



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

LEVI BRITO DE ARAUJO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO IN VITRO DO *PTC+* EM CÉLULAS
DE CÂNCER DE PULMÃO NCI-H460 e NCI-H1975**

FORTALEZA

2025

LEVI BRITO DE ARAUJO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO IN VITRO DO PTC(+) EM
CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO NCI-H460 e NCI-H1975

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier

FORTALEZA
2025

LEVI BRITO DE ARAUJO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO IN VITRO DO PTC(+)
EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO NCI-H460 e NCI-1975

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à obtenção
do grau de bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em: 22/07/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Sarah Sant'Anna Maranhão
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Jose de Brito Vieira Neto
Universidade Federal Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Ana Lúcia, a primeira professora da minha vida, que me ensinou o valor da educação. Com você aprendi o que é força, resiliência e garra, mas sem você eu jamais alcançaria tal vitória. Aos meus irmãos Arthur, Bianca e Davi, que completam minha família e meu propósito.

Aos meus amigos, que me acolheram, cuidaram, ouviram e ampararam, entre choros de tristeza e alegria, sem vocês minha trajetória seria arduamente mais difícil: Caio, Clarissa, Gabriela, Jamile, Lilia, Kaio Vinicius, Vitória Fernandes, Victoria, Maria e Mariane. Aos meus partyboys, Danilo, Helton, Thiago e Willer, obrigado por me mostrar que a vida vale a pena ser vivida e por me resgatarem da solidão. Vocês me mudaram *“for good”*.

À minha metade e meu amor, Miguel, por me ajudar quando eu nunca soube pedir ou nem havia pedido socorro, por me compreender quando nem mesmo eu me entendia e por me motivar quando eu nem encontrava motivos para continuar.

A todos meus colegas de laboratório e trabalho, em especial à Vitória Braga, Sarah Leyenne, Davi Nascimento, João Victor, Aniele, Jéssica, Robert, Lina Gress, Arthur e Clarissa. Graças à constante troca de conhecimento entre nós, me torno hoje o cientista que sempre quis ser antes.

Ao meu orientador – ou melhor, pai-científico, – Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier, pela persistência, ensinamentos e exímia orientação. Obrigado por ser fonte de inspiração e conhecimento e por me aceitar no LOE.

À Sarah Sant’Anna, pela supervisão, direcionamento e paciência. Obrigado por acreditar em meu potencial.

À FUNCAP, pelo incentivo a esta pesquisa, por meio da minha bolsa.

E, por fim, gostaria de agradecer ao Levi, por não desistir de si mesmo, principalmente quando houveram pedras no caminho. Sempre ouviu de sua mãe: “Tinha uma pedra no meio do caminho”. Sou o primeiro da minha família a ingressar, cursar e completar um curso em uma Federal, mas espero que não seja o último. Em nome daqueles que viveram na sombra para que eu pudesse alcançar o sol, em especial à minha mãe, removo a pedra que havia em seus caminhos.

“Aos que vieram antes de nós [...]
que voaram com êxito e sem recursos [...]

Caminharemos juntos.”

- Lorde

RESUMO

Os tumores malignos se apresentam como uma preocupação mundial, devido à sua alta incidência e mortalidade. A alta taxa de incidência e de mortalidade apresentada pelo câncer de pulmão o torna alvo de discussões acerca de novos tratamentos e seus mecanismos de ação biológica, como antimicrobiana, antiinflamatória, antineoplásica, etc. Nesse contexto, apesar dos avanços clínicos, os antineoplásicos disponíveis possuem muitos efeitos colaterais, dificultando o tratamento, além de poder gerar resistência nas células tumorais. Os pterocarpanos, maior classe de isoflavonóides, apresentam funções citotóxicas em linhagens tumorais de próstata, mama, entre outros. Neste trabalho, avaliou-se o potencial antiproliferativo, citotóxico e antimigratório do composto (+)-2,3,9-trimetoxipterocarpano (PTC+) em linhagens de câncer de pulmão de não pequenas células (NCI-H460 e NCI-H1975) e em fibroblastos pulmonares não tumorais (MRC-5). As linhagens celulares tumorais foram cultivadas à 37 °C em Meio RPMI, com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e 1% de antibiótico (Pen Strep Gibco) e não-tumoral com meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), contendo os mesmos percentuais de SBF e antibiótico. A atividade antiproliferativa foi avaliada por meio do ensaio de MTT, demonstrando que o PTC+ apresentou citotoxicidade tempo e concentração-dependente, com valores de IC₅₀ inferiores a 3 µM, como 1,48 e 2,91 µM para NCI-H460 e NCI-H1975, respectivamente, após 72 horas de exposição, para ambas as linhagens tumorais após 72 horas de exposição, sendo mais potente para NCI-H460. A análise morfológica, realizada por coloração de panótico rápido, evidenciou alterações compatíveis com apoptose em NCI-H460 e necrose em NCI-H1975, especialmente em concentrações mais elevadas do composto. Adicionalmente, os ensaios de migração celular demandaram etapas adicionais de padronização e otimização. Os resultados obtidos indicam que o (+)-2,3,9-trimetoxipterocarpano apresenta ação citotóxica e induzindo morte celular, com possíveis sinais indicativos de apoptose ou necrose em linhagens de câncer de pulmão, destacando-se como um candidato promissor para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas antineoplásicas.

Palavras-chave: Câncer de pulmão; Pterocarpano; Quimioterápico; Antineoplásico.

ABSTRACT

Cancer remains a global health challenge due to their high incidence and mortality rates. Among them, lung cancer stands out as one of the most aggressive types, prompting ongoing discussions about new therapeutic strategies and their underlying biological mechanisms, including antimicrobial, anti-inflammatory, and antineoplastic activities. Despite clinical advances, currently available antineoplastic agents often exhibit significant side effects and may lead to drug resistance in tumor cells. Pterocarpan, the largest class of isoflavonoids, have demonstrated cytotoxic activity against various tumor cell lines, including prostate and breast cancers. This study aimed to evaluate the antiproliferative, cytotoxic, and anti-migratory potential of (+)-2,3,9-trimethoxypterocarpan (PTC+) in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines (NCI-H460 and NCI-H1975) and non-tumoral lung fibroblasts (MRC-5). Tumor cell lines were cultured at 37 °C in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic (Pen-Strep, Gibco), while the non-tumoral line was maintained in DMEM. Cell viability was assessed using the MTT assay, revealing that PTC+ exerted time- and concentration-dependent cytotoxic effects, with IC_{50} values below 3 μ M, specifically 1.48 μ M for NCI-H460 and 2.91 μ M for NCI-H1975 after 72 hours of exposure, presenting more cytotoxic potency in NCI-H460. Morphological analysis using rapid panoptic staining revealed features consistent with apoptosis in NCI-H460 and necrosis in NCI-H1975, particularly at higher compound concentrations. Furthermore, the wound healing assays for cell migration required additional optimization steps to ensure proper standardization and reproducibility of the results. Taken together, the results suggest that (+)-2,3,9-trimethoxypterocarpan exhibits notable cytotoxic activity and induces cell death, potentially through apoptotic or necrotic mechanisms, in lung cancer cell lines, highlighting its promise as a candidate for the development of novel antineoplastic therapeutic strategies.

Keywords: Lung cancer; Antineoplastic; Pterocarpan; Chemotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.....	18
Figura 2 – Principais características do câncer.....	20
Figura 3 – Estrutura do (±)-2,3,9-trimetoxipterocarpano.....	24
Figura 4 - Protocolo estabelecido para análise morfológica.....	28
Figura 5 – Desenho experimental para ensaio de migração.....	30
Figura 6 – Curva de crescimento para determinação do plaqueamento de MRC-5.....	32
Figura 9 – Visualização por coloração de panótico em NCI-H1975.....	35
Figura 10 – Comparação entre taxa de células de NCI-H460 viáveis e não-viáveis para ensaio de migração celular.....	36
Figura 11 – Densidade celular de cada linhagem em diferentes tratamentos de SBF.....	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Linhagens utilizadas com suas respectivas concentrações de plaqueamento para o ensaio de MTT.....	27
Quadro 2 – Tempos de duplicação para as linhagens utilizadas.....	31
Quadro 3 – Efeito citotóxico do PTC(+) em linhagens testadas por tempo de incubação.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
ANOVA	Análise de Variância
Céls	Células
CI	Intervalo de confiança
CPPC	Câncer de pulmão de pequenas células
CPNPC	Câncer de pulmão de não pequenas células
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
h	Horas
IC50	Metade da concentração inibitória máxima
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IS	Índice de seletividade
LOE	Laboratório de Oncologia Experimental
mg	Miligramas
min	Minutos

mL	Mililitros
mM	Milimolar
MTT	Brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio
NCI-H460	Linhagem celular de carcinoma de pulmão de grandes células
NCI-H1975	Linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão de não pequenas células
nm	Nanometros
NSCLC	Câncer de pulmão de células não pequenas
OMS	Organização Mundial da Saúde
P53	Genes supressores de tumor
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PTC (+)	2,3,9-trimetoxipterocarpano enantiômero positivo
R²	Coeficiente de Determinação
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SBF	Soro Bovino Fetal
SCLC	Câncer de pulmão de pequenas células
UFC	Universidade Federal Ceará

UV	Radiação ultravioleta
Td	Tempo de duplicação / <i>doubling time</i>
µg/mL	Microgramas por mililitros
µL	Microlitros
µM	Micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro
m	Mili
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Fatores de Risco.....	17
1.2 Tipos de câncer de pulmão.....	18
1.3 Tratamento do câncer de pulmão.....	19
1.4 Pterocarpanos.....	21
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivo específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Obtenção da amostra.....	23
3.2 Cultivo das linhagens celulares.....	24
3.3 Avaliação da atividade antiproliferativa in vitro - (Tempo de duplicação e MTT)..	24
3.4 Análise morfológica – Coloração por Panótico rápido.....	26
3.5 Padronização da concentração mínima de SBF para inibir a proliferação das células neoplásicas.....	28
4. RESULTADOS.....	30
4.1 Avaliação da atividade antiproliferativa in vitro (Tempo de duplicação e MTT).....	30
4.2 Análise morfológica – Coloração por Panótico rápido.....	33
4.3 Padronização da concentração mínima de SBF para inibir a proliferação das células neoplásicas.....	35
5. DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença marcada pela desregulação do metabolismo celular que leva à alta proliferação e capacidade de invasão para tecidos distantes, gerando tumores e metástase (KAUFMAN, 2022). O câncer representa uma epidemia global e está entre os distúrbios crônicos mais relevantes da atualidade, devido à sua elevada mortalidade. No contexto mundial, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), cerca de 20 milhões de pessoas são afetadas pela doença e 9,7 milhões morrem em decorrência dela (IARC, 2022). No Brasil, estima-se que cerca de 704 mil casos surgem a cada ano desde 2023, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA).

