à reunião de informações para a construção de uma rede de interação proteína-proteína (PPI). A análise das redes de interação entre proteínas é crucial para o entendimento das funções biológicas das proteínas e dos mecanismos subjacentes às condições de saúde estudadas. O banco de dados *STRING* reúne e integra sistematicamente interações proteína-proteína, tanto de interações físicas quanto de associações funcionais (Szkarczyk et al., 2023).

Assim, usando a ferramenta *STRING*, foram criadas redes de interação com base nos alvos modulados e nas interações previstas dos compostos. Isso permitiu visualizar como os alvos interagem em um contexto mais amplo de vias metabólicas e sinalização celular, possivelmente indicando mecanismos de ação desconhecidos ou sugerindo novas abordagens terapêuticas.

2.2.3 Docking molecular

Após prospectar alvos de expressão modulada e avaliar as interações proteicas para este cenário, optou-se por investigar as possibilidades de ligação entre moléculas e proteínas-alvo escolhidas para este estudo. Neste sentido, Bär et al. (2022) demonstraram a relevância de experimentos *in silico* como o *docking* de busca ampla, na previsão de interações entre alvos sem estruturas cristalizadas e inibidores de HDACs, de forma a evitar um viés associado à limitação da ligação ao sítio ativo da proteína.

A fim de evitar o reforço de conotações capacitistas, neste trabalho optou-se por utilizar a expressão “*docking* de busca ampla” para identificar o procedimento que em outras fontes pode ser referido como “*docking* cego/*blind docking*”. Optou-se pela utilização de ferramentas de acesso aberto, como *DockThor* e *OpenBabel* (Manna et al., 2022; Purificação et al., 2024; Vaidergorn et al., 2025), a fim de manter a geração de dados confiáveis sem a necessidade de licenciamento. Outra opção estratégica foi a escolha de critérios qualitativos baseados em estabilidade conformacional, força de interação e número de poses em substituição

de parâmetros quantitativos como a *Ligand Efficiency* (LE), objetivando adaptações ao sistema estudado sem comprometimento de protocolos referenciados.

Para os testes de *docking* molecular, selecionaram-se as estruturas ideais para as previsões. O banco de dados *UniProt* foi usado para pesquisar as sequências de aminoácidos das estruturas proteicas e localizar o código das estruturas depositadas na plataforma do *Protein Data Bank* (PDB). Assim, depois de selecionar e adquirir os arquivos .PDB, as estruturas que não estavam na forma de monômero foram editadas usando o *PyMol Molecular Graphics System* - Versão 3.0.3 (*Schrodinger*, LLC), para padronizar todas as estruturas, e em seguida submetidas ao *DockThor*.

Este software, cujas configurações foram estabelecidas de acordo com o manual fornecido pela plataforma onde as proteínas foram submetidas, enviadas e padronizadas automaticamente de acordo com os parâmetros do campo de força MMFF94 (*Merck Molecular Force Field 94*), que apesar de ser mais antigo que o OPLS4 (*Optimized Potentials for Liquid Simulations 4*) (Purificação et al., 2024), é um modelo confiável, pois também se baseia em campos de força clássicos e possui licença aberta.

O sistema permite realizar amostragens conformacionais robustas e avaliações energéticas da interação ligante-receptor de forma precisa, além de oferecer interface web e definições flexíveis de sítio ativo. Outra vantagem está no fato de a plataforma apresentar menor demanda computacional e maior agilidade nas triagens virtuais. Todas essas características são observações importantes de serem realizadas ao avaliar interações comparativas entre diferentes ligantes. Cabe destacar que todas as proteínas disponíveis foram cristalizadas com cofatores, portanto, optou-se apenas pela retirada das moléculas de água para realização de todos os testes.

Neste trabalho, considerando que o estudo da molécula (+)-PTC em HDACs ainda não possui estruturas cristalizadas disponíveis no PDB e o prosseguimento com ensaios que simulem sua ancoragem em um sítio específico poderiam camuflar ligações mais energeticamente favoráveis a outros sítios das proteínas avaliadas, foi então realizado procedimento de *docking* de busca ampla pelo software *DockThor*.

Do mesmo modo, foi necessário padronizar as estruturas tridimensionais das moléculas usadas como ligantes durante o procedimento de *docking*. A molécula de (+)-PTC teve sua estrutura química obtida pela plataforma *PubChem* (CID 71182772) e salva em um arquivo no formato .MOL2. As moléculas SAHA, Inositol 1,4,5,6 Tetrakisphosphate (IOP), ~{N}-(4-methyl-1,3-thiazol-2-yl)ethanamide (6T4), Trichostatina A e ATP também foram

obtidas usando a plataforma *PubChem* em formato .MOL2. Todas as moléculas foram submetidas ao software *OpenBabel* - Versão 3.1.0, onde tiveram o formato alterado para.MOL2, que agrega mais informações estruturais, e suas estruturas tridimensionais foram adaptadas ao pH 7,4, a fim de simular as condições fisiológicas e evitar o viés causado por diferentes condições de protonação.

Uma vez que os arquivos necessários estavam adequados para o teste, foram submetidos à plataforma on-line brasileira *DockThor* - Versão 2.0 (disponível em: <https://dockthor.lncc.br/v2/>), que realiza experimentos virtuais usando o Supercomputador *SDumont*, localizado no Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis - Rio de Janeiro - Brasil.

A fim de garantir que a *Gridbox* fosse centrada no local correto, as coordenadas dos aminoácidos envolvidos nas reações foram rastreadas manualmente para estabelecimento preciso do sítio ativo de cada estrutura proteica. Esta abordagem visou restringir a área de pesquisa e aumentar a precisão dos resultados. As moléculas ligantes tiveram geometrias otimizadas previamente. O docking molecular foi realizado utilizando a plataforma on-line *DockThor*, que gera múltiplas posições para cada ligante e as classifica com base em valores de afinidade energética. Para cada proteína, foram geradas 1×10^6 interações possíveis, e ao final foram fornecidas as 100 posições distintas consideradas mais estáveis para cada composto. Dessas, apenas as 10 de maior afinidade energética foram consideradas para a próxima etapa.

Com o propósito de identificar potenciais alterações estruturais associadas ao processo de *docking*, cada estrutura proteica foi submetida sem o ligante ao software *DockThor* para que fossem comparadas com estruturas proteicas nativas - utilizando o módulo de análise estrutural do *Discovery Studio Visualizer* - Versão 21.1 - para avaliar as alterações conformacionais induzidas pela ligação.

As estruturas dos ligantes foram visualizadas usando o software do próprio *Discovery Studio*, separadas em clusters e tiveram sua posição mais provável determinada com base nos critérios de variação das posições de cada cluster e nas associações entre os valores de energia total (valores mais baixos indicam reações mais estáveis), energia de interação (soma das energias de van der Waals e Coulomb) e energia livre de ligação (ΔG).

Por fim, essas figuras e análises adicionais foram realizadas usando os softwares *PyMol* e *Maestro* V14.1.138 - Schrodinger Inc, considerando interações que ocorressem a até 5 Å de distância entre átomos do ligante e da proteína. Tanto as representações visuais de interações moleculares específicas, como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas,

quanto a orientação espacial preferencial de cada composto dentro do sítio ativo da proteína, foram otimizadas para ressaltar os resíduos-chave envolvidos nas interações do ligante.

2.3 Protocolos de cultura de células

2.3.1 Linhagens celulares

As linhagens de células tumorais usadas neste trabalho (Tabela 5) para avaliar a citotoxicidade dos compostos foram doadas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI) e pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BR-BCRJ).

Tabela 5 Origens das linhagens celulares e concentrações de plaqueamento.

Linhagem celular	Tipo histológico	Origem	Conc. de plaqueamento (cells/ml)
PC-3 (Carcinoma de próstata)	Adenocarcinoma prostático	Humano	0,1 x 10 ⁶
DU-145 (Carcinoma de próstata)	Adenocarcinoma prostático	Humano	0,8 x 10 ⁵
KG-1 (Leucemia mieloide aguda)	Mieloblasto	Humano	0,3 x 10 ⁶
MOLM-13 (Leucemia mieloide aguda)	Monoblasto	Humano	0,1 x 10 ⁵

2.3.2 Manutenção da linhagem celular

As células foram cultivadas em garrafas plásticas para cultura (25 cm², 50 mL ou 75 cm², 250 mL). Os meios usados para as linhagens celulares cultivadas foram *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 10% de soro bovino fetal (FBS) para as linhagens celulares MOLM-13 e PC-3, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) 10% de FBS para a linhagem celular DU-145 e DMEM 20% de FBS para a linhagem celular KG-1. Todos os meios de cultivo foram suplementados com 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina).

As células foram manipuladas em uma cabine de fluxo laminar vertical (VECO, modelo *Biosafe* 12 classe II) e mantidas em uma incubadora com 5% de CO₂ a 37 °C (*NUAIRE*, *TS Autoflow*). O crescimento e a morfologia das linhagens foram monitorados diariamente com

o auxílio de microscópio óptico invertido (*ZEISS, Axiovert 40C*). Quando necessário, o meio celular foi trocado. Para o modelo de células aderidas, o meio foi removido e a garrafa foi lavada duas vezes com PBS (*Phosphate Buffer Solution*) estéril, e 0,5% de tripsina-EDTA (Gibco) diluída 10X em solução tampão (PBS) foi adicionada para suspender as células. Uma vez suspensas, a ação da tripsina foi inibida pela adição de meio suplementado com SBF. Um determinado volume de células foi removido da garrafa e preenchido com meio. Para as células em suspensão, apenas o meio foi trocado.

2.4 Avaliação do efeito antiproliferativo de ((+)-PTC+SAHA)

2.4.1 Determinação do índice de combinação (CI) de compostos

A determinação do índice de combinação de compostos (CI) foi realizada com o software *CompuSyn version 1.0*, disponível para download em www.combosyn.com, seguindo as recomendações de Chou e Martin (2005), Chou (2006). A equação de *Michaelis-Menten*, a equação de *Hill*, a equação de *Henderson-Hasselbalch* e a equação de *Scatchard* fornecem a base teórica para uma determinação quantitativa das interações medicamentosas, em que $CI < 1$, $CI = 1$ e $CI > 1$ indicam, respectivamente, efeitos sinérgicos, aditivos e antagonistas.

Para calcular uma combinação de dois medicamentos, primeiro é necessário inserir novos dados de dose e efeito de cada composto isolado (medicamento A, medicamento B), bem como dos compostos combinados (medicamentos A+B). O item “dose” refere-se ao intervalo de concentração. O item “effect” (efeito) refere-se ao valor transformado de inibição correspondente. A CI50 para cada medicamento individual é necessária para determinar a proporção constante ou não constante usada na combinação.

Os detalhes do experimento de combinação de dois compostos podem ser visualizados no relatório completo gerado, que inclui: 1) desenho das descrições experimentais e dados brutos; 2) curva de dose-efeito; 3) gráfico de efeito mediano; 4) parâmetros m , Dm e r ; 5) tabela Fa-CI e gráfico Fa-CI; 6) tabela Fa-DRI e gráfico Fa-DRI, 7) isoblograma e poligonograma de ED50, ED75 e ED90; e 8) tabela de resumo do experimento.

2.4.2 Ensaio de viabilidade celular: MTT ((+)-PTC+SAHA)

O ensaio de viabilidade celular de MTT é um método colorimétrico quantitativo indireto capaz de avaliar a atividade mitocondrial por meio da redução do sal amarelo 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT) a cristais de formazan roxo em células metabolicamente ativas. A quantificação nesse estudo foi realizada por absorvância em um espectrofotômetro (Mosmann, 1983). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e 100 µL de meio de cultura, com a concentração de plaqueamento apropriada aplicada a cada poço descrita na Tabela 5.

Após 24 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, foram adicionados mais 100 µL da combinação de medicamentos diluídos em meio completo em concentrações que variaram de 0,19 µM a 25 µM, enquanto apenas o meio completo contendo 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) foi aplicado a uma das colunas. As placas foram incubadas novamente por 24, 48 ou 72 horas. No final do período de incubação, as placas foram centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos, e 100 µL ou 20 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados a cada poço para, respectivamente, as linhagens de células aderentes e em suspensão. Após isso, as placas foram colocadas novamente na incubadora por 3 horas.

No final do tempo definido, as placas foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi removido. Os cristais de formazan foram solubilizados em 100 µL de DMSO adicionados a cada poço. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro de placa (*Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880*), com comprimento de onda de 595 nm e software *Multimode Detection* (Beckman Coulter Inc.). Após a análise, foi decidido que a investigação continuaria apenas com as linhagens leucêmicas KG-1 e MOLM-13.

2.5 Protocolo de coloração com hematoxilina-eosina (HE)

O protocolo de coloração com hematoxilina-eosina (HE) foi realizado de acordo com as recomendações de Raphael (1986), Waessner (1990) e Lima et al. (1992). As células MOLM-13 foram plaqueadas em uma concentração de $0,1 \times 10^5$ células/mL em placas de 24 poços e, em seguida, tratadas com: a) (+)-PTC concentração ótima (3 µM); b) SAHA concentração ótima (9 µM); c) (+)-PTC concentração subótima (2 µM); d) SAHA concentração subótima (6 µM). As células foram incubadas por 6 e 12 horas em uma incubadora com 5% de CO₂ a 37 °C e o controle negativo foi tratado apenas com o veículo (DMSO).

Já as células KG-1 foram plaqueadas em uma concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL em placas de 24 poços e, em seguida, tratadas com: a) ((+)-PTC+SAHA) concentração superótima ((+)-PTC = $2 \mu\text{M}$; SAHA = $6 \mu\text{M}$); b) (+)-PTC concentração ótima ($3 \mu\text{M}$); c) SAHA concentração ótima ($9 \mu\text{M}$); d) (+)-PTC concentração subótima ($2 \mu\text{M}$); e) SAHA concentração subótima ($6 \mu\text{M}$). As células foram incubadas por 24 e 48 horas em uma incubadora com 5% de CO_2 a 37°C e o controle negativo foi tratado apenas com o veículo (DMSO).

2.5.1 Protocolo de citocentrífuga (Cytospin)

A citocentrífuga é um método eficiente para concentrar e capturar células, que possibilita a confecção de lâminas com camadas celulares finas a partir de qualquer amostra líquida (Thermo Fisher Scientific, 2017).

Para concentrar e depositar uma monocamada de células de uma suspensão celular diluída em uma área circular, foi usada uma citocentrífuga (CT 2000 Cientec®) com citofunis, microlâminas rotuladas e citoclips para cada amostra a ser examinada. Após a adição de $100 \mu\text{L}$ de cada suspensão de células, as microlâminas foram centrifugadas a 700 rpm por 5 minutos, depois cuidadosamente removidas da citocentrífuga e deixadas secar ao ar antes da coloração.

2.5.2 Protocolo de coloração de células

O kit de corante rápido Renylab® pode ser usado para a coloração de células em esfregaços de sangue periférico, medula óssea ou para o estudo citológico de elementos celulares (Renylab Química Farmacêutica Ltda., 2017). Trata-se de uma mistura de corantes com características neutras que, em condições adequadas, coram os componentes nucleares e citoplasmáticos, com tons predominantemente vermelhos (pH ácido) e azuis (pH básico). O corante rápido tem a vantagem de corar as células em 1 minuto. Essa técnica de coloração permite a observação de alterações morfológicas que caracterizam diferentes processos de morte celular.

Após períodos de incubação, as células foram fixadas com solução de triarilmetano a 0,1%, coradas com solução de xantenos a 0,1% e solução de tiazinas a 0,1% para coloração do núcleo e do citoplasma. As lâminas foram lavadas para remover o excesso de corante e, em

seguida, as células foram visualizadas em um microscópio óptico e fotografadas com aumento de 100x (Olympus, Tóquio, Japão).

2.6 Avaliação do ciclo celular e da viabilidade celular por meio de ensaios de citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica baseada em fluorescência aplicada ao estudo de células que possibilita a avaliação de características físicas, químicas e biológicas de vários tipos celulares (Carvalho et al., 2010). Por meio dela é possível realizar ensaios para avaliar a viabilidade celular por Integridade de Membrana (IM), fortemente relacionada à verificação de estágios de indução a perfis de morte celular (Nowak-Terpiowska et al., 2021). Também é possível inferir mecanismos de ação relacionados às alterações no ciclo celular e ativação de vias pró-apoptóticas (Peng et al., 2023) por meio da avaliação de Ciclo Celular (CC).

Para os ensaios de citometria de fluxo, as células MOLM-13 foram plaqueadas em uma concentração de $0,1 \times 10^5$ células/mL em placas de 24 poços e, em seguida, tratadas com: a) (+)-PTC concentração ótima (3 μM); b) SAHA concentração ótima (9 μM); c) (+)-PTC concentração subótima (2 μM); d) SAHA concentração subótima (6 μM). As células foram incubadas por 6 e 12 horas em uma incubadora com 5% de CO_2 a 37 °C e o controle negativo foi tratado apenas com o veículo (DMSO).

De forma similar, às células KG-1 foram plaqueadas em uma concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL em placas de 24 poços e depois tratadas com: a) ((+)-PTC+SAHA) concentração superótima ((+)-PTC = 2 μM ; SAHA = 6 μM); b) (+)-PTC concentração ótima (3 μM); c) SAHA concentração ótima (9 μM); d) (+)-PTC concentração subótima (2 μM); e) SAHA concentração subótima (6 μM). As células foram incubadas por 24 e 48 horas em uma incubadora com 5% de CO_2 a 37 °C e o controle negativo foi tratado apenas com o veículo (DMSO).

No final dos respectivos tempos de tratamento, as células foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 1 mL de PBS. Após isso, as células foram analisadas usando o citômetro BD FACSVerse®. Para todos os parâmetros avaliados, um total de 10.000 eventos foi levado em consideração para cada réplica de cada amostra. Os detritos celulares foram

omitidos da análise por meio de estratégias de *gating*, e cada experimento foi realizado pelo menos duas vezes em triplicata.

3 RESULTADOS

3.1 Predição de alvos moleculares por meio da estratégia de *Target Fishing*

Inicialmente, os resultados do *target fishing* nas três diferentes plataformas (TargetNet, Swiss Target Prediction e CDDI) apontaram mais de 700 potenciais alvos moleculares para os compostos (+)-PTC e SAHA. Entretanto, o alto número de alvos é reflexo da sobreposição de um mesmo alvo sendo predito entre as bases de dados. Após a aplicação do primeiro critério de exclusão, obteve-se um total de 682 alvos únicos, compreendendo o grupamento inicial de dados para análise.

O segundo critério de exclusão levou à eliminação de proteínas não humanas do conjunto, a fim de garantir a relevância para aplicações clínicas e concentrar a análise em alvos com aplicabilidade translacional. Ao fim dessa etapa, mantiveram-se 530 possíveis alvos correspondentes a proteínas humanas.

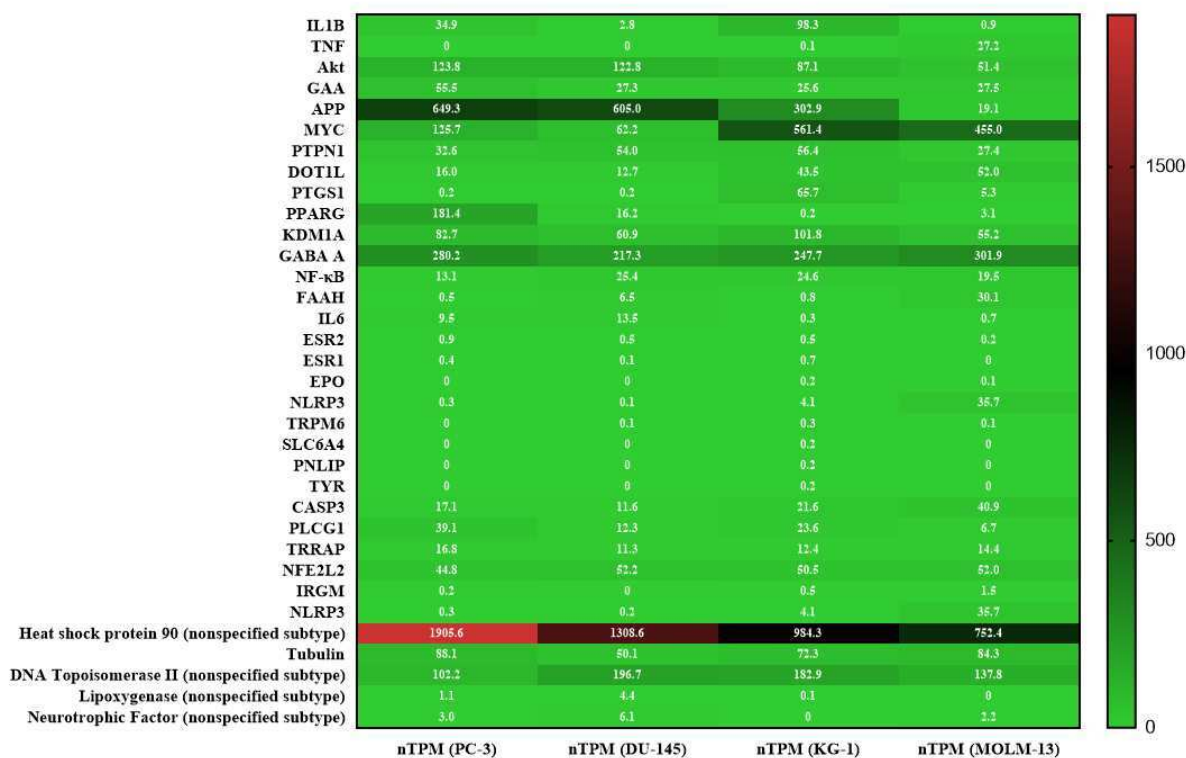
Em seguida, foi considerado como critério de inclusão a regulação epigenética, levando à identificação de alvos com potencial função na modulação epigenética, aspecto central para este estudo. Foram incluídas apenas as proteínas que apresentaram correspondência às palavras-chave do filtro. Por fim, o refinamento encontrou um total de 54 alvos moleculares mais diretamente associados à regulação epigenética derivada da ação dos compostos (+)-PTC e SAHA entre os inicialmente preditos.

3.2 Prospecção de alvos com expressão modulada

O levantamento de alvos com expressão modulada pelo tratamento sugerido foi realizado nos bancos de dados *The Human Protein Atlas (THPA)* e *Cortellis Drug Discovery Intelligence (CDDI)*, e mostrou 36 alvos que poderiam estar regulados positiva ou negativamente nas linhagens pesquisadas (PC-3, DU-145, KG-1 e MOLM-13). A Figura 12 mostra os alvos classificados de acordo com a expressão basal em cada linhagem (*normalized transcripts per million - nTPM*). Nela observamos alvos que apresentaram expressão basal

modulada como IL1B, TNF, GAA, APP, MYC, DNA Topoisomerase II e Heat shock protein 90.

Figura 12 Levantamento de possíveis alvos com expressão modulada pelo tratamento sugerido, de acordo com a expressão basal em cada linhagem (*normalized transcripts per million* - nTPM).



Fonte: Autoria própria.

3.3 Rede de interação proteína-proteína (*STRING*)

Após esse levantamento inicial, considerando a atuação do vorinostat (SAHA) como um inibidor pan-HDAC, com afinidade pelas isoformas HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6 e HDAC8, que a proteína Heat Shock Protein 90 (HSP90AA1) apresentou padrão de expressão basal marcadamente discrepante, foi analisado o perfil de interação dessas proteínas por meio da plataforma *STRING*, a fim de mapear os nós funcionais compartilhados entre essas proteínas.

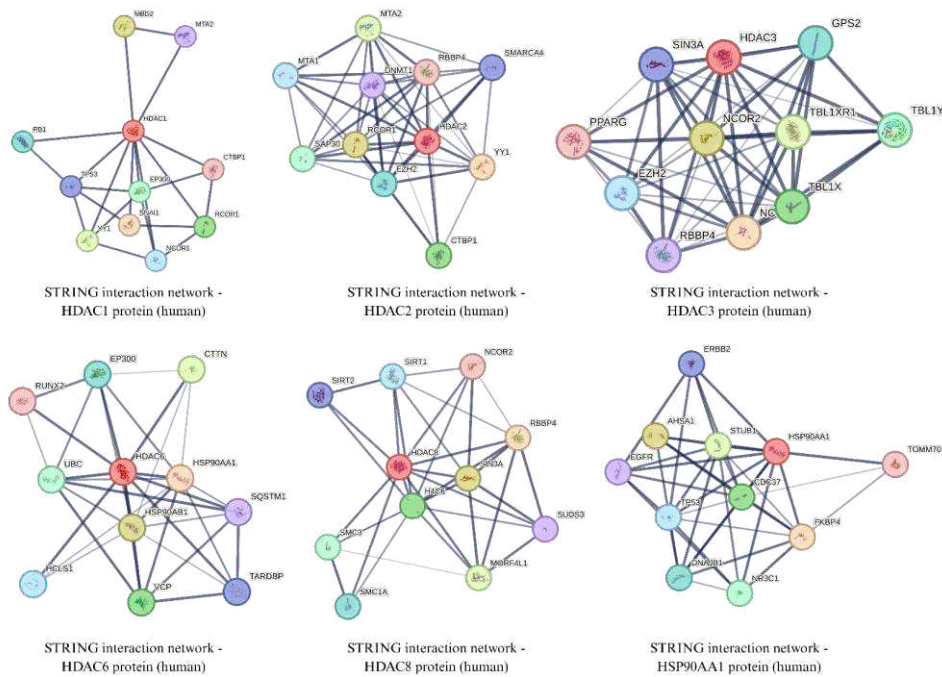
Partindo do princípio de que o objetivo da construção dessa rede de interação é estudar o núcleo funcional próximo de cada proteína sem restringi-la demasiadamente, optou-

se pela interação de 12 nós, uma vez que redes menores permitem interações diretas e maior confiabilidade dos resultados.

