

## Avaliação da citotoxicidade da fração do soro de *hevea brasiliensis* em linhagem celular de câncer de pulmão

*Cytotoxicity assessment of a fraction of serum hevea brasiliensis lineage in cell lung cancer*

Fabianna Almeida <sup>1</sup>, Bruna Lamounier <sup>1</sup>, Fátima Mrué <sup>2</sup>, Elisangela Lacerda <sup>3</sup>, Ingrid Travassos <sup>4</sup>

### Resumo

**Introdução:** O câncer de pulmão vem apresentando alta incidência e mortalidade no mundo, nas últimas décadas. A quimioterapia é a base do seu tratamento, entretanto implica em importantes efeitos colaterais. Para minimizá-los, pesquisadores têm estudado o potencial antineoplásico de plantas, como a *Hevea brasiliensis* (HB), conhecida como seringueira. Há indícios científicos de que o soro da HB (HBS) apresenta ação antineoplásica em algumas linhagens tumorais. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo investigar a citotoxicidade da fração F3 e do HBS em linhagem celular de Câncer de pulmão não pequenas células e em células não tumorais. **Métodos:** Estudo experimental *in vitro*. Para os ensaios biológicos foram utilizadas linhagens aderentes L929 (Fibroblasto murino) e NCI-H 1975 (Carcinoma pulmonar de não-pequenas células). As linhagens celulares foram tratadas por 48h com diferentes concentrações de HBS e da fração F3, e, posteriormente, submetidas a Teste de Viabilidade Celular, seguido de análise estatística. **Resultados:** O HBS apresentou discreto efeito sobre a linhagem normal, com diminuição máxima da viabilidade em 30% quando utilizada a concentração de 25 µg ml<sup>-1</sup>. Em relação à HBS na linhagem do câncer de pulmão, assim como a Fração F3 em ambas as linhagens, não se observou qualquer efeito inibitório. **Discussão:** O uso terapêutico do HBS iniciou-se com sua aplicação como biomaterial em 1996. Recentemente, estudos têm apontado para um potencial antineoplásico contido em frações do HBS. A fração F3 demonstrou previamente um efeito modulador do processo inflamatório, com importante produção de interleucina 10 (IL-10). A IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória, reconhecida como moduladora do crescimento e diferenciação das células inatas do sistema imunológico, sugerindo um potencial efeito imunoterapêutico para o câncer. **Conclusões:** No presente trabalho, a

4

1. Graduanda em Medicina pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás

2. Médica, doutora, professora assistente da Faculdade de Medicina da UFG e professora adjunta do Departamento de Medicina da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

3. Doutora em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia. Professora adjunta da Universidade Federal de Goiás

4. Especialista em Farmacologia Clínica pela Universidade Federal de Goiás. Coordenadora de Estudos Clínicos e membro do Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Hospital Alberto Rassi - HGG

E-mail do primeiro autor: fabianna\_almeida@hotmail.com

fração do soro da *Hevea brasiliensis* não demonstrou atividade antiproliferativa sobre linhagem de câncer de pulmão.

**Palavras chave:** Câncer de pulmão; *Hevea brasiliensis*; citotoxicidade; quimioterapia.

### **Abstract**

**Introduction:** Lung cancer has shown high incidence and mortality in the world in recent decades. Chemotherapy is the basis of your treatment, but implies significant side effects. To minimize them, researchers have studied the anticancer potential of plants, such as *Hevea brasiliensis* (HB), known as rubber. There is scientific evidence that serum HB (HBS) has antineoplastic action in some tumor cell lines. Therefore, this study aimed to investigate the cytotoxicity of the F3 fraction and the HBS in Lung cancer non-small cells and non-tumor cell lines **Methods:** An experimental study in vitro. For biological testing were used adherent cell, L929 (murine fibroblast) and NCI-H 1975 (lung carcinoma non-small cell). The cell lines were treated for 48 h with different concentrations of HBS and the fraction F3, and then subjected to cell viability test, followed by statistical analysis. **Results:** HBS showed slight effect on the normal line, with a decrease in viability by 30% when used at concentrations of 25 g ml<sup>-1</sup>. Regarding the HBS lung cancer cells, demonstrated the same results for fraction F3 in both cell lines, showing no inhibitory effect. **Discussion:** The therapeutic use of HBS began with its application as biomaterial in 1996. Recently, studies have pointed to an antineoplastic potential contained in HBS fractions. The fraction F3 previously demonstrated a modulating effect of the inflammatory process with significant production of interleukin 10 (IL-10). IL-10 is a potent anti-inflammatory cytokine, known as a modulator of growth and differentiation of innate immune cells system, suggesting a potential for immunotherapeutic cancer effect. **Conclusions:** In this study, the fraction of serum from *Hevea brasiliensis* has not demonstrated antiproliferative activity on lung cancer cell line.

