

Artigo original | Original article

Citotoxicidade do *Viscum album* L. em células de carcinoma epidermoide da cavidade bucal

Cytotoxicity of mistletoe (Viscum album L.) in oral squamous cell carcinoma

María Fátima G. Klingbeil,^{I,III} Luiz R. Sardinha,^{II} Moníca B. Mathor,^{III} Décio S. Pinto Júnior^I

^IDepartamento de Patologia Oral, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

^{II}Centro de Pesquisa Experimental do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein.

^{III}Centro de Tecnologia das Radiações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN-CNEN/SP.

Endereço para correspondência: Maria Fátima G. Klingbeil: fakling@usp.br

Palavras-chave: Carcinoma epidermoide de cavidade bucal; *Viscum album*; Iscador; terapia complementar; medicina antroposófica.

Key words: Oral squamous cell carcinoma; *Viscum album*; Iscador; mistletoe; complementary therapy; anthroposophic medicine.

RESUMO

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é uma doença bastante complexa com diversos fatores etiológicos, além de mudanças distintas das estruturas e bases moleculares as quais provocam determinados eventos que culminam no surgimento desses tumores. Globalmente, também é classificada como uma das doenças mais comuns desta região. Principalmente nos países europeus os extratos de *Viscum album* L. (VA) (*mistletoe*) vêm sendo utilizado como terapia coadjuvante, com resultados bastante promissores em diversos tipos de tumores malignos. Estudos *in vitro* demonstraram que vários tipos de VA são capazes de provocar efeitos citotóxicos em células de carcinoma, ativando a cascata apoptótica ou levando as células à necrose. Este estudo teve como objetivo verificar a ação de três tipos de extratos de VA, não estudados anteriormente: Iscador Qu Spezial, Iscador P e Iscador M, em células de linhagem de carcinoma epidermoide de língua (SCC9 e SCC25). A concentração de 0.3 mg/mL (IC₅₀) dos fármacos foi capaz de levar essas células à apoptose. Foi concluído que os extratos de VA possuem efeito citotóxico nas células de carcinoma epidermoide de língua (SCC9 e SCC25), entretanto as SCC9 possuem maior resistência à ação dos fármacos. Iscador Qu Spezial e Iscador M possuem maior potencial citotóxico em ambas as células, quando comparado ao Iscador P.

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma is a complex disease with several etiologic factors and different molecular changes that may trigger certain events; it is also globally one of the most common malignancies in this topography. Extracts from *Viscum album* L. (VA) (*mistletoe*) have been used as adjuvant therapies with promising results in several types of cancer, mainly in European countries. In vitro studies have demonstrated that various types of VA may have cytotoxicity in carcinoma cells, activating the apoptotic cascade or leading cells to necrosis. This study aimed to verify the effect of three types of VA extracts (Iscador Qu Spezial, Iscador P and Iscador M) in cell lines of squamous cell carcinoma of the tongue (SCC9 and SCC25), not previously studied. A concentration of 0.3 mg/mL (IC₅₀) of the drugs was capable to induce apoptosis. It was concluded that VA extracts have a cytotoxic effect on SCC9 and SCC25 cell lines, but while SCC9 cell line was more resistant to the action of the drugs. Iscador Qu Spezial and Iscador M have higher cytotoxic potential in both cell lines compared to Iscador P.

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, hoje considerada a sexta neoplasia mais frequente em todo o mundo¹⁻³ continua tendo como consequência altos índices de mortalidade e de morbidade.⁴ A utilização do tabaco e o consumo do álcool constam como principais fatores de risco.^{5,6} Infelizmente este só é diagnosticado quando os sintomas se fazem presentes, sendo que nesses casos aproximadamente dois terços desses pacientes apresentam estágios avançados da doença no momento do diagnóstico, mesmo apesar do fácil acesso à cavidade oral para exames regulares.^{7,8}

O carcinoma oral continua tendo um prognóstico pobre, com uma estimativa de sobrevida média de 56% aos cinco anos.⁹ Assim, podemos afirmar que dos pacientes diagnosticados anualmente com carcinoma oral, 50% irão morrer nos próximos cinco anos.^{2,10} Apesar dos avanços nas terapias adjuvantes, esses índices nos últimos vinte anos não apresentaram mudanças significativas.¹⁰ O tratamento de escolha até o momento continua sendo a excisão cirúrgica ou a radioterapia, ou ainda uma combinação de ambas.⁹ Ocasionalmente a quimioterapia é utilizada.^{11,12} Além das limitações causadas pelo tratamento cirúrgico, os tratamentos combinados de radioterapia e quimioterapia não alcançam o sucesso esperado e têm alto índice de toxicidade e desconforto para o paciente, diminuindo de maneira drástica a qualidade de vida.^{13,14} Desta forma, ao longo dos anos, a comunidade científica tem se mobilizado na constante busca de novas formas de tratamento.

