

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES RELACIONADOS AO TRANSPORTE E METABOLISMO DE QUIMIOTERÁPICOS BASEADOS EM PLATINA COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE TOXIDADES EM PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO

Ana Laura Branco Balestero (IC) e Eder de Carvalho Pincinato (Orientador)

Apoio: PIBIC Mackenzie

RESUMO

O câncer de pulmão é o segundo tipo de câncer mais comum no Brasil. O tratamento mais aplicado nestes pacientes é baseado nos derivados de platina, associados a outros quimioterápicos, mas apesar da alta efetividade terapêutica, estes derivados apresentam alta toxicidade, que variam entre os indivíduos. Esta variação pode ser explicada pela genética do indivíduo e estudos que buscam novos biomarcadores preditores de toxicidade são essenciais para uma melhora na eficácia terapêutica. Portanto, este trabalho tem por objetivos verificar a relação de polimorfismo nos genes *GSTM1* e *GSTT1* com as principais toxicidades induzidas por derivados de platina e avaliar novos possíveis biomarcadores de toxicidades em pacientes com câncer de pulmão. Para atingir estes objetivos. Foram obtidos dados demográficos e clínicos dos prontuários de 19 pacientes, além de coleta de sangue para análise dos polimorfismos gênicos. Os polimorfismos foram determinados por PCR multiplex e os resultados foram tabelados em planilha de Excel para análise e confecção dos dados. Observou-se que a maioria dos pacientes são fumantes, não consomem grandes quantidades de álcool, apresentam sobrepeso e hipertensão arterial sistêmica como principal comorbidade. Apresentam em sua maioria toxicidade hematológica associada à anemia. Os genótipos mais frequentes encontrados neste estudo foram o Presente para o polimorfismo *GSTT1* e Ausente para o polimorfismo *GSTM1*. Pode-se inferir que o genótipo Presente para o polimorfismo *GSTT1* e Deletado para o polimorfismo *GSTM1*, apresentaram maior grau de mielotoxicidade. Conclui-se que os polimorfismos nos genes *GSTM1* e *GSTT1* podem ser biomarcadores promissores na previsão de toxicidade ao tratamento com carboplatina.

Palavras-chave: Câncer de Pulmão, polimorfismos gênicos, Glutathione-S-transferase.

ABSTRACT

Lung cancer is the second most common type of cancer in Brazil. The most applied treatment in these patients is based on platinum, associated with other chemotherapeutic agents, but despite the high therapeutic effectiveness, these derivatives have high toxicity, which vary between individuals. This variation can be explained by individual's genetics and studies looking for new biomarkers that predict toxicity are essential for an improvement in therapeutic efficacy. Therefore, this work aims to verify the polymorphism relationship in the *GSTM1* and *GSTT1* genes with main toxicities induced by platinum derivatives and to evaluate new possible biomarkers of toxicities in patients with lung cancer. To achieve these goals. Demographic and clinical data were obtained from the medical records of 19 patients, in addition to blood collection for analysis of gene polymorphisms. Polymorphisms were determined by multiplex PCR and the results were tabulated in an Excel spreadsheet for analysis and data preparation. It was observed that most patients are smokers, do not consume large amounts of alcohol, are overweight and have arterial hypertension as the main comorbidity. They mostly present hematological toxicity associated with anemia. The most frequent genotypes found in this study were the Present for the *GSTT1* polymorphism and Deleted for the *GSTM1* polymorphism. It can be inferred that the Present genotype for the *GSTT1* polymorphism and Deleted for the *GSTM1* polymorphism, showed a higher degree of myelotoxicity. It is concluded that the polymorphisms in the *GSTM1* and *GSTT1* genes can be promising biomarkers in predicting toxicity to treatment with carboplatin.

Keywords: Lung cancer, Genetic polymorphism, Glutathione-S-transferase

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é uma das doenças crônicas mais temidas no mundo (SÓRIA et al., 2009). Tal doença atinge milhões de pessoas do planeta inteiro, independentemente de classe social, cultural ou religiosa, sendo que o impacto do diagnóstico da enfermidade é – na maioria dos casos – angustiante tanto para o doente, como para seus familiares e amigos. Foram cerca de 1,8 milhões de casos novos e 1,5 milhões de óbitos no ano 2012. Para 2020, é estimado mais de 2,2 e 1,9 milhões de casos novos e óbitos, respectivamente (GLOBOCAN, 2017). No Brasil, as estimativas de incidência para o ano de 2016 foram 17,49/100.000 para homens e 10,54/100.000 para mulheres (INCA, 2017).

Os primeiros registros sobre o câncer na história são encontrados em documentos da literatura hindu, no antigo Egito, e na civilização persa, onde se comentava sobre a prática de mastectomia e a existência de tratamentos à base de ervas medicinais. Por diversos anos a enfermidade foi considerada a “encarnação do mal absoluto” (SONTAG, 2007), sendo associado a um desfecho fatal devido à falta de tratamento exitoso, sendo que, após o diagnóstico, não se poderia fazer muito pelos doentes. (LANG, 2014). Atualmente ele continua sendo considerado altamente mortal, mas já existem muitas opções de tratamento, uma delas, considerado o mais eficaz é o tratamento com quimioterápicos a base de platina, porém eles apresentam uma alta taxa de toxicidade e por conta disso, torna-se importante caracterizar e avaliar o impacto destas complicações, observando parâmetros clínicos e laboratoriais que possam estar relacionadas tanto a estas complicações como, eventualmente, a resposta direta ao tratamento.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Atualmente, o câncer de pulmão é a principal causa de morbidade e mortalidade relacionada ao câncer no mundo. É classificado em dois grupos principais de acordo com o tipo histológico, sendo eles o carcinoma de não pequenas células e o de pequenas células. O primeiro grupo engloba todos os tipos histológicos (carcinoma epidermoide, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células) exceto o de pequenas células, que constitui o segundo grupo. Aproximadamente 70% dos casos de câncer de pulmão são os carcinomas de não pequenas células (HENSING, et al., 2014).