**Keywords:** Lung cancer; *Hevea brasiliensis*; cytotoxicity; chemotherapy.

### **Introdução**

A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu, em 2013, que Câncer é: “ o crescimento descontrolado e a disseminação de células que pode afetar quase qualquer parte do corpo, podendo muitas vezes invadir tecidos

circundantes e dar metástase para locais distantes”. O câncer é caracterizado pelo crescimento descontrolado de células e se dá a partir da interação de fatores de risco ambientais e hereditários. Os estímulos ambientais agem sobre genes especiais

denominados protooncogenes, presentes em células normais, transformando-os em oncogenes – os responsáveis pela malignização celular. Um exemplo dessa relação é o tabagismo e o câncer de pulmão. Ao processo de formação de neoplasia, dá-se o nome de carcinogênese, que abrange os estágios de iniciação, promoção e progressão <sup>1</sup>.

Os números relacionados à incidência e mortalidade mundial dos diversos tipos de Câncer são preocupantes. Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), trata-se da terceira causa de óbitos no mundo. No ano de 2012, conforme as estimativas mundiais do projeto Globocan em 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), houve 14,1 milhões de novos casos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes pela doença. As perspectivas são de que em duas décadas os números sejam ainda maiores: a carga global de casos novos será de 21,4 milhões e de 13,2 milhões de óbitos, em 2030. Só nos EUA são gastos mais de 20 bilhões de dólares em pesquisas e 200 bilhões de dólares, anualmente, com o tratamento do câncer.

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa para os anos de 2014 e 2015 aponta para cerca de 395 mil novos casos de câncer, excluindo-se os casos de pele não melanoma. Estima-se que em 2020 esse número seja superior a 500 mil <sup>2,3</sup>. Diante da elevada morbimortalidade e das estatísticas

desanimadoras de que a incidência do câncer tende a aumentar no Brasil e no mundo, a doença vem sendo alvo de imensa atividade médica e científica, nacional e internacional, em busca de uma cura definitiva <sup>4</sup>.

Até meados dos anos 70, os únicos tratamentos disponíveis para o câncer eram a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. Desde então, várias terapias que visam moléculas de sinalização envolvidas no processo da carcinogênese foram desenvolvidas <sup>5</sup>. Mesmo com várias possibilidades terapêuticas oncológicas, a quimioterapia antineoplásica tem sido uma das principais modalidades de tratamento do câncer. Há necessidade de novos compostos e esquemas mais eficientes, que reduzam completamente a população de células tumorais e com menor toxicidade.

Os agentes antineoplásicos agem em nível celular, principalmente naquelas em intenso processo de divisão mitótica, interferindo assim, no seu crescimento e proliferação. Os fármacos quimioterápicos apresentam diferentes mecanismos de ação. Dentre eles, cita-se o dano direto ao DNA e a condução à apoptose; inibição do processo mitótico; ação sobre microtúbulos; antibióticos antitumorais; ação de inibidores da topoisomerase e outros anti-metabólitos celulares <sup>6</sup>. Independente do mecanismo de ação, o objetivo primário do tratamento

quimioterápico é alcançar o maior nível de morte celular tumoral possível, preservando as células normais <sup>1</sup>. Muitos fármacos que compõem o arsenal terapêutico contra o câncer são divididos em ciclo-celular específicos (CCS) e não específicos (CCNS). O primeiro grupo atua sobre as células que se encontram no ciclo celular, já o segundo tem sua ação direcionada às células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo celular ou em repouso na fase G<sub>0</sub>. Dentre os CCS, destacam-se os produtos naturais, tais como os alcaloides vegetais, subdivididos em: alcaloides da vinca (vimblastina e vincristina), taxol (derivado da *Taxus brevifolia* e do *Taxus baccata*), podofilotoxinas (extraídas da raiz do *Podophyllum peltatum*). Já os CCNS interagem com o DNA por intercalação. Tais agentes têm como alvo principal a fenda menor do B-DNA e a alteração do mesmo ocorre a partir do aumento do espaçamento dos pares de base citosina-guanina, o qual resulta na formação de um trímero constituído pelo intercalante (no caso, o antineoplásico), DNA e a Topoisomerase II. Esse trímero é o responsável pelo impedimento da transcrição celular, e conseqüentemente, da proliferação celular. Alguns exemplos de CCNS são os antibióticos naturais, como as antraciclina e mitomicina e os Complexos de Coordenação de Platina, que têm a Cisplatina (cis-DDP) como exemplo <sup>1</sup>.