Cada nó (*node*) representa uma proteína e cada aresta (*edge*) uma interação entre os nós. O grau médio de interações (*node degree*) é medido dividindo-se o dobro do número de arestas pelo número de nós. Graus mais altos indicam proteínas com funções mais centrais na rede. O coeficiente de agrupamento local (*local clustering coefficient*) varia entre 0 e 1, e mede a probabilidade de conexão entre duas proteínas vizinhas, conceito ligado à formação de complexos proteicos ou vias bioquímicas.

Os p-valores de enriquecimento PPI (*PPI enrichment p-value*) mostraram-se significativos ($p < 0,05$) em sua maioria refletindo a confiabilidade na representação de um módulo funcional real. Em alguns casos, o enriquecimento é esperado e, portanto, tais resultados devem ser interpretados com alguma cautela. A cor dos nós também possui interpretações. Desse modo, os nós coloridos são a primeira camada de interação, em que as proteínas interagem diretamente entre si. Neste estudo, não houve nós cinzentos, que refletem a segunda camada de interação, ou interação indireta entre as proteínas. O resultado pode ser conferido na Figura 13 e na Tabela 6, a seguir.

Figura 13 Rede de interação proteica (PPI) gerada pela plataforma *STRING* para as histonas desacetilases HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6 e HDAC8 - principais alvos do inibidor epigenético vorinostat - e proteína HSP90AA1 - identificada como expressão basal elevada para as linhagens celulares PC-3, DU-145, KG-1 e MOLM-13.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 6 Perfil de interações proteicas (PPI) gerado pela plataforma *STRING*.

Proteína	Interação	Grau médio de interações	Coefficiente médio de agrupamento (<i>clustering</i>)	p-valor de enriquecimento PPI
HDAC 1	TP53, RB1, MDB2, MTA2, CTBP1, RCOR1, SNAI1, EP300, NCOR1, YY1	4,0	0,700	0,00446
HDAC 2	MTA1, MTA2, SMARCA4, RBBP4, DNMT1, RCOR1, SAP30, EZH2, YY11, CTBP1	8,73	0,908	$5,32 \times 10^{-12}$
HDAC 3	SIN3A, GPS2, TBL1Y, TBLX, TBLXR1, NCOR2, RBBP4, NC, EZH2, PPARG	9,27	0,941	$1,77 \times 10^{-13}$
HDAC 6	RUNX2, EP300, CTTN, UBC, HSP90AA1, HSP90AB1, SQSTM1,	6,18	0,825	0,0702

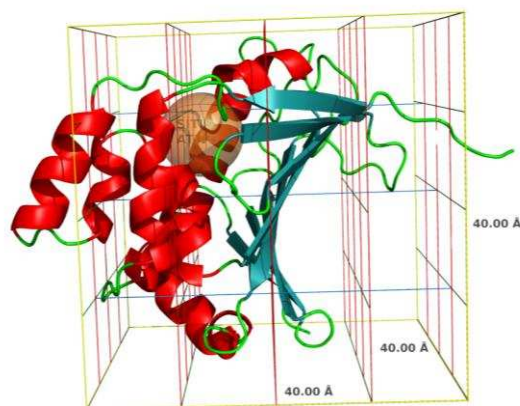
	HCLS1, VCP, TARDBP			
HDAC 8	SIRT1, SIRT2, NCOR2, RBBP4, SIN3A, H4C6, SUDB3, SMC3, SMC1A, MORF4LI	6,18	0,823	$8,46 \times 10^{-6}$
HSP90AA1	TOMM70, ERBB2, STUB1, AHSA1, EGFR, TP53, CDC37, FKBP4, DNAJB1, NR3C1	6,91	0,825	0,00269

Observa-se que as redes de interação das HDAC2, HDAC3 e HDAC8 se destacam por apresentarem maiores graus médios de interação (8,73, 9,27 e 6,18, respectivamente), coeficientes de agrupamento elevados (0,908, 0,941, 0,823, respectivamente) e menores valores de enriquecimento ($5,32 \times 10^{-12}$, $1,77 \times 10^{-13}$, $8,46 \times 10^{-6}$, respectivamente). A HDAC1 apresentou o menor grau médio de interação (4,0) e maior coeficiente de agrupamento (0,700), ainda que significativo ($p = 0,00446$). A HDAC6 exibiu valor de enriquecimento não significativo ($p = 0,0702$). A chaperona HSP90AA1 apresentou uma rede de interações consistente, com grau médio de 6,91, coeficiente de agrupamento de 0,825 e enriquecimento de $p = 0,00269$.

3.4 Docking molecular

Foi gerada uma caixa de delimitação (*Gridbox*) nas dimensões máximas permitidas - 40 angstroms (Å) para as dimensões X, Y e Z - para incluir o sítio ativo da proteína por completo e determinar o espaço tridimensional onde os ligantes foram testados (Figura 14). O ensaio foi realizado sempre seguindo os mesmos parâmetros padrões para todas as proteínas, de acordo com a capacidade máxima oferecida pela plataforma, conforme ilustrado na Tabela 7.

Figura 14 Representação ilustrativa da *Gridbox*, gerada no software *PyMol*. A imagem mostra a configuração espacial aplicada a uma das proteínas-alvo (HSP90) submetida ao docking de busca ampla, representando o procedimento adotado para todas as demais estruturas analisadas. A esfera em cor laranja representa o sítio ativo da proteína, sempre incluído em todos os ensaios.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 7 Parâmetros padrão do software *DockThor* para o procedimento de *docking* de busca ampla.

Parâmetro	Valor
Dimensão da caixa XYZ	40
Discretização	0.42
Nº de avaliações	1.000.000
Tamanho da população	750
Nº de corridas	24

Os resultados coletados foram comparados com as estruturas proteicas anteriores para avaliar o nível de modificação estrutural gerada pela molécula de teste em complexo com a proteína. As 10 reações mais prováveis foram selecionadas para análise posterior, a fim de escolher a posição mais adequada para usar como resultado do experimento.

Como critérios de escolha das estruturas 4BKX, 4LXZ, 4A69, 5B8D, 1T64 e 1BYQ, levou-se em consideração a disponibilidade da estrutura cristalizada com ligantes no

PDB, a ausência de mutações, e a melhor resolução possível em angstroms (Å) da estrutura proteica.

Os dados da Tabela 8 permitem avaliar o potencial de interação entre os ligantes ((+)-PTC, SAHA, IOP, 6T4, Tricostatina A e ATP) e os alvos (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, HDAC8 e HSP90). Para cada parâmetro a seguir descrito, podemos avaliar as respostas observadas da interação ligante-alvo.

De forma geral, os ligantes escolhidos apresentaram atração ao sítio de interesse na maioria das poses selecionadas. Isso indica que na configuração testada, sua estrutura apresentou probabilidade de se ligar a algum dos aminoácidos do sítio. Destacam-se aqui as HDACs 1 e 2, e a HSP90 cujos resultados foram acima de 90% de atração para ambos os ligantes (controle e (+)-PTC).

Tabela 8 Alvos e ligantes testados para o procedimento de *docking* de busca ampla usando a plataforma online *DockThor*. Energia Total = soma de interações intramoleculares e intermoleculares obtidas, valores negativos indicam melhor interação; Energia de ligação = afinidade entre ligante e proteína; vdW = forças de van der Waals; Coulomb = interação eletrostática; ΔG = energia livre de ligação (afinidade); RMSD = Desvio Quadrático Médio da estrutura proteica, antes e depois do *docking*, medido em angstroms (Å).

Alvo	UniProt ID	Código PDB	Ligante escolhido	Atração ao sítio de interesse (%)	Energia Total (kcal/mol)	Energia de Ligação (kcal/mol)	vdW (kcal/mol)	Coulomb (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	RMSD - Estrutura proteica (Å)
HDAC1	Q13547	4BKX	(+)-PTC	100	37,525	-21,558	-19,319	-2,239	-8,448	39,845
			SAHA	90	-10,265	-35,042	-1,669	-33,373	-6,853	30,559
HDAC2	Q13547	4LXZ	(+)-PTC	90	31,626	-29,532	-22,776	-6,756	-9,556	37,337
			SAHA	100	-53,348	-77,309	-1,922	-75,387	-8,340	37,193
HDAC3	O15379	4A69 (Sítio ACT)	(+)-PTC	80	36,590	-24,756	-20,964	-3,792	-9,064	38,711
			SAHA	100	-13,084	-36,141	-16,808	-19,333	-8,100	37,654
		(+)-PTC	50	35,418	-23,572	-18,235	-5,337	-8,325	39,553	
		I0P	90	-203,694	-64,179	15,250	-79,429	-6,451	42,418	
HDAC6	Q9UBN7	5B8D	(+)-PTC	90	36,944	-21,986	-17,427	-4,559	-8,257	17,364
			6T4	60	-27,049	-23,604	-14,381	-9,223	-7,344	15,381
HDAC8	Q9BY41	1T64	(+)-PTC	40	35,472	-25,465	-21,716	-3,749	-8,996	36,761
			Tricostatina A	50	38,172	-31,015	-18,506	-12,509	-8,447	35,584
HSP90	P07900	1BYQ	(+)-PTC	100	25,907	-34,207	-20,687	-13,520	-8,237	33,277
			ATP	100	-143,488	-65,066	-713	-64,353	-7,084	35,809

Priorizar a Energia Total como critério principal da avaliação é uma abordagem vantajosa por ser mais compatível com a flexibilidade do ligante na ferramenta de modelagem molecular (Agarwal; Mehrotra 2016). Tanto a Energia Total quanto a Energia de Ligação estão relacionadas às forças de interação e à estabilidade da reação de ligação, de modo que valores negativos indicam reações termodinamicamente favoráveis.

Nesse sentido, observou-se que o (+)-PTC apresentou energias totais menos favoráveis que as moléculas controle em quase todos os alvos. Destacam-se os ligantes IOP (HDAC3) e ATP (HSP90), cujas energias totais (respectivamente -203,694 kcal/mol e -143,488 kcal/mol) foram consideravelmente mais favoráveis à ligação que as do (+)-PTC (35,418 kcal/mol para HDAC3 e 25,907 kcal/mol para HSP90). Na HDAC8, observou-se que as energias totais foram bastante similares. Entretanto, ao verificar os valores das energias de ligação, o controle Tricostatina A apresentou estabilidade maior que o (+)-PTC, seguindo o padrão observado para os outros ligantes neste parâmetro.

As forças de van der Waals (vdW) e eletrostáticas (Coulomb) compõem elementos de interação entre os ligantes e sítios de interação (Meng et al., 2011). Ambos os parâmetros se apresentaram com valores negativos para todos os ligantes testados, um indicativo de tendência à estabilidade. Esses parâmetros também estão relacionados com a energia livre de ligação (ΔG), cujo valor negativo indica maior probabilidade de espontaneidade da ligação.

Dessa forma, os resultados da Tabela 8 apontam que o (+)-PTC tende a se ligar de forma espontânea tanto quanto os ligantes controle, visto que a diferença entre os valores de ΔG é muito próxima, variando entre -0,549 kcal/mol (HDAC8: (+)-PTC: -8,996; Tricostatina A: -8,447) e -1,874 kcal/mol (HDAC3 - sítio IOP: (+)-PTC: -8,325; IOP: -6,451). Entretanto, a estabilidade da ligação da maioria dos ligantes controle é mais robusta em relação ao (+)-PTC.

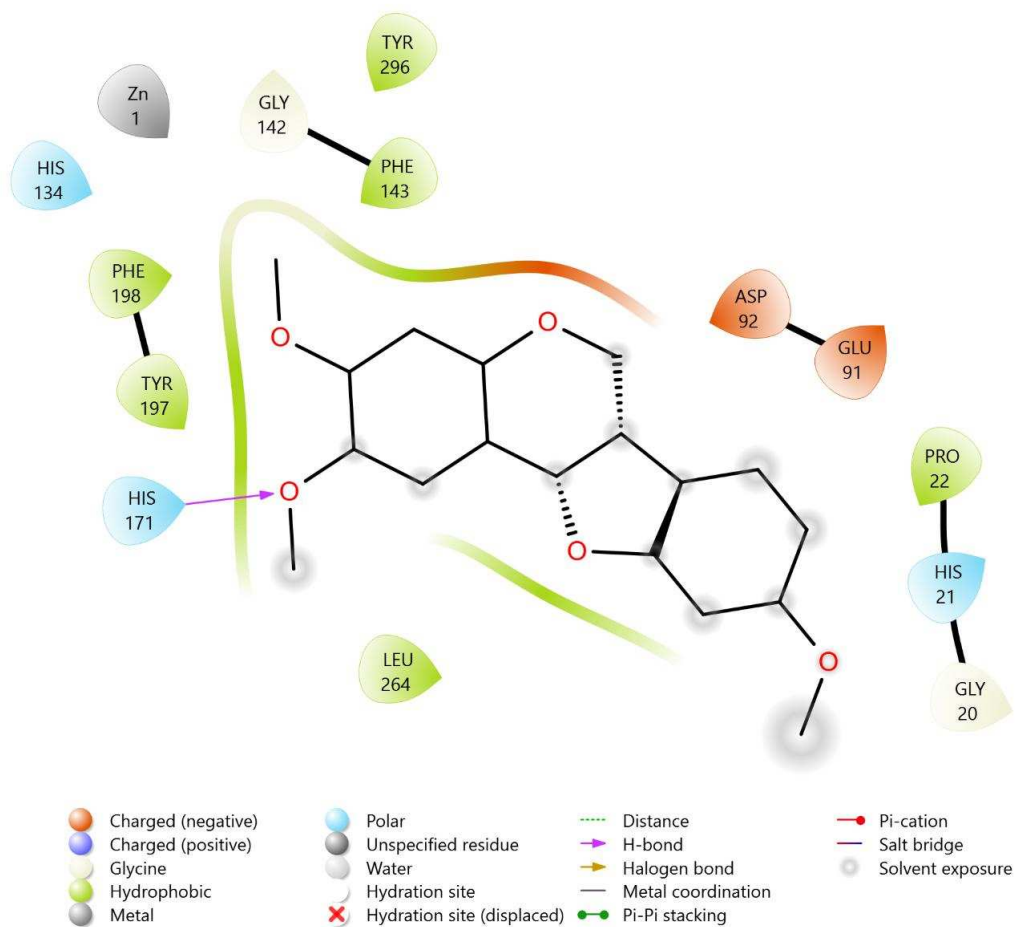
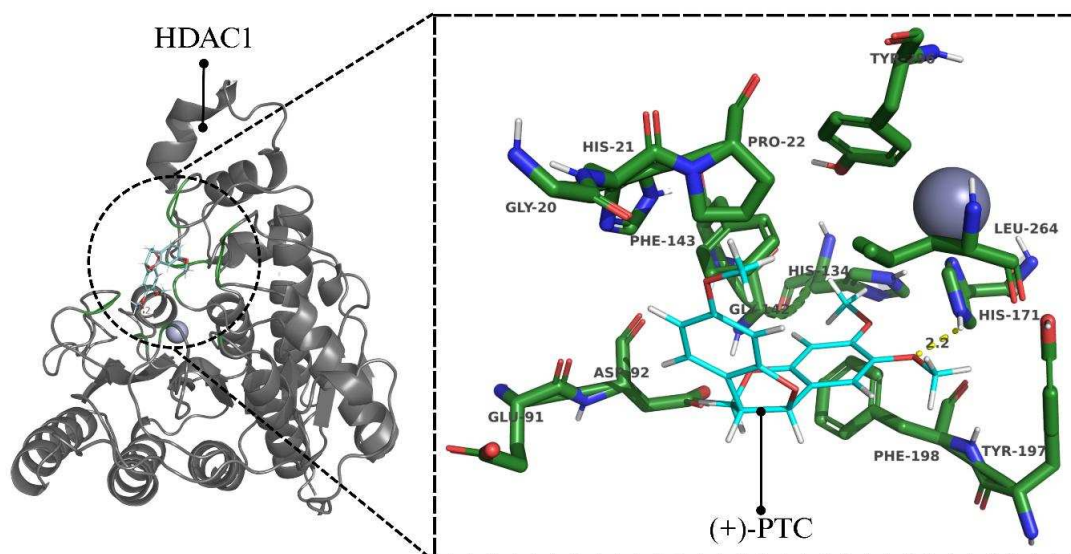
As predições obtidas nos experimentos de *docking* molecular indicam que, na conformação mais estável do complexo entre a molécula (+)-PTC e a estrutura cristalográfica da HDAC1 (PDB: 4BKKX), o ligante é atraído até o sítio ativo da enzima. Como observado na Figura 15, nessa interação, um dos oxigênios da extremidade dimetoxilada do ligante forma uma ligação de hidrogênio com o resíduo His171, contribuindo para o ancoramento inicial da molécula. Em seguida, os resíduos Gly142, Phe143, Tyr197, Phe198 e Leu264, localizados na porção mais interna da proteína, conformam um bolsão hidrofóbico que acomoda e estabiliza os grupos apolares do ligante, incluindo o radical metoxila, o cicloexano, o anel de pirano e o anel tetrahidrofurano.

Ademais, os resíduos Asp92 e Glu91, ambos carregados negativamente, estão posicionados nas proximidades do oxigênio do anel de pirano, que também é carregado negativamente; essa aproximação gera uma repulsão eletrostática que pode contribuir para o direcionamento do ligante ao bolsão hidrofóbico, potencialmente promovendo maior estabilidade conformacional por confinamento espacial. Por outro lado, a extremidade monometoxilada da molécula, que contém outro cicloexano apolar, permanece mais exposta ao solvente. Essa exposição sugere a possibilidade de que a água, por meio de efeitos hidrofóbicos e repulsivos, também possa contribuir para o encaixe do ligante no sítio ativo, reforçando o modelo de estabilidade proposto. Por fim, observa-se a presença de um íon Zn^{2+} a uma distância inferior a 5 Å do ligante. Embora não tenha sido predita nenhuma interação de coordenação direta entre o zinco e o (+)-PTC na conformação mais estável obtida através do experimento de *docking*, a proximidade e o campo eletrostático associado indicam que interações indiretas ou induzidas não devem ser descartadas.

Com base na estrutura cristalográfica da HDAC2 (PDB: 4LXZ), as simulações de *docking* apontam que o ligante (+)-PTC se associa preferencialmente à região do sítio ativo (Figura 16). Porém, ao contrário do que demonstrado na interação com a HDAC1, é a extremidade monometoxilada do ligante que é introduzida no sítio ativo do receptor, o que permite a formação de interações metálicas entre o íon de zinco e o grupo metoxila (MeO). Enquanto é alvo de interações metálicas, o grupo metoxila também participa de interações polares geradas pelos resíduos His133, His134, Asp169 e His171. Além disso, como relatado na representação tridimensional, o hidrogênio presente na hidroxila do resíduo Tyr296 realiza uma ligação de hidrogênio com o oxigênio do grupo monometoxilado; fatores que, quando somados, contribuem diretamente para o ancoramento do ligante no sítio ativo do receptor.

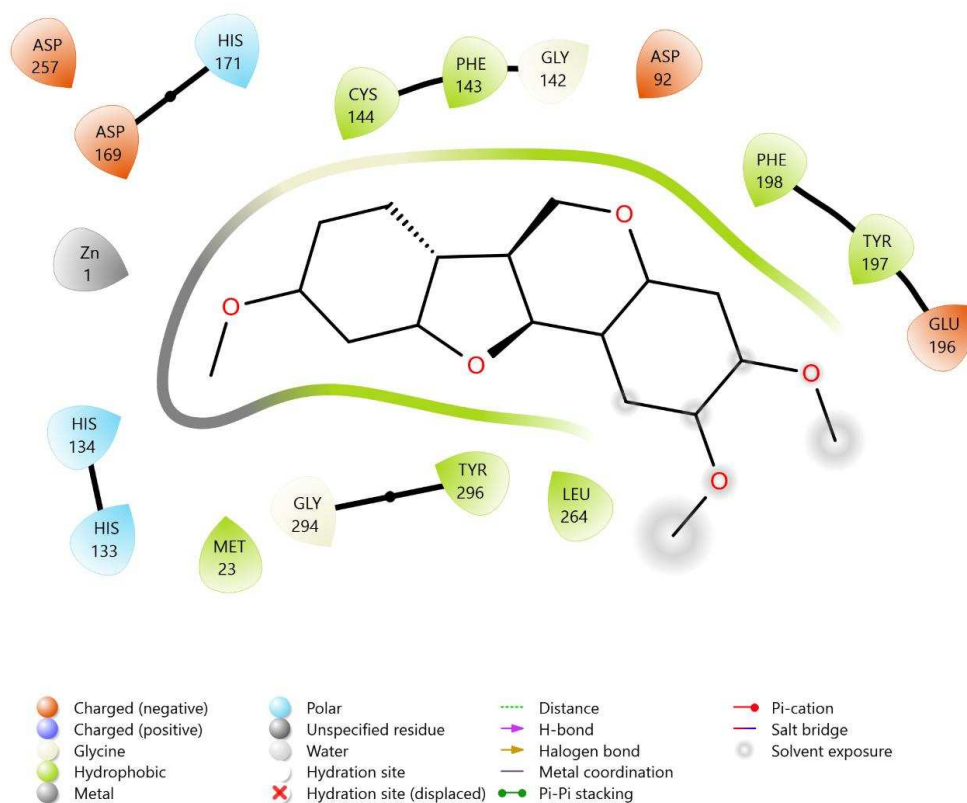
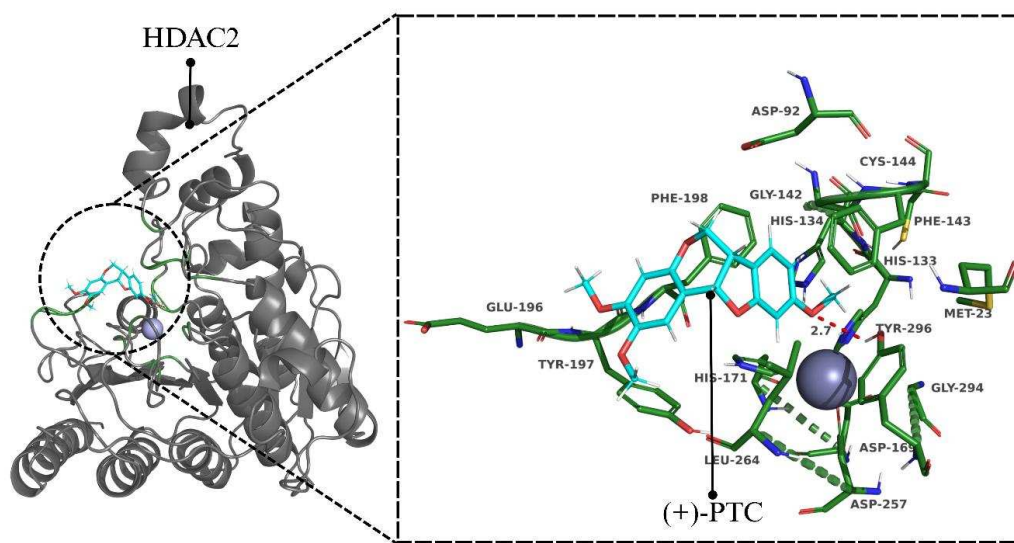
Ademais, os quatro anéis que compõem a molécula até a extremidade dimetoxilada encaixam-se em um bolsão hidrofóbico formado pelos resíduos de Met23, Gly142, Phe143, Cys144, Glu196, Phe197, Phe198, Leu264, Gly294 e Tyr296. Por fim, a extremidade dimetoxilada tem seus dois grupos apolares de metil (CH_3) expostos ao solvente, dessa forma, indicando que a água, através de forças repulsivas, também pode contribuir positivamente para o acontecimento da interação ao empurrar a molécula ligante em direção ao sítio ativo da proteína.

Figura 15 Complexo resultante entre o *docking* da molécula (+)-PTC e a estrutura PDBID 4BKX, correspondente à cristalização da proteína HDAC1.



Fonte: A autoria própria.

Figura 16 Complexo resultante entre o *docking* da molécula (+)-PTC e a estrutura PDBID 4LXZ, correspondente à cristalização da proteína HDAC2.



Fonte: Autoria própria.

Conforme observado na Figura 17, as predições via *docking* molecular indicam que, na conformação mais estável do complexo (+)-PTC e HDAC3 (PDB: 4A69), o ligante se acomoda preferencialmente no sítio ativo (sítio ACT) da enzima. E assim como predito na interação com a HDAC2, o ligante também é inserido na cavidade do sítio ativo da proteína através de reações polares envolvendo a extremidade monometoxilada. Portanto, os resíduos de His133, His134, Asp 169, His171, His172 e Asp174 formam uma região polar que atrai o grupo metoxila para a parte interna do receptor, enquanto os resíduos hidrofóbicos Gly142, Phe143, Ile170, Tyr197, Phe198, Phe199, Pro200, Leu265, Gly266 e Cys267 atuam estabilizando as regiões apolares do ligante.