O fumo é considerado o mais importante fator de risco modificável para o desenvolvimento do câncer de pulmão, responsável por 75% a 80% dos casos em homens e 50% dos casos nas mulheres (JEMAL, et al., 2011). Dentre os fatores de risco não modificáveis podem ser citados: idade maior ou igual a 50 anos, histórico familiar, gênero (mulheres fumantes apresentam maior risco), etnia (pretos apresentam maior risco quando

comparados com brancos) e fatores socioeconômicos (inversamente proporcional ao risco) (SATEIA et al., 2017).

Apesar dos fatores de risco para o desenvolvimento da neoplasia de pulmão serem bem conhecidos, atualmente, cerca de 75% dos pacientes com câncer de pulmão apresentam doença localmente avançada ou metastática no momento do diagnóstico, porque não existe nenhum método eficaz para o diagnóstico precoce (SATEIA et al., 2017).

As modalidades terapêuticas para o tratamento dos pacientes com câncer de pulmão, dependem inicialmente da definição do tipo de tumor e de seu estadiamento, mas os medicamentos mais efetivos no tratamento destes tumores são os derivados de platina (carboplatina, cisplatina), associados a outros quimioterápicos (paclitaxel, gencitabina, docetaxel, etoposideo), os quais encontram-se disponíveis como quimioterapia de primeira escolha no Sistema Único de Saúde (SUS) (GARCIA-CAMPELO, et al., 2015).

Os complexos derivados de platina como agentes citotóxicos foram identificados pela primeira vez em meados dos anos 60 por Barnett Rosenberg e colaboradores (ROSENBERG et al., 1965; ROSENBERG et al., 1969). A primeira molécula a ser descoberta foi a cisplatina, cis-diamina-dicloroplatina (II), mostrando-se eficaz no tratamento de cânceres de testículo, cânceres ginecológicos (principalmente o de ovário), gastrointestinais, geniturinários, de pulmão, e o câncer de cabeça e pescoço (REED, 2005).

A carboplatina, assim como a cisplatina, se liga covalentemente ao DNA, formando complexos platina-DNA, que induzem a célula à apoptose, porém, ao contrário da cisplatina, a carboplatina é mais estável no plasma. Devido às diferenças farmacocinéticas, a carboplatina é menos tóxica e frequentemente é utilizada em pacientes que não toleram a cisplatina, seja pelos seus efeitos tóxicos ou pela intensa hidratação necessária para sua infusão (ANDO, et al., 2014).

Conforme descrito, os derivados de platina são quimioterápicos de alto potencial antineoplásico com farmacocinética favorável, mas apesar de serem considerados as opções terapêuticas mais efetivas, os derivados de platina apresentam uma alta toxicidade, manifestadas por nefrotoxicidade, toxicidades gastrointestinais, hepatotoxicidade e mielotoxicidade.

2.1. Nefrotoxicidade

A nefrotoxicidade é estimada em 20 a 30% dos pacientes tratados com cisplatina, que desenvolvem severa disfunção renal, mesmo após hidratação salina e diurese no momento da infusão. Isso pode ser explicado pelo fato de que a excreção dos derivados de platina ocorre predominantemente por filtração glomerular e, em menor extensão, por secreção tubular. O rim é capaz de acumular o quimioterápico em maior quantidade que outros órgãos

e a concentração do fármaco nas células epiteliais do túbulo proximal pode chegar a ser cinco vezes maior do que na corrente sanguínea (KUHLMANN et al., 1997; KRÖNING et al., 2000; ARANY e SAFIRSTEIN, 2003). A insuficiência renal costuma se iniciar alguns dias após a administração de cisplatina, evidenciada pelo aumento da creatinina e ureia sérica, e redução da taxa de filtração glomerular. A recuperação da função renal normalmente ocorre em 2 a 4 semanas, mas pode haver nefrotoxicidade progressiva e permanente, mesmo com as medidas preventivas (PERES et al., 2013).

2.2. *Toxicidade gastrointestinal*

A toxicidade gastrointestinal relacionada, principalmente à cisplatina, envolve náuseas, vômitos e, em menor frequência, diarreia. Esses eventos, embora menos agressivos que os observados na toxicidade renal, são difíceis de controlar e geram falha no tratamento e redução na qualidade de vida do paciente (BALLATORI e ROILA, 2003; BLOEHL-DAUM et al., 2006; BALLATORI et al., 2007; COHEN et al., 2007). O trato gastrointestinal é afetado pelo estresse oxidativo gerado pelo fármaco e, por danos causados às células cromafins entéricas do intestino delgado, capazes de produzir serotonina (5-HT), que por sua vez, ativam os receptores de 5-HT no bulbo, estimulando a zona de gatilho quimiorreceptora e o centro de controle do vômito, provocando assim os reflexos de vômito característicos (HESKETH et al., 2003; HESKETH, 2008).

2.3. *Hepatotoxicidade*

A hepatotoxicidade pode ser observada após administração de altas doses de derivados de platina, ou de baixas doses repetidas, provavelmente por acúmulo no fígado (CVITKOVIC, 1998; FENOGLIO et al., 2005). Alguns estudos sugerem que o estresse oxidativo gerado pela cisplatina tem um importante papel neste processo (CVITKOVIC, 1998; MORIEL, 2017). Martins et al. (2008) demonstraram que a cisplatina aumenta as enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), altera o metabolismo energético no fígado, causa enrijecimento da membrana hepática, peroxidação lipídica, dano oxidativo à cardiolipina e de proteínas com grupos sulfidril, além de indução de morte celular hepática por apoptose, via mitocôndria.

2.4. *Mielotoxicidade*

A leucopenia pode estar relacionada à redução de neutrófilos e/ou linfócitos e a mielossupressão é observada em 25 a 30% dos pacientes tratados com carboplatina. Em

um estudo desenvolvido por Bar-Sela et al. (2003), metade dos pacientes tratados com carboplatina desenvolveram severa mielotoxicidade, com predomínio de neutropenia e trombocitopenia. A anemia induzida pelos derivados de platina ocorre por aplasia, hemólise e deficiência de eritropoietina secundária à nefrotoxicidade. A depleção de glutathione e o estresse oxidativo induzidos pelo quimioterápico levam à mielossupressão e hematotoxicidade (KHYNRIAM e PRASAD, 2001; DLOTT et al., 2004; OLAS et al., 2004; GAO et al., 2006; VANDENDRIES e DREWS, 2006; SON et al., 2011; GAO et al., 2013).