O carcinoma de pulmão é o segundo tipo de câncer mais incidente no mundo entre mulheres e homens, precedido apenas pelo câncer de mama e próstata (SIEGEL, 2025), respectivamente, correspondendo a cerca de 2,5 milhões (11,4%) de novos casos mundiais e 1,8 milhões de mortes até 2022, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2022). Com uma maior incidência entre os homens, sobretudo em países que possuem Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) baixo, o câncer de pulmão no Brasil atinge cerca de 32.560 novos casos por ano, dos quais 18.020 (55%) são homens e 14.540 (45%) são mulheres (OMS - GLOBOCAN, 2025) e a mortalidade atingiu aproximadamente 30.000 casos em 2021 (INCA, 2022). Apesar de sua alta mortalidade, o câncer de pulmão tem exibido um avanço na sobrevida em 5 anos (S5A) pós-tratamento, registrando nos últimos 15 anos um aumento de 5% a 10% de casos em escala mundial e alcançando percentuais próximos a 30% em países asiáticos e europeus, contrastando com o cenário brasileiro, que apresenta S5A abaixo de 10% (ALLEMANI *et al.*, 2018), refletindo os altos índices de exposição no país aos fatores de risco geralmente associados a esse tumor.

Tratamentos clínicos para o câncer de pulmão compreendem desde a quimioterapia, cirurgia e radioterapia, porém apresentam resultados diferenciados no paciente. Nos últimos anos, as terapias anticâncer avançaram para diminuir os efeitos secundários não desejados que costumam ocorrer com o uso dos tratamentos convencionais. Os pterocarpanos são altamente estudados por apresentar conhecida atividade citotóxica e possível atividade antimetabólica em algumas linhagens tumorais, como em células de leucemia, câncer de mama e melanoma (MILITÃO *et al.*, 2014), apresentando parada no ciclo celular em G2/M e ativação de vias de apoptose,

resultando em atividade antimitótica ao inibir a formação do fuso mitótico.

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%			Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Fonte: INCA, 2023.

1.1 Fatores de Risco

Os fatores de risco do desenvolvimento do câncer de pulmão incluem a baixa alimentação de frutas e vegetais, a exposição a agentes ambientais (como poluição atmosférica), mutações genéticas herdadas e, especialmente, a inalação de fumaça, provinda em maior parte do tabagismo (AZEVEDO E SILVA, 2014). O tabagismo, passivo ou ativo, gera alterações morfofisiológicas no pulmão devido à inalação da fumaça formada pelo cigarro que contém agentes carcinogênicos como acroleína, alcatrão e formaldeído, conhecidos por inibir o reparo do DNA e indução de mutagênese nas células (ALEXANDROV *et al.*, 2016). Estudos recentes indicam que o uso combinado de cigarro convencional com cigarro eletrônico aumenta em até 4 vezes a susceptibilidade de câncer de pulmão (BITTONI *et al.*, 2024).

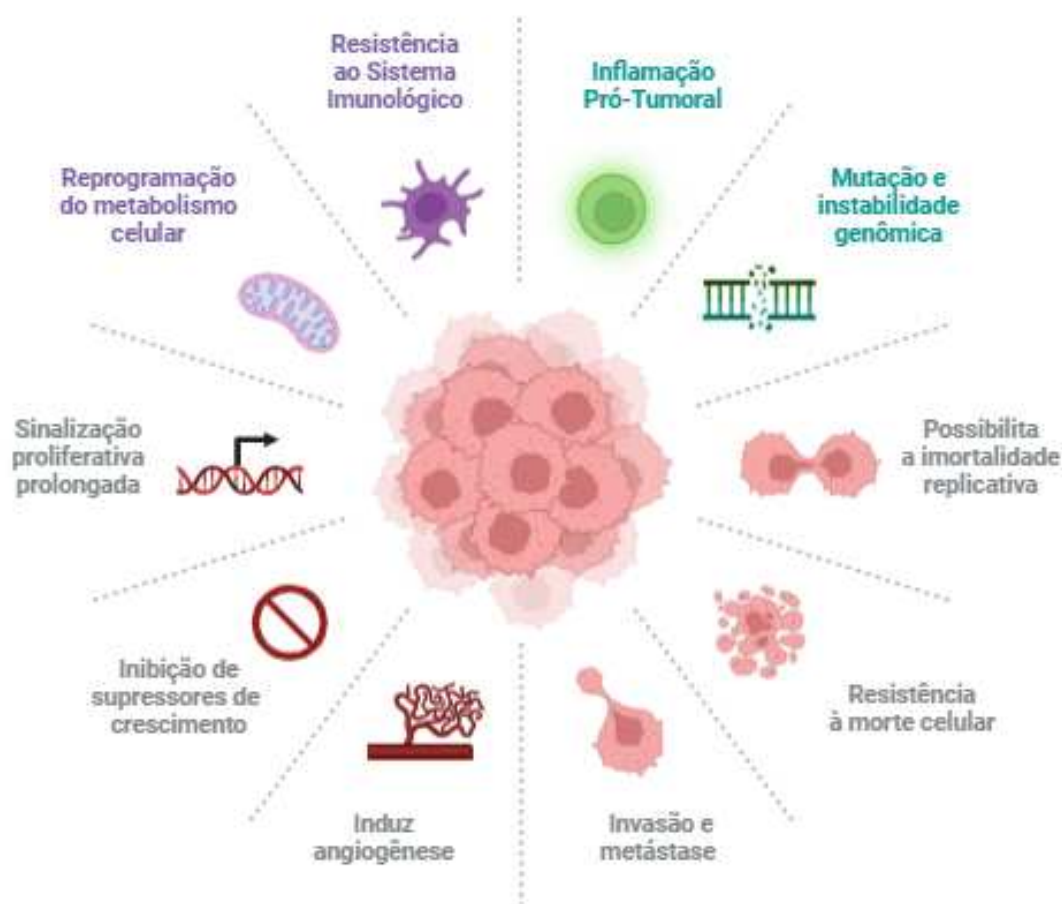
1.2 Tipos de câncer de pulmão

Os tumores de pulmão podem ser classificados de acordo com suas características morfohistológicas em câncer de pulmão de pequenas células (CPPC, do inglês *Small Cell Lung Cancer* - SCLC) e câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC, do inglês: *Non-Small Cell Lung Cancer* - NSCLC). O câncer de pulmão de não pequenas células é o responsável pela maioria das mortes, cerca de 80-85%, enquanto que o CPPC compreende aproximadamente 15% dos casos (CHANSKY, 2017). Dentre o câncer de pulmão de não pequenas células, os subtipos mais comuns são o adenocarcinoma de pulmão, o carcinoma de células escamosas e o carcinoma de grandes células.

Apesar da classificação geral dos tipos da neoplasia, por ser um tumor heterogêneo e repleto de alterações epigenéticas, os avanços nos estudos genômicos geraram diferentes classificações de subtipos de câncer de pulmão baseados no tipo de células presentes e na caracterização de biomarcadores tumorais, como mutações gênicas e rearranjos genéticos (ZHU, 2017). Tais genes marcadores, como *epi* ou *mut-driver*, auxiliam a célula tumoral a realizar processos característicos da oncogênese, como sinalização celular, sobrevivência celular e reparo do DNA (Figura 2) (HANAHAN, 2022). Assim como a maioria dos tumores, o câncer de células escamosas apresenta mutação nos genes TP53 (gene de reparo) e CDKN2A (gene de regulação do ciclo celular), gerando cascatas que levam ao comportamento aberrante celular (YOU, 2023).

De acordo com o National Cancer Institute (2025), o adenocarcinoma é o subtipo mais comum de CPNPC, responsável por cerca de 40% dos casos, sendo caracterizado pelo crescimento lento do tumor e por regulação das vias de EGFR, KRAS, PI3K e ALK, modificando a sensibilidade a determinados medicamentos. O carcinoma escamoso, originado das células escamosas que revestem o pulmão, se caracteriza pela queratinização pulmonar e pela alta associação com tabagismo. O carcinoma de grandes células, subtipo menos comum do CPNPC, é um tumor indiferenciado e pode ser caracterizado pelo tamanho anormal de suas células, tendendo a se espalhar de maneira mais abrupta e rápida do que outros subtipos.

Figura 2 – Principais características do câncer.



Fonte: elaborado pelo autor, adaptado de HANAHAN, 2022.

1.3 Tratamento do câncer de pulmão

Devido sua heterogeneidade, o tratamento para a neoplasia pulmonar compreende desde a remoção cirúrgica do órgão ao uso de terapia alvo-direcionada através de marcadores específicos. A remoção cirúrgica do câncer de pulmão é indicada para tumores que estão em estágio inicial (estágio I e II) e sem metástase, podendo necessitar de tratamento adjuvante pós-remoção, como radioterapia, quimioterapia ou imunoterapia (SILVA, 2022). A quimioterapia, geralmente utilizando agentes com platina (como cisplatina) e agentes citotóxicos (paclitaxel, docetaxel e gemcitabina), é recomendada em esquemas de combinação com radioterapia ou com outros quimioterápicos para tumores em estágios localmente avançados (National Comprehensive Cancer Network, 2025). A terapia alvo-direcionada é o tratamento de

primeira linha para o câncer de pulmão indicado para casos em estágios avançados (III), se baseia no perfil molecular visando aumentar a sobrevida e qualidade de vida dos pacientes. A identificação de mutações específicas, como no EGFR, denota uma mudança de tratamento convencional, visto que pacientes com tal mutação apresentam menor resposta à quimioterapia convencional (PATEL, 2020).