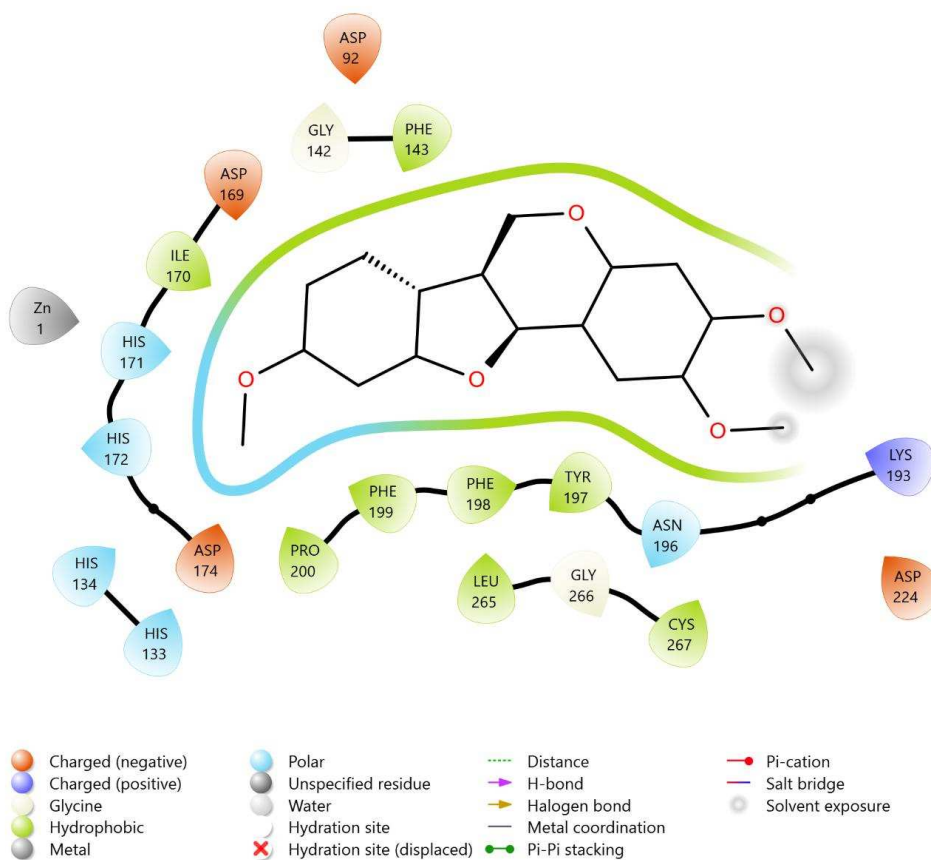
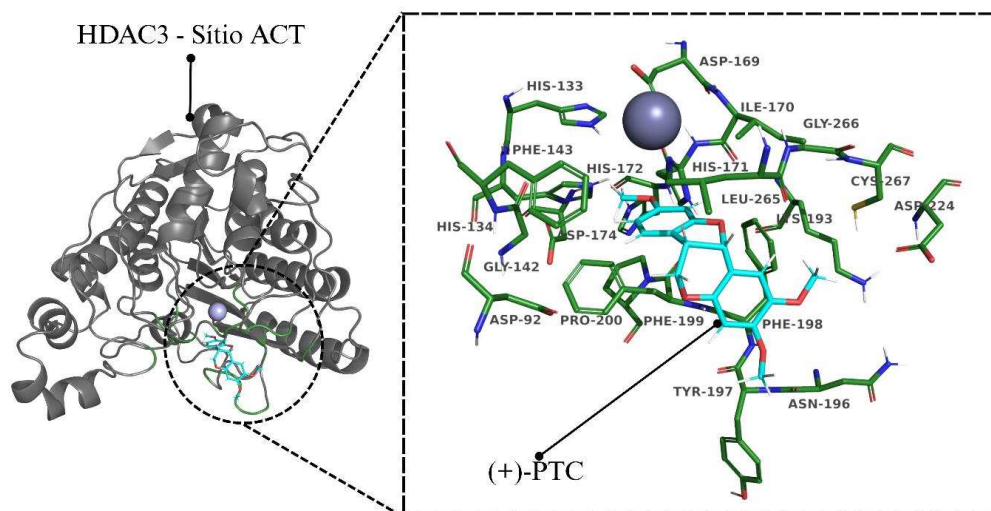
Dessa forma, apenas a molécula de (+)-PTC é quase completamente internalizada na cavidade, restando apenas seu grupo dimetoxilado sendo exposto, indicando então que caso o solvente do ambiente sejam moléculas de água, seus grupos CH₃ tendem a sofrer efeitos repulsivos que a forcem a se internalizar ainda mais no bolsão proteico, o que favorece ainda mais a ligação. Em suma, o íon Zn²⁺ encontra-se a uma distância inferior a 5 Å do ligante, e apesar da ausência de interação direta entre o zinco e o (+)-PTC nos resultados de *docking*, a proximidade e o campo eletrostático associado indicam que interações indiretas ou induzidas não devem ser descartadas.

Considerando a possibilidade de atuação em outros sítios funcionais da proteína receptora, optou-se por avaliar uma potencial interação entre a molécula (+)-PTC e o sítio em que a molécula IOP se liga enquanto atua como corepressor da proteína HDAC3 (Figura 18). As predições indicaram que há possibilidade de que a extremidade monometoxilada seja atraída por resíduos de aminoácidos carregados positivamente, acarretando em uma ligação de hidrogênio entre o grupo metoxila e o resíduo de Arg264; também acontecem interações polares envolvendo os resíduos Asp92 e His134 e os anéis pirano e cicloexano na outra extremidade do ligante, que somadas servem como um ancoramento parcial da molécula.

Além disso, a porção central do ligante é estabilizada ao encaixar em um pequeno bolso hidrofóbico criado pelo resíduo Leu265 do receptor. As porções do ligante próximas à extremidade dimetoxilada entram em contato com outro bolsão hidrofóbico formado pelos resíduos de Gly142, Phe143, Phe198, Phe199, contribuindo para uma maior estabilidade da interação. Porém, apesar de os valores da interação da molécula de (+)-PTC se mostrarem levemente favoráveis à região de ligação do IOP, é importante ressaltar que os valores obtidos ao realizar o *redocking* do IOP mostram que a interação é muito mais favorável a este do que ao (+)-PTC, o que implica dizer que há chances extremamente baixas deste competir e inibir o

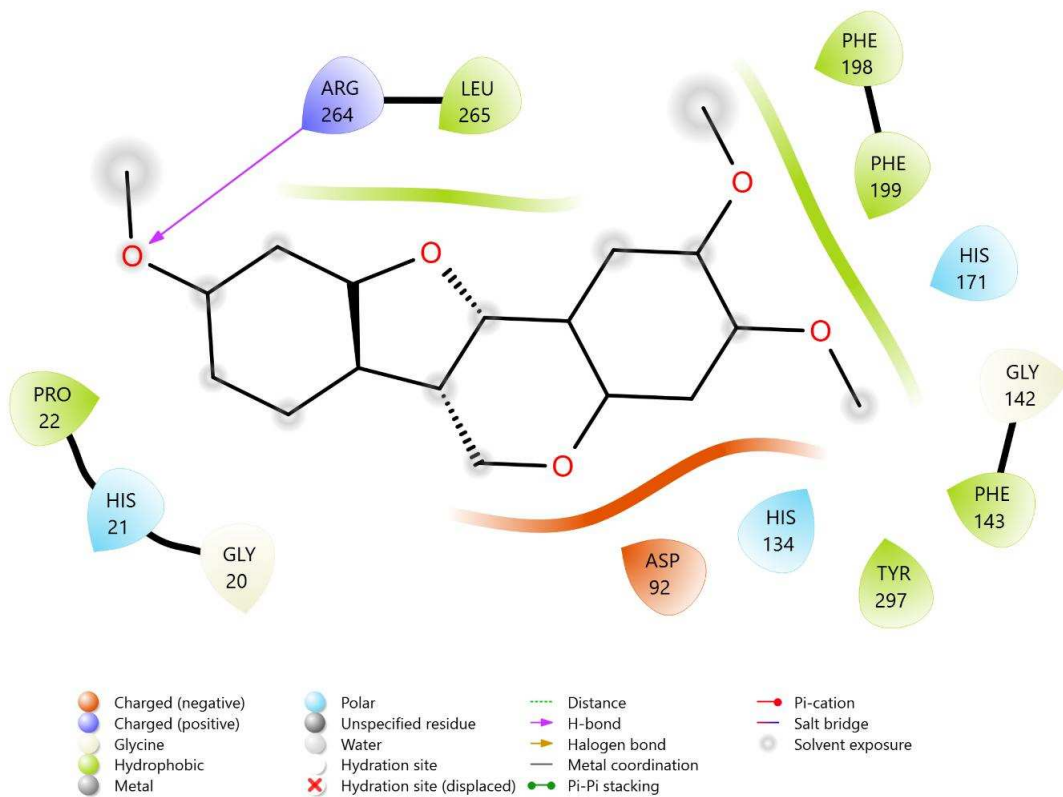
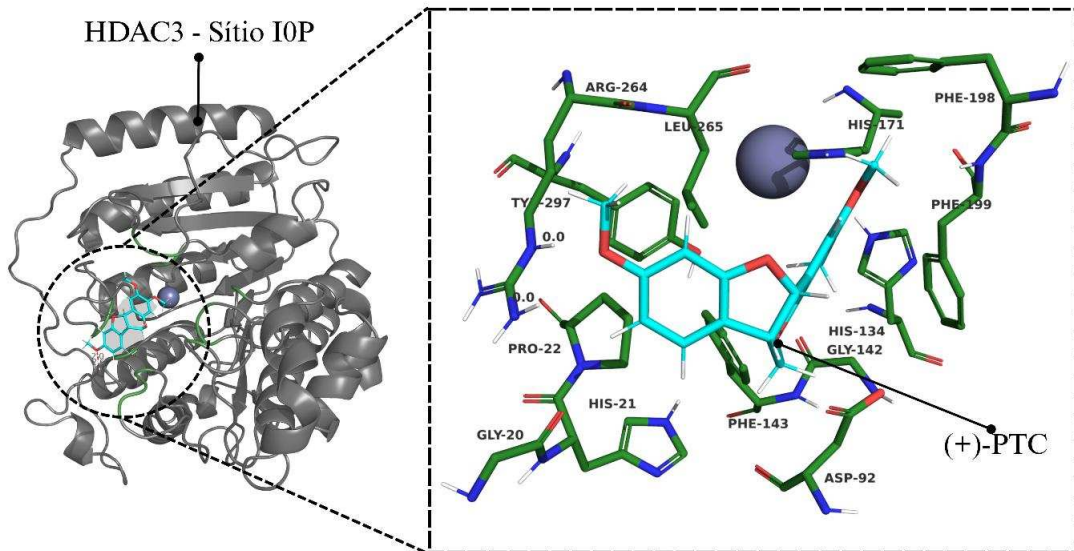
sítio de ligação do IOP; sendo mais provável, portanto, que o (+)-PTC seja atraído ao sítio ativo da proteína, que ao sítio de IOP.

Figura 17 Complexo resultante entre o *docking* da molécula (+)-PTC e a estrutura PDBID 4A69, correspondente à cristalização da proteína HDAC3 (sítio ACT).



Fonte: Autoria própria.

Figura 18 Complexo resultante entre o *docking* da molécula (+)-PTC e a estrutura PDBID 4A69, correspondente à cristalização da proteína HDAC3 (sítio I0P).



Fonte: Autoria própria.

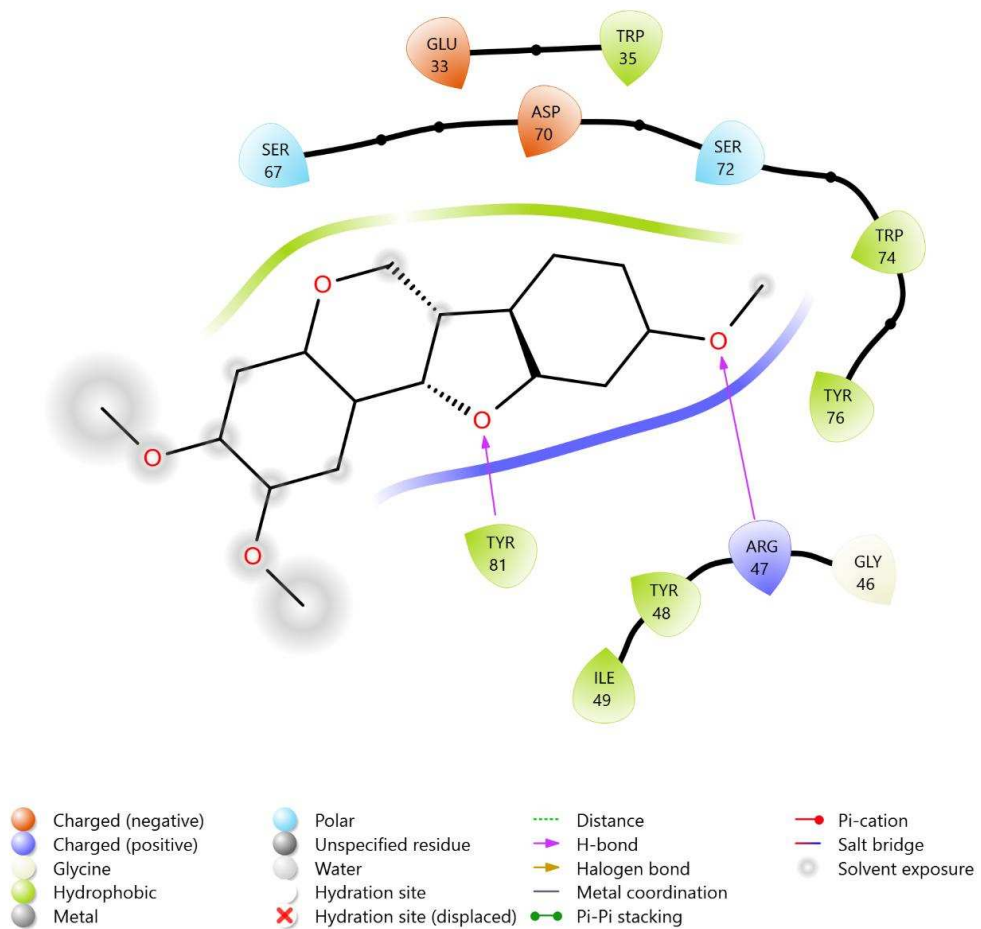
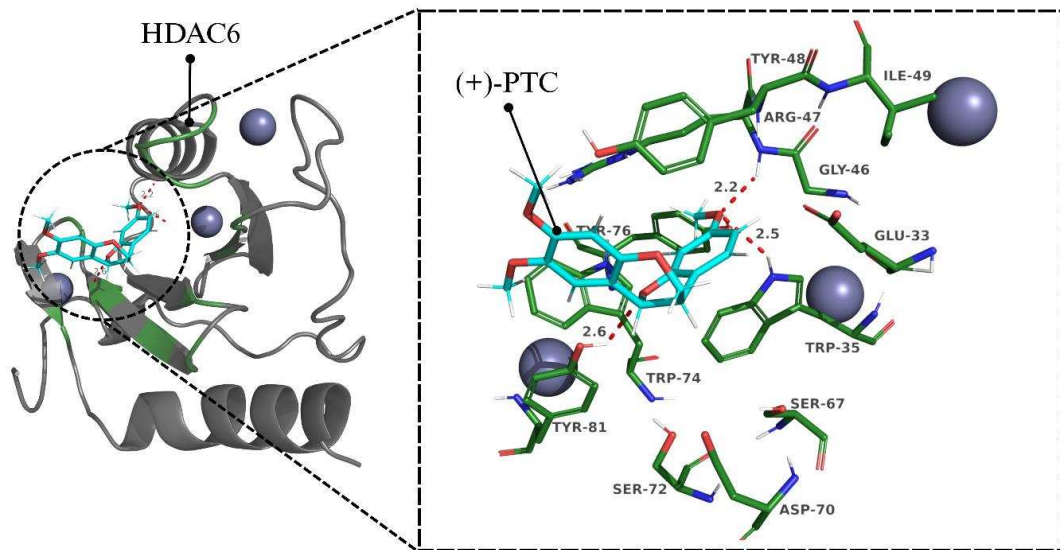
As simulações de *docking* molecular indicam que, na conformação mais termodinamicamente favorável, o ligante (+)-PTC é direcionado ao sítio ativo da HDAC6 (PDB: 5B8D) (Figura 19), de tal maneira que sua extremidade monometoxilada é atraída à parte mais internalizada da cavidade receptora. O oxigênio presente na metoxila mais internalizada do ligante forma uma ligação de hidrogênio com o resíduo de Arg47, e o mesmo evento acontece envolvendo o oxigênio presente no anel tetrahidrofurano e hidrogênio presente na extremidade do resíduo Tyr98; essas duas ligações de hidrogênio formam um gradiente de energia eletrostática carregada positivamente na cavidade receptora e que atrai os átomos negativamente carregados do ligante.

Concomitantemente, os resíduos de Ser67, Asp70, Ser72, Trp74 e Tyr76 geram um bolsão hidrofóbico que interage com grande parte das regiões apolares dos anéis da molécula de (+)-PTC, que somada à exposição da extremidade apolar de dupla metoxila ao solvente, resulta em potenciais fatores a contribuir positivamente para a estabilidade da interação.

Assim como a maioria dos outros experimentos de *docking* molecular executados neste estudo, as predições indicam que na conformação mais termodinamicamente favorável, a molécula de (+)-PTC é direcionada até o sítio ativo da proteína HDAC8 (PDB: 1T64), de tal maneira que sua extremidade monometoxilada é atraída à parte mais internalizada da cavidade proteica (Figura 20). Onde é possível ver através da representação tridimensional que o oxigênio presente na metoxila mais internalizada do ligante realiza ligações de hidrogênio com a hidroxila presente no resíduo Tyr293, o que potencialmente leva a um ancoramento inicial do ligante.

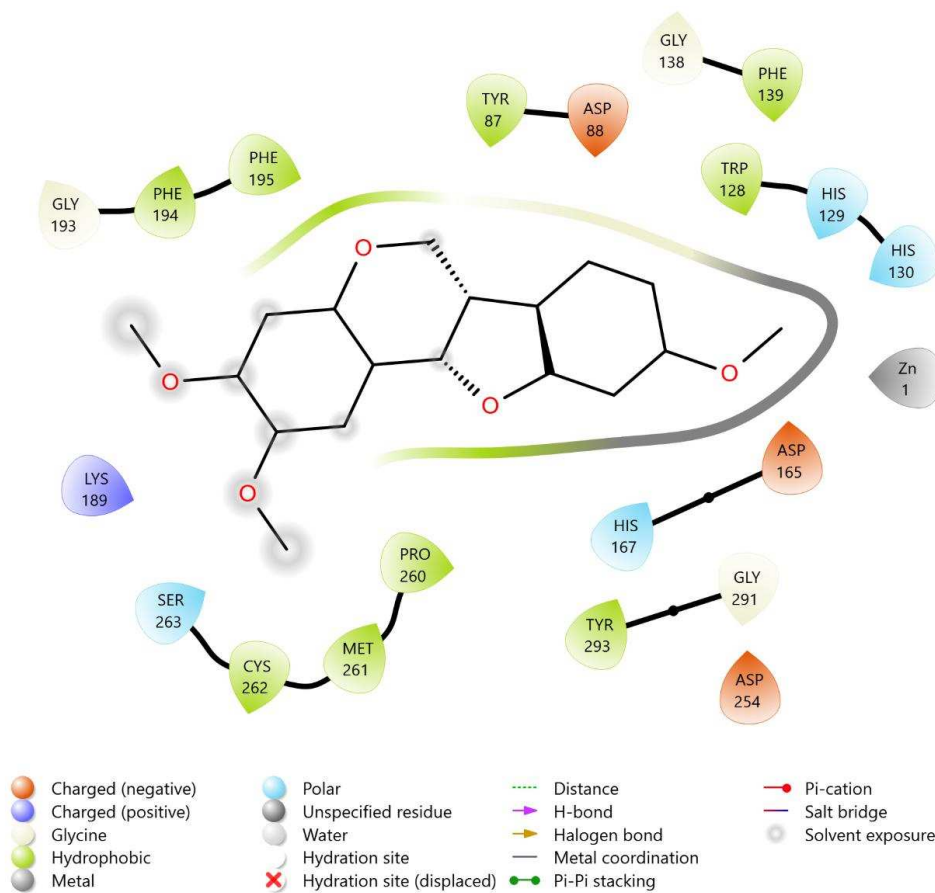
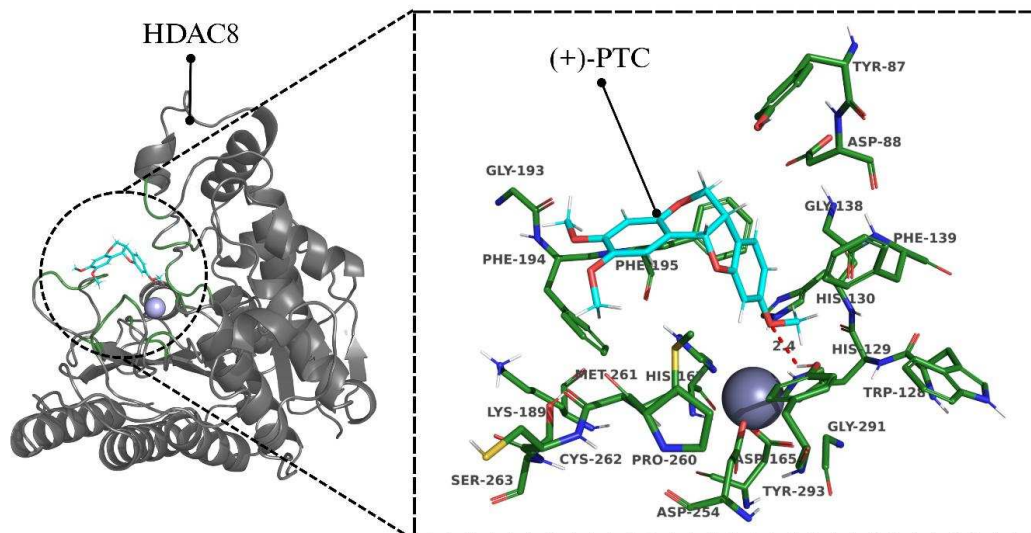
Além da ligação de hidrogênio, o íon de Zn^{2+} gera um gradiente de interação metálica que interage tanto com o grupo MeO quanto com a parte inicial do cicloexano, o que contribui significativamente para a força de interação do complexo formado. A forte interação na parte mais interna do complexo é reforçada por interações hidrofóbicas que acontecem entre a parte central do (+)-PTC e os resíduos de Tyr87, Asp88, Gly138, Phe139, Gly193, Phe194, Phe195, Pro 260, Met261, Cys262 e Ser263. Por fim, também seguindo o mesmo padrão das predições deste estudo, a região dimetoxilada se encontra para fora da cavidade e exposta ao solvente. Assim, levando em conta o caráter apolar desses grupos de metoxila, a reação pode ser favorecida caso o solvente do ambiente seja aquoso, pois esses grupos hidrofóbicos serão empurrados para dentro da cavidade receptora, favorecendo a estabilidade das reações que acontecerão no interior do sítio ativo.

Figura 19 Complexo resultante entre o *docking* da molécula (+)-PTC e a estrutura PDBID 5B8D, correspondente à cristalização da proteína HDAC6.



Fonte: Autoria própria.