2.5. Polimorfismos nos genes das GSTs

Os genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* codificam as enzimas GSTs M1 (GSTM1), T1 (GSTT1) e P1 (GSTP1), respectivamente. Estas enzimas são também de extrema importância na detoxificação de fase II, envolvidas na conjugação de substratos tóxicos à célula, catalisando a conjugação do peptídeo glutathione (GSH) a estes compostos, tornando-os hidrofílicos e mais facilmente excretados pela urina (MOYER et al., 2010).

Diante deste mecanismo de ação, pode-se supor que polimorfismos nestes genes influenciam a detoxificação de xenobióticos, dentre eles os quimioterápicos baseados em platina, alterando a resposta terapêutica e toxicidade ao tratamento. Carron et al. (2017) avaliaram a influência de diversos polimorfismos na toxicidade à cisplatina em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e observaram que dentre outros polimorfismos, o polimorfismo GSTP1 Ile/Ile estava associado ao maior risco de vômito severo a moderado, porém existem ainda dados controversos em relação ao papel dos polimorfismos das GSTs em pacientes com câncer de pulmão tratados com quimioterapia baseada em platina.

2.6. Justificativa

Acredita-se que este estudo contribuirá para o melhor entendimento das toxicidades causadas pelos medicamentos baseados em platina, e consequentemente uma melhora do tratamento antineoplásico. As toxicidades geradas são extremamente impactantes na vida dos pacientes, uma vez que muitos deles acabam diminuindo a dose do quimioterápico, ou até mesmo mudando de protocolo de tratamento devido a essas reações. A diminuição de dose e mudança de protocolo faz com que os pacientes tenham que receber tratamentos muitas vezes menos eficazes.

A necessidade da pesquisa de novos biomarcadores se dá pelo fato de que os marcadores tradicionais são geralmente pouco sensíveis. Essa falta de sensibilidade e especificidade pode gerar resultados falsos positivos ou falsos negativos, levando a uma

detecção tardia da lesão renal ou levando a conclusões falsas (HERRERA-PÉREZ et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Verificar a relação de polimorfismo nos genes *GSTM1* e *GSTT1* com as principais toxicidades induzidas por derivados de platina e avaliar novos possíveis biomarcadores de toxicidades em pacientes com câncer de pulmão.

3.2. Objetivos Específicos

Caracterizar os pacientes quanto à idade, sexo, peso, altura, cor da pele, presença de traqueostomia para respiração e sonda para alimentação, Índice de Karnofsky (KPS) (Karnofsky e Burchenal, 1946), escolaridade, situação de trabalho, renda familiar, estado civil, tabagismo/etilismo; e dados referentes ao tumor, como localização e graduação histopatológica (obtidos do laudo da biópsia), estadiamento e estadiolocalização do tumor, graduação histopatológica, estadiamento, estadio e presença de comorbidades.

Caracterizar os pacientes quanto à nefrotoxicidade, às toxicidades gastrointestinais, hepáticas e à mielotoxicidade à platina;

Determinar a ocorrência de polimorfismos nos genes *GSTM1* e *GSTT1*.

4. METODOLOGIA

4.1. Caracterização dos pacientes

Foram recrutados 20 pacientes atendidos no ambulatório de pneumologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Destes, um paciente foi descartado para este estudo por impossibilidade de genotipagem dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1*.

No dia do caso novo e nas consultas subsequentes, foram obtidos dos prontuários, da discussão de caso realizada pela equipe médica e da entrevista com o paciente, dados para caracterização dos sujeitos.

O TCLE foi obtido pelos próprios pesquisadores envolvidos após a leitura plena do documento pelos pacientes e seus acompanhantes.

Foram coletados:

- dados demográficos: identificação, dados para contato, idade, sexo, peso, altura, cor da pele, presença de traqueostomia para respiração e sonda para alimentação, KPS, tabagismo/etilismo;

- dados referentes ao tumor: localização e graduação histopatológica (obtidos do laudo da biópsia), estadiamento e estágio - o estadiamento (TNM) é feito através de tomografia computadorizada de pescoço e tórax e o estágio é determinado com base no TNM.

A coleta de amostras biológicas foi solicitada à enfermeira presente no ambulatório.

4.2. Avaliação das toxicidades

Foram investigadas a nefrotoxicidade, a hepatotoxicidade, as toxicidades gastrointestinais e a mielotoxicidade, induzidas pela carboplatina.

A nefrotoxicidade, a hepatotoxicidade e a mielotoxicidade foram avaliadas através de coletas de sangue que todos os pacientes realizaram antes e 15 dias após a quimioterapia com carboplatina. Os valores basais foram comparados com os valores encontrados após a aplicação de carboplatina e também foram classificadas em relação à gravidade de acordo com os Critérios Comuns de Toxicidade (CTCAE - versão 4) (*US Department of Health and Human Services*, 2010).

Em relação às toxicidades gastrointestinais, foram investigadas a náusea, vômito e diarreia por meio de ligação telefônica ou entrevista pessoalmente no dia 1 (primeiras 24 horas após a quimioterapia) e nos dias 2 ao 5 (de 24 a 120 horas após a quimioterapia) de cada ciclo do tratamento, e foram classificadas em relação à gravidade de acordo com Critérios Comuns de Toxicidade (CTCAE - versão 4) (*US Department of Health and Human Services*, 2010).

Os parâmetros analisados de hepatotoxicidade foram: AST, ALT, GGT, ALP e bilirrubinas. Os parâmetros analisados para nefrotoxicidade foram: creatinina sérica, estimativa do *clearance* de creatinina (Fórmula de Cockcroft-Gault), ureia, ácido úrico, sódio, magnésio, cálcio, fósforo e potássio. E aqueles analisados para mielotoxicidade foram: hemoglobina, leucócitos, neutrófilos, linfócitos e plaquetas.