Os imunoterápicos, como pembrolizumabe, são anticorpos monoclonais que atuam como bloqueadores de checkpoints imunológicos e são aprovados para o tratamento do câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC). Já o osimertinibe é um inibidor de tirosina-quinase (TKI), classificado como terapia alvo-direcionada, utilizado em tumores com mutação específica no receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), atuando diretamente na via de sinalização tumoral. Recentemente, o órgão Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso combinado de dois anticorpos monoclonais (mABs), lazertinibe e amivantamabe, como tratamento de primeira linha para CPNPC em fase metastática, resultando num aumento significativo da sobrevida dos pacientes tratados (CHO, 2024). Ainda que ideal, a terapia alvo-direcionada pode ser custosa, o que na escolha da terapia convencional com quimioterápicos. Adicionalmente, terapias combinadas que associam quimioterapia, imunoterapia e terapias-alvo têm sido exploradas para maximizar os benefícios clínicos (HIRSCH, 2017).

Os quimioterápicos apresentam eficácia clínica significativa na redução tumoral e na sobrevida, especialmente em estágios avançados ou localmente avançados da doença, entretanto apresentam diversos efeitos colaterais nos pacientes, como resistência tumoral. Por isso, novas moléculas, como os pterocarpanos, são estudadas como potenciais agentes alvo contra o câncer.

1.4 Pterocarpanos

Derivados da isoflavona, os pterocarpanos são conhecidos por serem o segundo maior grupo de isoflavonóides e por serem utilizados popularmente como terapia alternativa. Também denominados de fitoalexinas, os compostos dessa classe vem sendo estudados devido suas diversas atividades biológicas encontradas na literatura, como atividades antimicrobianas (WANJALA *et al.*, 2002), antibacteriano (NGUYEN *et al.*, 2010), antifúngicas (KURAMOTO *et al.*, 2002; MUKHERJEE *et al.*, 1974), antidiabética (KIM *et al.*, 2014) e atividade antitumoral (MILITAO *et al.*, 2007), tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O composto demonstrou em estudos apoptose em células tumorais, inibe a proliferação celular e atua como agentes antitumorais promissores, especialmente devido à sua capacidade de modular vias celulares relacionadas ao ciclo celular e morte programada (FARIAS *et al.*, 2020).

Militão *et al.* (2014) relataram a atividade antiproliferativa de pterocarpanos em células de leucemia promielocítica humana, evidenciando a inibição da síntese de DNA e a indução da apoptose. As pesquisas recentes indicam possível atividade citotóxica e antimitótica, interferindo na proliferação celular e no ciclo celular na fase G2/M, indução de apoptose e alterações no fuso mitótico (FARIAS *et al.*, 2022). Esse conjunto de características demonstram como a versatilidade funcional da molécula serve como plataforma para a síntese novas moléculas com atividades melhoradas.

Apesar das atividades comprovadas na literatura, o entendimento da molécula ainda é limitado, o que evidencia a necessidade de ampliar as pesquisas para validar e explorar seu potencial terapêutico. Assim, o PTC(+) se torna promissor na investigação de novos antineoplásicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar os efeitos antiproliferativos e morfológicos do (+)-PTC, *in vitro*, em linhagens tumorais de pulmão.

2.2 Objetivo específicos

Avaliar a atividade citotóxica e potencial antiproliferativo do (+)-PTC em linhagens tumorais de pulmão.

Determinar IC₅₀ do (+)-PTC em linhagens tumorais de pulmão.

Determinar a seletividade tumoral do composto (+)-PTC em células de pulmão.

Analisar os efeitos morfológicos do (+)-PTC nas células tumorais de pulmão.

Padronizar etapas para analisar o potencial anti migratório do (+)-PTC em linhagens de câncer de pulmão.

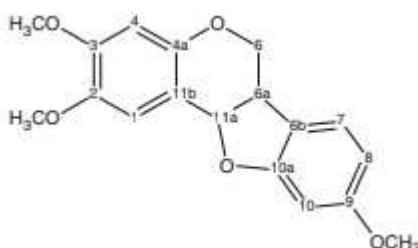
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção da amostra

O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano é um produto natural isolado da madeira do cerne da planta *Platymiscium floribundum* Vog, conhecida popularmente no Brasil como Jacarandá-caviúna, Caviúna-vermelha, Jacarandar-do-litoral ou simplesmente caviúna, coletada em Acarape, no estado do Ceará, Brasil.

A extração envolveu etapas sucessivas de partições com hexano, clorofórmio e etanol, seguidas de purificação cromatográfica, obtendo-se o composto puro (MILITAO, 2006). Visando estudos mais avançados, uma rota sintética para o racemato [(±)-2,3,9-trimetoxipterocarpano] (Figura 3) foi desenvolvida por pesquisadores da *Australian National University (ANU)* e pesquisadores da Universidade Federal do Ceará (UFC), envolvendo reações de hidroarilação e oxiarilação catalisadas por metais (Au(I), Pd(0)), com posterior purificação por cromatografia quiral (DO Ó PESSOA *et al.*, 2013). A rota desenvolvida foi patenteada sob o número WO2013000054 (A1) e depositada no World Intellectual Property Organization (WIPO).

Figura 3 – Estrutura do (±)-2,3,9-trimetoxipterocarpano



Fonte: MILITAO, 2006.

3.2 Cultivo das linhagens celulares

As linhagens tumorais utilizadas foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (United States - National Cancer Institute – US-NCI). A linhagem de fibroblasto pulmonar humano não tumoral MRC-5 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As linhagens foram mantidas em incubadora de CO₂ a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (NUAIRE, modelo TS Autoflow) e manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe A B C D 61 12, classe II).

As linhagens tumorais NCI-H460 e NCI-H1975 foram cultivadas em garrafas de cultura de células de 25 cm² ou de 75 cm² com volume de 250 mL em meio RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico (Pen Strep Gibco). Para a linhagem não tumoral MRC-5, foi utilizado meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), contendo os mesmos percentuais de SBF e antibiótico que o meio das linhagens tumorais (RPMI). A manutenção foi realizada quando as células atingiram uma confluência entre 80% a 90%, momento em qual as células permanecem na fase log de crescimento.

As linhagens representam diferentes tipos de doenças morfológicas do câncer de pulmão de não pequenas células, a linhagem celular NCI-H460 é derivada de carcinoma de pulmão de grande células, enquanto que a linhagem NCI-H1975 é de origem de adenocarcinoma de pulmão, com alta expressão de EGFR. Assim, o estudo da ação do (+)-PTC pode ser visto em tipos celulares com diferentes tipos de câncer de pulmão.

3.3 Avaliação da atividade antiproliferativa in vitro - (Tempo de duplicação e MTT)

Para avaliar o crescimento celular das linhagens tumorais foi realizado o ensaio de Tempo de duplicação (Td) e para não tumoral curva de crescimento para avaliar a taxa de crescimento, determinando o tempo para que a população dobre sua quantidade e a concentração ideal de plaqueamento. O tempo de duplicação para as linhagens tumorais foi determinado a partir da Omni Calculator (Żuławieńska, 2025), enquanto que para a linhagem não-tumoral foi realizado uma curva de concentração. A curva de crescimento foi plaqueada em uma placa de 96 poços em quadruplicatas, com

concentrações que variam de 2×10^6 a $1,5 \times 10^4$ células/mL. Posteriormente foram incubadas a 37°C e 5% de CO_2 . Após 24 h, os poços foram completados com 100 μL de meio e, após 72 h, foi realizado o ensaio de MTT. A curva foi realizada com 8 pontos e em quadruplicatas.

O ensaio do MTT é uma análise colorimétrica que quantifica a atividade mitocondrial, de maneira indireta, por meio da redução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenilbrometo de tetrazólico (MTT) de cor amarela, resultando na formação de cristais de formazan de cor púrpura em células metabolicamente ativas. Na reação, a atividade metabólica é dependente do número de células viáveis, sendo relacionada com a quantidade de MTT metabolizada (MOSMANN, 1983). O teste quantifica a citotoxicidade do composto testado, estimando um valor para a concentração inibitória média (IC_{50}). As células foram incubadas em placas de 96 poços utilizando uma concentração de plaqueamento de 7×10^4 , 7×10^4 para NCI-H460 e NCI-H1975, respectivamente, conforme descrito no Quadro 1. A concentração ideal para o plaqueamento de MRC-5 foi determinada posteriormente. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e 5 % de CO_2 , o PTC+ foi dissolvido em DMSO (dimetilsulfóxido) P.A. na concentração estoque de 10 mM e testado nas concentrações finais de 1 μM , 3 μM e 1 μM em 0,5 % DMSO. Após o tempo de incubação (24h, 48h ou 72h), as placas foram centrifugadas a 1500 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos em centrífuga (Eppendorf® modelo 5810R). O sobrenadante foi descartado e adicionado 100 μL por poço de solução de MTT 0,5 mg/mL, diluído em meio de cultura correspondente a cada linhagem, incubando a placa em estufa por 3h. Após o período de incubação, as placas foram novamente centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante removido. Adicionou-se 100 μL de DMSO P.A. em cada poço a fim de solubilizar o formazan. A absorbância foi medida a 595 nm usando o leitor de placas Victor Nivo Multimode (PerkinElmer®). Os valores de IC_{50} foram calculados por meio de regressão não linear com o software Graphpad Prism versão 8.0 e o IS (índice de seletividade), onde quanto maior o IS, mais seletivo e seguro o composto é, foi determinado usando a seguinte fórmula:

$$IS = \frac{\text{IC}_{50} \text{ da linhagem não tumoral}}{\text{IC}_{50} \text{ da linhagem tumoral}}$$

Quadro 1 – Linhagens utilizadas com suas respectivas concentrações de plaqueamento para o ensaio de MTT.