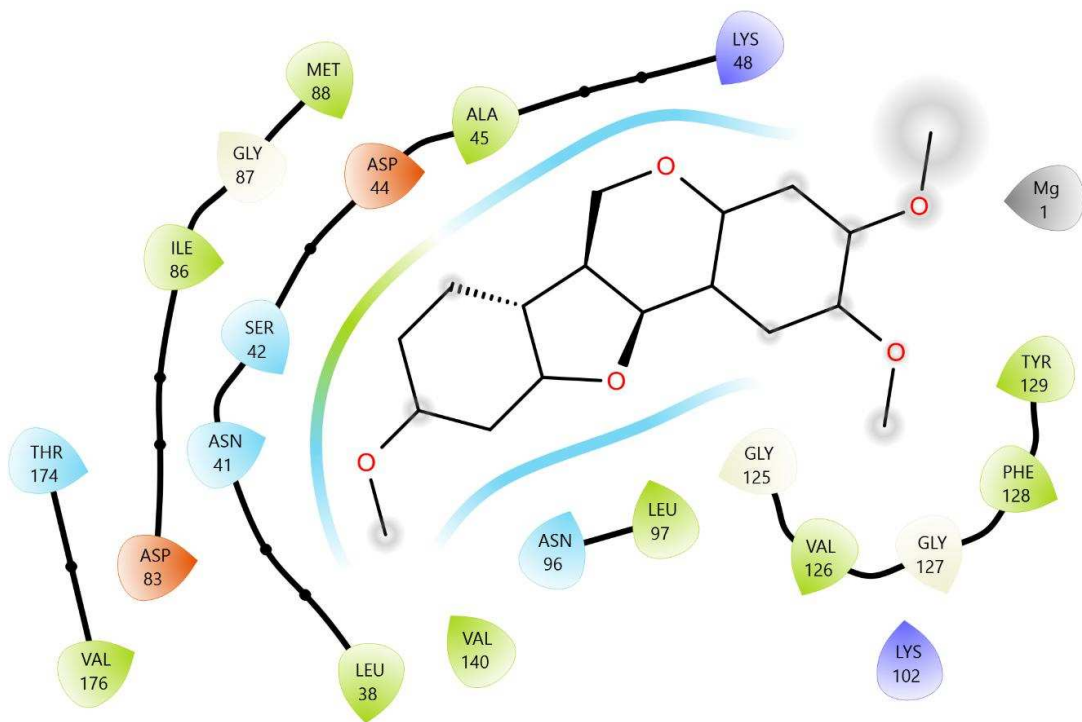
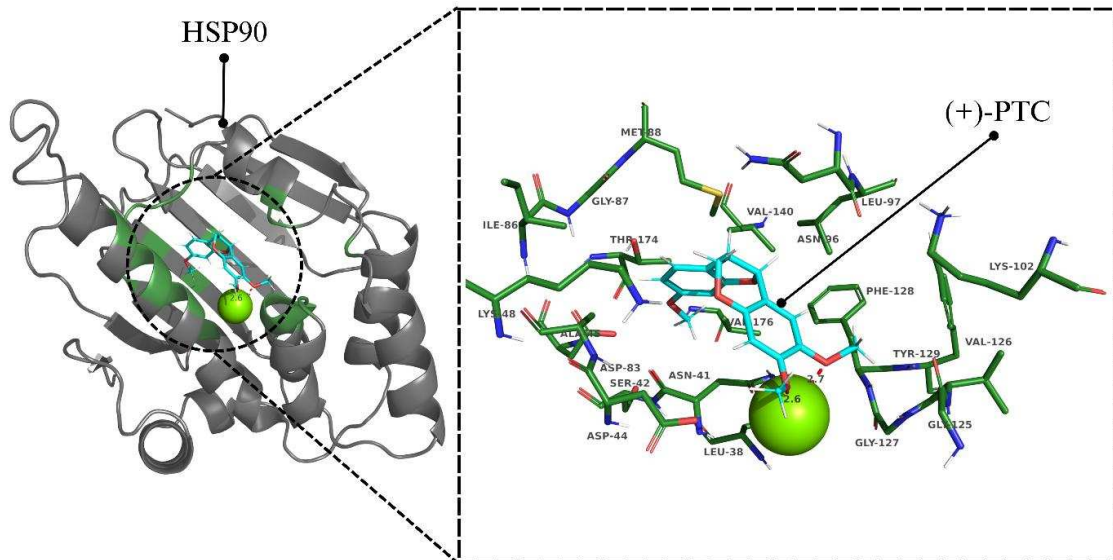
Figura 20 Complexo resultante entre o *docking* da molécula (+)-PTC e a estrutura PDBID 1T64, correspondente à cristalização da proteína HDAC8.



Fonte: Autoria própria.

Ao contrário das interações previstas nos experimentos até aqui executados tendo as proteínas HDACs como alvo, as interações previstas para a proteína HSP90 (PDB: 1BYQ) indicam que o complexo formado é repleto de interações polares que envolvem toda a molécula de (+)-PTC (Figura 21). O ligante é atraído ao sítio ativo da proteína receptora e os oxigênios de sua extremidade dimetoxilada formam interações polares com o íon de Mg^{2+} , o que tende a servir como âncora do ligante à cavidade receptora. A molécula de (+)-PTC entra de maneira lateralizada no complexo, de forma que os oxigênios da região dimetoxilada interagem com o cátion, e simultaneamente os dois grupos de CH_3 são expostos ao solvente. Isto também pode empurrar o ligante em direção ao sítio ativo e favorecer ainda mais a estabilidade da ligação. Paralelamente às interações previamente citadas, a outra extremidade da molécula está mais envolvida em interações polares com a cavidade receptora, que através dos resíduos Leu38, Asn41, Ser42, Asp44, Ala45, Lys48, Asn96 e Leu97, cria um bolsão polar que interage com o radical metoxila, o cicloexano, o anel de pirano e o anel tetrahidrofurano. Por fim, os resíduos de Asp83, Ile86, Gly87 e Met88 formam um pequeno bolso hidrofóbico que, ao interagir com o anel cicloexano do ligante, torna a interação ainda mais estável.

Figura 21 Complexo resultante entre o *docking* da molécula (+)-PTC e a estrutura PDBID 1BYQ, correspondente à cristalização da proteína HSP90.



- | | | | |
|--|---|---|--|
| ● Charged (negative) | ● Polar | --- Distance | ● Pi-cation |
| ● Charged (positive) | ● Unspecified residue | — H-bond | — Salt bridge |
| ● Glycine | ● Water | — Halogen bond | ○ Solvent exposure |
| ● Hydrophobic | ○ Hydration site | — Metal coordination | |
| ● Metal | ✗ Hydration site (displaced) | ●—● Pi-Pi stacking | |

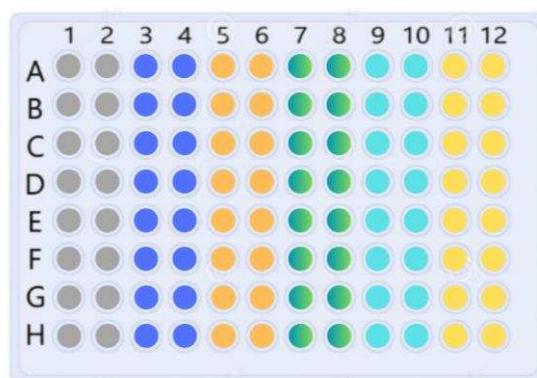
Fonte: Autoria própria.

3.5 Efeito antiproliferativo da combinação ((+)-PTC+SAHA) em linhagens de tumores sólidos e hematológico *in vitro*

Durante a fase de desenho experimental, o projeto visava aplicar as mesmas etapas para todas as linhagens celulares (PC-3, DU-145, KG-1 e MOLM-13). No entanto, foi necessário realizar ajustes metodológicos devido a limitações técnicas. Para a MOLM-13, seguiu-se diretamente para as análises dos efeitos morfológicos por meio de coloração HE e caracterização molecular por citometria de fluxo nos tempos de 6h e 12h de tratamento. A decisão foi influenciada pela necessidade de identificar alterações morfológicas precoces e indícios de morte celular programada nessa linhagem celular, alinhando-se aos objetivos do estudo e buscando otimizar o uso de recursos.

O efeito antiproliferativo da combinação entre os compostos (+)-2,3,9 - trimetoxipterocarpano ((+)-PTC) e Vorinostat (SAHA) foi avaliado para as linhagens PC-3, DU-145 (ambas de tumores de próstata) e KG-1 (LMA) diante de diferentes grupos experimentais com concentrações definidas de acordo com a CI50 obtida através do método de MTT em 72h. Para investigar o potencial efeito citotóxico da combinação ((+)-PTC+SAHA) foram definidos seis grupos experimentais, divididos entre a aplicação dos compostos em separado e combinados (Figura 22).

Figura 22 Definição do desenho considerando seis grupos experimentais: a) Nas colunas 1 e 2, em “cinza”: Controle Negativo (C-); b) Nas colunas 3 e 4, em “azul real”: (+)-PTC concentração ótima (3 μM); c) Nas colunas 5 e 6, em “pêssego”: SAHA concentração ótima (9 μM); d) Nas colunas 7 e 8, em “gradiente de cores”: ((+)-PTC+SAHA) concentração super ótima ((+)-PTC = 2 μM + SAHA = 6 μM); e) Nas colunas 9 e 10, em “azul turquesa”: (+)-PTC concentração subótima (2 μM); f) Nas colunas 11 e 12, em “amarelo”: SAHA concentração subótima (6 μM).



Fonte: Autoria própria.

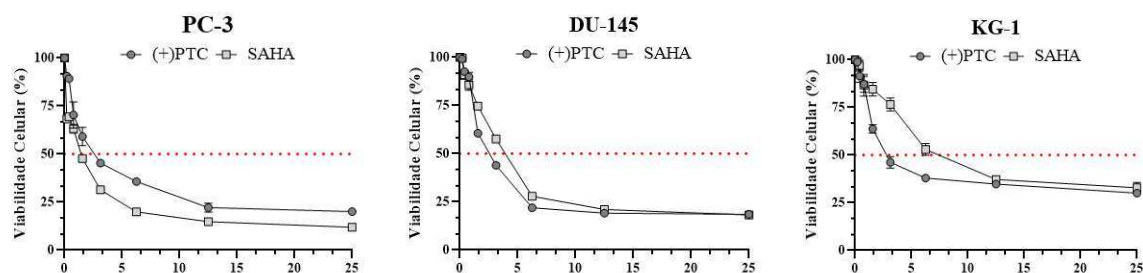
Para que se pudesse inferir a proporção de combinação dos dois compostos, primeiro foram verificadas as concentrações inibitórias mínimas do (+)-PTC e do SAHA quando separados. Para ambas as linhagens prostáticas, os valores de CI50 do (+)-PTC foram maiores que os do SAHA. Para PC-3, a CI50 do (+)-PTC = 3,12 μ M (95% IC: 2,95 - 3,30; R^2 = 0,99) enquanto a CI50 do SAHA = 1,93 μ M (95% IC: 1,75 - 2,14; R^2 = 0,97). Para DU-145 a CI50 do (+)-PTC = 3,49 μ M (95% IC: 3,09 - 3,96; R^2 = 0,94) à medida que a CI50 do SAHA = 2,70 μ M (95% IC: 2,48 - 2,94; R^2 = 0,97). Já para a linhagem leucêmica KG-1, o (+)-PTC apresentou CI50 menor que o SAHA. Para o (+)-PTC a CI50 = 3,45 μ M (95% IC: 2,99 - 3,99; R^2 = 0,95) enquanto que para o SAHA o valor foi marcadamente mais elevado, CI50 = 9,88 μ M (95% IC: 9,07 - 10,80; R^2 = 0,97). Os valores das CI50 em 72h para cada linhagem foram detalhados na Tabela 9 a seguir:

Tabela 9 Concentrações inibitórias mínimas (CI50) em 72h dos compostos quando o tratamento ocorreu em separado para as linhagens celulares PC-3, DU-145 e KG-1.

Linhagens	PC-3			DU-145			KG-1		
	Amostra	CI50 (μ M)	95% IC	R^2	CI50 (μ M)	95% IC	R^2	CI50 (μ M)	95% IC
(+)-PTC	3,12	2,95 to 3,30	0,99	3,49	3,09 to 3,96	0,94	3,45	2,99 to 3,99	0,95
SAHA	1,93	1,75 to 2,14	0,97	2,70	2,48 to 2,94	0,97	9,88	9,07 to 10,80	0,97
Proporção (+)-PTC : SAHA	1,6 : 1			1,3 : 1			1 : 2,9		

Com esses resultados (ilustrados ainda na Figura 23), observou-se que as concentrações inibitórias mínimas apresentavam proporções diferentes entre as linhagens celulares. Enquanto para as linhagens de tumores sólidos, as razões se mantiveram em torno de 1,5 μ M, para a linhagem leucêmica KG-1 observou-se valor mais elevado (2,9 μ M) e que, portanto, pôde ser entendido, que se beneficiaria mais do tratamento combinado. Diante dessa proporção, decidiu-se seguir para os próximos experimentos apenas com a linhagem leucêmica e adotar o padrão de combinação de 1 : 3, respectivamente, dos compostos (+)-PTC e SAHA.

Figura 23 Concentrações inibitórias médias apresentadas pelos compostos (+)-PTC e SAHA para as linhagens celulares PC-3, DU-145 e KG-1 no teste de MTT 72h.



Fonte: Autoria própria.

Diante da necessidade de obtenção de mais dados sobre o efeito citotóxico do tratamento proposto, foram ainda realizados testes de MTT nos tempos de 24h e 48h apenas com a linhagem KG-1. Estes dados foram reunidos com os anteriormente obtidos para o tempo de 72h de tratamento e utilizados para abastecer o software *CompuSyn version 1.0*, que calculou pontos reais de combinação para informar um potencial efeito sinérgico/antagônico/aditivo da combinação (onde *CI values*: se (=1) = efeito aditivo; se (<1) = efeito sinérgico; se (>1) = efeito antagônico).

Os resultados da simulação rodada para os tempos de 24h e 48h demonstraram que apesar do potencial de sinergismo da combinação ((+)-PTC+SAHA), seria necessário utilizar os compostos em concentrações inviáveis para efeito prático de inibição de 50% da população de células (para 24h: Fa = 0,5 (+)-PTC 8,47 μM e SAHA 66,66 μM; para 48h: Fa = 0,5 (+)-PTC 5,23 μM e SAHA 78,56 μM) a fim de alcançar a CI50 na linhagem KG-1.

Por esse motivo, foram utilizados os dados da simulação no tempo de 72h, cujo resultado sugeriu alcance de Fa = 0,5 (+)-PTC 2,76 μM e SAHA 6,54 μM. Neste experimento, foi possível ainda observar valores para *DRI Data for Drug Combo*, que calcula o "índice de redução de droga", com possibilidade de redução das concentrações dos compostos e ainda obtenção do mesmo efeito, quando há sinergismo. Estes dados foram compilados na Tabela 10 a seguir.

Tabela 10 Demonstrativo do potencial de sinergismo da combinação ((+)-PTC+SAHA) investigado nos tempos de 24, 48 e 72 horas para a linhagem leucêmica KG-1. Fa = faixa de simulação entre 5% e 97% de inibição; CI values: se (=1) = efeito aditivo; se (<1) = efeito sinérgico; se (>1) = efeito antagônico; DRI: informa quanto de cada composto é necessário para obter certo efeito.

Compostos	24h			48h			72h		
	CI value	(+)-PTC (μM)	SAHA (μM)	CI value	(+)-PTC (μM)	SAHA (μM)	CI value	(+)-PTC (μM)	SAHA (μM)
(+)-PTC		8,47			5,23			2,76	
SAHA			66,66			78,56			6,54
DRI ((+)-PTC+SAHA)	0,82	5,02	15,06	0,92	4,02	12,07	0,90	1,10	3,30

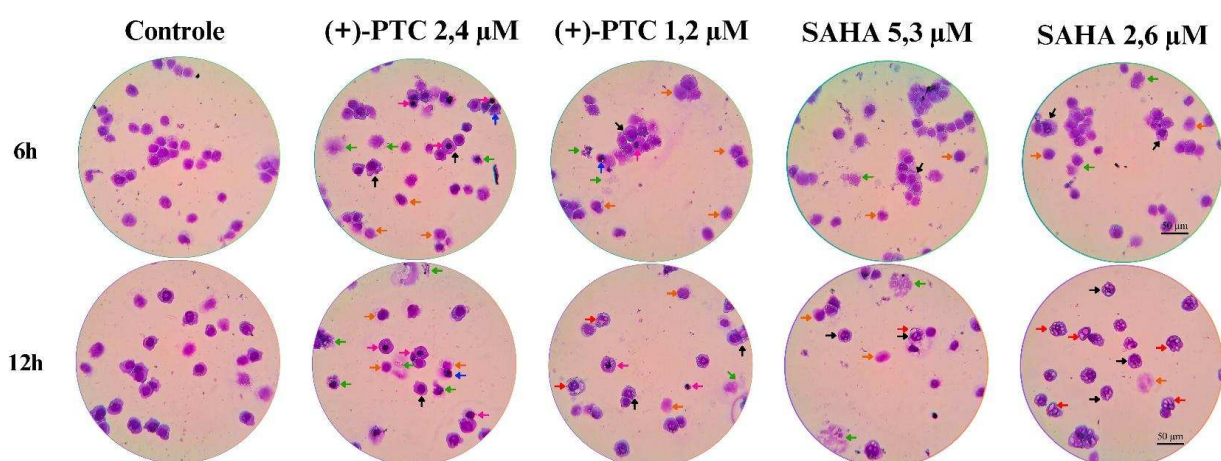
Posteriormente a estes resultados, células da linhagem KG-1 foram tratadas com os compostos (+)-PTC e SAHA em diferentes concentrações (SAHA 9 μM e 6 μM; (+)-PTC 3 μM e 2 μM), além da combinação ((+)-PTC+SAHA) 2 μM + 6 μM, e ainda submetidas a testes de citometria de fluxo, visando avaliar os possíveis efeitos de indução à inviabilidade celular e alterações no ciclo celular das populações celulares experimentadas.

3.6 Alterações morfológicas identificadas por coloração HE

Visando avaliar possíveis alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com os compostos (+)-PTC e SAHA em diferentes concentrações, as linhagens MOLM-13 e KG-1 foram submetidas ao protocolo de coloração por hematoxilina-eosina. Esta é uma abordagem histológica fundamental para a identificação de alterações morfológicas indicativas de processos de inviabilidade celular, como a apoptose.

A Figura 24 apresenta as principais alterações morfológicas observadas em células da linhagem MOLM-13 submetidas ao tratamento de 6h e 12h. No grupo tratado com (+)-PTC, foram observadas alterações morfológicas características de indução à apoptose e necrose, como formação de invaginações da membrana plasmática (blebs), rompimento da membrana plasmática, picnose, cariólise, cariorrexe e formação de vacúolos citoplasmáticos. Por outro lado, nos grupos experimentais tratados com SAHA, as alterações morfológicas incluíram blebs citoplasmáticos, rompimento de membrana, cariólise e presença de vacúolos de forma mais perceptível.

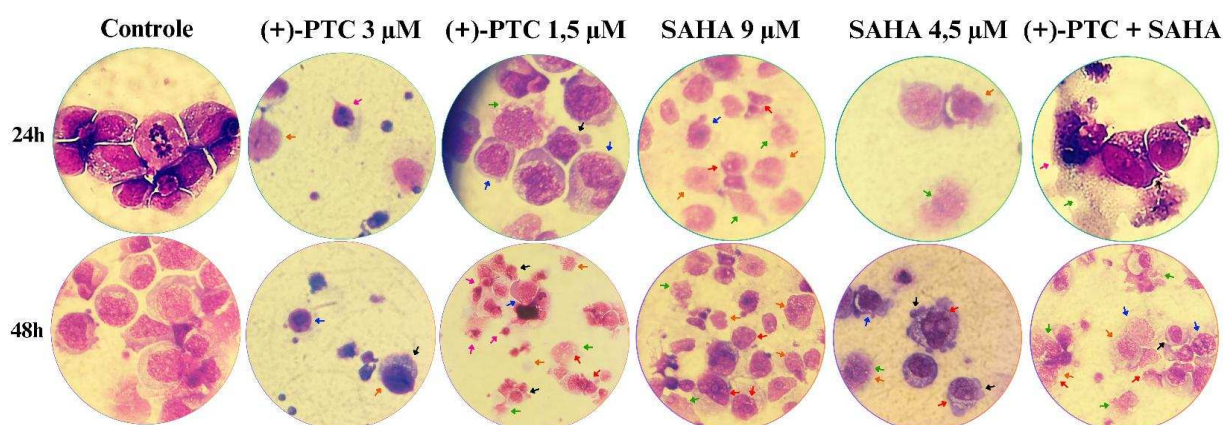
Figura 24 Análise microscópica de células MOLM-13 coradas com hematoxilina-eosina (HE) após 6 e 12 horas de tratamento. As células do grupo Controle não foram tratadas. As setas de diferentes cores indicam múltiplas alterações morfológicas observadas: setas pretas referem-se a blebs citoplasmáticos, setas verdes indicam rompimento da membrana plasmática, setas laranjas designam picnose, setas cor-de-rosa identificam cariólise, setas azuis sinalizam cariorrexe e setas vermelhas apontam o surgimento de vacúolos citoplasmáticos.



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 25 observam-se alterações morfológicas em células da linhagem KG-1, submetidas ao tratamento de 24h e 48h. Nos grupos em que o tratamento ocorreu apenas com (+)-PTC, foram observadas alterações morfológicas como blebs, rompimento da membrana plasmática, picnose e cariólise. Já nos grupos tratados apenas com SAHA, foram identificados rompimento de membrana plasmática, cariólise e formação de vacúolos em maior proporção. Nesse ensaio houve a inclusão do grupo ((+)-PTC+SAHA) que apresentou alterações morfológicas mais marcadas para a apoptose, como a vacuolização, a picnose e a cariólise.

Figura 25 Análise microscópica de células KG-1 coradas com hematoxilina-eosina (HE) após 24 e 48 horas de tratamento. As células do grupo Controle não foram tratadas. As setas de diferentes cores indicam múltiplas alterações morfológicas observadas. Setas pretas referem-se a blebs citoplasmáticos, setas verdes indicam rompimento da membrana plasmática, setas laranjas designam picnose, setas cor-de-rosa identificam cariólise, setas azuis sinalizam cariorrexe e setas vermelhas apontam o surgimento de vacúolos citoplasmáticos.



Fonte: Autoria própria.

3.7 Avaliação do ciclo celular e da viabilidade celular por meio de ensaios de citometria de fluxo

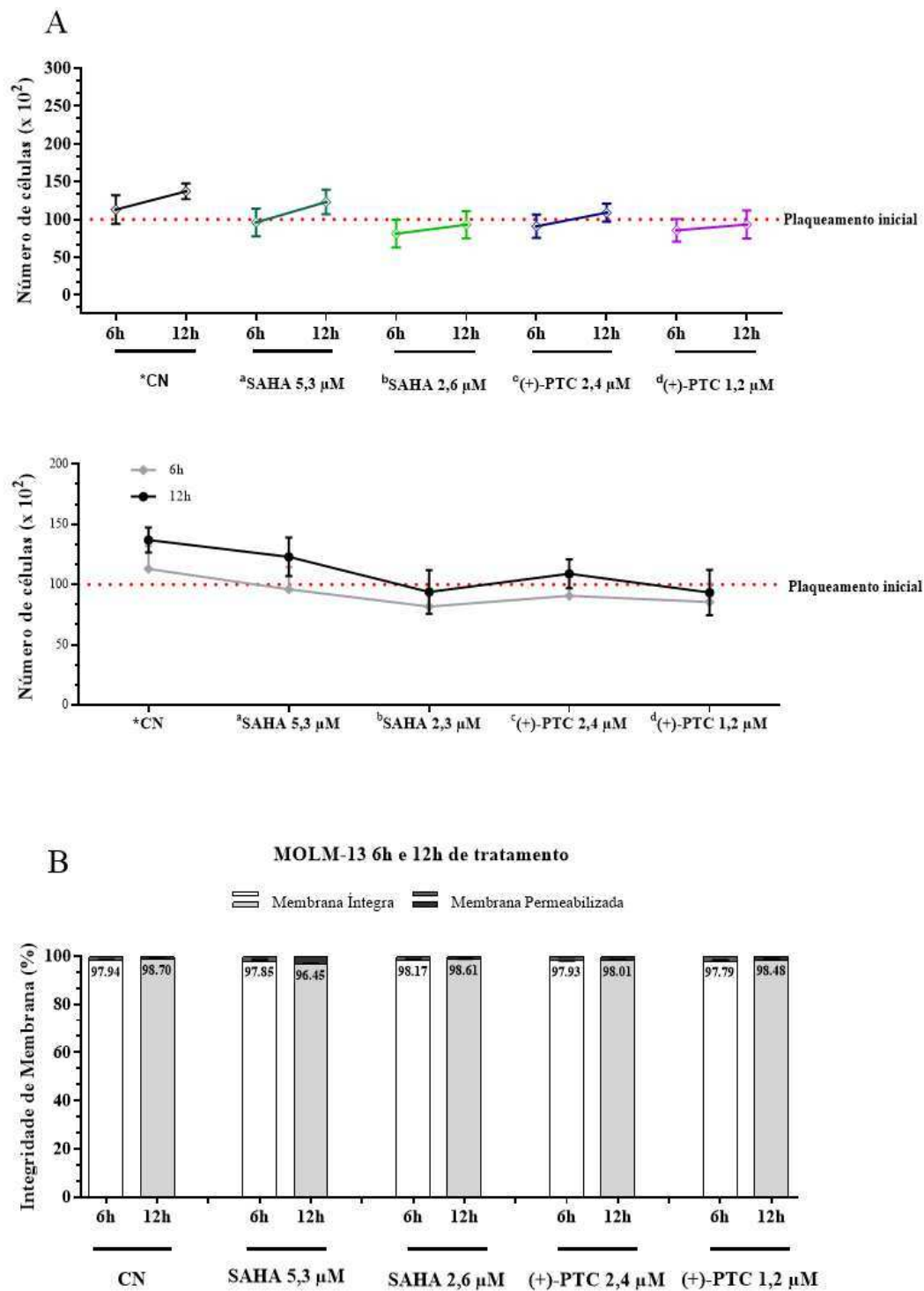
A avaliação da integridade da membrana plasmática (IM) e da progressão do ciclo celular (CC) em células submetidas a tratamentos experimentais representa uma estratégia crucial para a caracterização de compostos candidatos a antineoplásicos. A IM é um indicador já estabelecido de viabilidade celular, cuja permeabilização está associada a estágios avançados de morte celular, incluindo indução à apoptose e necrose (Nowak-Terpiowska et al., 2021). A fluorescência emitida pelo iodeto de propídio (PI) pode ser utilizada para distinguir entre células vivas, apoptóticas e apoptóticas tardias/necróticas, pois células viáveis apresentam sinais de fluorescência baixos, enquanto células inviáveis apresentam fluorescência mais intensa, uma vez que o PI pôde penetrar na célula devido a permeabilização da membrana (Nowak-Terpiowska et al., 2021).