4.3. Análise dos polimorfismos

Foram coletados 4 mL de sangue, em tubos contendo EDTA como anticoagulante, que foram utilizados para genotipagem. O isolamento do DNA foi realizado por procedimentos padronizados (Wizard® genomic DNA purification Kit, Promega). Após a última etapa de hidratação do DNA, as amostras foram armazenadas em geladeira para quantificação.

A quantificação do DNA foi avaliada através do equipamento QuantiFluor® (TM) dsDNA System, Promega. E as amostras de DNA foram então armazenadas em freezer a temperatura de -20°C até a determinação dos polimorfismos.

Fragmentos dos éxons 4 e 5 do gene *GSTM1* e fragmentos do éxon 4 e do íntron 4 do gene *GSTT1* foram amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex. Fragmento do gene da beta globina, incluindo o éxon 3 e os íntrons 2 e 3, foi amplificado na mesma reação e serviu como controle da amostra de DNA. A PCR multiplex foi realizada em mistura de 25 µL de tampão GoTaq® G2 Hot Start Master Mixes (Promega), 1 µL de cada iniciador (100 pmol) e 50 ng de DNA, em um volume final de 50 µL.

A reação foi conduzida inicialmente, por um ciclo de 94°C por 5 minutos, para inativação de proteases que podem interferir na reação enzimática e ativação da Taq polimerase do Master Mix, posteriormente, por 32 ciclos de amplificação em termociclador (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Cada ciclo foi realizado sob as condições: 94°C por 1 minuto; 62°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Ao término dos 32 ciclos, o produto foi mantido a 72°C por 7 minutos, completando um único ciclo. A seguir, as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C.

Fragmentos de 273 pares de bases (pb), 480 pb e 630 pb foram obtidos com a amplificação das regiões específicas dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e beta-globina, respectivamente. A presença ou a deleção homozigótica dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 2,0%. Os genótipos só foram avaliados quando foi identificado o fragmento correspondente à amplificação do gene da beta-globina. Controles positivo e negativo foram utilizados em todas as reações.

4.4. *Análise dos resultados*

As informações foram documentadas inicialmente em formulários padronizados e em seguida armazenados em planilha do Excel® periodicamente. Foram realizadas análises descritivas com apresentação de frequências absolutas/percentuais para as variáveis categóricas e medidas de posição (média) e dispersão (desvio-padrão) para as variáveis numéricas.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos pacientes

Os dados demográficos dos 19 pacientes incluídos no estudo estão representados na tabela 1 e os dados clínicos na tabela 2.

Tabela 1. Dados demográficos dos pacientes.

Dados demográficos	Todos Pacientes n = 19
Idade (média ± desvio padrão, anos)	63,7 ± 5,0
Sexo (n, %)	
Masculino	4 (21,0)
Feminino	15 (79,0)
Cor da pele	
Branco	18 (94,7)
Não Branco	1 (5,3)
Renda familiar (média ± desvio padrão, SM/pessoa)	2,5 ± 1,2
Situação de trabalho (n, %)	
Empregado	3 (15,8)
Aposentado	8 (50,0)
Afastado pela doença	4 (21,0)
Desempregado	4 (21,0)
Afastado por outra condição	0 (0,00)
Anos de estudo (média ± desvio padrão, anos)	6,3±4,8
Escolaridade (n, %)	
Nunca estudou	2 (10,5)
Fundamental incompleto	10 (52,6)
Fundamental completo	1 (5,3)
Médio incompleto	2 (10,5)
Médio completo	3 (15,8)
Superior incompleto	0 (0,00)
Superior completo	1 (5,3)
Estado civil (n, %)	
Solteiro	4 (21,0)
Casado	8 (42,1)
Divorciado	6(31,6)
Viúvo	1 (5,3)

Legenda: n= número absoluto de paciente; SM = salário mínimo;

Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes.

Dados clínicos	Todos Pacientes n = 19
Tabagismo (n, %)	
Não tabagista	8 (42,1)
Tabagista discreto	1 (5,3)
Tabagista moderado	2 (10,5)
Tabagista acentuado	8 (42,1)
Etilismo (n, %)	
Abstêmio	13 (68,4)
Etilista discreto	2 (10,5)
Etilista moderado	1 (5,3)
Etilista acentuado	2 (10,5)
Etilista mais que acentuado	1 (5,3)
IMC (média $\pm$ desvio padrão, Kg/m²)	27,9 $\pm$ 8,0
KPS (n, %)	
100	14 (73,7)
90	5 (33,3)
Tipo Histológico (n, %)	
CEC	5 (41,7)
Adenocarcinoma	7 (58,3)
Comorbidades (n, %)	
Sem comorbidades	6 (31,6)
Hipertensão arterial sistêmica	10 (52,6)
Diabetes melito	6 (31,6)
Outras*	3 (15,8)

n= número absoluto de paciente; KPS = Karnofsky Performance Status.

*=hipercolesterolemia, DPOC.

A maioria dos participantes do estudo eram fumantes (57,9%) e dentre estes, 72,7% foram classificados como tabagistas acentuados. Em relação ao etilismo, a maioria (68,4%) era abstêmio. O índice de massa corpórea teve uma média de 27,9 $\pm$ 8,0 Kg/m², classificados na média como sobrepeso. A maior parte dos pacientes apresentaram KPS de 100 (73,7%) e apresentavam hipertensão arterial sistêmica como principal comorbidade associada.

5.2. Reações Adversas e Graus de Toxicidade

5.2.1. Reações Adversas Hematológicas

Todos os pacientes incluídos no estudo realizaram coletas de sangue para avaliação de reações adversas hematológicas antes e após o primeiro ciclo de quimioterapia. Os valores de hemoglobina, leucócitos, neutrófilos, linfócitos e plaquetas basais, bem como nos 15 e 20 dias após o primeiro ciclo de quimioterapia estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de hemoglobina, leucócitos, neutrófilos, linfócitos e plaquetas basais, 15 e 20 dias após o primeiro ciclo de quimioterapia com carboplatina (média $\pm$ desvio padrão) (n = 19).