Linhagem Celular	Doença	Densidade de plaqueamento (células/mL)
NCI-H460	Adenocarcinoma de pulmão	7×10^4
NCI-H1975	Câncer de pulmão de células não pequenas	7×10^4

Quadro demonstrativo sobre as diferenças de origem patológica de cada linhagem celular
 Fonte: Elaborado pelo autor

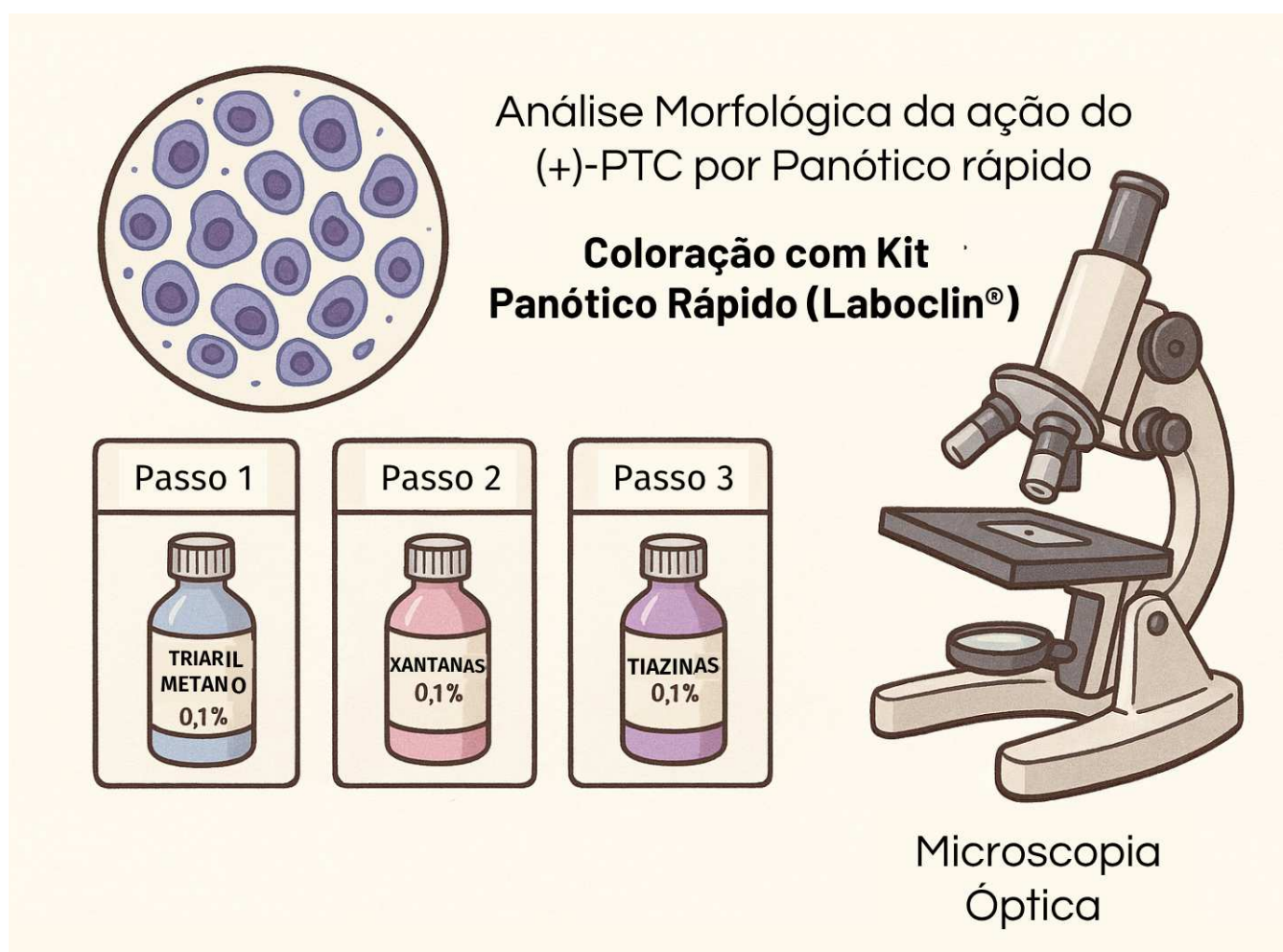
3.4 Análise morfológica – Coloração por Panótico rápido

Para análise de alterações celulares causadas pelo PTC+, foram observados padrões morfológicos das células após serem coradas com o Kit Panótico Rápido (Laborclin®). A coloração permite visualizar mudanças morfológicas pela marcação da cor diferenciada do citoplasma e do núcleo, baseando-se na capacidade que um dos corantes tem de marcar o núcleo em cor azul devido ao seu caráter alcalino. Já ao citoplasma é conferida uma cor avermelhada devido ao caráter ácido do segundo corante. Durante a apoptose, as células apresentam uma série de alterações características, como a formação “bolhas” (‘blobs’ – vesículas apoptóticas), condensação da cromatina e fragmentação celular, formando corpos apoptóticos. Já a necrose, que ocorre com estímulos necessariamente nocivos, como hipóxia e substâncias químicas, é caracterizada pelo inchaço das organelas, ruptura da membrana celular e vazamento de conteúdo celular para o tecido circundante, desencadeando uma resposta inflamatória e mais danos teciduais (NORMANNO *et al.*, 2025).

As células NCI-H460 e NCI-H1975 foram plaqueadas em lamínulas circulares de 13 mm em placas de 24 poços na concentração de 70.000 células/mL e incubadas por 48h com PTC(+) nas concentrações de 1µM, 3µM e 5µM e controle negativo utilizado foi apenas com o veículo (DMSO). Após o período de incubação, o meio de cultivo foi removido e as células lavadas com PBS estéril e as lamínulas foram retiradas da placa

para serem fixadas com solução de triarilmetano (Passo 1) a 0.1%, coradas com solução de xantenos a 0.1% (Passo 2) e com solução de 0,1% de tiazinas (Passo 3). O tempo de ação de cada solução foi de aproximadamente 30-60s. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada para remover o excesso de corante e colocadas para secarem em temperatura ambiente. Depois de secas, a montagem das lâminas se deu com clarificação por xilol e fixação com bálsamo do Canadá (Synth®). A análise morfológica do núcleo e do citoplasma celular ocorreu com o auxílio de um microscópio óptico (ZEISS) com aumento de 10X, 40X e 100X. As fotografias foram obtidas com câmera integrada de um dispositivo móvel acoplado ao microscópio, garantindo registro visual para posterior análise das mudanças morfológicas. As imagens foram escolhidas a partir dos padrões mais representativos nas lâminas.

Figura 4 - Protocolo estabelecido para análise morfológica.



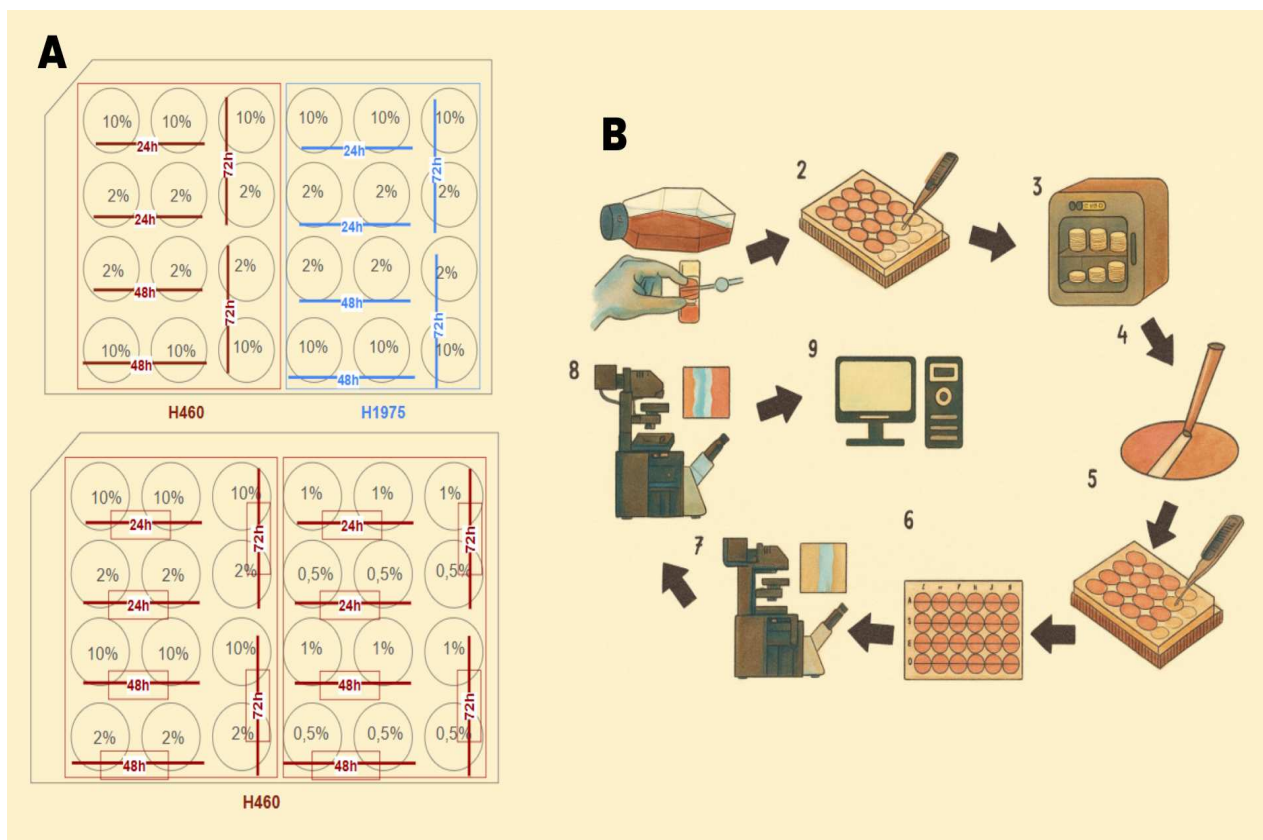
Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado com Canva®.

3.5 Padronização da concentração mínima de SBF para inibir a proliferação das células neoplásicas

A concentração mínima de SBF foi determinada para aplicar em, posteriormente, uma técnica de scratching, utilizada para estudar a migração e invasão tecidual por meio de uma ferida em uma monocamada celular. As células com alta capacidade migratória ultrapassam a linha da ferida feita na placa, tornando possível a análise da regeneração e o estudo de drogas que possam interferir no mecanismo migratório (BRITO *et al.*, 2005).