Por sua vez, as alterações no ciclo celular, como parada em fases específicas ou acúmulo sub-G1, permitem deduzir mecanismos de ação relacionados à inibição da proliferação, danos ao DNA e ativação de vias pró-apoptóticas (Peng et al., 2023). No contexto

das linhagens MOLM-13 e KG-1, esses parâmetros são fundamentais para avaliar a eficácia e seletividade de novas moléculas com potencial terapêutico.

Células da linhagem MOLM-13 estiveram sob tratamento com os compostos (+)-PTC e SAHA separadamente por 6 e 12 horas. Como observado na Figura 26A, o número total de células permaneceu equilibrado, com valores semelhantes nos tempos de 6 e 12 horas de tratamento. Na Figura 26B, o ensaio de integridade de membrana demonstrou que para todos os cinco grupos experimentais, o índice de viabilidade celular foi superior a 96% em ambos os tempos de 6 e 12 horas.

Figura 26 Ilustração da quantificação número total de células (A) e resultado dos testes de integridade de membrana (IM) realizados pela técnica de citometria de fluxo (B) na linhagem MOLM-13 submetida a tratamento de cinco grupos experimentais diferentes pelos tempos de 6h e 12h.

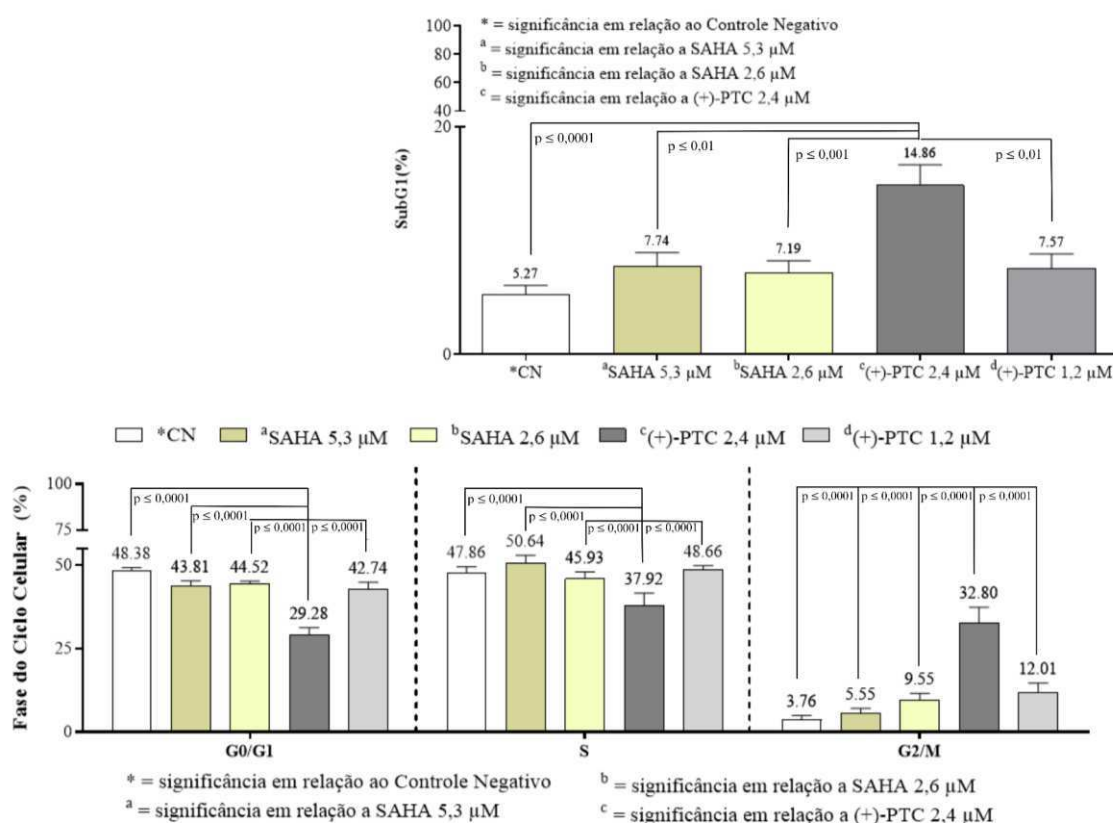


Fonte: Autoria própria.

Na Figura 27 observa-se o resultado da avaliação da dinâmica de ciclo celular nos períodos de 6 e 12 horas para a linhagem MOLM-13. É possível notar que na análise estatística dos dados Sub-G1 houve diferença significativa ($p \leq 0,0001$) na comparação entre os grupos CN vs (+)-PTC 2,4 μM . A diferença foi significativa ($p \leq 0,001$) quando comparados os grupos SAHA 2,6 μM vs (+)-PTC 2,4 μM . Houve diferença significativa ($p \leq 0,01$) quando comparados os grupos SAHA 5,3 μM vs (+)-PTC 2,4 μM e (+)-PTC 2,4 μM vs (+)-PTC 1,2 μM . O comparativo entre os demais grupos não foi significativo ($p > 0,05$).

Ainda na Figura 27, observa-se que em todas as fases do ciclo celular, a diferença foi significativa entre o grupo (+)-PTC 2,4 μM e todos os outros grupos experimentais, mais marcadamente notável na fase G2/M ($p \leq 0,0001$).

Figura 27 Testes de avaliação do ciclo celular (CC) realizados pela técnica de citometria de fluxo na linhagem MOLM-13 submetida a tratamento de cinco grupos experimentais diferentes pelos tempos de 6h e 12h.



Fonte: Autoria própria.

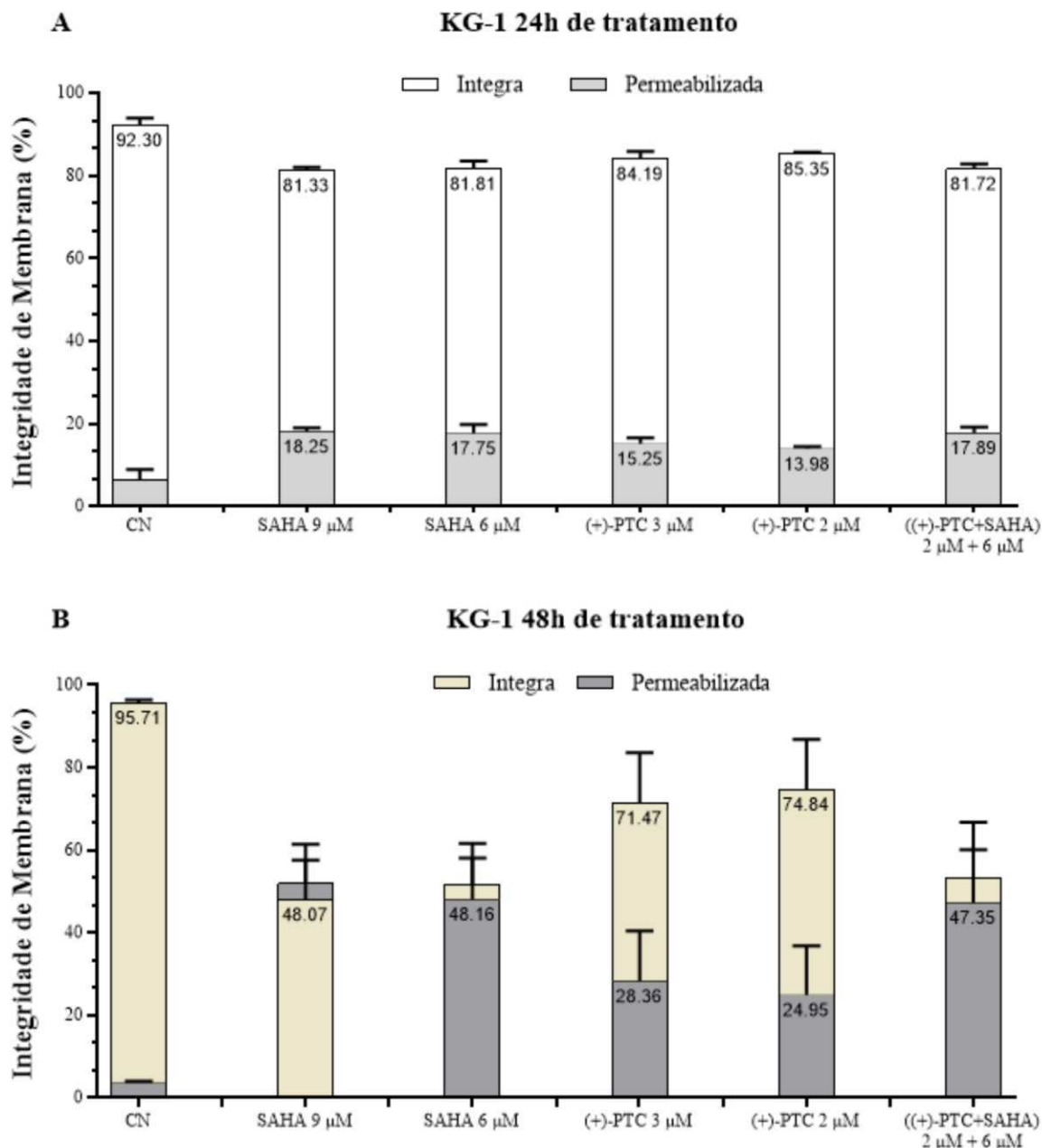
Células da linhagem KG-1 foram submetidas ao tratamento com a combinação ((+)-PTC+SAHA) para comparação da sua ação com os compostos separados. A fim de observar a atuação dos compostos durante o metabolismo celular, os tempos de tratamento foram 24h e 48h.

Inicialmente foi realizada análise de integridade de membrana para verificação da viabilidade das populações celulares tratadas no experimento. Uma vez que, na análise *in silico*, observou-se potencial de sinergismo para tratamento com a combinação ((+)-PTC+SAHA), esperava-se que houvesse diferenças marcantes em resposta às concentrações significativamente diferentes. Entretanto, conforme observa-se na Figura 28, pelo teste ANOVA não houve significância ($p > 0,05$) entre os resultados médios encontrados para os diferentes grupos experimentais em ambos os tempos de 24h e 48h de tratamento.

Para o tratamento de 24h (Figura 28A), o teste Shapiro-Wilk revelou não haver normalidade em quatro dos seis grupos experimentais. No Controle Negativo (CN) observou-se 92,30% de viabilidade; no grupo SAHA 9 μM observou-se 81,33% de viabilidade; para o grupo SAHA 6 μM , 81,81% de viabilidade; no grupo experimental (+)-PTC 3 μM foram observados 84,19% de viabilidade; para o grupo (+)-PTC 2 μM , 85,35% de viabilidade; e por fim, no grupo ((+)-PTC+SAHA) 2 μM + 6 μM , o resultado demonstrou 81,72% de viabilidade celular.

Para o tratamento de 48h, apesar de haver normalidade, pelo teste Shapiro -Wilk, nos valores dos grupos de tratamento, se manteve o resultado não significativo ($p > 0,05$) pelo teste ANOVA, quando comparada a influência das diferentes concentrações de cada composto, como também observou-se que o grupo ((+)-PTC+SAHA) 2 μM + 6 μM obteve valores muito próximos dos encontrados nos grupos SAHA 9 μM e SAHA 6 μM . Como visto na Figura 28B, os grupos apresentaram os seguintes valores de viabilidade celular: Controle Negativo (CN) 95,71% de viabilidade; SAHA 9 μM 48,07% de viabilidade; SAHA 6 μM , 51,69% de viabilidade; (+)-PTC 3 μM 71,47% de viabilidade; (+)-PTC 2 μM , 74,84% de viabilidade; e no grupo ((+)-PTC+SAHA) 2 μM + 6 μM , observou-se 53,22% de viabilidade.

Figura 28 Testes de integridade de membrana (IM) realizados pela técnica de citometria de fluxo na linhagem KG-1 submetida a tratamento de seis grupos experimentais diferentes pelos tempos de 24h (A) e 48h (B).

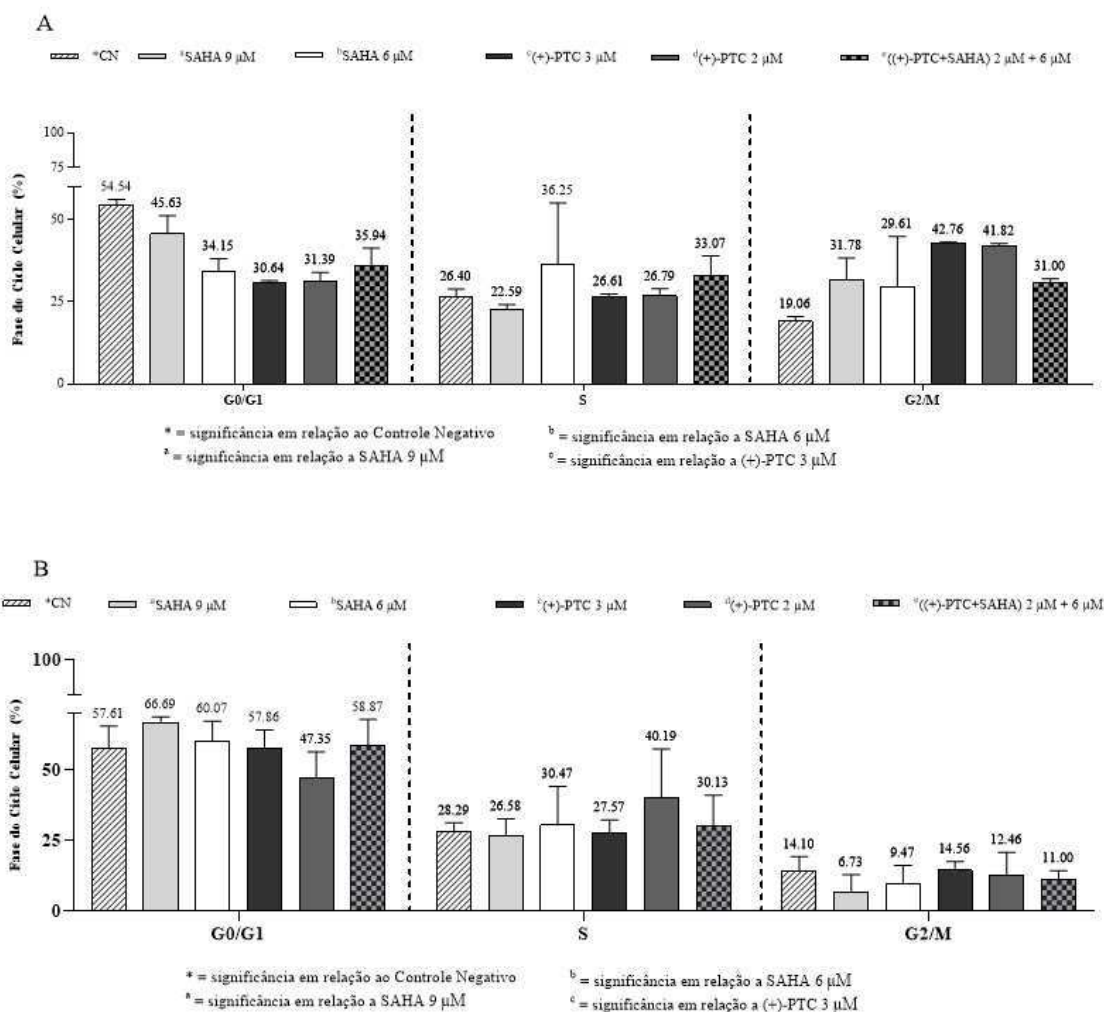


Fonte: Autoria própria.

Ainda por meio dos testes de citometria de fluxo, foi possível observar o padrão e modificações ocorridas no ciclo celular da linhagem KG-1 quando tratada com os grupos experimentais anteriormente mencionados. O resultado desse experimento demonstrou que há normalidade (Shapiro-Wilk $p > 0,05$) nos dados dos grupos experimentais, porém não

demonstrou significância (ANOVA $p > 0,05$) entre os grupos de nenhum dos tempos (24h: Figura 29A; 48h: Figura 29B) ou nenhuma das etapas do ciclo celular na linhagem leucêmica, como pode-se observar a seguir.

Figura 29 Testes de avaliação do ciclo celular (CC) realizados pela técnica de citometria de fluxo na linhagem KG-1 submetida a tratamento de seis grupos experimentais diferentes pelos tempos de 24h (A) e 48h (B).



Fonte: Autoria própria.

Deste modo, os dados integrados das análises *in vitro* obtidos neste estudo permitem inferir impactos relevantes dos compostos (+)-PTC e SAHA sobre o metabolismo celular nas linhagens analisadas, ainda que para KG-1 alguns dados tenham sido inconclusivos. Para uma visão consistente, os principais resultados obtidos foram sintetizados na Tabela 11, oferecendo uma perspectiva objetiva para interpretação dos efeitos globais do tratamento.

Tabela 11 Síntese dos principais resultados obtidos nas análises *in vitro*: efeito antiproliferativo dos compostos (+)-PTC e SAHA, alterações morfológicas identificadas por meio de coloração HE, caracterização por citometria de fluxo dos seus efeitos sobre a viabilidade celular e ciclo celular das linhagens celulares analisadas.

Composto	Citotoxicidade/sinergismo 72h		Alterações morfológicas		Viabilidade celular		Ciclo celular	
	Linhagem		Linhagem		Linhagem		Linhagem	
(+)-PTC	Fa 0,5 = 2,762 µM	KG-1	Blebs, rompimento de membrana, picnose, cariólise, cariorrexe, vacúolos	MOLM-13 e KG-1	Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais	(+)-PTC 2,4 µM apresentou diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos para MOLM-13, mas não significativa para KG-1	MOLM-13 e KG-1	
SAHA	Fa 0,5 = 6,540 µM	KG-1	Blebs, rompimento de membrana, cariólise, vacúolos		Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais	A inibição dos tratamentos do SAHA foram significativamente menores ($p < 0,01$) que as do (+)-PTC para MOLM-13	MOLM-13 e KG-1	
((+)-PTC+SAHA)	DRI = 1,098 µM DRI = 3,295 µM	KG-1	Picnose, cariólise, vacúolos	KG-1	Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o tratamento combinado e os outros grupos experimentais.	Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o tratamento combinado e os outros grupos experimentais.	KG-1	

O composto (+)-PTC, quando administrado isoladamente, exibiu atividade antiproliferativa moderada, com efeito em linhagens tumorais, porém mais restrito em paralelo ao SAHA. O SAHA isolado, apresentou efeito antiproliferativo mais plausível, com redução da viabilidade celular de forma significativa nas linhagens tumorais testadas. A combinação ((+)-PTC+SAHA) mostrou a melhor resposta citotóxica, uma vez que demonstrou maior redução da viabilidade celular e induziu alterações morfológicas compatíveis com apoptose em linhagem leucêmica.

4 DISCUSSÃO

No mapeamento de alvos moleculares, os dados obtidos contribuem para orientar abordagens experimentais nas linhagens tumorais PC-3, DU-145, KG-1 e MOLM-13, indicando perfis de expressão gênica relevantes para o entendimento da ação epigenética do composto (+)-PTC e de sua associação com o Vorinostat (SAHA). Nesse processo, alguns genes apresentam expressão basal modulada, com destaque para IL1B, TNF, GAA, APP, MYC, DNA Topoisomerase II e a Heat shock protein 90 (HSP90AA1). Esta última apresentou uma superexpressão consistente em todas as quatro linhagens avaliadas, indicando atuação fundamental na proteção celular ao estresse e indução à apoptose. A superexpressão de HSP90AA1, uma chaperona molecular fortemente associada ao câncer, que estabiliza diversas oncoproteínas, crucial em processos de proliferação, evasão da apoptose e progressão tumoral (Aswad; Liu, 2021), reforça sua potencial relevância como alvo terapêutico, especialmente em combinação com compostos epigenéticos. Os achados contribuem para a compreensão dos mecanismos de ação do (+)-PTC e possibilitam a abertura para estratégias terapêuticas mais direcionadas para tumores hematológicos e prostáticos.

Em uma análise complementar ao mapeamento de expressão basal dos alvos moleculares, realizou-se um levantamento de interação protéica por meio da plataforma STRING, utilizando como foco as HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6 e HDAC8, principais alvos do Vorinostat, além da HSP90AA1 mencionada anteriormente. A decisão de restringir o mapeamento a essas proteínas foi estrategicamente direcionada à compreensão dos possíveis mecanismos de ação da terapia combinada proposta.

O mapa de rede gerado evidenciou que as conexões de HDAC1 possuem estrutura de rede coesa, feita de interações com moduladores epigenéticos, como CHD4 e EP300 (Akerberg; Pu, 2020), e proteínas reguladoras tumorais. As redes de HDAC2 e HDAC3 são

mais robustas (*clustering* > 0,9 e p-valor < 10^{-12}), indicando ocuparem funções centrais em complexos epigenéticos multiproteicos (Drew et al., 2021). A HDAC6 apresentou a menor significância estatística ($p = 0,0702$), possivelmente relacionado a interações menos direcionadas devido a sua localização citoplasmática (Kaur et al., 2022). Já a rede de HDAC8 apresentou p-valor altamente significativo ($8,46 \times 10^{-6}$), determinante de conexões da rede maior do que o esperado ao acaso. Sua interação com sirtuínas (SIRT1/2) e correpressores transcricionais (SIN3A) indica atuação em silenciamento epigenético (Li et al., 2020; Cao et al., 2022). As conexões de HSP90AA1 são dirigidas a outras proteínas chaperonas e reguladores tumorais, corroborando sua atuação em ambientes tumorais agressivos.

Nesse aspecto, a observação de que todas as proteínas cujo p-valor foi significativo ($p < 0,05$) reforça o entendimento de que a rede de interações não é aleatória e pode ser representativa de um módulo funcional real. A visualização dessas interações contribui para a formulação de hipóteses sobre sinergismos moleculares entre o (+)-PTC e o Vorinostat, além de oferecer indicativos de vias que podem ser moduladas pela combinação terapêutica.

Embora estudos anteriores tenham descrito o potencial antiproliferativo do (+)-PTC, limitações ainda permanecem quanto à sua interação com diferentes alvos celulares. De mesmo modo, apesar de o SAHA ser clinicamente aprovado como inibidor de HDACs, suas limitações na monoterapia decorrem de efeitos adversos, como a toxicidade e indução à resistência tumoral. Neste cenário, o presente estudo contribui fundamentalmente para a ampliação da resposta antitumoral e redução de efeitos adversos quando do uso individual desses compostos, além de incentivar a investigação de novas aplicações do (+)-PTC em associações terapêuticas.

Prezando pelo princípio da economicidade, a realização do *docking* molecular com HDACs teve como objetivo explorar outros potenciais alvos do (+)-PTC a nível epigenético. A fim de verificar a competitividade do (+)-PTC diante do SAHA como composto epigenético, pretendia-se ainda proceder à realização dos experimentos de expressão gênica, considerando que essa etapa permitiria a complementaridade dos dados já obtidos e ampliação das conclusões; contudo, não houve tempo suficiente para tal execução.

Diante disso, os resultados obtidos nos ensaios de *docking* molecular indicam que apesar de haver reações favoráveis a acontecer com as HDACs, o (+)-PTC possui uma tendência mais acentuada a formar complexos mais estáveis com a proteína HSP90. Entretanto, se limitarmos a comparação às HDACs, a estrutura 4LXZ (HDAC2) apresentou melhor força

de interação e melhor estabilidade, simultaneamente, o que a torna um destaque na avaliação dos resultados.

É possível observar ainda que quando o (+)-PTC e o SAHA competem pelo sítio ativo das HDACs, o SAHA apresenta melhor desempenho. Isso se justifica pois, apesar de se ligar com uma força menor se comparado ao (+)-PTC, o SAHA é energeticamente mais estável. O SAHA é um inibidor de HDACs consolidado, portanto, sua atuação não deveria gerar grandes implicações. Entretanto, o fato de o (+)-PTC se apresentar como competitivamente atraído às HDACs demonstra a aplicação deste composto como inibidor de HDACs. Competição semelhante foi observada entre o flavonóide Apigenina e o SAHA frente às HDACs 1 e 3, cuja similaridade nos valores de RMSD dos complexos avaliados por *docking* molecular corroboram uma competição conformacional pelo mesmo sítio ativo (Nimal et al., 2024).

Flavonóides como a Luteolina e a Apigenina podem interagir com a HDAC1 e HDAC2 com valores de energia de ligação semelhantes ou superiores ao SAHA (Scafuri et al., 2020). Nesse estudo, a competição pelo sítio ativo das HDACs pode gerar efeito antagonista, em vez do sinergismo buscado, pois ambas as moléculas disputam a mesma cavidade enzimática.

De forma similar, a competição entre (+)-PTC e SAHA observada pelo *docking* molecular que foi realizado pode estar relacionada a posicionamentos mutuamente exclusivos no sítio ativo das proteínas, e consequente ausência de sinergismo funcional observada nos experimentos de citometria de fluxo, como discutido à frente.

O ensaio de MTT teve como objetivo avaliar o potencial antiproliferativo da combinação ((+)-PTC+SAHA) nas linhagens PC-3, DU-145 e KG-1. A partir dos dados de 72h de tratamento, a linhagem KG-1 foi selecionada para análise temporal mais detalhada, com experimentos adicionais realizados em 24h e 48h de exposição à combinação de compostos.