Parâmetros	Basal	Após 1º ciclo - D15	Após 1º ciclo - D20
Hemoglobina (g/L)	12,6 $\pm$ 1,3	12,3 $\pm$ 0,9	12,3 $\pm$ 2,3
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	8,4 $\pm$ 2,6	5,3 $\pm$ 1,8	7,0 $\pm$ 2,7
Neutrófilo ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	5,6 $\pm$ 2,0	3,0 $\pm$ 1,5	4,4 $\pm$ 2,4
Linfócito ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	2,4 $\pm$ 0,6	2,2 $\pm$ 1,2	2,3 $\pm$ 0,9
Plaqueta ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	329,6 $\pm$ 83,4	275,0 $\pm$ 86,0	270,8 $\pm$ 87,1

Legenda: D15: 15º dia a partir da primeira quimioterapia; D20: 20º dia a partir da primeira quimioterapia.

As alterações hematológicas apresentadas pelos pacientes também foram avaliadas e classificadas em relação à gravidade de 0 a 4, de acordo com os Critérios Comuns de Toxicidade (CTCAE - versão 4), conforme descrito na Tabela 4. A tabela mostra o maior grau de toxicidade após a quimioterapia, considerando o 15º e 20º dia após o primeiro ciclo de carboplatina.

Tabela 4. Graus de reações adversas hematológicas após primeiro ciclo de quimioterapia com carboplatina (frequência absoluta e frequência relativa) (n = 19).

	Graus de toxicidade - Primeiro ciclo				
	Número absoluto (Porcentagem)				
	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Anemia	8 (42,1)	11 (57,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Leucopenia	15 (79,0)	2 (10,5)	2 (10,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
Neutropenia	15 (78,9)	3 (15,8)	1 (5,3)	1 (8,3)	0 (0,0)
Linfopenia	17 (89,5)	1 (5,3)	1 (5,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
Plaquetopenia	17 (89,5)	2 (10,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Analisando-se as tabelas 3 e 4, é possível verificar uma redução para quase todos os parâmetros hematológicos após o primeiro ciclo de tratamento com carboplatina, com predomínio de grau 1 para anemia e grau 0 para os demais parâmetros hematológicos.

5.2.2. Reações adversas gastrointestinais

Os graus de toxicidade de náusea, vômito e diarreia foram avaliados nos cinco primeiros dias (D1 ao D5) subsequentes a quimioterapia com carboplatina. Os graus de toxicidade e suas respectivas frequências estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Graus de toxicidade gastrointestinal em frequência absoluta e em porcentagem (n = 19).

	Graus de toxicidade - Primeiro ciclo Número absoluto (Porcentagem)				
	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Náusea	14 (73,7)	4 (21,0)	0 (0,0)	1 (5,3)	0 (0,0)
Vômito	17 (89,5)	1 (5,3)	0 (0,0)	1 (5,3)	0 (0,0)
Diarreia	17 (89,5)	2 (10,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Observando a Tabela 5, é possível verificar uma frequência muito baixa de reação adversa vômito e diarreia. Apresentaram náusea aproximadamente 25 % dos pacientes, mas, em sua grande maioria, de grau leve.

5.2.3. Reações adversas renais

As alterações renais ocasionadas pelo primeiro ciclo de carboplatina foram acompanhadas antes, 15 e 20 dias após a quimioterapia, por meio dos parâmetros descritos na Tabela 6. Além disso, as reações foram classificadas em graus de toxicidade, com exceção da ureia que não possui classificação determinada pelo CTCAE, conforme demonstrado na Tabela 7.

Tabela 6. Valores de creatinina sérica, *clearance* de creatinina, ureia, ácido úrico, sódio, potássio, magnésio, fósforo inorgânico e cálcio antes, 15 e 20 dias após primeiro ciclo de quimioterapia com carboplatina (média $\pm$ desvio padrão) (n = 19).

Parâmetros	Basal	Após 1º ciclo - D15	Após 1º ciclo - D20
Creatinina (mg/dL)	0,73 $\pm$ 0,23	0,65 $\pm$ 0,17	0,72 $\pm$ 0,13
<i>Clearance</i> de Creatinina (mL/min)	100,64 $\pm$ 34,36	112,45 $\pm$ 19,85	99,05 $\pm$ 22,96
Ureia (mg/dL)	31,58 $\pm$ 14,09	34,26 $\pm$ 14,37	29,58 $\pm$ 14,29
Ácido úrico (mg/dL)	4,06 $\pm$ 0,63	4,07 $\pm$ 0,95	3,93 $\pm$ 0,95
Sódio (mEq/L)	137,42 $\pm$ 3,69	135,89 $\pm$ 4,00	136,11 $\pm$ 3,18
Potássio (mEq/L)	4,46 $\pm$ 0,32	4,23 $\pm$ 0,62	4,01 $\pm$ 0,44
Magnésio (mEq/L)	1,56 $\pm$ 0,27	1,43 $\pm$ 0,29	1,52 $\pm$ 0,26
Fosfato inorgânico (mg/dL)	3,79 $\pm$ 0,50	3,48 $\pm$ 0,46	3,84 $\pm$ 0,51
Cálcio (mg/dL)	9,46 $\pm$ 0,46	9,24 $\pm$ 0,32	9,03 $\pm$ 0,34

Legenda: D15: 15º dia a partir da primeira quimioterapia; D20: 20º dia a partir da primeira quimioterapia.

Tabela 7. Grau de reação adversa renal obtido a partir de diferentes parâmetros após o primeiro ciclo de quimioterapia com carboplatina (n = 19).