Como o alvo da quimioterapia são as células com alta taxa de divisão mitótica, tem-se como resultado a morte celular tumoral e não tumoral (tecido hematopoiético, do revestimento gastrointestinal, do folículo piloso e do tecido germinativo), resultando em seus efeitos colaterais <sup>7</sup>. Esses são variáveis e imprevisíveis e podem causar morbidade e mortalidade significativas, gerando custos de saúde substanciais devido ao aumento da necessidade de hospitalização relacionada a tais eventos adversos <sup>8,9</sup>.

Fármacos à base de cisplatina {*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]} ainda são os antineoplásicos mais utilizados do mundo. Suas propriedades anticancerígenas foram descobertas em meados da década de 1960, por Resenberg e colaboradores. O seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que o seu alvo é a molécula de DNA, que sofre danos irreversíveis, levando à morte celular, pois a célula torna-se incapaz de se replicar <sup>10</sup>. Tal quimioterápico desempenha um papel importante em alguns tratamentos contra o câncer testicular, de cabeça e pescoço, de ovário, cervical, de bexiga, melanoma, linfomas e câncer de pulmão <sup>11,12</sup>.

O uso quimioterápico da cisplatina tem sido limitado por efeitos colaterais, como a neuropatia periférica, mielossupressão, nefrotoxicidade e distúrbios eletrolíticos, efeitos gastrointestinais, ototoxicidade e

resistência adquirida e intrínseca. Essas toxicidades são doses dependentes, limitando a terapia e a dose máxima tolerada, que está entre 100 e 120mg/ m<sup>2</sup>(I.V.) ou entre 2,5 e 3,0 mg;Kg (I.V.) por ciclo <sup>13,14</sup>.

Diante da ampla gama de efeitos colaterais relacionados à toxicidade do tratamento quimioterápico, torna-se evidente a necessidade de encontrar alternativas de antineoplásicos que sejam mais seletivos para células cancerígenas.

Dentre as neoplasias, o câncer de pulmão (CP) tem sido o mais comum no mundo nas últimas décadas, excetuando-se o câncer de pele não-melanoma. A estimativa mundial apontou incidência de 1,82 milhão de casos novos para o ano de 2012 (12,9% do total), liderando também como principal causa de mortalidade, sendo o responsável por aproximadamente 1 em cada 5 óbitos pelo câncer (1,59 milhão, 19,4% do total) <sup>2</sup>. Conforme o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, a estimativa para o ano de 2014 e 2015 é de 576 mil casos novos de câncer, sendo 4,7% de pulmão. Sem considerar o tumor de pele não melanoma, nos homens trata-se do 2º tipo mais frequente, nas mulheres ocupa o 4º lugar.

O CP é classificado em CP pequenas células (CPPC) e CP não pequenas células (CPNPC). Este grupo corresponde a 85% dos casos e compõe variados tipos histológicos,

como o adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e o carcinoma de células grandes. O estadiamento clínico TNM (T: tumor primário N: linfonodo; M: metástase) do CP baseia-se no tamanho do tumor; envolvimento do brônquio fonte; acometimento de estruturas adjacentes e estruturas específicas (coração, grandes vasos, traqueia e esôfago); acometimento linfonodal e metástases à distância. Estando agrupados nos estádios de Ia a IV.

Sabe-se que o tabagismo está diretamente relacionado à patogênese do CP, assim como a exposição aos carcinógenos ocupacionais e ambientais (amianto, arsênico e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos). Por se tratar de uma doença assintomática em sua fase inicial e não possuir nenhum método de rastreamento, seu diagnóstico, em geral, é feito mais tardiamente explicando em parte, a sua letalidade, comprovada por sua alta razão mortalidade/incidência de 0,86 <sup>4</sup>.