As linhagens NCI-H460 e NCI-9175 foram mantidas conforme protocolo previamente estabelecido e plaqueadas nas concentrações de 3×10^5 células/mL. Após o plaqueamento, o crescimento celular foi observado determinando a porcentagem de SBF em cada tratamento, para favorecer apenas a migração celular (Figura 5A). Plaqueou-se e monitorou-se as células diariamente até atingir uma confluência entre 95% e 100%. Com o auxílio de uma ponteira P200, realizou-se um risco no centro de cada poço da placa, gerando uma ferida artificial. As soluções intermediárias de trabalho (*working solution*) de (+)-PTC foram preparadas nas concentrações finais de 1 μ M, 3 μ M e 5 μ M para um volume final de 1mL, a partir do estoque de (+)-PTC a 10 mM. Em seguida, aplicou-se 10 μ L das soluções de trabalho nos poços correspondentes às suas concentrações de PTC(+) e 10 μ L de meio RPMI nos poços representativos para controle negativo. Para impedir a proliferação celular na borda dos riscos, alterou-se o percentual do SBF e monitorou-se nos tempos de 24h, 48h e 72h após a aplicação do composto e foram registradas fotografias de cada poço utilizando objetivas de 4x, 10x e 20x, destacando o risco na monocamada de células.

Figura 5 – Desenho experimental para ensaio de migração.



Esquema do desenho experimental evidenciando (A) Padronização da determinação de SBF e (B) Metodologia do Scratching

Fonte: Elaborado pelo autor e adaptado de ALMEIDA *et al.*, 2019.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade antiproliferativa in vitro (Tempo de duplicação e MTT)

Para avaliar a citotoxicidade, avaliando o efeito citotóxico do (+)-PTC, observou-se o crescimento celular e o tempo de duplicação (Td) das linhagens, comparando com a literatura e determinando a concentração ideal de plaqueamento. Segundo Brower *et al.* (1986), a linhagem NCI-H460 apresenta tempo de duplicação de 36 ± 3 h, enquanto a linhagem NCI-H1975 apresenta um Td de $38 \pm 5,92$ h, conforme descrito por Wang *et al.* (2014). A comparação entre os tempos de duplicação obtidos experimentalmente e os descritos na literatura para as linhagens tumorais está apresentada no Quadro 2. Para a linhagem não-tumoral de fibroblasto humano de pulmão, MRC-5, a melhor faixa de concentração foi escolhida baseada no Index celular máximo encontrado, com uma concentração ótima de 60.000 células/poço (Figura 6).

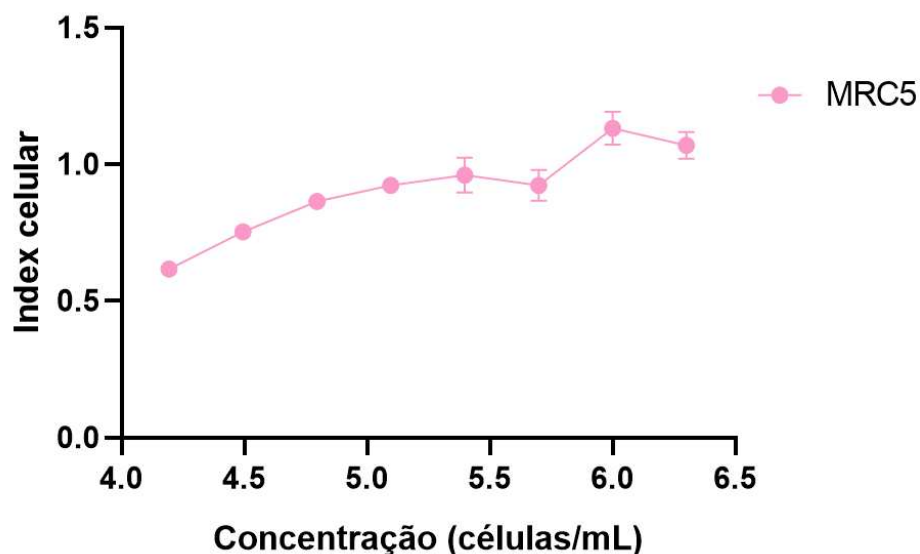
Quadro 2 – Tempos de duplicação para as linhagens utilizadas.

Linhagem Celular	Tempo encontrado	Tempo obtido
NCI-H460	36 ± 3 h (Brower et al., 1986)	33h
NCI-H1975	$38 \pm 5,92$ (Wang et al. (2014)	31h

Quadro indicativo dos tempos de duplicação obtidos para as linhagens tumorais.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Curva de crescimento para determinação do plaqueamento de MRC-5.



Curva dose-resposta de crescimento da linhagem celular MRC-5.
A concentração se encontra em (cél_s × 10⁴/mL). Fonte: Elaborado pelo autor.

As linhagens tumorais de NCI apresentaram valores de IC₅₀ menores que 50 µM no tempo de 72h, demonstrando ser tempo-dependente. Nos outros tempos testados, as IC₅₀ apresentaram valor acima de 50 µM, não gerando resultados significativos. Destaca-se que a linhagem NCI-H460 obteve uma IC₅₀ quase duas vezes menor que a obtida pela NCI-H1975, cujos valores foram 1,488 µM e 2,491 µM, respectivamente. O valor de IC₅₀ para a linhagem MRC-5 foi superior a 50 (197,1 µM), indicando a ausência de efeito citotóxico em células não-tumorais, obtendo um IS superior a 1 (IS > 1), demonstrando que o composto é mais tóxico em células tumorais e indicando seletividade do (+)-PTC em relação às células não-tumorais. A avaliação antineoplásica inicial do (+)-PTC mostrou que o composto foi capaz de exercer efeito antiproliferativo nas linhagens tumorais testadas e efeito seletivo para a linhagem não-tumoral (Quadro 3).

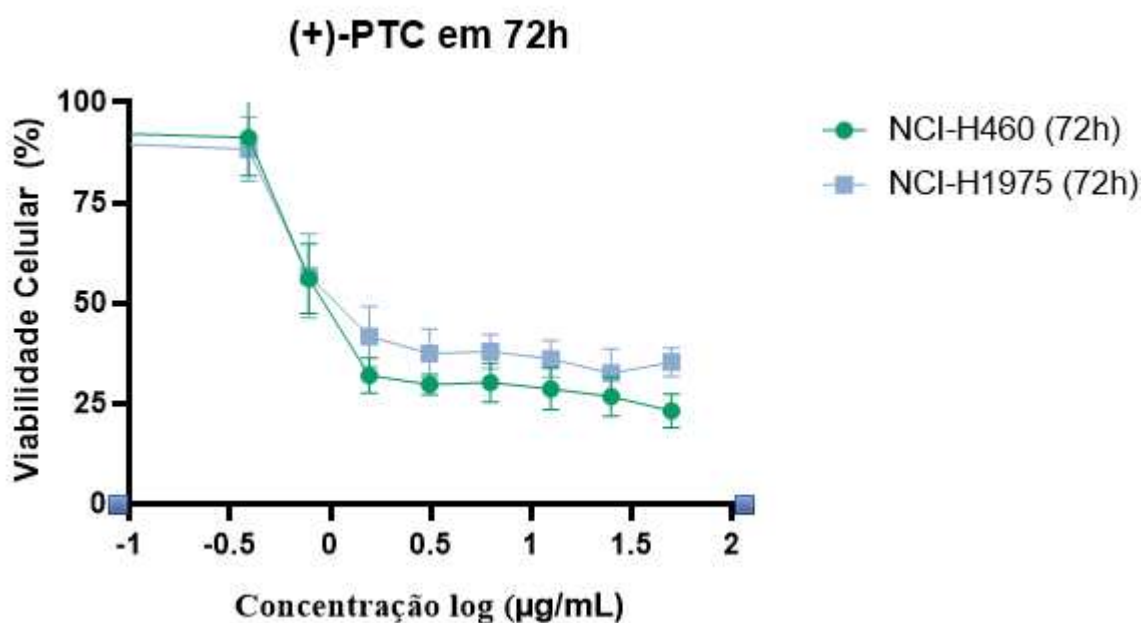
Quadro 3 – Efeito citotóxico do PTC(+) em linhagens testadas por tempo de incubação.

Linhagem		IC50 (Intervalo de Confiança de 95 %)		
		24h	48h	72h
Tumores sólidos	NCI-H460	>50	>50 (26,60 – 1229)	1,488 (1,115 – 1,927)
	NCI-H1975	>50	>50 (35,56 – 97,92)	2,491 (1,805 – 3,369)
Não-tumoral	MRC-5	>50	>50	>50 (123,2 – 371)

Os valores de IC50 estão apresentados em μM . Dados representativos de média e intervalo de confiança 95% calculado através de regressão não linear. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Entre parênteses estão os valores de intervalo de confiança de 95 %. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Perfil citotóxico do PTC(+) nas linhagens tumorais de pulmão em 72h.