A carcinogênese é um processo multifatorial que envolve vários eventos moleculares. A desregulação de genes relacionados ao ciclo celular é comum entre esses eventos.¹⁵

O *Viscum album* (VA) é uma planta semiparasita, com composição fitoquímica de grande complexidade, tendo a Europa como seu habitat original.¹⁶ O VA é amplamente utilizado no tratamento complementar do câncer, especialmente na Europa central. Há evidências clínicas que apontam seus efeitos antitumorais, além de estudos *in vitro*, utilizando linhagens celulares de câncer, que demonstraram efeitos citotóxicos que podem desencadear sinais apoptóticos.¹⁶⁻²⁰

Lectinas, viscotoxinas e polissacarídeos são os principais componentes ativos, clinicamente já estudados, do extrato vegetal do VA.¹⁷ A concentração destas substâncias pode variar de acordo com a árvore hospedeira onde o VA se desenvolve. São mais de duzentas espécies hospedeiras conhecidas.^{16,19}

Pela escassez de publicações sobre o efeito do VA em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, os autores do presente trabalho avaliaram a resposta celular de duas linhagens de carcinoma epidermoide de língua, utilizando VA, comercialmente disponível. Os resultados obtidos foram avaliados em termos de viabilidade celular e apoptose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagem celular, reagentes e condições de cultura

Foram utilizadas duas linhagens celulares humanas de carcinoma epidermoide de língua: SCC9 (CRL-1629) proveniente de paciente do sexo masculino, 25 anos de idade, e SCC25 (CRL-1628) proveniente de paciente do sexo masculino, 70 anos de idade, adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EUA). No cultivo dessas células foram utilizados os seguintes reagentes: uma mistura (1:1) de *Eagle Medium* modificado por Dulbecco (DMEM) e F-12, suplementado com 10% de soro bovino, acrescido de penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 mg/ml), anfotericina B (2,5 mg/ml) e glutamina (4 mM). As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. As células foram incubadas por 24 e 48 horas com os respectivos fármacos, à concentração de 0,3 mg/mL, que corresponde à IC₅₀ (concentração inibitória média) a qual foi determinada pelo ensaio utilizando MTS, descrito abaixo. Esta mistura não poderia exceder 10% do volume total do meio de cultivo celular. A citotoxicidade da solução fisiológica, onde os fármacos são diluídos, foi previamente testada e não apresentou nenhum efeito sobre as células.

Fármacos

Iscador® (Weleda AG, Arlesheim, Suíça)* é uma preparação aquosa estéril derivada do *Viscum album* L. cultivado em carvalho (*Quercus*), macieira (*Mali*) e pinheiro (*Pini*) e fermentado com *Lactobacillus plantarum*. Foram utilizadas neste estudo as apresentações Iscador Qu Spezial (*Quercus*) 5 mg, Iscador P (*Pini*) 10 mg e Iscador M (*Mali*) 5 mg.

Determinação de IC₅₀ utilizando o ensaio MTS

Ambas as linhagens celulares foram incubadas em poços de 0,32 cm² de área (3x10³ células por poço), em placas de 96 poços. Os experimentos utilizaram diferentes concentrações de Iscador Qu Spezial. Após 24, 48 e 72 horas de incubação com o fármaco, a viabilidade celular foi avaliada, utilizando um kit de ensaio MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolium] (*Cell-Titer 96 Aqueous One Solution*, Promega).

Utilizando um espectrofotômetro, chegamos aos resultados por meio da leitura da densidade ótica, em valores de absorvância de comprimento de onda de 490 nm. Considerando que a quantidade de princípio ativo de Iscador Qu Spezial é o mesmo que o Iscador M (5 mg/mL) e metade do Iscador P (10 mg/mL), a IC₅₀ do Iscador Qu Spezial foi a mesma utilizada para os outros fármacos.

Análise da apoptose por citometria de fluxo

A apoptose foi avaliada usando um kit de detecção de apoptose Anexina V-FITV/PI (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ,

*N.E.: Atualmente, o medicamento Iscador pertence à Iscador AG, Arlesheim, Suíça.

EUA) seguindo o protocolo do fabricante. Os resultados foram analisados por meio de citometria de fluxo (BD FACSAria) com um *softer* FACSDIVA, versão 6.1.3.U, a fim de distinguir células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e células mortas.

Análise estatística

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para determinar o valor da IC_{50} e no ensaio de apoptose realizado pela citometria de fluxo. Os dados foram analisados usando SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 17.0. Os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Análise das células apoptóticas pelo método Tunel

Nas mesmas condições dos experimentos anteriores, as células apoptóticas foram analisadas utilizando o kit DeadEnd Fluorometric Tunel System – Promega. Para a montagem das lamínulas com as células, foi utilizado o sistema de montagem VectaShield com DAPI (Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA, EUA). As lamínulas foram visualizadas e analisadas qualitativamente em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Este sistema detecta o DNA fragmentado das células apoptóticas, cuja visualização ao microscópio se dá pela coloração verde fluorescente. Por meio da utilização do DAPI, contido na solução de VectaShield, a coloração dos núcleos de todas as células (apoptóticas e viáveis) se dá pelo azul fluorescente.