A escolha do tratamento é baseada no TNM, condições clínicas, capacidade funcional (escala ECOG/Zubrod) e preferência do doente <sup>15</sup>. A quimioterapia (QT) consitui principal terapêutica para os estádios III e IV, apesar de também ser usada em estádios mais precoces (IIa e IIb) como tratamento adjuvante com melhora da sobrevida dos pacientes <sup>16</sup>. De acordo com as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do MS do Brasil, o esquema

terapêutico padrão para QT prévia ou adjuvante do CPNPC é a base de Platina. No entanto, estudos clínicos controlados sugerem superioridade, tanto em taxa de resposta quanto em aumento de sobrevida, da QT de 3ª geração (vinorelbine, gemcitabina, paclitaxel, docetaxel e irinotecano) combinados à cisplatina. Estas drogas foram incorporadas em regimes combinados com carboplatina e cisplatina e estudadas em diversos ensaios randomizados de fase III, que evidenciaram, inclusive, atividade de agente único e menor toxicidade que a cisplatina<sup>17,18</sup>. A combinação terapêutica no tratamento do câncer é vantajosa, visto que possibilita atingir células em diferentes estágios do ciclo celular, com aumento da eficácia terapêutica, redução das dosagens e consequentemente redução de toxicidade, assim como redução ou retardo na aquisição de fenótipos de resistência.

Uma metanálise que avaliou 37 ensaios randomizados com um total de 7.633 pacientes concluiu um aumento de 5% na taxa de sobrevida em 1 ano com regime a base de platina. Observou-se também que não houve aumento estatisticamente significativo na sobrevida em 1 ano quando comparados regimes com derivados de platina e regimes baseados exclusivamente em compostos de 3ª geração, o que evidencia a importância dos derivados de platina na terapêutica do CP.

São fatores prognósticos no tratamento do CP: tamanho do tumor maior que 3cm; histologia não escamosos; metástases para múltiplos linfonodos de uma mesma cadeia linfonodal e invasão vascular<sup>16</sup>. Recentemente, vários pesquisadores têm se dedicado ao estudo do potencial antineoplásico de plantas, sendo que alguns destes estudos sugerem capacidade antineoplásica de algumas<sup>19,20</sup>. A *Hevea brasiliensis* (HB), popularmente conhecida como seringueira, uma árvore da família Euphorbiaceae, é comumente encontradas em áreas de clima tropical e úmido. O látex natural extraído da mesma é um sistema polidisperso, em forma de emulsão, com a seguinte constituição: 30-45% de seu peso de moléculas de cis-poliisopreno, 4-5% de proteínas, lipídeos, carboidratos e açúcar e 50% de água, com pequenas modificações nestas concentrações de acordo com a estação do ano em que é coletado e da idade da árvore<sup>21</sup>. Em nosso grupo de pesquisa, alguns estudos em linhagens de células tumorais (dados ainda não publicados) apontam para um potencial antineoplásico do soro total da *Hevea brasiliensis* (HBS), em cinco de sete linhagens tumorais testadas, tendo efeito antineoplásico expressivo em linhagens de leucemia mielocítica, de câncer de ovário com perfil de resistência a múltiplas drogas de maneira surpreendente, afetando pouco a linhagem de células normais testada. Neste estudo, apenas

duas linhagens tumorais não tiveram inibição do crescimento celular, foram elas o câncer de rim e câncer de pulmão não pequenas células. Tendo em vista o impacto do câncer de pulmão no mundo e indícios cinéticos de que o HBS apresenta ação antineoplásica em algumas linhagens tumorais, o presente estudo teve como objetivo investigar a citotoxicidade da fração F3 e do HBS no CPNPC, em linhagem celular NCIH 1975 e investigar a toxicidade da HB em células não tumorais.

### Métodos

**Cultura Celular:** Para os ensaios biológicos foram utilizadas as linhagens aderentes L929 (Fibroblasto murino) e NCI-H 1975 (Carcinoma pulmonar de não-pequenas células). As linhagens celulares foram mantidas em meio específico DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementados com 10% de soro fetal bovino, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de penicilina e 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de estreptomicina, incubadas em estufa (Thermo Scientific) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> segundo protocolo estabelecido pela *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EUA).

**Substância teste:** foram obtidas amostras de soro total da *Hevea brasiliensis*, denominado HBS e amostras da fração denominada F3. As amostras foram gentilmente cedidas pelo Laboratório Pelenova Biotecnologia SA. As

amostras foram filtradas em filtro 0,22  $\mu\text{m}$  de poro, obtendo-se uma concentração de 5mg/ml para o HBS e 0,492  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para o F3. A partir destas soluções foram realizadas diluições seriadas na proporção de 1:10, obtendo-se concentrações finais de 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 0,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para o HBS e 2,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 0,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para o F3.