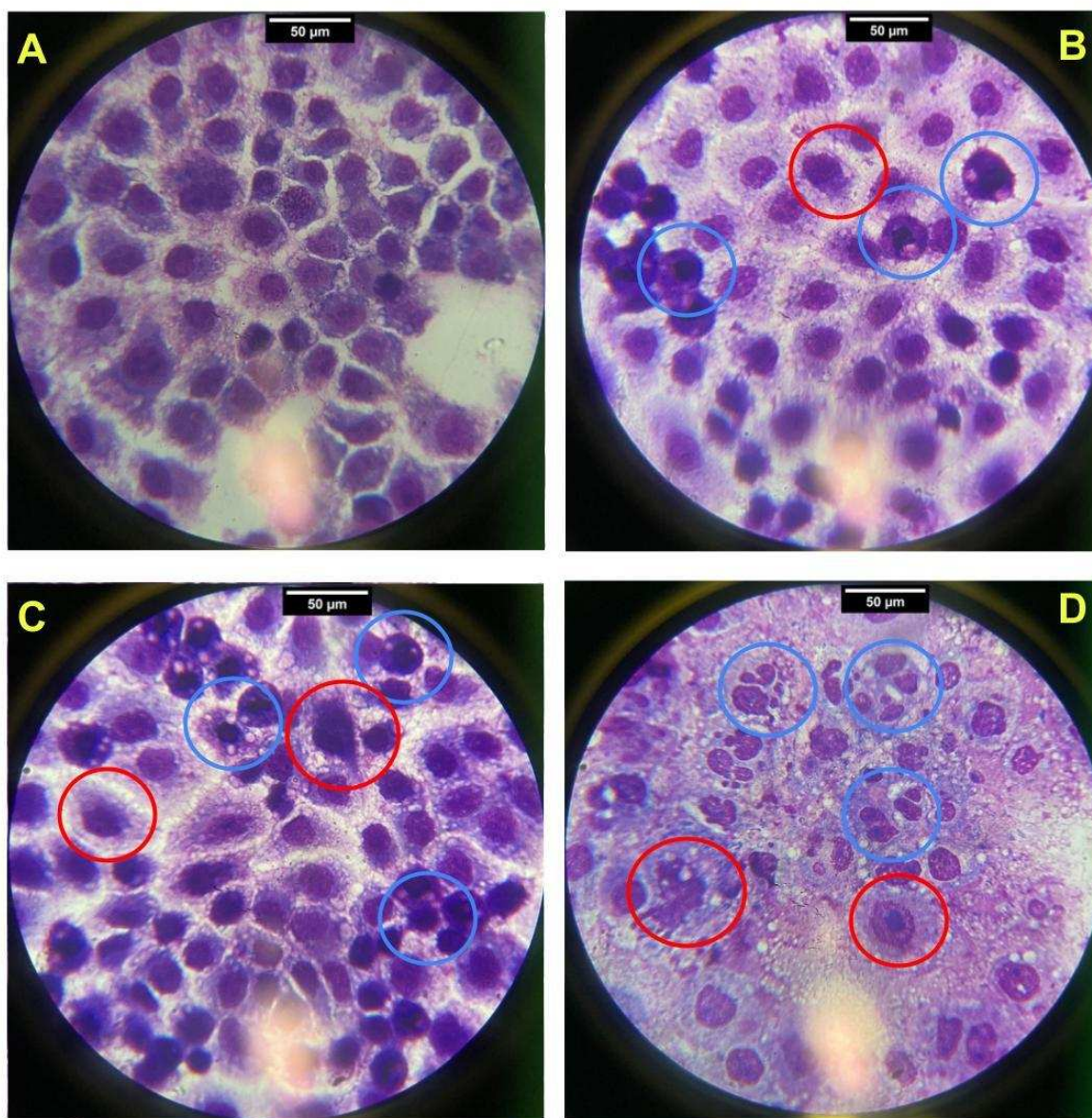


Curva dose-resposta do (+)-PTC em 72h nas linhagens de NCI-H460 e NCI-H1975. $R^2 = 0,80$ e $0,81$ respectivamente. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Análise morfológica – Coloração por Panótico rápido

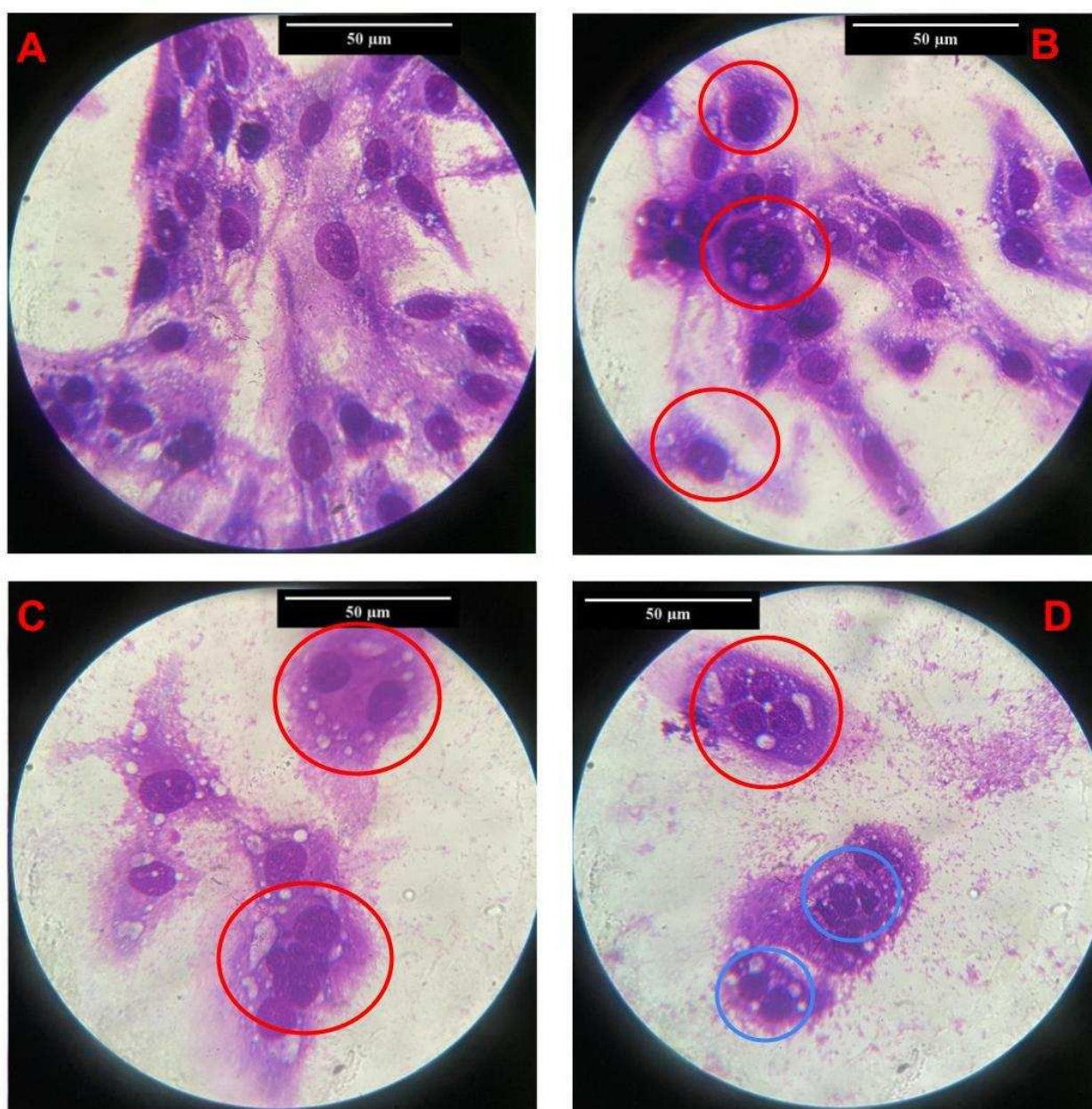
Os grupos analisados foram três diferentes concentrações de PTC(+), (1uM, 3uM e 5uM) e controle negativo (C-) para cada linhagem, após 48h de incubação. As células do controle receberam a mesma concentração de veículo (DMSO) que as células tratadas. Nas células de NCI-H460 (Figura 8) é possível observar de possíveis sinais indicativos de apoptose, indicado pelos círculos em azul, enquanto que as células de NCI-H1975, que se encontram na Figura 8, possuem sinais possíveis de necrose, indicado pelos círculos em vermelho.

Figura 8 – Visualização por coloração de panótico em NCI-H460.



Linhagem NCI-H460 em lente com aumento de 40x. A) Controle negativo contendo 0,5 % de DMSO; B) 1 μ M de PTC(+); C) 3 μ M de PTC(+); D) 5 μ M de PTC(+). Círculos azuis apontam possíveis sinais de apoptose, como a formação de corpos apoptóticos. Em vermelho, possíveis sinais de necrose, como a vacuolização celular. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 – Visualização por coloração de panótico em NCI-H1975.



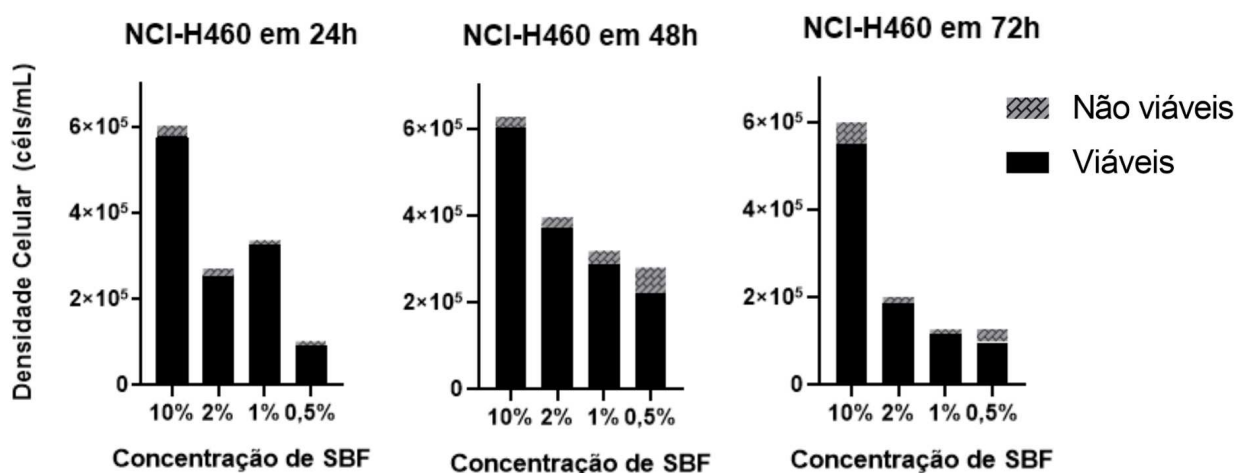
Linhagem NCI-H1975 em lente com aumento de 100x. A) Controle negativo contendo 0,5 % de DMSO; B) 1 μ M de PTC(+); C) 3 μ M de PTC(+); D) 5 μ M de PTC(+). Círculos azuis apontam possíveis sinais de apoptose, como a formação de corpos apoptóticos. Em vermelho, possíveis sinais de necrose, como a vacuolização celular. Fonte: Elaborado pelo autor.