Parâmetros	Graus de toxicidade - Primeiro ciclo Número absoluto (Porcentagem)				
	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Aumento da creatinina sérica	17 (89,5)	2 (10,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Redução do clearance de creatinina	12 (63,2)	7 (36,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Hiperuricemia	18 (94,7)	1 (5,3)	-*	0 (0,0)	0 (0,0)
Hiponatremia	12 (63,2)	7 (36,8)	-*	0 (0,0)	0 (0,0)
Hipocalemia	18 (94,7)	1 (5,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Hipomagnesemia	15 (78,9)	3 (15,8)	1 (5,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
Hipofosfatemia	19 (100,0)	-*	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Hipocalcemia	15 (78,9)	4 (21,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

*Não há grau segundo CTCAE

Nota-se que não houveram alterações evidentes na média dos parâmetros laboratoriais realizados nos dias 15 e 20 após o primeiro ciclo de carboplatina. Em relação aos graus de toxicidade, a maioria dos pacientes apresentaram grau zero de toxicidade em todos os parâmetros avaliados, porém, com tendência a um aumento de toxicidade de grau 1 para a redução do *clearance* de creatinina e hiponatremia.

5.2.4. Reações adversas hepáticas

As reações adversas hepáticas foram acompanhadas antes, 15 e 20 dias após o 1º ciclo de quimioterapia com carboplatina pela verificação dos parâmetros descritos na Tabela 8. As alterações na função hepática destes pacientes também foram avaliadas quanto à gravidade e classificadas de grau 0 a 4, conforme descrito na Tabela 9, exceto para os parâmetros gamaglutamiltransferase (GGT) e proteínas totais que não possuem classificação determinada pelo CTCAE.

Tabela 8. Valores de albumina (ALB), bilirrubina total (BT), gama glutamiltransferase (GGT), proteínas totais, fosfatase alcalina (FALC), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) antes, 15 e 20 dias após o primeiro ciclo de quimioterapia com carboplatina (média $\pm$ desvio padrão) (n = 19).

Parâmetros	Basal	Após 1º ciclo – D15	Após 1º ciclo - D20
Albumina (g/dL)	3,8 $\pm$ 0,4	3,7 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,5
Bilirrubina total (mg/dL)	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1
Gama glutamiltransferase (U/L)	73,1 $\pm$ 68,0	63,6 $\pm$ 55,9	62,4 $\pm$ 61,7
Proteínas totais (g/dL)	6,6 $\pm$ 0,6	6,3 $\pm$ 0,8	6,4 $\pm$ 0,6
Fosfatase alcalina (U/L)	120,7 $\pm$ 65,2	107,9 $\pm$ 51,1	107,5 $\pm$ 60,4
Alanina aminotransferase (U/L)	18,6 $\pm$ 12,1	21,2 $\pm$ 12,7	19,2 $\pm$ 14,6
Aspartato aminotransferase (U/L)	16,9 $\pm$ 5,5	16,8 $\pm$ 5,7	16,4 $\pm$ 4,7

Legenda: D15: 15º dia a partir da primeira quimioterapia; D20: 20º dia a partir da primeira quimioterapia.

Tabela 9. Graus de toxicidade hepática em frequência absoluta e em porcentagem (n = 19).

Parâmetros	Graus de toxicidade - 1º ciclo		
	Número absoluto (Porcentagem)		
	Grau 0	Grau 1	Grau 2
Hipoalbuminemia	12 (63,2)	7 (36,8)	0 (0,0)
Aumento da BT	19 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Aumento da FALC	14 (76,7)	5 (26,3)	0 (0,0)
Aumento da ALT	17 (89,5)	2 (10,5)	0 (0,0)
Aumento da AST	19 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Legenda: AST = Aspartato aminotransferase; ALT = Alanina aminotransferase FALC = Fosfatase alcalina; BT = Bilirrubina total.

A respeito das reações adversas hepáticas, alguns parâmetros hepáticos apresentaram grau 1 de toxicidade (hipoalbuminemia, aumento de fosfatase alcalina e de alanina aminotransferase), com predomínio de grau 0 de toxicidade para todos os parâmetros analisados (aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, bilirrubina total e albumina).

5.2.5. Detecção de polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*

Os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foram detectados pela técnica de PCR multiplex, utilizando-se como controle positivo da reação a amplificação do gene da beta-globina. Todos os 19 pacientes tiveram amplificadas as regiões do gene da beta-globina, e, portanto, o genótipo para os genes *GSTM1* e *GSTT1* puderam ser obtidos em todos os pacientes (figura 1).

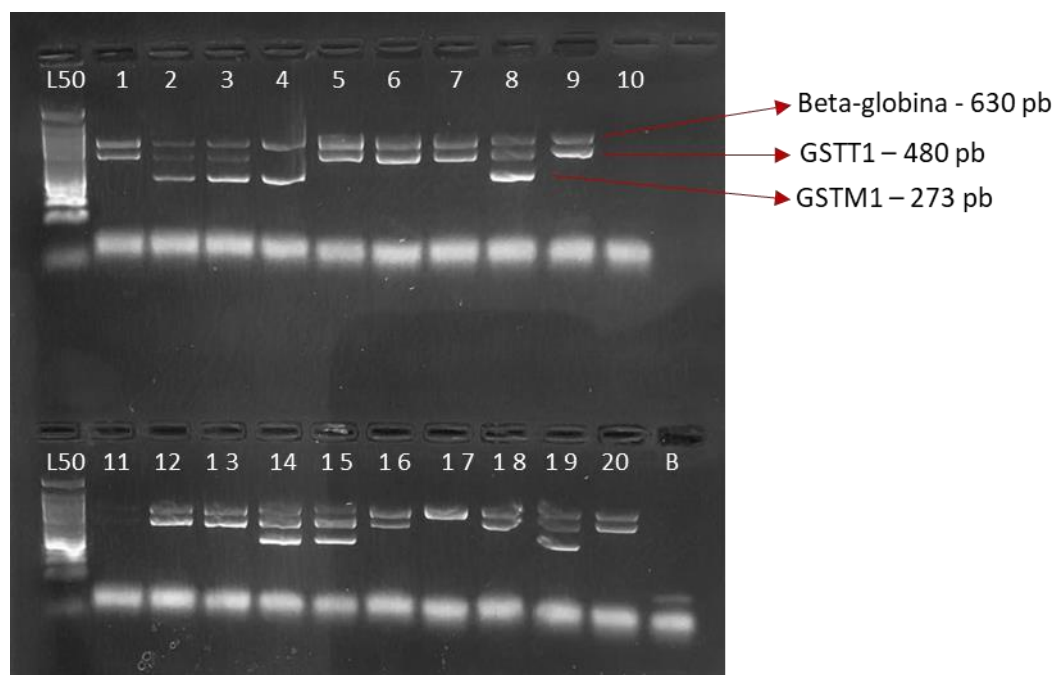


Figura 1. Gel de agarose a 2,0% contendo os fragmentos amplificados por PRC multiplex de 20 pacientes.