### Teste de viabilidade celular (Teste MTT)

Para avaliar os efeitos citotóxicos dos compostos classificados como Fração Integral e Fração F3, as linhagens celulares foram semeadas em placas de cultivo de 24 poços na concentração de 4.10<sup>5</sup> de células em 1 mL de meio completo de cultivo celular para a Fração Integral de 2 mL para a Fração F3. Após 24 horas foi verificada a aderência celular e os compostos foram adicionados a cada poço, sendo 100  $\mu\text{L}$  da Fração Integral e 200  $\mu\text{L}$  da Fração F3, nas concentrações de 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 0,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para o primeiro composto e de 2,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 0,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para o último. As placas foram incubadas por 48 horas, e após isso, foi adicionado o composto MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium). As placas foram incubadas novamente por 3 horas. Após 3 horas as placas foram centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos sendo descartado o meio de cultivo. Foi adicionado DMSO em cada poço para lise celular e dissolução dos cristais de azul de formazan. As placas foram colocadas

sobre agitação mecânica por 15 minutos e então 200µL de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços e a viabilidade celular determinada em leitor de microplacas a 570 nm<sup>22</sup>. O método de MTT tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzir brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico (MTT, Sigma), formando cristais insolúveis de formazan de coloração violeta.

#### Análise estatística

Para comparação entre os grupos tratados e controle, foram utilizados Teste T-student e Análise de Variância (Anova), seguido de pós-teste GraphPad Prism 5®. Diferença significativa valores de p menores que 0,05 ( $p < 0.05$ ).

#### Resultados

A atividade citotóxica das substâncias foi avaliada mediante a observação de sua capacidade em diminuir a viabilidade celular. A HBS apresentou discreto efeito sobre a linhagem normal, com diminuição máxima da viabilidade em 30% quando utilizada a concentração de 25 µg ml<sup>-1</sup>. Por outro lado, em relação à linhagem do câncer de pulmão, não se observou qualquer efeito inibitório (Figuras 1 e 2).

Em relação à fração F3, não houve evidência de efeito inibitório sobre a linhagem celular não neoplásica, assim como também não apresentou qualquer efeito inibitório sobre a linhagem de células do câncer de pulmão (Figuras 3 e 4).

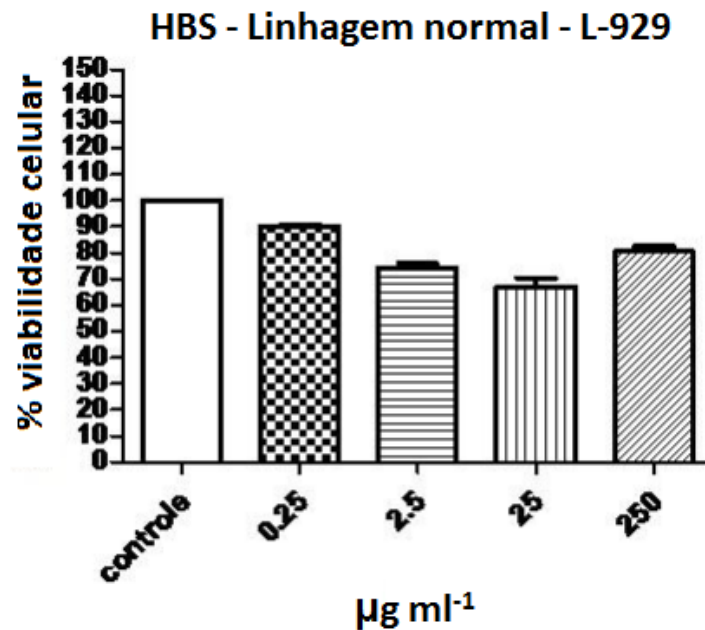


Figura 1 – Atividade da HBS sobre Linhagem normal (L-929)