A análise de sinergismo realizada com o software *CompuSyn* permitiu aprofundar a compreensão dos efeitos combinados do (+)-PTC e SAHA na linhagem leucêmica KG-1. O modelo computacional demonstrou que, em concentrações reduzidas ((+)-PTC 1,098 μM + SAHA 3,295 μM), a combinação foi capaz de atingir 50% de inibição da viabilidade celular. Esse resultado evidencia um perfil de sinergismo, indicando que a associação ((+)-PTC+SAHA) potencializa os efeitos antiproliferativos de forma superior ao uso em separado de cada composto.

Tal interação é relevante no contexto terapêutico, pois sugere a possibilidade de diminuição das concentrações administradas, redução de efeitos adversos e ampliação da janela

terapêutica (Boik; Newan, 2008; Lopez; Banerji, 2017; Jaaks et al., 2022). Este potencial efeito sinérgico pode estar relacionado à capacidade do (+)-PTC de modular vias epigenéticas que, somadas à ação inibitória do SAHA em histonas desacetilases, garantem uma supressão mais eficaz da viabilidade celular nestas células leucêmicas.

De acordo com as regras de interpretação do *CompuSyn* (CI = 1 efeito aditivo, CI < 1 sinergismo, CI > 1 antagonismo) (Chou; Martin, 2005), pode-se afirmar que embora os resultados de 24h e 48h tenham indicado um possível sinergismo (CI < 1), os valores de CI50 calculados para esses tempos de tratamento (8,466 μ M de (+)-PTC + 66,659 μ M de SAHA em 24h; 5,226 μ M de (+)-PTC + 78,556 μ M de SAHA em 48h) demonstraram que seriam necessárias concentrações inviáveis, levando ao comprometimento de sua aplicação clínica.

Entretanto, na avaliação de 72h de tratamento, o perfil de sinergismo apresentou índice de combinação (CI) de 0,901 para alcançar 50% de inibição celular ($F_a = 0,5$), sugerindo, assim, sinergismo moderado entre os compostos. Sendo assim, é perceptível a redução para valores de concentração (PTC 1,098 μ M + SAHA 3,295 μ M).

Os dados do índice de redução de dose (DRI) corroboram o ganho terapêutico, uma vez que indicam o alcance da mesma resposta biológica com doses até 15 vezes menores para o (+)-PTC e 12 vezes menores para o SAHA. Desta maneira, os resultados até aqui obtidos sustentam a hipótese de sinergismo entre o pterocarpano e o inibidor de HDAC na linhagem KG-1, especialmente em períodos mais prolongados de exposição, fator relevante para aplicação de terapias combinadas no tratamento de leucemias.

Para avaliar a presença de alterações morfológicas nas células tratadas em diferentes tempos de exposição, células das linhagens MOLM-13 e KG-1 foram submetidas à coloração HE. Foi possível avaliar que os compostos (+)-PTC e SAHA induziram alterações morfológicas em cada linhagem nos tempos de exposição em que foram submetidas (6h até 12h de tratamento na linhagem MOLM-13, 24h até 48h de tratamento na linhagem KG-1).

Para MOLM-13, em 6h de exposição foi possível observar a formação de blebs citoplasmáticos, rompimento da membrana plasmática, picnose e cariólise, especialmente na maior concentração do (+)-PTC. Também foram observadas cariólise e rompimento de membrana nas células tratadas com SAHA. Após 12h, às alterações morfológicas aumentaram em quantidade e diversidade, com a observação de picnose e cariorrexe nas células tratadas com (+)-PTC e surgimento expressivo de vacúolos no tratamento com SAHA em todas as concentrações.

Para a avaliação morfológica da linhagem KG-1, no tempo de 24h de exposição ao (+)-PTC foram observadas alterações relacionadas ao núcleo das células, como cariorrexe e picnose (em menor quantidade). Após 24h de exposição ao SAHA, observou-se rompimento de membrana, vacuolização e cariólise, mais marcadamente na maior concentração. Ainda em 24h, a combinação ((+)-PTC+SAHA) provocou alterações como rompimento de membrana e picnose, mas em quantidades menos distinguíveis das células não afetadas.

Após 48h de exposição ao (+)-PTC, os efeitos gerados compreendem cariorrexe, picnose, blebs, rompimento de membrana, cariólise e vacuolização mesmo na menor concentração testada. O SAHA provocou o surgimento de vacúolos, rompimento de membrana e formação de blebs. Por sua vez, a combinação ((+)-PTC+SAHA) gerou alterações morfológicas como cariorrexe, vacúolos, rompimento de membrana e cariólise.

De forma geral, foram observadas alterações morfológicas nas linhagens MOLM-13 e KG-1 causadas pela exposição aos compostos (+)-PTC e SAHA, quando separados ou em combinação. Essas alterações listadas acima são características de processos distintos de morte celular, como apoptose, autofagia e necrose.

A morte celular por apoptose é caracterizada por blebs na membrana, condensação da cromatina/constricção nuclear (picnose), fragmentação nuclear (cariorrexe) e formação de corpos apoptóticos (Ozyerli-Goknar; Bagci-Onder, 2021; Delgado, 2023), alterações observadas nas células tratadas com (+)-PTC. Já a autofagia, que se baseia em intensa vacuolização citoplasmática, como visto no tratamento com SAHA, os autofagossomos se fundem com lisossomos, promovendo a degradação de componentes celulares danificados no interior dos vacúolos (Delgado, 2023).

Alterações morfológicas causadas pelo composto (+)-PTC em linhagens tumorais são investigadas há pelo menos duas décadas. Militão (2005) descreve como a exposição de células HL-60 ao pterocarpano provocou condensação da cromatina, picnose, redução do volume celular e formação de vacúolos citoplasmáticos e apoptóticos. Farias et al. (2020) descrevem como o (+)-PTC foi responsável por produzir alterações morfológicas como condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos em células da linhagem OVCAR-8. Sales (2022) relata o aparecimento de blebs citoplasmáticas, vacuolização e diminuição do conteúdo nuclear em células KG-1 tratadas com (+)-PTC.

Ainda que apoptose e autofagia possuam características diferentes, esses mecanismos podem estar funcionalmente interligados e atuando de forma cooperativa ou alternada. A depender do estímulo celular, a autofagia pode contribuir para a ativação da

apoptose, e ambas serem desencadeadas por vias de sinalização comuns ou a célula pode ser induzida a seguir os dois mecanismos de forma mutuamente exclusiva (Sharma et al., 2023).

Por outro lado, a necrose é tradicionalmente considerada um processo em que ocorre picnose, expansão de organelas, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo intracelular, como citocinas e fragmentos de DNA, provocando inflamação e morte das células circundantes (Delgado, 2023; Liu et al., 2023). Essas características foram vistas nas células de ambas as linhagens para exposição a ambos os compostos.

A interpretação dos estímulos ambientais ou da autoavaliação dos danos celulares surgidos é que irá direcionar a decisão da célula de seguir o processo apoptótico ou não (Ozyerli-Goknar; Bagci-Onder, 2021). Pode-se, portanto, inferir que a administração dos compostos SAHA e especialmente (+)-PTC causa danos celulares e/ou estímulos ambientais suficientemente intensos a ponto de direcionar as células das linhagens MOLM-13 e KG-1 ao processo apoptótico caracterizado pelas alterações morfológicas identificadas pelo protocolo de coloração HE.

Com relação à avaliação de integridade de membrana, na linhagem MOLM-13 o número total de células permaneceu constante nos tempos de 6 e 12 horas de tratamento, assim como a viabilidade celular se manteve numa mesma faixa de desvio em todas as concentrações e grupos experimentais testados, possivelmente indicando não haver ação citotóxica do (+)-PTC e SAHA nesses tempos. Já na avaliação do ciclo celular pelo intervalo da exposição entre 6h e 12h, observou-se que o (+)-PTC 2,4 μ M provocou diferenças significativas entre todos os grupos experimentais, mais marcadamente notável na fase G2/M ($p \leq 0,0001$). Essa observação deve-se à capacidade do (+)-PTC de agir citostaticamente na fase G2/M como comprovado pela literatura (Farias et al., 2022; Sales, 2022).

A linhagem KG-1 também foi avaliada quanto a integridade de membrana e alterações do ciclo celular, mas nos períodos de 24h e 48h, e sob ação da combinação ((+)-PTC+SAHA) a fim de investigar os mecanismos de ação antes do efeito citotóxico observado em 72h. Apesar do potencial para sinergismo sugerido, no experimento de bancada não foi possível corroborar o resultado previsto pelo experimento *in silico* CompuSyn. Dessa forma, não houve significância ($p > 0,05$) entre os resultados médios encontrados para os diferentes grupos experimentais em nenhum dos tempos de exposição, tanto para a avaliação da integridade de membrana quanto para o ciclo celular.

Diante do exposto, é importante dizer que a interpretação de resultados não significativos ($p > 0,05$) não significa que obrigatoriamente houve ausência de evidência. O

título do trabalho de Altman e Blant (1995), “Absence of evidence is not evidence of absence” expressa com precisão a ideia de que, tratar resultados originais não significativos como evidência de ausência de efeito é estatisticamente equivocado. Considerar apenas a não significância estatística ($p > 0,05$) como critério para determinar ausência de efeito é questionável. Nesse sentido, o baixo poder estatístico da análise levaria a um resultado inconclusivo, porém não comprova ausência de efeito (Pawel et al., 2023).

Outro ponto a se considerar é que a variabilidade acumulada em sucessivas replicações *in vitro* pode justificar uma falta de significância estatística nos resultados. A extensão da variabilidade genética de linhagens celulares ocasionada pela manutenção do cultivo *in vitro* com sucessivas passagens, pode influenciar os resultados e a reprodutibilidade dos testes de genotoxicidade, e levar a resultados não significativos ($p > 0,05$) relacionados a comportamentos inespecíficos derivados do “drift” da linhagem (Li et al., 2019).

Portanto, ainda que os resultados aqui obtidos nos ensaios de citometria de fluxo com a linhagem KG-1 não tenham corroborado a proposta inicial do projeto, as atividades experimentais desenvolvidas com (+)-PTC e SAHA direcionam a aplicação desses compostos para novas abordagens terapêuticas, especialmente no contexto de combinações com outros agentes antineoplásicos e terapias epigenéticas.

Cabe ainda destacar que, apesar do crescente interesse na combinação de compostos naturais com compostos epigenéticos como estratégia terapêutica no tratamento do câncer, observa-se uma oportunidade de construção de conhecimento a partir de estudos como este que realizem comparações diretas entre abordagens combinatórias e terapias convencionais.

Pesquisas recentes indicam que compostos naturais, como EGCG (Wu et al., 2020), apigenina (Zhang et al., 2021), quercetina (Zhu et al., 2023), baicaleína (Xu et al., 2023), genisteína (Sacko et al., 2019), irigenina (Guo et al., 2020) e medicarpina (Imran et al., 2018) apresentam efeitos inibitórios sobre alvos epigenéticos e propriedades promissoras como epidrogas, sugerindo seu potencial na prevenção e tratamento de diversos tipos de câncer. Porém, apenas os estudos de Sacko et al. (2019) e Zhang et al. (2021) têm direcionamento para os efeitos combinatórios de compostos naturais e outras estratégias terapêuticas. Os outros estudos mencionados anteriormente focam em investigações da ação isolada de cada composto, sem promover comparações com sua atuação em terapias combinadas ou associações com outros compostos epigenéticos. Isso abre caminho para a realização de novos estudos na busca de novas interações moleculares sinérgicas entre flavonóides, isoflavonóides e pterocarpanos com epidrogas clinicamente estabelecidas. Estas observações enfatizam a importância de

estudos mais detalhados sobre a eficácia e a segurança dessas associações, objetivando aprimorar estratégias terapêuticas fundamentadas na epigenética.

Além disso, apesar da relevância dos achados *in vitro*, é importante considerar as potenciais aplicações translacionais. Esses resultados podem servir de base para investigações *in vivo*, ampliando a compreensão do potencial terapêutico. Outro aspecto que merece destaque refere-se aos desafios da pesquisa inerentes à biodisponibilidade e à farmacocinética dos compostos estudados, somados ao risco de desenvolvimento de resistência tumoral, que devem ser considerados e discutidos. A aplicação de compostos naturais como estratégia suplementar à quimioterapia tradicional é evidente em estudos com diferentes abordagens (Su et al., 2018; Pal et al., 2023; Balaji et al., 2025). Sua grande diversidade de alvos e mecanismos de ação instiga a pesquisa de terapias para a resistência a outros compostos (Talib et al., 2021).

Por fim, cabe levantar hipóteses que justifiquem o sinergismo entre (+)-PTC e SAHA. Sendo uma possibilidade em que a combinação atue por vias de complementaridade na sinalização celular. Uma vez que as produções do grupo de pesquisa do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) indiquem a atuação do (+)-PTC como atuante no fuso mitótico, promovendo formação de fusos monopolares e desorganização dos centrossomas (Farias et al., 2022) e a literatura recente corrobora que o SAHA é notadamente um inibidor de HDACs (Nepali et al., 2020; Waitman et al., 2024), a complementaridade dessas atuações pode potencializar a resposta apoptótica ou outros processos de morte celular. Destaca-se ainda outra hipótese, na qual seria de que a modulação e efeitos epigenéticos e proteínas como HDACs e HSP90 podem ser melhor evidenciados se a atuação da associação ((+)-PTC+SAHA) for investigada por estudos complementares, avaliando outras concentrações de tratamento, avaliação de toxicidade sistêmica, além de análises de expressão gênica/proteica. Essas alternativas necessitam de confirmação experimental; entretanto, fornecem provocações para novas pesquisas.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até aqui evidenciam a complexidade dos mecanismos regulatórios envolvidos na resposta à exposição das linhagens cancerosas a compostos com potencial antineoplásico. A identificação de alvos com expressão modulada pelo tratamento proposto, junto aos resultados da caracterização do efeito antiproliferativo em tumores sólidos e hematológicos, pode apresentar um caminho para regulação de outras proteínas e alterações

na expressão gênica em diferentes contextos experimentais, sugerindo que cada um dos compostos exerce influência específica na regulação celular. Adicionalmente, a combinação dos compostos (+)-2,3,9-trimetoxipterocarpano ((+)-PTC) e Vorinostat (SAHA) demonstrou um potencial efeito mais expressivo em tumores hematológicos, sendo que, na linhagem KG-1, a redução da concentração administrada teve um impacto mais perceptível, levando a considerar a proposta para redução de efeitos adversos provenientes de tratamentos monoterapêuticos.

A observação de um sinergismo leve entre os compostos (+)-PTC e SAHA incentivou a realização de testes voltados para a identificação de possíveis efeitos modulatórios da integridade de membrana e do ciclo celular, buscando compreender melhor os efeitos da combinação dos compostos por meio da técnica de citometria de fluxo. No entanto, os achados da citometria não corroboraram integralmente os resultados do teste de citotoxicidade, uma vez que não foi verificada significância entre os diferentes grupos experimentais testados, sejam entre concentrações diferentes do mesmo composto, ou em alguns casos, entre grupos de investigação da ação dos compostos quando combinados ou em separado.

Nesse estudo, esperava-se que houvesse aumento da inviabilidade celular no tratamento combinado, uma vez que o sinergismo verificado poderia ser proveniente de ação citotóxica colaborativa entre os compostos. Entretanto, a não confirmação na prática do que foi simulado *in silico* reforça a importância de análises complementares para aprofundar a compreensão dos mecanismos de ação desses compostos e sua aplicabilidade terapêutica.

Portanto, os resultados obtidos demonstram o potencial da combinação entre (+)-PTC e SAHA como estratégia terapêutica para ampliar a resposta antitumoral e reduzir as restrições do uso individual de cada composto. Entretanto, este estudo apresenta algumas limitações, incluindo a dependência exclusiva de ensaios de viabilidade, a ausência de análises moleculares confirmatórias e o uso de um número reduzido de linhagens celulares. Esses pontos são importantes de serem citados pois abrem caminhos para novas investigações e estudos complementares.

Uma das principais limitações identificadas refere-se à restrição metodológica das análises realizadas, o que limita a extrapolação direta dos resultados. Ainda assim, os achados sugerem aplicações e caminhos importantes, seja pelo encorajamento a pesquisas com foco na atuação epigenética do (+)-PTC ou pela sugestão de integrações entre estratégias *in silico* e estratégias *in vitro* consolidadas. As dificuldades metodológicas enfrentadas, relacionadas a comportamentos inespecíficos advindos do “drift” celular comum em culturas *in vitro*, foram

superadas por meio de adequações metodológicas, refinamento das técnicas de cultivo e reorganização do planejamento de pesquisa, assegurando o rigor científico do processo experimental. Com maior disponibilidade de recursos, experimentos adicionais de caráter confirmatório dos efeitos epigenéticos, como expressão gênica e *western blotting*, poderiam fortalecer as evidências e consolidar o potencial terapêutico da combinação investigada.

Assim, para pesquisas futuras dentro dessa área, pode-se considerar importante a complementaridade com análises de expressão gênica e/ou proteica, bem como a avaliação de toxicidade sistêmica, a realização de experimentos *in vivo* e o desenvolvimento de formulações que aumentem a estabilidade e a biodisponibilidade da combinação ((+)-PTC+SAHA).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese se propôs a investigar o potencial epigenético do pterocarpano (+)-PTC, isoladamente e em combinação com o Vorinostat (SAHA), através da integração de abordagens *in silico* e *in vitro*, a fim de elucidar mecanismos de morte celular e avaliar perspectivas de novas estratégias terapêuticas em modelos de câncer hematológico e de próstata. Nesse contexto, procedeu-se ao mapeamento de compostos de origem natural das classes dos flavonoides, isoflavonoides e pterocarpanos cujas atividades epigenéticas e outras alterações moleculares são descritas na literatura, realizou-se análise do possível efeito sinérgico da combinação ((+)-PTC+SAHA) em diferentes linhagens tumorais, realizou-se experimentos de *docking* molecular para caracterização das interações com alvos epigenéticos relevantes, determinou-se a CI_{50} dos compostos (+)-PTC e Vorinostat em linhagens PC-3, DU-145, MOLM-13 e KG-1, identificou-se alterações morfológicas em linhagens leucêmicas provocadas pela exposição aos compostos (+)-PTC e Vorinostat em combinação, e investigou-se a modulação do ciclo celular nas linhagens MOLM-13 e KG-1.

Embora o potencial antineoplásico do (+)-2,3,9-trimetoxipterocarpano ((+)-PTC) tenha sido observado em investigações anteriores deste grupo de pesquisa, sua combinação com um inibidor de histona desacetilase (iHDAC) amplamente utilizado na clínica como o Vorinostat (SAHA) não revelou um efeito terapêutico expressivo neste contexto estudado. Motivos múltiplos podem ter contribuído para este achado, desde interferências não investigadas até possíveis adaptações no desenho experimental proposto até aqui.

Diante disso, a continuidade das pesquisas explorando outras abordagens terapêuticas que visem a combinação entre o (+)-PTC e outros compostos pode abrir caminhos para potencializar resultados positivos e reduzir efeitos indesejados de compostos já utilizados nos tratamentos existentes. Algumas indicações podem incluir a investigação de outras moléculas epigenéticas em combinação com o (+)-PTC; variações nas concentrações e proporções aplicadas de cada composto buscando intervalos que potencializam uma possível ação sinérgica; e expansão da investigação para outras linhagens hematológicas que melhor respondam aos tratamentos experimentais propostos.

Dessa forma, embora os resultados obtidos não tenham corroborado um efeito sinérgico promissor para tratamento da Leucemia Mielóide Aguda (LMA), o potencial do (+)-PTC como composto bioativo de origem natural permanece relevante e merece aprofundamento em futuros estudos.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, Shweta; MEHROTRA, Ranjana. An overview of Molecular Docking. **JSM Chem**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 1024-1028, 2016. DOI: <https://doi.org/10.47739/2334-1831/1024>
- AKERBERG, Brynn N; PU, William T. Genetic and Epigenetic Control of Heart Development. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [s. l.], v. 12, n. 7, a036756, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036756>
- AKONE, Sergi Herve; NTIE-KANG, Fidele; STUHLREIER, Fidele; EWONKEM, Monique Bassomo; NOAH, Alexandre Mboene; MOUELLE, Simon Eitel Misse; MÜLLER, Rolf. Natural Products Impacting DNA Methyltransferases and Histone Deacetylases. **Frontiers in pharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 992, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00992>
- AL-KHAYRI, Jameel M; RASHMI Ramakrishnan; TOPPO Varsha; CHOLE, Pranjali Bajrang; BANADKA Akshatha; SUDHEER, Wudali Narasimha; NAGELLA, Praveen; SHEHATA, Wael Fathi; AL-MSSALLEM, Muneera Qassim; ALESSA, Fatima Mohammed; ALMAGHASLA, Mustafa Ibrahim; REZK, Adel Abdel-Sabour. Plant Secondary Metabolites: The Weapons for Biotic Stress Management. **Metabolites**, [s. l.], v. 13, n. 6, p.716, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo13060716>
- ALTMAN, Douglas G; BLAND, J Martin. Absence of evidence is not evidence of absence. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 311, n. 7003, p. 485, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.311.7003.485>
- ARORA, Itika; SHARMA, Manvi; TOLLEFSBO, Trygve O. Combinatorial Epigenetics Impact of Polyphenols and Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 20, n. 18, p. 4567, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20184567>
- ASWAD, Anthony; LIU, Tuoen. Targeting heat shock protein 90 for anti-cancer drug development. **Advances in cancer research**, [s. l.], v. 152, p. 179–204, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2021.03.006>
- AVCI, Cigir Biray; SUSLUER, Sunde Yilmaz; CAGLAR, Hasan Onur; BALCI, Tugce; AYGUNES, Duygu, Dodurga, Yavuz; GUNDUZ, Cumhur. Genistein-induced mir-23b expression inhibits the growth of breast cancer cells. **Wspolczesna Onkologia**, [s. l.], v. 19, p. 1, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5114/wo.2014.44121>
- BALAJI, Sathyanarayan; ANBARASU, Suvitha; RAMAIAH, Sudha; ANBARASU, Anand. Hispidulin: a potential alternative to vorinostat against HDAC1 for acute myeloid leukemia. **Discover oncology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p.1389, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12672-025-03182-y>
- BÄR, Sofia; PRADHAN, Rohan; BIRSACK, Bernhard; NITZSCHE, Bianca; HÖPFNER, Michael; SCHOBERT, Rainer. New chimeric HDAC inhibitors for the treatment of colorectal cancer. **Archiv der Pharmazie**, [s. l.], v. 356, n. 2, e2200422, 2023. DOI:

<https://doi.org/10.1002/ardp.202200422>

BLAGOSKLONNY, Mikhail V. Analysis of FDA approved anticancer drugs reveals the future of cancer therapy. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. 1035–1042, 2004.

BOIK, John C; NEWMAN, Robert A. A classification model to predict synergism/antagonism of cytotoxic mixtures using protein-drug docking scores. **BMC pharmacology**, [s. l.], v. 8, n. 13, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2210-8-13>

BOUYAHYA, Abdelhakim; MECHCHATE, Hamza; OUMESLAKHT, Loubna; ZEOUK, Ikrame; ABOULAGHRAS, Sara; BALAHBIB, Abdelaali; ZENGIN, Gokhan; KAMAL, Mohammad Amjad; GALLO, Monica; MONTESANO, Domenico; & EL OMARI, Nasreddine. The Role of Epigenetic Modifications in Human Cancers and the Use of Natural Compounds as Epidrugs: Mechanistic Pathways and Pharmacodynamic Actions. **Biomolecules**, [s. l.], v. 12, n. 3, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom12030367>

BOUYAHYA, Abdelhakim; EL HACHLAFI, Naoufal; AANNIZ, Tarik; BOURAIS, Ilhame; MECHCHATE, Hamza; BENALI, Taoufiq; SHARIATI, Mohammad Ali; BURKOV, Pavel; LORENZO, José M; WILAIRATANA, Polrat; MUBARAK, Mohammad S; EL OMARI, Nasreddine. Natural Bioactive Compounds Targeting Histone Deacetylases in Human Cancers: Recent Updates. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 8, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27082568>

BRAY, Freddie; LAVERSANNE, Mathieu; SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L; SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmadin. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21834>

CAO, Meng; WANG, Liqiang; XU, Dahua; BI, Xiaoman; GUO, Shengnan; XU, Zhizhou; CHEN, Liyang; ZHENG, Dehua; LI, Peihu; XU, Jiankai; ZHENG, Shaojiang; WANG, Hong; WANG, Bo; LU, Jianping; LI, Kongning. The synergistic interaction landscape of chromatin regulators reveals their epigenetic regulation mechanisms across five cancer cell lines. **Computational and structural biotechnology journal**, [s. l.], v. 20, p. 5028–5039, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.09.008>

CARLOS-REYES, Ángeles; LÓPEZ-GONZÁLEZ, José Sullivan; MENESES-FLORES, Manuel; GALLARDO-RINCÓN, Dolores; RUÍZ-GARCÍA, Erika; MARCHAT, Laurence A; VEGA, Horacio Astudillo-de la; CRUZ, Olga N Hernández de la; LÓPEZ-CAMARILLO, César. Dietary compounds as epigenetic modulating agents in cancer. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00079>

CARVALHO, Amanda Torrentes; RIBEIRO, Grazielle Alves; FERRAZ, Raquel. **Citometria de fluxo no estudo das doenças infecto-parasitárias**. (Curso de Férias – Inverno; Coord. Santos, A. L. B). Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, 2010. Disponível em: https://www.ioc.fiocruz.br/picf/PROD_LITERAT/Apostilas/2010_Citometria_de_Fluxo_no_estudo_das_doencas_infecto-parasitarias.pdf . Acesso em: 30 maio 2025.