Legenda: L50= marcador de peso molecular de 50 pares de base (pb). Os números indicados em cima de cada coluna se referem às identificações laboratoriais dos pacientes estudados. O paciente nº 10 foi desconsiderado neste estudo por impossibilidade de genotipagem. B=branco.

Para 1 dos 20 pacientes originalmente recrutados no estudo não foi possível realizar a determinação de seus polimorfismos pois não houve amplificação de seu DNA mediante a técnica de PCR. Este paciente não foi considerado neste estudo e seus dados não foram considerados nas análises apresentadas anteriormente.

Após análise do gel, os 19 pacientes foram genotipados para os polimorfismos das *GSTM1* e *GSTT1* em Presentes e Deletados, referindo-se à presença (genótipo selvagem) ou ausência (polimorfismo gênico) do gene, respectivamente. Estes dados estão representados na tabela 10.

Tabela 10. Genótipos dos polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* (n = 19).

	Polimorfismos das <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i>	
	Número absoluto (Porcentagem)	
	Presente	Deletado
<i>GSTT1</i>	17 (89,5)	2 (10,5)
<i>GSTM1</i>	7 (36,8)	12 (63,2)

Dos 19 pacientes considerados neste estudo, a maioria (89,5%) apresentou o genótipo presente para o polimorfismo *GSTT1* e a maioria (63,2%) apresentou o genótipo deletado para o polimorfismo *GSTM1*.

O número de pacientes ainda é muito pequeno para poder fazer qualquer análise estatística que seja representativa neste estudo. Porém, foi realizada a seguinte comparação inicial: Como a maior toxicidade à carboplatina encontrada neste estudo foi a hematológica associada à anemia (tabela 4, onde 57,9% dos pacientes apresentaram grau 1 de toxicidade), comparamos os polimorfismos estudados frente a este grau de toxicidade (tabela 11).

Tabela 11. Associação dos polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* e grau de toxicidade hematológica – anemia (n = 19).

Polimorfismos	Pacientes com grau 1 de toxicidade hematológica - ANEMIA	
	Número absoluto (Porcentagem)	
<i>GSTT1</i>	Pré (n = 17)	Del (n = 2)
	11 (64,7)	0 (0,0)
<i>GSTM1</i>	Pré (n = 7)	Del (n = 12)
	3 (42,9)	8 (66,7)

Este dado demonstra que pacientes com os genótipos presente para o polimorfismo *GSTT1* e deletado para o polimorfismo *GSTM1*, apresentam maior grau de anemia, comparados com os pacientes com os genótipos deletado para o polimorfismo *GSTT1* e presente para o polimorfismo *GSTM1*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os pacientes inseridos neste estudo são, em sua maioria, fumantes, não consomem grandes quantidades de álcool, apresentam sobrepeso, bom estado geral, observado pelo índice de Karnofsky e hipertensão arterial sistêmica como principal comorbidade.

Apresentam em sua maioria toxicidade hematológica associada à anemia e não apresentam alterações maiores de nefrotoxicidade e toxicidade gastrointestinal.

Os genótipos mais frequentes encontrados neste estudo foram o Presente para o polimorfismo *GSTT1* e Ausente para o polimorfismo *GSTM1*.

Apesar do baixo número de pacientes, pode-se inferir que o genótipo Presente para o polimorfismo *GSTT1* e Deletado para o polimorfismo *GSTM1*, apresentam maior grau de anemia, comparados com os pacientes com o genótipo Deletado para o polimorfismo *GSTT1* e Presente para o polimorfismo *GSTM1*.

7. REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. **Chem Biodivers**. 2010; vol.7, n.3, p. 66-543
- ANDO, Y, et al. Carboplatin dosing for adult Japanese patients. **Nagoya J Med Sci**. 2014 Feb; vol.76, n.1-2, p.1-9.
- ARANY, I; SAFIRSTEIN, RL. Cisplatin nephrotoxicity. **Semin Nephrol**. 2003; 23(5):460-vol. 4.
- BLAIR, BG, et al. Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin. **Clin Cancer Res**. 2009; vol.15, n.13, p.21-4312.
- BRASIL. **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em Oncologia**. Ministério da Saúde, 2014.
- CIARIMBOLI, G, et al. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. **Am J Pathol**. 2005; vol.167, n.6, p.84-1477.
- CORVÒ, R. Evidence-based radiation oncology in head and neck squamous cell carcinoma. **Radiother Oncol**. 2007; vol.85, n.1, p.70-156.
- DHAWAN, D, et al. Genetic variability & chemotoxicity of 5-fluoracil & cisplatin in head & neck cancer patients: a preliminary study. **Indian J Med Res**. 2013; vol.137, p.29-125.
- DOBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer Metastasis Rev**. 2005; vol.24, n.1, p.9-17.
- FRANCESCHI, S, et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx and esophagus in Northern Italy. **Cancer Res**.1990; vol.50, n.20, p.7-6502.
- GARCIA-CAMPELO, R, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) 2015. **Clin Transl Oncol**. 2015 Dec; vol.17, n.12, p.9-1020.
- GAUTIER, JC, et al. Evaluation of novel biomarkers of nephrotoxicity in two strains of rat treated with cisplatin, **Toxicol Pathol**. 2010; vol.38, p.56-943.
- GLOBOCAN. **Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. In: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Acesso em 20/07/2017.
- HASSAN, I, et al. Cisplatin-induced neurotoxicity in vivo can be alleviated by riboflavin under photoillumination. **Cancer Biother Radiopharm** 2013; vol.28, p.8-160.
- HAYASHI, S, et al. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIIE1 gene. **J Biochem**. 1991; vol.110, p.65-559.
- HENSING, T, et al. A personalized treatment for lung cancer: molecular pathways, targeted therapies, and genomic characterization. **Adv Exp Med Biol**. 2014; vol.79, p.85-117.
- HERRERA-PÉREZ, Z, et al. A comprehensive review on the genetic regulation of cisplatininduced nephrotoxicity. **Curr Genomics**. 2016; vol.17, p.93-279.
- HILL, JM, et al. Clinical studies of Platinum Coordination compounds in the treatment of various malignant diseases. **Cancer Chemother Rep**. 1975; vol.59, n.3, p.59-647.