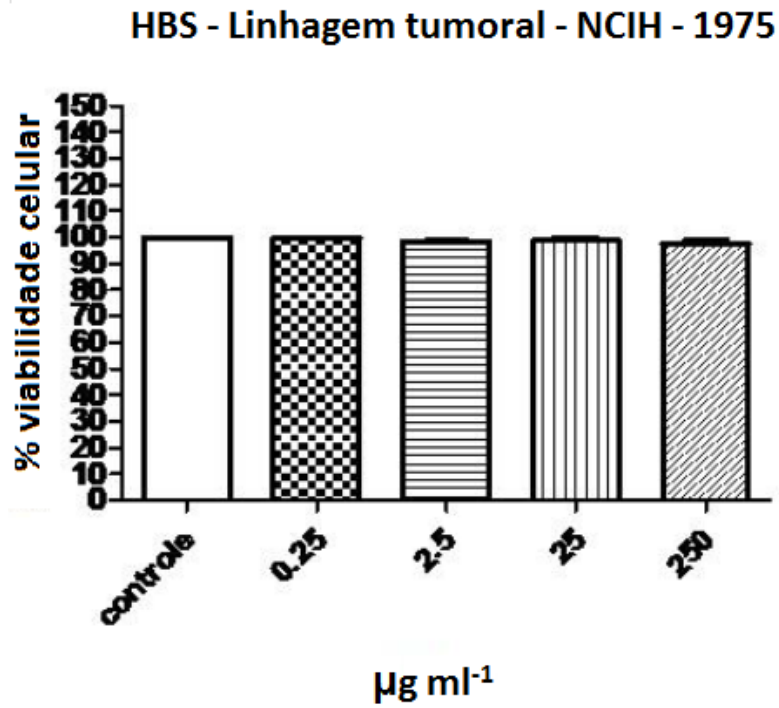


Figura 2: Atividade da HBS sobre Linhagem tumoral (NCIH-1975)

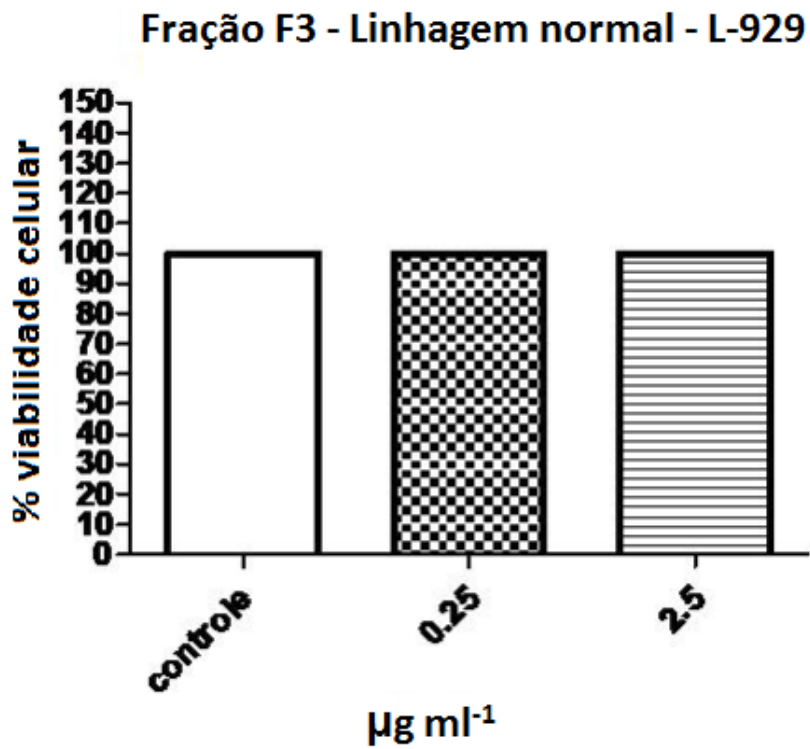


Figura 3: Atividade da fração F3 sobre Linhagem normal (L-929)