CARVALHO, Adonias A., SANTOS, Lucivania R. dos; FREITAS, Jurema S. de. Isoflavonoides da tribo dalbergieae: uma contribuição quimiosistemática para a subfamília papilionoideae. **Química Nova**, [s. l.], v. 43, n. 9, p. 1294–1311, 2020. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170588>

CARVALHO, Guilherme Graziany Camelo de. (2021). **Identificação De Biomarcadores Na Síndrome Mielodisplásica E Predição In Silico Com Caracterização In Vitro Da Farmacocinética De Um Novo Fármaco Antitumoral Candidato A Molécula Lead**. 2021. Tese (Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

CASARI, Giulia; ROMALDI, Brenda; SCIRE, Andrea; MINNELLI, Cristina; MARZIONI, Daniela; FERRETTI, Gianna; ARMENI, Tatiana. Epigenetic Properties of Compounds Contained in Functional Foods Against Cancer. **Biomolecules**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 15, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom15010015>

CAYETANO-SALAZAR, Lorena; OLEA-FLORES, Monserrat; ZUÑIGA-EULOGIO, Miriam D; WEINSTEIN-OPPENHEIMER, Caroline; FERNÁNDEZ-TILAPA, Gloria; MENDOZA-CATALÁN, Miguel A; ZACAPALA-GÓMEZ, Ana E; ORTIZ-ORTIZ, Julio; ORTUÑO-PINEDA, Carlos; NAVARRO-TITO, Napoleón. Natural isoflavonoids in invasive cancer therapy: From bench to bedside. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 35, n. 8, p. 4092–4110, 2021. DOI: [10.1002/ptr.7072](https://doi.org/10.1002/ptr.7072)

CHAVDA, Vivek P; CHAUDHARI, Amit Z; BALAR, Pankti C; GHOLAP, Amol; VORA, Lalitkumar K. Phytoestrogens: Chemistry, potential health benefits, and their medicinal importance. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 3060–3079, 2024. DOI: [10.1002/ptr.8196](https://doi.org/10.1002/ptr.8196)

CHEN, Shen; WANG, Xiaojing; CHENG, Yu; GAO, Hongsheng; CHEN, Xuehao. A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. **Molecules**, [s. l.], v. 28, n. 13, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28134982>

CHEN, Shanshan; HE, Ruonan; LI, Ying; ZHANG, Shuo. Pure total flavonoids from Citrus ameliorate NSAIDs-induced intestinal mucosal injury via regulation of exosomal LncRNA H19 and protective autophagy. **Heliyon**, [s. l.], v. 10, n. 9, e29797. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29797>

CHOU, Ting-Chao; MARTIN, Nick. **CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50**. Paramus, NJ: ComboSyn Inc., 2005. Disponível em: https://combosyn.com/uat/pdf/CompuSyn_users_guide.pdf. Acesso em: 30 maio 2025.

CHOU, Ting-Chao. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological reviews**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 621–681, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>

CHOU, Ting-Chao; MARTIN, Nick. CompuSyn for drug combinations and for general dose-effect analysis. **ComboSyn Inc, Paramus, (NJ)**, 2005.

COSTA, Pedro Mikael da Silva; SALES, Sarah Leyenne Alves; PINHEIRO, Daniel Pascoalino; PONTES, Larissa Queiroz; MARANHÃO, Sarah Sant'Anna; PESSOA, Claudia do Ó, Furtado; FURTADO, Gilvan Pessoa; FURTADO, Cristiana Libardi Miranda. Epigenetic reprogramming in cancer: From diagnosis to treatment. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 11, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1116805>

DAI, Enyong; ZHU, Zhi; WAHED, Shudipto; QU, Zhaoxia; STORKUS, Walter J; GUO, Zong Shengguo. Epigenetic modulation of antitumor immunity for improved cancer immunotherapy. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01464-x>

DAINA, Antoine; MICHELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep42717>

DELGADO, Elena Fernández. **Síntesis y caracterización de nuevos quimioterápicos derivados de pirazol y heterociclos S,N: efectos sobre la apoptosis en líneas celulares tumorales**. 2023. Tese (Programa de doctorado en Biología Molecular y celular, biomedicina y biotecnología), Universidad de Extremadura, 2023. Disponível em: <https://dehesa.unex.es/handle/10662/18343>. Acesso em: 30 maio 2025.

DIVYA RAJASELVI, N; JIDA, M. D., Nair, Devu B; SUJITH, S; BEEGUM, Nisaath; NISHA, A. R. Toxicity prediction and analysis of flavonoid apigenin as a histone deacetylase inhibitor: an in-silico approach. **Silico Pharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 34, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40203-023-00170-4>

DIXON, Richard A; PASINETTI, Giulio M. Flavonoids and isoflavonoids: From plant biology to agriculture and neuroscience. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 154, n. 2, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.110.161430>

DREW, Kevin; WALLINGFORD, John B; MARCOTTE, Eduardo M. hu.MAP 2.0: integration of over 15,000 proteomic experiments builds a global compendium of human multiprotein assemblies. **Molecular systems biology**, [s. l.], v. 17, n. 5, e10016, 2021. DOI: <https://doi.org/10.15252/msb.202010016>

FALCÃO, Maria José C; POULIQUEM, Yvone Brígido M; LIMA, Mary Anne S; GRAMOSA, Nilce Viana; COSTA-LOTUFO, Letícia V; MILITÃO, Gardênia Carmen G; PESSOA, Cláudia; MORAES, Manoel Odorico de; SILVEIRA, Edilberto R. Cytotoxic flavonoids from *Platymiscium floribundum*. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 68, n. 3, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/np049854d>

FARIAS, Kaio; COSTA, Roner F. da; MEIRA, Assuero S; DINIZ-FILHO, Jairo; BEZERRA, Eveline M; FREIRE, Valder N; GUEST, Prue; NIKAHD, Maryam; MA, Xinghua; GARDINER, Michael G; BANWELL, Martin G; OLIVEIRA, Maria da C. F. de; MORAES, Manoel O. de; PESSOA, Claudia do Ó. Antitumor Potential of the Isoflavonoids (+)- and (-)-2,3,9-Trimethoxypterocarpan: Mechanism-of-Action Studies. **ACS medicinal chemistry**

letters, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1274–1280, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00097>

FARIAS, Kaio Moraes de; ROSA-RIBEIRO, Rafaela; SOUZA, Edmarcia E; KOBARG, Jörg; BANWELL, Martin G; NETO, José de Brito Vieira; SALES, Sarah Leyenne Alves; COSTA, Paulo Roberto Ribeiro; SANTOS, Rafael Cavalcante dos; GASPAR, Francisco Vilaça; JUNIOR, Amaro Gomes Barreto; OLIVEIRA, Maria da Conceição Ferreira; MORAES, Manoel Odorico de; FURTADO, Cristiana Libardi M; CARVALHO, Hernandes F; PESSOA, Claudia. The Isoflavanoid (+)-PTC Regulates Cell-Cycle Progression and Mitotic Spindle Assembly in a Prostate Cancer Cell Line. **Chemistry & biodiversity**, [s. l.], v. 19, n. 5, e202200102, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200102>

FARIAS, Kaio; DA COSTA, Roner F; MEIRA, Assuero S; DINIZ-FILHO, Jairo; BEZERRA, Eveline M; FREIRE, Valder N; GUEST, Prue; NIKAHD, Maryam; MA, Xinghua; Gardiner, Michael G; BANWELL, Martin G; de Oliveira, Maria da C. F; MORAES, Manoel O de; PESSOA, Cláudia do Ó. Antitumor Potential of the Isoflavonoids (+)- and (-)-2,3,9-Trimethoxypterocarpan: Mechanism-of-Action Studies. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1274–1280, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00097>

FILHO, A. M.; LAVERSANNE, M.; FERLAY, J.; COLOMBET, M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; PARKIN, D. M.; SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. The GLOBOCAN 2022 cancer estimates: Data sources, methods, and a snapshot of the cancer burden worldwide. **International journal of cancer**, [s. l.], v. 156, n. 7, p. 1336–1346, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.35278>

FURTADO, Cristiana Libardi Miranda; LUCIANO, Maria Claudia Dos Santos; SANTOS, Renan Da Silva; FURTADO, Gilvan Pessoa; MORAES, Manoel Odorico; PESSOA, Cláudia do Ó. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. **Epigenetics**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1164–1176, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1640546>

FREI III, Emil; KARON, Myron; LEVIN, Robert H; FREIREICII, Emil J; TAYLOR, Robert J; HANANIAN, Julieta; SELAWRY, Oleg; HOLLAND, James F; HOOGSTRATEN, Barth; WOLMAN, Irving J; ABIR, Esshagh; SAWITSKY, Arthur; LEE, Stanley; MILLS, Stephan D; BURGERT JR, E. Omer; SPURR, Charles L; PATTERSON, Richard B; EBAUGH, Franklin G; JAMES III, Watson; MOON, John H. The effectiveness of combinations of antileukemic agents in inducing and maintaining remission in children with acute leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 642–656, 1965.

FREGONA, Vincent; BAYET, Manon; Gerby, Bastien. Oncogene-Induced Reprogramming in Acute Lymphoblastic Leukemia: Towards Targeted Therapy of Leukemia-Initiating Cells. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 21, 5511, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13215511>

GAJENDER, Avijit Mazumder; SHARMA, Ashwani; AZAD, Md. A. K. A comprehensive review of the pharmacological importance of dietary flavonoids as hepatoprotective agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 21, p. 4139117, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/4139117>

GALATI, Salvatore; DI STEFANO, Miriana; MARTINELLI, Elisa; POLI, Giulio; TUCCINARDI, Tiziano. Recent Advances in In Silico Target Fishing. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 26, n. 17, p. 5124, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26175124>

GANAI, Shabir Ahmad; SHEIKH, Farooq Ahmad; BABA, Zahoor Ahmad; MIR, Mudasir Ahmad; MANTOO, Mohd Ayoob; YATOO, Manzoor Ahmad. Anticancer activity of the plant flavonoid luteolin against preclinical models of various cancers and insights on different signalling mechanisms modulated. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 35, n. 7, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.7044>

GASPAR, Francisco V; RIBEIRO, Soraya Marques; BARCELLOS, Júlio C. F; MONTEIRO, Samuel; DOMINGOS, Jorge L. O; LUCIANO, Maria Claudia dos Santos; PAIER, Carlos R. K; PESSOA, Cláudia; COSTA, Paulo R. R. New 5-carba-pterocarpan: Synthesis and preliminary antiproliferative activity on a panel of human cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 107, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104584>

GUO, Langtao; ZHENG, Xueping; WANG, Enwei; JIA, Xusheng; WANG, Gang; WEN, Jian. Iriegenin treatment alleviates doxorubicin (DOX)-induced cardiotoxicity by suppressing apoptosis, inflammation and oxidative stress via the increase of miR-425. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, [s. l.], v. 125, p. 109784, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109784>

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer discovery**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **Cell**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HANCIO, Thaís; MAZZOCCOLI, Luciano; GUIMARÃES, Gustavo; ROBAINA, Marcela; MENDONÇA, Bruna Dos Santos; NESTAL DE MORAES, Gabriela; MONTE-MOR, Barbara Da Costa Reis; MAYUMI GUTUYAMA, Luciana; DE CARVALHO, Luíze Otero; NETTO, Chaquib Daher; COSTA, Paulo R. R; DE FARIA, Fernanda Costas Casal; MAIA, Raquel Ciuvalsch. The pterocarpanquinone LQB-118 compound induces apoptosis of cytarabine-resistant acute myeloid leukemia cells. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 58, n. 6, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijo.2021.5204>

HARINANTENAINA, Liva; BRODIE, Peggy J; SLEBODNICK, Carla; CALLMANDER, Martin W; RAKOTOBÉ, Etienne; RANDRIANASOLO, Sennen; RANDRIANAIVO, Richard; RASAMISON, Vincent E; TENDYKE, Karen; SHEN, Yongchun; SUH, Edward M; KINGSTON, David G. I. Antiproliferative compounds from *Pongamiopsis pervilleana* from the madagascar dry forest (1). **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 73, n. 9, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/np100430r>

HEWLINGS, Susan J; KALMAN, Douglas S. Curcumin: A review of its effects on human health. **Foods**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. 92, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods6100092>

ILANGO, Suganya; PAITAL, Biswaranjan; JAYACHANDRAN, Priyanka; PADMA, Palghat Raghunathan; NIRMALADEVI, Ramalingam. Epigenetic alterations in cancer. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 1058–1109, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2741/4847>

IMRAN, Khan Mohammad; YOON, Dahyeon; LEE, Tae-Jin; KIM, Yong-Sik. Medicago induces lipolysis via activation of Protein Kinase A in brown adipocytes. **BMB reports**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 249–254, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2018.51.5.228>

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Cancer Today**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/en>. Acesso em: 21 set. 2025.

IRSHAD, Rasha; HUSAIN, Mohammad. Natural products in the reprogramming of cancer epigenetics. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 417, p. 115467, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115467>

JAAKS, Patricia; COKER, Elizabeth A; VIS, Daniel J; EDWARDS, Olivia; CARPENTER, Emma F; LETO, Simonetta M; DWANE, Lisa; SASSI, Francesco; LIGHTFOOT, Howard; BARTHORPE, Syd; MEER, Dieudonne van der; YANG, Wanjuan; BECK, Alexandra; MIRONENKO, Tatiana; HALL, Caitlin; HALL, James; MALI, Iman; RICHARDSON, Laura; TOLLEY, Charlotte; MORRIS, James; THOMAS, Frances; LLESHI, Ermira; ABEN, Nanne; BENES, Cyril H; GARNETT, Mathew J. Effective drug combinations in breast, colon and pancreatic cancer cells. **Nature**, [s. l.], v. 603, n. 7899, p. 166–173, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04437-2>

JAIN, Shweta; VAIDYA, Ankur. Comprehensive review on pharmacological effects and mechanism of actions of taxifolin: A bioactive flavonoid. **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**, [s. l.], v. 7, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100240>

JIANG, Weiyi; XIA, Tingting; LIU, Cun; LI, Jie; ZHANG, Wenfeng; SUN, Changgang. Remodeling the Epigenetic Landscape of Cancer—Application Potential of Flavonoids in the Prevention and Treatment of Cancer. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.705903>

JULIUSSON, Gunnar; HOUGH, Rachael. Leukemia. **Progress in Tumor Research**, [s. l.], v. 43, p. 87–100, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1159/000447076>

KAUFMAN-SZYMCZYK, Agnieszka; JALMUZNA, Justyna; LUBECKA-GAJEWSKA, Katarzyna. Soy-derived isoflavones as chemo-preventive agents targeting multiple signalling pathways for cancer prevention and therapy. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 182, n. 10, p. 2259–2286, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1111/bph.16353>

KAUR, Sumeet; RAJORIA, Prerna; CHOPRA, Madhu. HDAC6: A unique HDAC family member as a cancer target. **Cellular oncology (Dordrecht, Netherlands)**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 779–829, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13402-022-00704-6>

KHAN, Haroon; BELWAL, Tarun; EFFERTH, Thomas; FAROOQI, Ammad Ahmad; SANCHES-SILVA, Ana; VACCA, Rosa Anna; NABAVI, Seyed Fazel; KHAN, Fazlullah; PRASAD DEVKOTA, Hari; BARRECA, Davide; SUREDA, Antoni; TEJADA, Silvia; DACREMA, Marco; DAGLIA, Maria; SUNTAR, İpek; XU, Suowen; ULLAH, Hammad; BATTINO, Maurizio; GIAMPIERI, Francesca; NABAVI, Seyed Mohammad. Targeting epigenetics in cancer: therapeutic potential of flavonoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 61, n.10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1763910>

KI, Mi-Ran; YOUN, Sol; KIM, Dong Hyun; PACK, Seung Pil. Natural Compounds for Preventing Age-Related Diseases and Cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 14, p. 7530, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25147530>

KLUSKA, Magdalena; WOŹNIAK, Katarzyna. Natural polyphenols as modulators of etoposide anti-cancer activity. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 6602, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms2212660>

KUREEL, J; DIXIT, M; TYAGI, A. M; MANSOORI, M. N; SRIVASTAVA, K; RAGHUVANSHI, A; MAURYA, R; TRIVEDI, R; GOEL, A; SINGH, D. MiR-542-3p suppresses osteoblast cell proliferation and differentiation, targets BMP-7 signaling and inhibits bone formation. **Cell Death and Disease**, [s. l.], v. 5, n. 2, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.4>

LI, Jinpeng; SETTIVARI, Raja S; LEBARON, Matthew J. Genetic instability of in vitro cell lines: Implications for genetic toxicity testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 559–562, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.22280>

LI, Tianlu; GARCIA-GOMEZ, Antonio; MORANTE-PALACIOS, Octavi; CIUDAD, Laura; ÖZKARAMEHMET, Sevgi; DIJCK, Evelien Van; RODRÍGUEZ-UBREVA, Javier; VAQUERO, Alejandro; BALLESTAR, Esteban. SIRT1/2 orchestrate acquisition of DNA methylation and loss of histone H3 activating marks to prevent premature activation of inflammatory genes in macrophages. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 665–681, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1127>

LIMA, A Oliveira; SOARES, J Benjamin; GRECO, J B; GALIZZI, João; CANÇADO, J. Romeu. **Métodos de laboratório aplicados à clínica: Técnica e interpretação**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

LIPINSKI, Christopher A; LOMBARDO, Franco; Dominy, BERYL W; FEENEY, Paul J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 64, p. 4–17, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>

LIU, Lei; GONG, Fangyan; JIANG, Fang. Epigenetic regulation of necrosis and pyknosis. **Epigenetics in Organ Specific Disorders**, [s. l.], v. 34, p. 51–62, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823931-5.00024-4>

LOPEZ, Juanita S; BANERJI, Udai. Combine and conquer: challenges for targeted therapy combinations in early phase trials. *Nature reviews. Clinical oncology*, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 57–66, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.96>

LOSSI, Laura; CASTAGNA, Claudia; MERIGHI, Adalberto. An Overview of the Epigenetic Modifications in the Brain under Normal and Pathological Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 3881, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25073881>

LU, Xinxing; YANG, Feiya; CHEN, Dexi; ZHAO, Qinxin; CHEN, Dong; PING, Hao; XING, Nianzeng. Quercetin reverses docetaxel resistance in prostate cancer via androgen receptor and PI3K/Akt signaling pathways. *International Journal of Biological Sciences*, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 1121–1134, 2020. DOI: <https://doi.org/10.7150/ijbs.41686>

LU, Kai-Zhou; FENG, Zi-Ming; YUAN, Xiang; YANG, Ya-Nan; Jiang, Xu; Zhang, Pei-Cheng. Five Novel Pterocarpan Derivatives from *Sophora flavescens*. *Chinese Journal of Chemistry*, [s. l.], v. 39, p. 10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/cjoc.202100357>

MANNA, Shibambika; SAMAL, Pragati; BASAK, Rohini; MITRA, Anushka; ROY, Arijit Kumar; KUNDU, Raima; AHIR, Amrita; ROYCHOWDHURY, Amlan; HAZRA, Ditipriya. Amentoflavone and methyl hesperidin, novel lead molecules targeting epitranscriptomic modulator in acute myeloid leukemia: in silico drug screening and molecular dynamics simulation approach. *Journal of molecular modeling*, [s. l.], v. 29, n. 1, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00894-022-05407-1>

MARTIN, Yvonne C. A bioavailability score. *Journal of Medicinal Chemistry*, [s. l.], v. 48, n. 9, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm0492002>

MAUGERI, Alessandro; RUSSO, Caterina; MUSUMECI, Laura; LOMBARDO, Giovanni Enrico; DE SARRO, Giovambattista; BARRECA, Davide; CIRMI, Santa; NAVARRA, Michele. The Anticancer Effect of a Flavonoid-Rich Extract of Bergamot Juice in THP-1 Cells Engages the SIRT2/AKT/p53 Pathway. *Pharmaceutics*, [s. l.], v. 14, n. 10, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102168>

MENG, Xuan-Yu; ZHANG, Hong-Xing; MEZEI, Mihaly; CUI, Meng. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>

MILITÃO, Gardênia Carmen Gadelha. **Potencial antitumoral de flavonóides isolados de plantas do nordeste brasileiro: estudos preliminares da relação estrutura-atividade citotóxica**. 2005. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/2357>. Acesso em: 30 maio 2025.

MILITÃO, Gardenia C G; PRADO, Marisa P; PESSOA, Cláudia; DE MORAES, Manoel Odorico; SILVEIRA, Edilberto R; LIMA, Mary Anne S; VELOSO, Pérsio Alexandrino; COSTA-LOTUFO, Letícia V; MACHADO-SANTELLI, Gláucia M. Pterocarpan induces

tumor cell death through persistent mitotic arrest during prometaphase. **Biochimie**, [s. l.], v. 104, n. 1, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.06.005>

MILITÃO, Gardenia C. G; BEZERRA, Daniel P; PESSOA, Claudia; MORAES, Manoel Odorico de; PONTE, Flavio A. F. da; LIMA, Mary Anne S; SILVEIRA, Edilberto R, COSTA-LOTUFO, Letícia V. Comparative cytotoxicity of 2, 3, 9-trimethoxypterocarpan in leukemia cell lines (HL-60, Jurkat, Molt-4, and K562) and human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of natural medicines**, [s. l.], v. 61, p. 196-199, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11418-006-0118-3>

MIRANDA FURTADO, Cristiana Libardi; DOS SANTOS LUCIANO, Maria Claudia; SILVA SANTOS, Renan Da; FURTADO, Gilvan Pessoa; MORAES, Manoel Odorico; PESSOA, Claudia. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. **Epigenetics**, [s. l.], v. 14, n. 12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1640546>

MIRANDA FURTADO, Cristiana Libardi; DOS SANTOS LUCIANO, Maria Claudia; SILVA SANTOS, Renan Da; FURTADO, Gilvan Pessoa; MORAES, Manoel Odorico; PESSOA, Claudia. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. **Epigenetics**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1164–1176, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1640546>

MOKHTARI, Reza Bayat; HOMAYOUNI, Tina S; BALUCH, Narges; MORGATSKAYA, Evgeniya; KUMAR, Sushil; DAS, Bikul; YEGER, Herman. Combination therapy in combating cancer. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 23, p. 38022–38043, 2017. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16723>

MOLINIÉ, Benoit; GEORGEL, Philippe. Genetic and epigenetic regulations of prostate cancer by genistein. **Drug news & perspectives**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 247-254, 2009. DOI: [10.1358/dnp.2009.22.5.1378633](https://doi.org/10.1358/dnp.2009.22.5.1378633)

MORAES DE FARIAS, Kaio; ROSA-RIBEIRO, Rafaela; SOUZA, Edmarcia E; KOBARG, Jörg; BANWELL, Martin G; NETO, José de Brito Vieira; SALES, Sarah Leyenne Alves; COSTA, Paulo Roberto Ribeiro; SANTOS, Rafael Cavalcante Dos; GASPAR, Francisco Vilaça; BARRETO JUNIOR, Amaro Gomes; OLIVEIRA, Maria da Conceição Ferreira; MORAES, Manoel Odorico de; FURTADO, Cristiana Libardi M; CARVALHO, Hernandes F; PESSOA, Claudia. The Isoflavanoid (+)-PTC Regulates Cell-Cycle Progression and Mitotic Spindle Assembly in a Prostate Cancer Cell Line. **Chemistry and Biodiversity**, [s. l.], v. 19, n. 5. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200102>

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, [s. l.], v. 65, p. 55-63, 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

MUKHERJEE, Neelam; KUMAR, Addanki P; GHOSH, Rita. DNA Methylation and Flavonoids in Genitourinary Cancers. **Current Pharmacology Reports**, [s. l.], v. 1, p. 112–120, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40495-014-0004-8>

MUTHA, Rakesh E; TATIYA, Anilkumar U; SURANA, Sanjay J. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: An overview. **Future journal of**

pharmaceutical sciences, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 25, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00161-8>

NEBBIOSO, Angela; TAMBARO, Francesco Paolo; DELL'AVERSANA, Carmela; ALTUCCI, Lucia. Cancer epigenetics: Moving forward. **PLoS Genetics**, [s. l.], v. 14, n. 6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007362>

NEPALI, Kunal; CHANG, Ting-Yu; LAI, Mei-Jung; HSU, Kai-Cheng; YEN, Yun; LIN, Tony Eight; LEE, Sung-Bau; LIOU, Jing-Ping. Purine/purine isoster based scaffolds as new derivatives of benzamide class of HDAC inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 196, 112291, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112291>

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

NIMAL, Snehal; KUMBHAR, Navanath; SARUCHI; RATHORE, Shriya; NAIK, Nitin; PAYMAL, Sneha; GACCHE, Rajesh N. Apigenin and its combination with Vorinostat induces apoptotic-mediated cell death in TNBC by modulating the epigenetic and apoptotic regulators and related miRNAs. **Scientific reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 9540, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60395-x>

NOVIANY, Noviany; HADI, Sutopo; NOFIANI, Risa; LOTULUNG, Puspa Dewi Narrij; OSMAN, Hasnah. Fabaceae: a significant flavonoid source for plant and human health. **Physical Sciences Reviews**, [s. l.], v. 8, p. 3897 – 3907, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1515/psr-2021-0224>

NOWAK-TERPIŁOWSKA, Agnieszka; ŚLEDZIŃSKI, Paweł.; ZEYLAND, J. Impact of cell harvesting methods on detection of cell surface proteins and apoptotic markers. **Brazilian journal of medical and biological research**, [s. l.], v. 54, n. 2, e10197, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1414-431X202010197>

OKEM, Ambrose; HENSTRA, Charlotte; LAMBERT, Maarten; HAYESHI, Rose. A review of the pharmacodynamic effect of chemo-herbal drug combinations therapy for cancer treatment. **Medicine in Drug Discovery**, [s. l.], v. 17, 100147, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2022.100147>

OZYERLI-GOKNAR, Ezgi; BAGCI-ONDER, Tugba. Epigenetic Deregulation of Apoptosis in Cancers. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 13, p. 3210, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13133210>

PAIER, Carlos Roberto Koscky; MARANHÃO, Sarah Sant'Anna; CARNEIRO, Teiliane Rodrigues; LIMA, Lídia Moreira; ROCHA, Danilo Damasceno; SANTOS, Renan da Silva; DE FARIAS, Kaio Moraes; MORAES-FILHO, Manoel Odorico de; PESSOA, Claudia. Natural products as new antimitotic compounds for anticancer drug development. **Clinics**, [s. l.], v. 73, 2018. DOI: <https://doi.org/10.6061/CLINICS/2018/E813S>

PAL, Dilipkumar; RAJ, Khushboo; NANDI, Shyam Sundar; SINHA, Surajit; MISHRA, Abhishek; MONDAL, Arijit; LAGOVA, Ricardo; BURCHER, Jack T; BISHAYEE, Anupam.