HOHAUS, S, et al. Glutathione S-transferase P1 genotype and prognosis in Hodgkin's lymphoma. **Clin Cancer Res**. 2005; vol.11, n.6, p.2175-2179.

IAMARROM, A, et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 2004; vol.33, n.1, p.8-84.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016-v11: **Incidência de Câncer no Brasil**. In: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/mapa.asp?ID=15>. Acesso em 20/07/2017.

JEMAL, A, et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**. 2011 Mar-Apr; vol.61, n.2, p.69-90.

KRONING, R, et al. Sulfur-containing amino acids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines. **Cancer Chemother Pharmacol**. 2000; vol.45, n.1, p.9-43.

KUHLMANN, MK, et al. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. **Nephrol Dial Transplant**. 1997; vol.12, n.12, p.80-2478.

LIU, H, et al. Effect of cytochrome P450 2E1 inhibitors on cisplatin-induced cytotoxicity to renal proximal tubular epithelial cells. **Anticancer Res**. 2002; vol.22, p.8-863.

LIU, H; BALIGA, R. Cytochrome P450 2E1 null mice provide novel protection against cisplatin-induced nephrotoxicity and apoptosis. **Kidney Int**. 2003; vol.63, p.168796.

LIU, HE, et al. Multiple Analytical Approaches Demonstrate a Complex Relationship of Genetic and Nongenetic Factors with Cisplatin- and Carboplatin-Induced Nephrotoxicity in Lung Cancer Patients. **Biomed Res Int**. 2014; vol.2014, p.937429.

MARULLO, R, et al. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. **PLoS One**. 2013; vol.8, n.11, p.81162.

MENDELSSOHN, DC, et al. Elevated levels of serum creatinine, recommendations for management and referral. **CMAJ**. 1999; vol.161, p.7-413.

MENDENHALL, WM, et al. **Treatment of head and neck cancers**. In: De Vita VT, Hellman, S, Rosenberg SA. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

MILLER, RP, et al. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. **Toxins (Basel)**. 2010; vol.2, n.11, p.518-2490.

NAKAYAMA, K, et al. Expression and cisplatin sensitivity of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human solid carcinoma cell lines. **Oncol Rep**. 2001; vol.8, n.6, p.7-1285.

PERES, LA; DA CUNHA, AD, Jr. Acute nephrotoxicity of cisplatin: molecular mechanisms. **J Bras Nefrol**. 2013; vol.35, p.40-332.

PÉREZ-RAMÍREZ, C, et al. Contribution of genetic factors to platinum-based chemotherapy sensitivity and prognosis of non-small cell lung cancer. **Mutat Res**. 2017 Jan - Mar; vol.771, p.32-58.

QUINTANILHA, JCF. **Avaliação das reações adversas, qualidade de vida e estresse oxidativo celular em pacientes com câncer de cabeça e pescoço em tratamento com cisplatina e radioterapia**. 2017. 186f. Dissertação (mestrado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.

- RANG, HP, et al. **Rang & Dale Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p.724-25.
- ROSENBERG, B, et al. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**. 1965; vol.205, n.4972, p.9-698.
- ROSENBERG, B, et al. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. **Nature**. 1969; vol.222, n.5191, p.6-385.
- SCRIPTURE, CD, et al. Modulation of cytochrome P450 activity: implications for cancer therapy. **Lancet Oncol**. 2005; vol.6, p.9-780.
- SHAROM, FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. **Pharmacogenomics**. 2008; vol.9, n.1, p.27-105.
- SIEGEL, R, et al. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin**. 2014; vol.64, p.9-29.
- SMITH, HS; TAYLOR, DM. Distribution and retention of the antitumor agent 195mPt-cis-dichlorodiammine platinum (II) in man. **J Nucl Med**. 1974; vol.15, n.5, p.51-349.
- STEWART, DJ, et al. Human tissue distribution of platinum after cis-diamminedichloroplatinum. **Cancer Chemother Pharmacol**. 1982; vol.10, n.1, p.4-51.
- SUZUKI, H; SUGIYAMA, Y. **Transporters for bile acids and organic anions**. In: Membrane Transporters as Drug Targets; 1999. p. 387–439.
- TOYODA, H, et al. HeLa cell transformants overproducing mouse metallothionein show in vivo resistance to cis-platinum in nude mice. **Jpn J Cancer Res**. 2000; vol.91, n.1, p.8-91.
- VERMA, PK, et al. Total antioxidante status of plasma and renal tissue of cisplatin-induced nephrotoxic rats: protection by floral extracts of Calendula officinalis Linn. **Ren Fail**. 2015; vol.38, n.1, p.50-142.
- WANG, A; LAI KN. Drug-induced renal diseases. **Adv Drug React Bull**. 1994; vol.168, p.8-635.
- WASSEEM, M, et al. Cisplatin hepatotoxicity mediated by mitochondrial stress. **Drug Chem Toxicol**. 2015; vol.13, p.1–8.
- YAO, X, et al. Cisplatin nephrotoxicity: a review. **Am J Med Sci**. 2007; vol.334, n.2, p.24-115.

Contatos: laurabalestero@hotmail.com (IC) e eder.pincinato@mackenzie.br
(orientador)