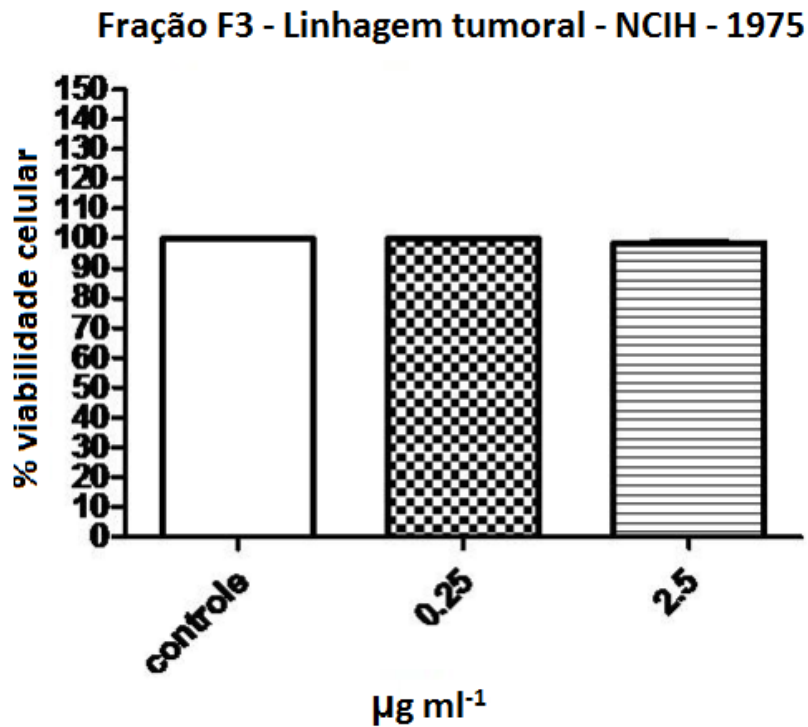


Figura 4: Atividade da fração F3 sobre Linhagem tumoral (NCIH-1975)

### Discussão

O ponto de partida para o início do uso terapêutico do HBS foi a divulgação de resultados favoráveis à sua aplicação como biomaterial. A biomembrana de látex da seringueira, foi desenvolvida no laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e, no ano de 1996, foi reportado o primeiro resultado de sua utilização experimental como substituto do esôfago cervical de cães. Nesse estudo, foi observado um acentuado aumento na vascularização (neoangiogênese), epitelização e neoformação da submucosa esofágica <sup>23</sup>.

A partir da publicação de Mrué, vários autores iniciaram pesquisas buscando novas utilidades terapêuticas para a biomembrana. Dentre as propriedades evidenciadas nesses estudos, destacaram-se: atividade angiogênica - indução de proliferação da muscular da íntima, endotelização e deposição de matriz de fibrina em artéria femoral; cicatrização - granulação de peritoneostomia em cachorros, fechamento de úlceras de membros inferiores e de perfurações em membrana timpânica; biocompatibilidade - substituição parcial do pericárdio de cães, possibilidade de uso como implante vascular e como suporte de transplantes de células encapsuladas isoladas; atividade anti-inflamatória - evidenciada por

modelos experimentais em ratos na doença de Crohn e artrite<sup>24</sup>. Recentemente vários estudos têm apontado para um potencial antineoplásico contido em frações do látex da *Hevea brasiliensis*<sup>25,26</sup>. Em estudos recentes de nosso grupo (ainda não publicados), observou-se importante efeito antineoplásico do soro total da HB, com ação expressiva sobre algumas linhagens e ação inexpressiva sobre as células de carcinoma de rim e de câncer de pulmão não pequenas células. A fração F3 estudada no presente trabalho demonstrou previamente um efeito modulador do processo inflamatório, com importante produção de interleucina-10<sup>25</sup>.

A interleucina-10 é reconhecida como a mais potente citocina anti-inflamatória e atualmente tem sido também reconhecida como moduladora do crescimento e diferenciação das células inatas do sistema imunológico, sugerindo um potencial efeito imunoterapêutico para o câncer<sup>27,28,29</sup>.

### Conclusão

No presente trabalho, a Fração Integral nas concentrações de 250 µg ml<sup>-1</sup>, 25 µg ml<sup>-1</sup>, 2,5 µg ml<sup>-1</sup> e 0,25 µg ml<sup>-1</sup> e a Fração F3 nas concentrações 2,5 µg ml<sup>-1</sup> e 0,25 µg ml<sup>-1</sup> não demonstraram efeito antiproliferativo sobre as linhagens celulares de câncer de pulmão não pequenas células. Entretanto, neste trabalho, somente foi possível estudar as concentrações

descritas. Possivelmente esta fração do látex não exerça efeito inibitório no crescimento desta linhagem do câncer de pulmão, ou eventualmente exerça este efeito em concentrações maiores.

### Referências

1. Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, Montanari CA, Donnici CL. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. Quim. Nova. 2005; 28:118-29.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013.
3. Goss PE, Lee BL, Badovinac-Crnjevic T, Strasser-Weippl K, Chavarri-Guerra Y, St Louis J, et al. Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. Lancet Oncol. 2013; 14(5):391-436.
4. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (BR). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. 2014.
5. Aggarwal BB. Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. In International Journal of Cancer. 2010; 127 (2): 257-68.
6. Masui K, Gini B, Wykosky J, Zanca C, Mischel PS, Furnari FB, et al. A tale of two approaches: complementary mechanisms of cytotoxic and targeted therapy resistance may inform next-generation cancer treatments. Carcinogenesis. 2013; 34: 725-38.