Potential of Synthetic and Natural Compounds as Novel Histone Deacetylase Inhibitors for the Treatment of Hematological Malignancies. **Cancers**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 2808, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers15102808>

PAWEL, Samuel; HEYARD, Rachel; MICHELOUD, Charlotte; HELD, Leonhard. Replication of null results: Absence of evidence or evidence of absence?. **eLife**, [s. l.], v. 12, RP92311, 2024. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.92311>

PENG, Bou-Yue; SINGH, Abhinay Kumar; CHAN, Chun-Hao; DENG, Yue-Hua; LI, Pin-Ying; SU, Chun-Wei; WU, Chia-Yu; DENG, Win-Ping. AGA induces sub-G1 cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells through p53-independent/p53-dependent pathway. **BMC cancer**, [s. l.], v. 23, n. 1, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-022-10466-x>

PEREZ ROJO, Fernando; PILLOW, J Jane; KAUR, Parwinder. Bioprospecting microbes and enzymes for the production of pterocarpanes and coumestans. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 11, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1154779>

PESSOA, Cláudia DO Ó; NEPOMUCENO, Francisco Washington Araújo Barros; ROCHA, Danilo Damasceno; CAVALCANTI, Bruno Coêlho; MEIRA, Assuero Silva; DINIZ FILHO, Jairo; COSTA, Marcília Pinheiro Da; BANWELL, Martin Gerhardt; GUEST, Prudence Elizabeth; DI FIORE, Stefano; FISCHER, Rainer. **Method for producing pterocarpanes, cytomodulating composition containing pterocarpanes, and use of pterocarpanes**. WO2013000054A1, 2013. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/047360565/publication/WO2013000054A1>. Acesso em: 12 jan 2024.

PLANA, Deborah; PALMER, Adam C; SORGER, Peter K. Independent Drug Action in Combination Therapy: Implications for Precision Oncology. **Cancer discovery**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 606–624, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0212>

PRADO, Eduarda Martins do; MAIA, Matheus Miguel; SILVA, Antony Pereira de Faria; MIRANDA, Camille Cristina; GONÇALVES, Luciana Angélica. Terapias Alvo-Direcionadas Na Oncologia: Uma Nova Era No Tratamento Do Câncer. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 6050–6059, 2024. DOI: [10.51891/rease.v10i5.14320](https://doi.org/10.51891/rease.v10i5.14320).

PUDENZ, Maria; ROTH, Kevin; GERHAUSER, Clarissa. Impact of soy isoflavones on the epigenome in cancer prevention. **Nutrients**, [s. l.], v. 6, n. 10, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu6104218>

PHUKHATMUEN, Piyaporn; MEESAKUL, Pornphimol; SUTHIPHASILP, Virayu; CHAROENSUP, Raviwan; MANEERAT, Tharakorn; CHEENPRACHA, Sarot; LIMTHARAKUL, Thunwadee; PYNE, Stephen G; LAPHOOKHIEO, Surat. Antidiabetic and antimicrobial flavonoids from the twigs and roots of *Erythrina subumbrans* (Hassk.) Merr. **Heliyon**, [s. l.], v. 7, n. 4, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06904>

PURIFICAÇÃO, Aline D; SILVA-MENDONÇA, Sabrina; CRUZ, Luiza V; SACRAMENTO, Carolina Q; TEMEROZO, Jairo R; FINTELMAN-RODRIGUES, Natalia;

FREITAS, Caroline Souza de; GODOI, Bruna Fleck; VAIDERGORN, Miguel Menezes; LEITE, Juliana Almeida; ÁLVAREZ, Luís Carlos Salazar; FREITAS, Murillo V; SILVAC, Meryck FB; MARTIN, Bianca A; LOPEZ, Renata FV; NEVES, Bruno J; COSTA, Fabio TM; SOUZA, Thiago ML; EMERY, Flávio da Silva; ANDRADE, Carolina Horta; NONATO, M Cristina. Unveiling the Antiviral Capabilities of Targeting Human Dihydroorotate Dehydrogenase against SARS-CoV-2. **ACS omega**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 11418–11430, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c07845>

RAPHAEL, Stanley S. **Lynch: técnicas de laboratório**. 4 ed. p. 1053-1053. São Paulo; Manole, 1986.

RENYLAB QUÍMICA FARMACÊUTICA LTDA. **Corante rápido. Renylab**, 2017. Disponível em: <https://www.renylab.ind.br/wp-content/uploads/2018/05/Corante-Rapido-1.pdf> Acesso em: 30 maio 2025.

ROY, Arpita; KHAN, Ariba; AHMAD, Irfan; ALGHAMDI, Saad; RAJAB, Bodour S; BABALGHITH, Ahmad O; ALSHAHRANI, Mohammad Y; ISLAM, Saiful; ISLAM, Md Rabiul. Flavonoids a Bioactive Compound from Medicinal Plants and Its Therapeutic Applications. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2022, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/5445291>

SACKO, Koita; THANGAVEL, Karthik; SHOYELE, Sunday A. Codelivery of Genistein and miRNA-29b to A549 Cells Using Aptamer-Hybrid Nanoparticle Bioconjugates. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 1052, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano9071052>

SAHAFNEJAD, Z.; RAMAZI, S.; ALLAHVERDI, A. An update of epigenetic drugs for the treatment of cancers and brain diseases: a comprehensive review. **Genes**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 873, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes14040873>

SAJID, Moon; STONE, Shane Ramsay; KAUR, Parwinder. Recent Advances in Heterologous Synthesis Paving Way for Future Green-Modular Bioindustries: A Review With Special Reference to Isoflavonoids. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 9, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.673270>

SALES, Sarah Leyenne Alves. **Regulação da expressão de genes de controle do ciclo celular em linhagem de leucemia mielóide aguda (kg-1): caracterização de alvos de um novo fármaco**. 2022. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/67478>. Acesso em: 30 maio 2025.

SARDAR, Haseeba. Drug like potential of Daidzein using SwissADME prediction: In silico Approaches. **PHYTONutrients**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2023. DOI: <https://doi.org/10.62368/pn.vi.18>

SARNO, Federica; PEPE, Giacomo; TERMOLINO, Pasquale; CARAFA, Vincenzo; MASSARO, Crescenzo; MERCIAI, Fabrizio; CAMPIGLIA, Pietro; NEBBIOSO, Angela; ALTUCCI, Lucia. *Trifolium Repens* blocks proliferation in chronic myelogenous leukemia

via the BCR-ABL/STAT5 pathway. *Cells*, [s. l.], v. 9, n. 2, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9020379>

SCAFURI, Bernardina; BONTEMPO, Paola; ALTUCCI, Lucia; MASI, Luigi De; FACCHIANO, Angelo. Molecular docking simulations on histone deacetylases (HDAC)-1 and-2 to investigate the flavone binding. *Biomedicines*, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 568, 2020. DOI: [10.3390/biomedicines8120568](https://doi.org/10.3390/biomedicines8120568)

SCOTT, Emma C; BAINES, Andrea C; GONG, Yutao; MOORE JR, Rodney; PAMUK, Gulsum E; SABER, Haleh; SUBEDEE, Ashim; THOMPSON, Matthew D; XIAO, Wenming; PAZDUR, Richard; RAO, V. Ashutosh; SCHNEIDER, Julie; BEAVER, Julia A. Trends in the approval of cancer therapies by the FDA in the twenty-first century. *Nature reviews. Drug discovery*, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 625–640, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00723-4>

SHAHMORADI, Mohsen, BANISHARIF-DEHKORDI, Fatemeh; KOUHIHABIBIDEHKORDI, Mahnoush; GHATREHSAMANI, Mahdi; JAMI, Mohammad-Saied; SHIRZAD, Hedayatollah; POURGHEYSARI, Batoul. Molecular effects of genistein, as a potential anticancer agent, on CXCR-4 and VEGF pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Molecular Biology Reports*, [s. l.], v. 49, n. 6, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07163-0>

SHARMA, Parul; KAUSHAL, Naveen; SALETH, Leena Regi; GHAVAMI, Saeid; DHINGRA, Sanjiv; KAUR, Parminder. Oxidative stress-induced apoptosis and autophagy: Balancing the contrary forces in spermatogenesis. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, [s. l.], v. 1869, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166742>

SOHLENIUS-STERNBECK, Anna-Karin; TERELIUS, Ylva. Evaluation of ADMET Predictor in Early Discovery Drug Metabolism and Pharmacokinetics Project Work. *Drug Metabolism and Disposition*, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 95–104, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.121.000552>

SON, Se In; SU, Dan; HO, Thanh Tu; LIN, Hening. Garcinol is an HDAC11 inhibitor. *ACS chemical biology*, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 2866-2871, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/acscchembio.0c00719>

SU, Pengfei; YANG, Yong; WANG, Guoxin; CHEN, Xiaowu; JU, Yongle. Curcumin attenuates resistance to irinotecan via induction of apoptosis of cancer stem cells in chemoresistant colon cancer cells. *International journal of oncology*, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 1343–1353, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijco.2018.4461>

SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L; LAVERSANNE, Mathieu; SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmedin; BRAY, Freddie. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

SURAWEERA, Amila; O'BYRNE, Kenneth J; RICHARD, Derek J. Epigenetic drugs in cancer therapy. **Cancer and Metastasis Reviews**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 37, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10555-025-10253-7>

SZKLARCZYK, Damian; KIRSCH, Rebecca; KOUTROULI, Mikaela; NASTOU, Katerina; MEHRYARY, Farrokh; HACHILIF, Radja; GABLE, Annika L; FANG, Tao; DONCHEVA, Nadezhda T; PYYSALO, Sampo; BORK, Peer; JENSEN, Lars J; MERING, Christian von. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 51, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>

TALIB, Wamidh H; ALSAYED, Ahmad Riyad; BARAKAT, Muna; ABU-TAHA, Que Ibrahim; MAHMUD, Asma Ismail. Targeting Drug Chemo-Resistance in Cancer Using Natural Products. **Biomedicines**, [s. l.], v. 9, n. 10, p.1353, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101353>

THERMO FISHER SCIENTIFIC. (2017). **Thermo Scientific Cytology Solutions**. Disponível em: <https://www.thermofisher.com.au/godirect/TechInfo/ProductDetails/Thermo-Scientific-Cytospin-4-Brochure-1494306793.pdf>. Acesso em: 30 maio 2025.

TORELLO, Cristiane Okuda; ALVAREZ, Marisa Claudia; OLALLA SAAD, Sara T. Polyphenolic flavonoid compound quercetin effects in the treatment of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 19, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26195781>

VAIDERGORN, Miguel M; PURIFICAÇÃO, Aline D; LEITE, Pedro I P; SILVA-MENDONÇA, Sabrina; SILVA, Wemenes J L; SANTOS, Thiago Dos; SILVA, Daniel Gedder; GODOI, Bruna Fleck; SACRAMENTO, Carolina Q; MATTOS, Mayara; FINTELMAN-RODRIGUES, Natalia; FREITAS, Caroline S; DAMASCENO, Luis Eduardo Alves; SHISHIKURA, Yoko; BROWN, Alex; WROBEL, Karolina; RILEY, Jennifer; SOUZA, Thiago M L; READ, Kevin D; ALVES-FILHO, José C; ANDRADE, Carolina H; NONATO, M Cristina; EMERY, Flavio S. Targeting dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) for host-directed therapy: Discovery of a novel alkyne-based scaffold inhibitor effective against SARS-CoV-2. **European journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 297, 117876, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.117876>

VALERIO, Luis G. In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 241, n. 3, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.08.022>

WAESSNER, S. **Técnicas em citologia hematológica**. [s. l.], p. 16-32, 1990.

WANG, Kang; LIU, Huicong; HU, Qinchao; WANG, Lingna; LIU, Jiaqing; ZHENG, Zikai; ZHANG, Weiqi; REN, Jie; ZHU, Fangfang; LIU, Guang-Hui. Epigenetic regulation of aging: implications for interventions of aging and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01211-8>

WAITMAN, Karoline B; ALMEIDA, Larissa C; PRIMI, Marina C; CARLOS, Jorge A E G; RUIZ, Claudia; KRONENBERGER, Thales; LAUFER, Stefan; GOETTERT, Marcia Ines; POSO, Antti; VASSILIADES, Sandra V; SOUZA, Vinícius A M de; TOLEDO, Mônica F Z

J; HASSIMOTTO, Neuza M A; CAMERON, Michael D; BANNISTER, Thomas D; COSTA-LOTUFO, Leticia V; MACHADO-NETO, João A; TAVARES, Maurício T; PARISE-FILHO, Roberto. HDAC specificity and kinase off-targeting by purine-benzohydroxamate anti-hematological tumor agents. **European journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 263, 115935, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115935>

WADDINGTON, Conrad Hal. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. **Nature**, [s. l.], v. 150, p. 563–565, 1942. DOI: <https://doi.org/10.1038/150563a0>

WU, Mingcai; JIANG, Ming; XUE, Mengya; LI, Qing; CHENG, Bing; HUANG, Mengzhu; XU, Lei; ZHANG, Yao. Epigallocatechin gallate induces CHD5 gene demethylation to promote acute myeloid leukemia cell apoptosis in vitro by regulating p19Arf-p53-p21Cip1 signaling pathway. **Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University**, [s. l.], v. 40, n. 9, p. 1230–1238, 2020. DOI: <https://doi.org/10.12122/j.issn.1673-4254.2020.09.02>

XU, Xuefen; JI, Shufan; CHEN, Yuan; XIA, Siwei; LI, Yang; CHEN, Li; LI, Yujia; ZHANG, Feng; ZHANG, Zili; ZHENG, Shizhong. Induction of DNMT1-dependent demethylation of SHP-1 by the natural flavonoid compound Baicalein overcame Imatinib-resistance in CML CD34+ cells. **Cell communication and signaling: CCS**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 47, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01049-9>

YANG, Tianshu; YANG, Yunkai; WANG, Yan. Predictive biomarkers and potential drug combinations of epi-drugs in cancer therapy. **Clin Epigenet**, [s. l.], v. 13, n. 113, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01098-2>

YIP, Bon Ham; SO, Chi Wai Eric. Mixed lineage leukemia protein in normal and leukemic stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 238, n. 3, p. 315–323, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1177/1535370213480717>

ZENG, Xiangwei; FENG, Qian; ZHAO, Fengming; SUN, Chao; ZHOU, Tao; YANG, Jing; ZHAN, Xiuqin. Puerarin inhibits TRPM3/miR-204 to promote MC3T3-E1 cells proliferation, differentiation and mineralization. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 32, n. 6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr>

YU, Xiaoxuan; LI, Hui; HU, Po; QING, Yingjie; WANG, Xiangyuan; ZHU, Mengyuan; WANG, Hongzheng; WANG, Zhanyu; XU, Jingyan; GUO, , Qinglong; HUI, Hui. Natural HDAC-1/8 inhibitor baicalein exerts therapeutic effect in CBF-AML. **Clinical and translational medicine**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. e154, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/ctm2.154>

ZHANG, Juan; GAO, Xuefeng; WEI, Mingming; LI, Yonghui; YANG, Guang; YANG, Cheng; YU, Li. A novel epigenetic drug conjugating flavonoid and HDAC inhibitor confer suppression of acute myeloid leukemogenesis. **Clinical science**, London, England, v. 135, n. 14, p. 1751–1765, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1042/CS20210571>

ZHANG, Xiangyu; HUANG, Jingwen; YU, Chao; XIANG, Longquan; LI, Liang; SHI, Dongmei; LIN, Fanzhong. Quercetin Enhanced Paclitaxel Therapeutic Effects Towards PC-3

Prostate Cancer Through ER Stress Induction and ROS Production. **Onco Targets Ther**, [s. l.], v. 13, p. 513–23, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2147/OTT.S228453>

ZHOU, Hua-rong; SHEN, Jian-zhen; FU, Hai-ying; ZHANG, Feng. Genistein-induced Anticancer Effects on Acute Leukemia Cells Involve the Regulation of Wnt Signaling Pathway Through H4K20me1 Rather Than DNA Demethylation. **Current Medical Science**, [s. l.], v. 41, n. 5, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11596-021-2445-8>

ZHU, Jinfeng; CHENG, Xiaju; NAUMOVSKI, Nenad; HU, Lin; WANG, Kai. Epigenetic regulation by quercetin: a comprehensive review focused on its biological mechanisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. 627–646, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2278760>

ANEXO A – ARTIGO 1 DERIVADO DA TESE

Chemistry & Biodiversity



REVIEW OPEN ACCESS

Isoflavonoids and Epigenetic Modulation: Therapeutic Insights for Cancer Treatment

Eduardo de Moraes e Sousa^{1,2} | Maria Claudia dos Santos Luciano^{1,3,4} | Gabriel Caetano de Souza² | Maria Francilene Souza Silva^{3,2,5} | Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira^{1,2,3} | Sarah Sant'Anna Maranhão² | Felipe Vasconcelos² | Cristiana Libardi Miranda Furtado^{6,6} | Claudia do Ó Pessoa^{1,2}

¹Northeast Biotechnology Network—RENORBIO, Recife, Brazil | ²Drug Research and Development Center, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil | ³Ceará Cancer Institute—ICC/Rodolfo Teófilo Faculty—F, Fortaleza, Brazil | ⁴Department of Translational Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil | ⁵Núcleo De Biologia Experimental (Nubes), Fortaleza, Brazil | ⁶Department of Genetics, Ecology and Evolution, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Correspondence: Maria Claudia dos Santos Luciano (claudia.luciano@ccc.org.br) | Cristiana Libardi Miranda Furtado (clibardi@gmail.com)

Received: 29 October 2025 | Revised: 17 January 2026 | Accepted: 26 January 2026

Keywords: epidriaga | epigenome | flavonoids | genetics | natural products

ABSTRACT

Isoflavonoides represent the second largest subgroup of flavonoids and have an influence on critical molecular pathways and restore cellular homeostasis, through the reprogramming of epigenetic regulatory mechanisms. This feature indicates a crucial therapeutic potential that could be better explored to attend cancer treatment. Isoflavonoids, acting as epigenetic modulators, could contribute to the development of new therapeutic approaches in cancer, especially in onco-hematological diseases. Pterocarpanes are a subgroup of isoflavonoids that have been extensively studied for their biological properties. The molecule (+)-2,3,9-trimethoxypterocarpan demonstrates high gastrointestinal (GI) absorption and the ability to cross the blood-brain barrier (BBB) *in silico* without violating Lipinski's rule, making it a desirable candidate in leukemia treatment. The synthesis of this molecule dates back more than a decade. *In silico* models, such as SwissADME, corroborate the notion of good intestinal absorption and the ability to cross the BBB. Also, it is suggested that P-glycoprotein is a substrate, which is related to its potential for active efflux from both the BBB and GI. This review highlights the biological mechanisms of this class of natural products from a translational perspective, emphasizing their chemical properties and epigenetic biological activities, which offer new therapeutic perspectives, particularly in oncology.

1 | Introduction

The flavonoids are related to diverse roles, specifically targeting the epigenome of tumor cells in human cancers [1], including effects on important epigenetic modifications such as histone deacetylation [2, 3] and DNA methylation [3]. Computational (*in silico*) evaluations consider multiple parameters that help to optimize the screening of potential therapeutic agents, especially

considering the absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) properties, key determinants of pharmacological efficacy and safety [4].

Leukemias are a group of hematological malignancies of the blood in which the clonal expansion of aberrant hematopoietic stem cells causes malignant disorders of the blood and bone marrow [5]. Disruptions in chromatin modifiers and remodelers have

Eduardo de Moraes e Sousa, Maria Claudia dos Santos Luciano, Cristiana Libardi Miranda Furtado, and Claudia do Ó Pessoa contributed equally to this study.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2025 The Author(s). Chemistry & Biodiversity published by Wiley-VCH GmbH.

ANEXO B – ARTIGO 2 DERIVADO DA TESE

Full Paper

Journal of
the Brazilian
Chemical
Society<https://doi.org/10.21577/003-5053.20240016>J. Braz. Chem. Soc. 2024, 57, e-20240016, 1-15
©2024 Sociedade Brasileira de Química***In silico* and *in vitro* Studies of the (+)-2,3,9-Trimethoxypterocarpan and Vorinostat Association as an Epigenetic Strategy to Inhibit Human Cancer Cells**Eduardo M. e Sousa,^{✉,*,†} Maria Claudia S. Luciano,^{✉,*,†} Gabriel Caetano de Souza,^{✉,†}
Giuliana Aparecida V. Barreto,^{✉,†} Roner F. da Costa,^{✉,†} Cristiana L. M. Furtado,^{✉,†} and
Claudia do Ó Pessoa^{✉,*,†}^{*}Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia,
60440-900 Fortaleza-CE, Brazil[†]Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto do Câncer do Ceará (ICC),
60430-230 Fortaleza-CE, Brazil[‡]Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, Departamento de Fisiologia e Farmacologia,
Universidade Federal do Ceará, 60430-275 Fortaleza-CE, Brazil[§]Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais,
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), 59625-900 Mossoró-RN, Brazil[¶]Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil

Recent years have highlighted the potential of flavonoids to enhance the efficacy and/or sensitivity of chemotherapeutics. The combination of histone deacetylase (HDAC) inhibitors with natural compounds has shown positive results. Thus, this study evaluates the association of pterocarpan and vorinostat, a potential epigenetic strategy against cancer cells, using *in silico* and *in vitro* approaches. The methodology involved using computational tools to map molecular targets and construct protein-protein interaction networks, followed by *in vitro* assays to evaluate cytotoxicity in cancer cell lines. The antiproliferative effects of the combination ((+)-2,3,9-trimethoxypterocarpan ((+)-PTC) + vorinostat) were assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays. The combination index (CI) was calculated to determine synergistic effects between the compounds. Molecular target prediction followed by evaluation of up- or downregulated expression in PC-3 (prostate carcinoma), DU-145 (prostate carcinoma), KG-1 (acute myeloid leukemia), and MOL.M-13 (acute myeloid leukemia) cell lines identified 36 targets, including interleukin 1 beta (IL1B), tumor necrosis factor (TNF), amyloid beta precursor protein (APP), MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor (MYC) and Heat Shock Protein 90 (HSP90). Additionally, all vorinostat targets (HDACs 1-10) were evaluated. Docking experiments indicated stable complexes between (+)-PTC and HDAC1 (PDB: 4BKX), HDAC2 (PDB: 4LXZ), HDAC6 (PDB: 5B8D), and HDAC8 (PDB: 1T64). Minimum inhibitory concentrations varied among cell lines, with *in vitro* associations showing inhibitory concentrations ranging from 1.5 to 2.9 μ M. The combination of (+)-PTC and vorinostat shows greater inhibition of cell proliferation than either compound alone.

Keywords: vorinostat, (+)-2,3,9-trimethoxypterocarpan, IC₅₀, combination index, inhibition of cell growth

Introduction

The integration of two or more anticancer approaches represents a fundamental aspect of combination cancer

therapy treatment. Therapeutic advances can be achieved by combining multiple anticancer strategies. Over the past 25 years, innovation in oncology therapeutic approaches has steadily increased. Blagosklonny¹ reported that combination therapy enhances the selectivity of cytotoxic agents by either preserving normal cells, amplifying toxicity in cancer cells, or both. The use of biomarkers in oncology indications has grown consistently since

[✉]e-mail: claudia.luciano@icc.org.br, clcpessoa@ufc.br

[†]Equal contribution.

Editor handled this article: Paulo Augusto Netz (Associate)



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.