Essas alterações foram mais evidenciadas quando as células foram expostas a maiores concentrações do composto (3 μ M e 5 μ M), sugerindo um efeito dependente de concentração. Em ambas linhagens, o tratamento de maior concentração (5 μ M) levou ao processo de morte celular, traduzido na morfologia pela quantidade de debris celulares presentes e pelo baixo número de células. Conforme previsto, o grupo controle (apenas com DMSO 0,5%) não apresentou mudanças morfológicas aparentes.

4.3 Padronização da concentração mínima de SBF para inibir a proliferação das células neoplásicas

Para determinar o risco na placa para posterior migração celular (*wound healing*), definiu-se as porcentagens de SBF utilizadas em cada tratamento, baseado na taxa de células viáveis e não-viáveis e na taxa de duplicação de cada linhagem tumoral. (Figura 10).

Figura 10 – Comparação entre taxa de células de NCI-H460 viáveis e não-viáveis para ensaio de migração celular.

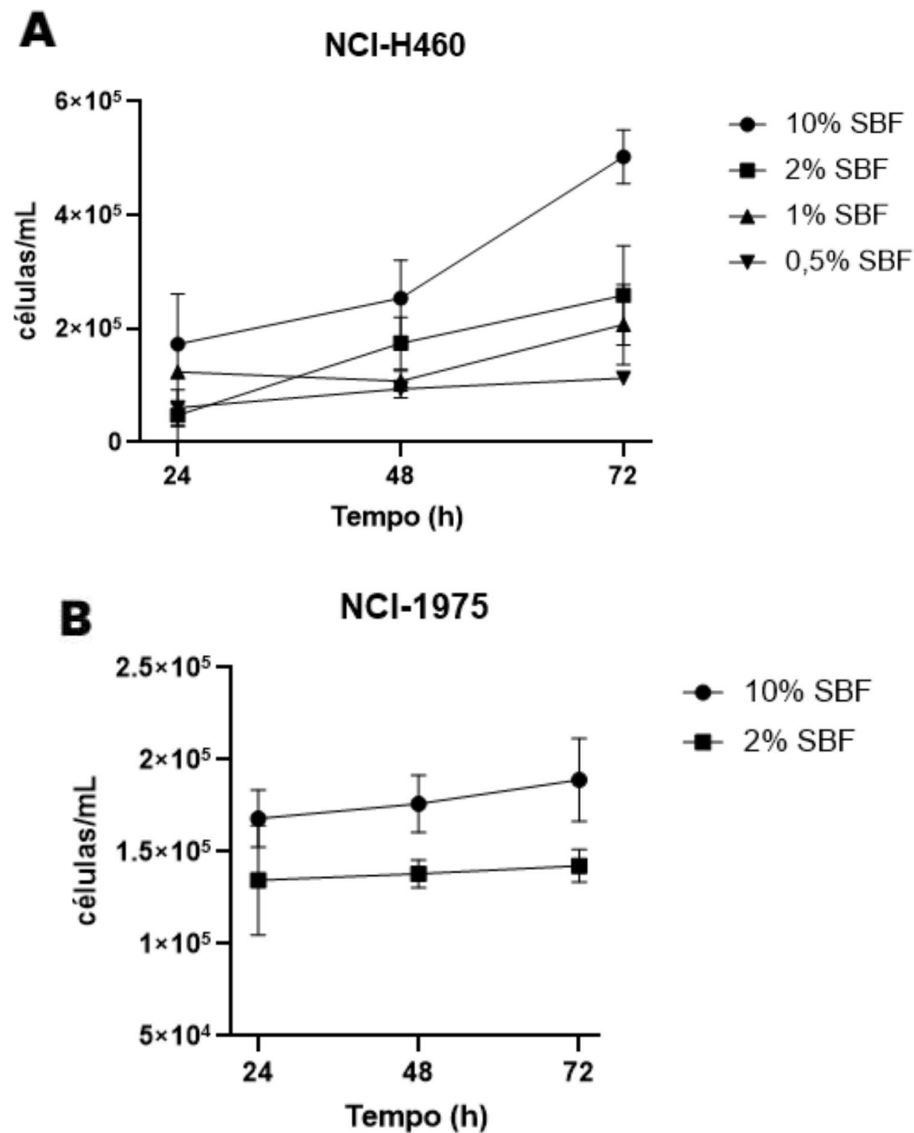


Viabilidade celular nas placas após mudança do Soro Bovino Fetal nos tempos até 72h na linhagem tumoral NCI-H1975. Fonte: Elaborado pelo autor.

A linhagem NCI-H460 apresentou baixa duplicação na concentração de 0,5%, entretanto obteve alta taxa de mortalidade. Por tal razão, as concentrações escolhidas para a linhagem NCI-H460 foram 10% como controle negativo e 1% como porcentagem definida. Para a linhagem NCI-H1975, a porcentagem escolhida se deu pela

metodologia de baixa duplicação celular (Figura 11). O protocolo ainda se encontra em estabelecimento para futura análise da migração celular

Figura 11 – Densidade celular de cada linhagem em diferentes tratamentos de SBF.



Concentrações de SBF testadas para determinação da porcentagem ideal para teste de scratching. **(A)** Células de câncer de pulmão NCI-H460, determinando que 1% é ideal pela baixa duplicação. **(B)** Células de câncer de pulmão NCI-H1975, determinando que 2% é ideal pela baixa duplicação. Fonte: Elaborado pelo autor.

5. DISCUSSÃO

O câncer de pulmão representa um grave desafio na oncologia devido à sua alta incidência, complexidade molecular e elevada taxa de mortalidade. A disponibilidade de agentes antineoplásicos eficazes e seguros, apesar dos avanços científicos, ainda é limitada devido à baixa seletividade contra as células tumorais, levando a efeitos indesejados e resistência aos tratamentos convencionais no câncer de pulmão (SUWAL *et al.*, 2025). Por isso, é essencial desenvolver novos fármacos quimioterápicos para uso em combinação, potencializando a eficácia dos tratamentos disponíveis e superando efeitos colaterais, expandindo as opções terapêuticas. Diante disso, a avaliação de substâncias naturais, como os pterocarpanos, integra uma estratégia válida para ampliar o arsenal terapêutico disponível.

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa já demonstraram, em diversas linhagens, efeitos antiproliferativos do PTC(+), como em câncer de mama (MCF-7) com IC₅₀ próximo de 5,21 μ M (FALCAO *et al.*, 2005) e em leucemia promielocítica aguda (HL-60) próximo de 2,98 μ M (MILITAO *et al.*, 2007) em tempos próximos de 72h, confirmando o efeito citotóxico tempo-dose dependente. Efeitos morfológicos também foram encontrados com alterações típicas de mitose bloqueada e efeitos antimitóticos com parada na fase prometáfase (G2/M), desorganizando os centrôssomos, em 24h (FARIAS, 2022).

Portanto, a utilização de compostos como o (+)-PTC reforça o uso de compostos novos na busca por agentes antineoplásicos que contornem os desafios das terapias convencionais (HUISMAN, 2002). Nesse contexto, este estudo analisou as alterações citológicas causadas pelo PTC(+) em linhagens tumorais de pulmão, a fim de estudar o potencial do composto como um futuro tratamento em câncer de pulmão, oferecendo uma alternativa promissora frente às terapias tradicionais.

Com base nos resultados obtidos, o PTC+ demonstrou atividade citotóxica relevante e frente às linhagens de câncer de pulmão não pequenas células, especialmente após 72 horas de exposição. Os valores de IC₅₀ observados para as linhagens NCI-H460 (1,488 μ M) e NCI-H1975 (2,491 μ M) indicam que o composto apresenta potência considerável, sendo mais eficaz para NCI-H460, o que sugere diferenças intrínsecas de sensibilidade entre as linhagens testadas. O efeito citotóxico foi

tempo-dependente, visto que nos tempos de 24h e 48h, os valores de IC50 foram superiores a 50 μ M, reforçando a necessidade de exposições prolongadas para ação efetiva do PTC+. Além disso, a alta seletividade do composto nas linhagens tumorais em relação à não tumoral testadas ($IS > 1$) sugerem maior segurança para futuro uso clínico.

A análise morfológica corrobora parcialmente com o ensaio de viabilidade, revelando possíveis padrões de apoptose e necrose nas linhagens testadas. Esses achados podem indicar que o PTC(+) induz vias de morte celular distintas dependendo do contexto molecular da célula-alvo, que pode estar relacionado a mutações em genes de regulação do ciclo celular, sendo discutido como um fator crítico no sucesso de terapias direcionadas (HERBST, 2018). Além disso, demonstrou dependência de concentração, visto que os maiores efeitos morfológicos ocorreram nas doses mais elevadas de 3 μ M e 5 μ M. Os resultados da padronização da concentração de SBF demonstraram que as porcentagens de Soro Bovino Fetal foram suficientes para inibir a taxa de proliferação, conforme a literatura (ALMEIDA *et al.*, 2019).

Os resultados promissores encontrados indicam a necessidade de prosseguir com estudos pré-clínicos e ensaios *in vivo* para avaliação detalhada da eficácia e segurança desse composto, alinhando-se às demandas globais por tratamentos antitumorais mais seguros e eficazes.

6. CONCLUSÃO

Dessa forma, observa-se que o PTC+ tem potencial citotóxico, atuando de maneira seletiva a depender da linhagem, sendo mais potente para a linhagem NCI-H460, o que sugere diferentes mecanismos de ação celular. A utilização do ensaio de migração com redução do soro no meio permite entender o efeito do PTC+ sobre a capacidade migratória, mas ainda é inconclusivo e necessitando de dados e replicatas mais precisas sobre seu potencial antimigratório. Os resultados demonstraram que o (+)-PTC inibiu a proliferação das linhagens celulares NCI-H460 e NCI-H1975 de maneira dose-dependente, revelando seu potencial citotóxico e antiproliferativo. Conclui-se, portanto, que o (+)-PTC possui atividade citotóxica e seletiva antitumoral significativa *in vitro*. Para futuras investigações, sugere-se completar o protocolo de migração, realizar citometria para análise do ciclo celular e indução de apoptose e ensaios pré-clínicos *in vivo*, avaliando a eficácia e farmacocinética do (+)-PTC. Esses achados reforçam o potencial do (+)-2,3,9-trimetoxipterocarpano como candidato promissor para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento do câncer de pulmão, ressaltando a importância de estudos futuros para elucidar seus mecanismos de ação e avaliar sua eficácia e segurança.