7. Bonassa EMA, Santana TR. *Enfermagem em Terapêutica oncológica*. 3rd ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2005.
8. Sharma R, Cunningham D, Smith P, Robertson G, Dent O, Clarke SJ. Inflammatory (B) symptoms are independent predictors of myelosuppression from chemotherapy in Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) patients--analysis of data from a British National Lymphoma Investigation phase III trial comparing CHOP to PMitCEBO. *BMC Cancer*. 2009; 9: 15.
9. National Cancer Institute. *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) (USA)*. NCI. 2010.
10. Reedijk J. Improved understanding in platinum antitumor chemistry. *Chem. Commun*. 1996; 7: 801-805.
11. D'Addario G<sup>1</sup>, Pintilie M, Leighl NB, Feld R, Cerny T, Shepherd FA. Platinum-based versus non-platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of the published literature. *J Clin Oncol*. 2005 May 1; 23(13): 2926-36.
12. Pizarro AM, Sadler PJ. Unusual DNA models for metal anticancer complexes. *Biochimie*. 2009; 91: 1198-1211.
13. Siddik Z H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003; 22: 7265-79.
14. Santos GC. *Avaliação do efeito protetor do urucum e da bixina sobre a genotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina em células da linhagem PC12 [tese]*. São Paulo: UNESP, Faculdade De Ciências Farmacêuticas; 2008.
15. Ministério da Saúde. *Diretrizes diagnósticas e terapêuticas do Câncer de Pulmão (BR)*. Ministério da Saúde. Brasília. 2012.
16. National Cancer Institute. *Non-Small Cell Lung Cancer Treatment – for health professionals (PDQ®) ( USA)* NCI. 2015.
17. Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG, Sause W, Smith TJ, Baker SJ, et al. American Society of Clinical Oncology Treatment of Unresectable Non-Small-Cell Lung Cancer Guideline: Update 2003. *Journal of Clinical Oncology*. 2004; 22: 330-53.
18. Reis DGC, Baldoto CS, Soares LMC. Avaliação retrospectiva do tratamento quimioterápico neoadjuvante do câncer de pulmão não pequenas células nos anos de 2007 e 2008 no Instituto Nacional de Câncer. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*. 2010; 7(22): 44-48.
19. Liu B, Bian H, Bao J. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters*. 2010; 287:1-12.
20. Varma APH, Shrivastava N. Andrographolide: a new plant-derived antineoplastic entity on horizon. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2009; 11: 1-9.
21. Ferreira M, Mendonça RJ, Coutinho-Netto J, Mulato M, M. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. *Braz. J. Phys*. 2009; 39: 464-569.
22. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for cellular Growth and Survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65: 55-63.
23. Mrué F. *Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex – Estudo experimental em cães [dissertação]*. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 1996.
24. Teixeira LB, Epifânio VLAA, Lachat JJ, Foss NT, Coutinho-Neto J. Oral treatment with Hev. b. 13 prevents experimental arthritis in mice. *Clin Exp Immunol*. 2012; 168: 285–90.
25. Lee YK, Lay LK, Mahsufi MS, Guan TS, Elumalai S, Thong O. Anti-proliferation effect of *Hevea brasiliensis* latex B-serum on human breast epithelial cells. *Pak J Pharm Sci. Pulau Pinang*. 2012; 25(3): 645-50.

26. Lam KL, Yang KL, Sunderasan E, Ong MT. Latex C-serum from *Hevea brasiliensis* induces non-apoptotic cell death in hepatocellular carcinoma cell line (HepG2). *Cell Prolif.* 2012; 45: 577-85.

27. Dennis KL, Blatner NR, Gounari F and Khazaie K. “Current Status of IL-10 and Regulatory T-Cells in Cancer.” *Current opinion in oncology.* 2016; 25(6): 637–45.

28, Yu Z, Liu Q, Huang C, Wu M, & Li G. The Interleukin 10 –819C/T Polymorphism and Cancer Risk: A HuGE Review and Meta-Analysis of 73 Studies Including 15,942 Cases and 22,336 Controls. *OMICS : A Journal of Integrative Biology.* 2013; 17(4): 200–14.