REFERÊNCIAS

ALLEMANI, C. et al. **Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries.** The Lancet, [S.l.], v. 391, n. 10125, p. 1023–1075, mar. 2018. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3.

ALMEIDA, Vitor M. et al. **Triagem de drogas anticâncer: padronização do ensaio de ranhura *in vitro*.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro, v. 55, n. 6, p. 606–619, 2019. DOI: 10.5935/1676-2444.20190054.

ARRUDA, I. T. S.; MENDONÇA, T. G. L. C. **Câncer de pulmão: efeitos da inalação passiva dos compostos químicos do cigarro.** Revista Saúde e Ciência Online, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 66–72, maio/ago. 2019. ISSN 2317-8469.

AZEVEDO E SILVA, G. et al. **A situação do câncer no Brasil: tendências e desafios para o controle.** Revista Brasileira de Cancerologia, v. 65, n. 1, p. e–071207, 2019. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/207>.

AZEVEDO E SILVA, G. et al. **The fraction of cancer attributable to ways of life, infections, occupation, and environmental agents in Brazil in 2020.** PLOS ONE, [S.l.], v. 11, n. 2, e0148761, fev. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0148761.

BADE, B. C.; DELA CRUZ, C. S. **Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention.** Clinics in Chest Medicine, v. 41, n. 1, p. 1–24, mar. 2020. DOI: 10.1016/j.ccm.2019.10.001.

BITTONI, M. A.; CARBONE, D. P.; HARRIS, R. E. **Vaping, smoking and lung cancer risk.** Journal of Oncology Research, v. 9, n. 3, p. 10229, 2024. DOI: 10.29011/2574-710x.10229.

BRAY, F. et al. **The changing global burden of cancer: transitions in human development and implications for prevention and control.** The Lancet Oncology, v. 22, n. 2, p. 129–142, 2021. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30090-7.

BROWER, M. et al. **Growth of cell lines and clinical specimens of human non-small cell lung cancer in a serum-free defined medium.** Cancer Research, v. 46, n. 2, p. 798–806, fev. 1986. PMID: 3940644.

CARVALHO, P. L. N. de. **Estudo químico e do potencial biológico do produto da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis*.** 2016. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Surveillance for cancers associated with tobacco use — United States, 2010–2014.** MMWR Surveillance Summaries, v. 67, n. 12, p. 1–42, 2018.

CHANSKY, K. et al. The IASLC. **Lung Cancer Staging Project: External validation of the revision of the TNM stage groupings in the eighth edition of the TNM classification of lung cancer.** Journal of Thoracic Oncology, [S.l.], v. 12, n. 7, p. 1109–1121, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.04.010>.

CHO, Byoung C. et al. **Amivantamab plus Lazertinib in Previously Untreated EGFR-Mutated Advanced NSCLC.** The New England Journal of Medicine, v. 391, n. 16, p. 1486–1498, 24 out. 2024. DOI: 10.1056/NEJMoa2403614.

FARIAS, Kaio Moraes de. **Efeitos farmacológicos, fenotípicos e proteômicos do tratamento com PTC (+) em linhagens de câncer de próstata.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Fortaleza, 2017.

GONÇALVES, M. C. et al. **Padronização do ensaio de *wound healing in vitro* para avaliação de atividade proliferativa e migratória em células tumorais.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 56, n. 1, p. 12–20, mar. 2020.

HAMRA, G. B. et al. **Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis.** Environmental Health Perspectives, [S.l.], v. 122, n. 9, p. 906–911, set. 2014. DOI: 10.1289/ehp.1408092.

HANAHAN, Douglas. **Hallmarks of cancer: new dimensions.** Cancer Discovery, Philadelphia, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

HERBST, R. S.; MORGENSZTERN, D.; BOSHOFF, C. **The biology and management of non-small cell lung cancer.** Nature, v. 553, p. 446–454, 2018. DOI: 10.1038/nature25183.

HIRSCH, F. R. et al. **Lung cancer: current therapies and new targeted treatments.** Lancet, [S.l.], v. 389, p. 299–311, 2017. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30958-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30958-8).

HUISMAN, Cynthia et al. **Paclitaxel triggers cell death primarily via caspase-independent routes in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460.** Clinical Cancer Research, v. 8, n. 2, p. 596–606, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer de pulmão – tipos, fatores de risco, prevenção e dados.** Rio de Janeiro: INCA, 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2022.

JETT, J. et al. **Cannabis use, lung cancer, and related issues.** Journal of Thoracic Oncology, v. 13, n. 4, p. 480–487, abr. 2018. DOI: 10.1016/j.jtho.2017.12.013.

KHALIL, Nardein Nasser. **Pharmacological inhibition of lung cancer metastases. 2023.** Dissertação (Capstone Project) – University of California, Riverside, 2023.

KIM, H. J. *et al.* **Anti-proliferative, anti-migration, and anti-invasion effects of hesperidin, diosmin, and derivatives on lung cancer cells.** *Respiratory Investigation*, v. 61, n. 4, p. 345–356, 2023.

KURAMOTO, K *et al.* **Chromosomal instability and radiosensitivity in myelodysplastic syndrome cells.** *Leukemia*, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 2253–2258, 2002. DOI: 10.1038/sj.leu.2402703.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. Robbins **Basic Pathology.** 10th ed. Philadelphia: Elsevier, 2018.

LEMJABBAR-ALAOUI, Hassan *et al.* **Lung cancer: biology and treatment options.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1856, n. 2, p. 189–210, maio 2015. DOI: 10.1016/j.bbcan.2015.02.003.

MACROSTY, Christina R.; RIVERA, M. Patricia. **Lung cancer in women: a modern epidemic.** *Clinics in Chest Medicine*, v. 41, n. 1, p. 47–55, mar. 2020. DOI: 10.1016/j.ccm.2019.11.002.

MUKHERJEE, N.; GUPTA, P. K.; ADITYACHAUDHURY, N. **Antifungal activity of some pterocarpan and coumestans.** *Science and Culture*, v. 40, p. 198-201, 1974.

NASIM, Farhood; SABATH, Bruce F.; EAPEN, George A. **Lung cancer. Medical Clinics of North America**, v. 103, n. 3, p. 463–473, maio 2019. DOI: 10.1016/j.mcna.2018.12.006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What is cancer?** U.S. Department of Health and Human Services, [2023]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®)–Health Professional Version.** Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/lung/hp/non-small-cell-lung-treatment-pdq>.

NORMANNO, N.; MORABITO, A.; RACHIGLIO, A. M. et al. **Circulating tumour DNA in early stage and locally advanced NSCLC: ready for clinical implementation?** *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 22, p. 215–231, 2025.

NGUYEN, P. H.; NGUYEN, T. N. A.; KANG, K. W.; NDINTEH, D. T.; MBAFOR, J. T.; KIM, Y. R.; OH, W. K. **Prenylated pterocarpanes as bacterial neuraminidase inhibitors.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 9, p. 3335-3344, 1 maio 2010. DOI: 10.1016/j.bmc.2010.03.005.

RUKACHAISIRIKUL, Thitima et al. **Antibacterial pterocarpanes from *Erythrina subumbrans*.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, n. 1, p. 171-175, Mar. 2007. DOI: 10.1016/j.jep.2006.09.022.

SIEGEL, R. L.; KRATZER, T. B.; GIAQUINTO, A. N.; SUNG, H.; JEMAL, A. **Cancer statistics, 2025.** *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 75, n. 1, p. 10–45, jan./fev. 2025. DOI: 10.3322/caac.21871.

SILVA, A. L. da et al. **Planejamento de fármacos antitumorais: uma abordagem baseada em complexos metálicos.** *Química Nova*, v. 45, n. 4, p. 405–414, 2022. DOI: 10.1590/S0100-40422005000100021.

SUNG, H. et al. **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: 10.3322/caac.21660.

SUWAL, Newton et al. **Targeting oncogenic signaling pathways in lung cancer: the emerging role of nobiletin, a flavonoid from citrus peel.** Food Bioscience, [S.l.], v. 69, 106887, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.106887>.

THAI, Alesha A. et al. **Lung cancer.** The Lancet, v. 398, n. 10299, p. 535–554, 2021. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01584-7.

WANG, Jing et al. **The reverse effect of X-ray irradiation on acquired gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cell line NCI-H1975 *in vitro*.** Journal of Molecular Histology, v. 45, n. 6, p. 641–652, dez. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10735-014-9583-2>.

WANJALA, C. C. W.; JUMA, B. F.; BOJASE, G.; GASHE, B. A.; MAJINDA, R. R. T. **Erythrinaline alkaloids and antimicrobial flavonoids from *Erythrina latissima*.** Planta Medica, v. 68, p. 640-642, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer fact sheet.** Geneva, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

WU, Y. et al. **Metabolomic analysis, antiproliferative, anti-migratory, and anti-invasive effects of amlodipine on non-small cell lung cancer cells.** Drug Design, Development and Therapy, v. 19, p. 123–137, fev. 2025.

YOU, Mengshu et al. **Signaling pathways in cancer metabolism: mechanisms and therapeutic targets.** Signal Transduction and Targeted Therapy, [S.l.], v. 8, n. 196, p. 1–26, 2023. DOI: 10.1038/s41392-023-01442-3.

ZAVALETA-MONESTEL, E. et al. **Amivantamab: A Novel Advance in the Treatment of Non-small Cell Lung Cancer.** Cureus, v. 16, n. 5, p. e60851, 22 maio 2024. DOI: 10.7759/cureus.60851. PMID: 38910714; PMCID: PMC11191844.

ŻUŁAWIŃSKA, J. **Cell Doubling Time Calculator**. Disponível em: <https://www.omnicalculator.com/biology/cell-doubling-time>.

ZHU, Q. G. et al. **Driver genes in non-small cell lung cancer: characteristics, detection methods, and targeted therapies**. *Oncotarget*, [S.l.], v. 8, p. 57680–57692, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.17409.