RESULTADOS

A capacidade do Iscador Qu Spezial em induzir a morte celular é dose e tempo-dependente

Para determinar se o VA teria a capacidade de induzir a morte celular, ambas as linhagens celulares foram tratadas com Iscador Qu Spezial durante 24, 48 e 72 horas com várias concentrações. A viabilidade celular utilizando MTS mostrou a ação tempo-dependente deste fármaco. A IC_{50} de 0,3 mg/mL foi determinada após 48 horas de exposição ($P = 0,011$). Em seguida, foi utilizada a mesma concentração (0,3 mg/mL) para os ensaios com o Iscador M e Iscador P.

Iscador Qu Spezial e Iscador M foram mais eficientes que Iscador P na indução de morte celular em SCC9 e SCC25

Para confirmar o efeito apoptótico de Iscador Qu Spezial, P e M nas linhagens celulares SCC9 e SCC25, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo. Iscador Qu Spezial e M apresentaram melhor efeito apoptótico em ambas as linhagens após 48 horas em comparação com Iscador P (Fig. 1: A e B SCC9, 24 e 48 horas respectivamente e C e D SCC25, 24 e 48 horas respectivamente). Os resultados também corroboram a ação tempo-dependente desses fármacos, uma vez que observamos maior quantidade de células em apoptose após 48 horas do que após 24 horas de exposição aos fármacos. Esses resultados, sumarizados na Figura 1, já foram objeto de publicação anterior.²¹

Os fármacos foram capazes de induzir a apoptose. Iscador Qu Spezial e M foram mais eficazes e as células SCC25 são mais sensíveis aos efeitos dos fármacos que as SCC9

Após 24 horas de incubação, visualmente não se detecta diferenças (Fig. 2: A, C, E, G, I, K, M, O). Após 48 horas observam-se diferenças nos campos com os fármacos Iscador Qu e Iscador M, (Fig. 2: F, H, N, P). Pelos núcleos corados com DAPI, observa-se que a quantidade de células nos campos contendo as células SCC25 é menor (Fig. 2: H, P), principalmente no campo contendo o Iscador Qu (Fig. 2: H). A quantidade de células apoptóticas em todos os campos é bastante semelhante, entretanto, quando avaliamos e comparamos a relação entre a quantidade total de células e a quantidade de células apoptóticas, esses resultados ganham outra dimensão, pois nos campos contendo os fármacos Iscador Qu e Iscador M a quantidade total de células é bem menor. Ao compararmos os campos do Iscador P (Fig. 2: J, L) com o controle (Fig. 2: B, D), notamos um aumento no volume dos núcleos. Os testes utilizando a metodologia do Tunel nos fornecem resultados qualitativos, confirmando a presença de células apoptóticas e comprovando mais uma vez o efeito tempo-dependente dos fármacos analisados.

DISCUSSÃO

A ação *in vitro* do extrato do VA Iscador (Qu Spezial, P e M) foi avaliada em células de carcinoma epidermoide da língua. O teste de viabilidade celular mostrou uma ação tempo-dependente deste fármaco. Na prática clínica, cada ampola destes medicamentos é utilizada duas ou três vezes por semana no tratamento do câncer.²² O efeito do fármaco foi diferente dependendo da célula analisada, como anteriormente observado por outros autores.¹⁶ Eggenchwiler *et al.* observaram que as linhagens celulares derivadas do mesmo tipo de tumor podem ter comportamentos distintos em resposta a um mesmo fármaco.¹⁹ De fato, as células SCC9 parecem ser mais resistentes à apoptose induzida pelo VA quando comparadas com as células SCC25. Assim, nossos resultados corroboram os resultados de testes de viabilidades e citotoxicidade realizados com células de meduloblastoma infantil,¹⁶ carcinoma de bexiga,²⁰ carcinoma ductal e adenocarcinoma de mama,¹⁹ entre outros.²²⁻²⁴

Por outro lado, Iscador Qu Spezial, devido à sua maior concentração de viscotoxinas e lectinas, proporciona um efeito mais acentuado quando comparado aos outros extratos.^{16,17,19,20,25} No teste realizado pelo método Tunel foi observado que após 24 horas as células não apresentaram padrões marcantes de alteração em ambas as linhagens celulares. Em todos os campos foram observadas poucas células em apoptose. Essas células possuem inibição de contato, assim, existe a presença de algumas figuras apoptóticas independente do efeito

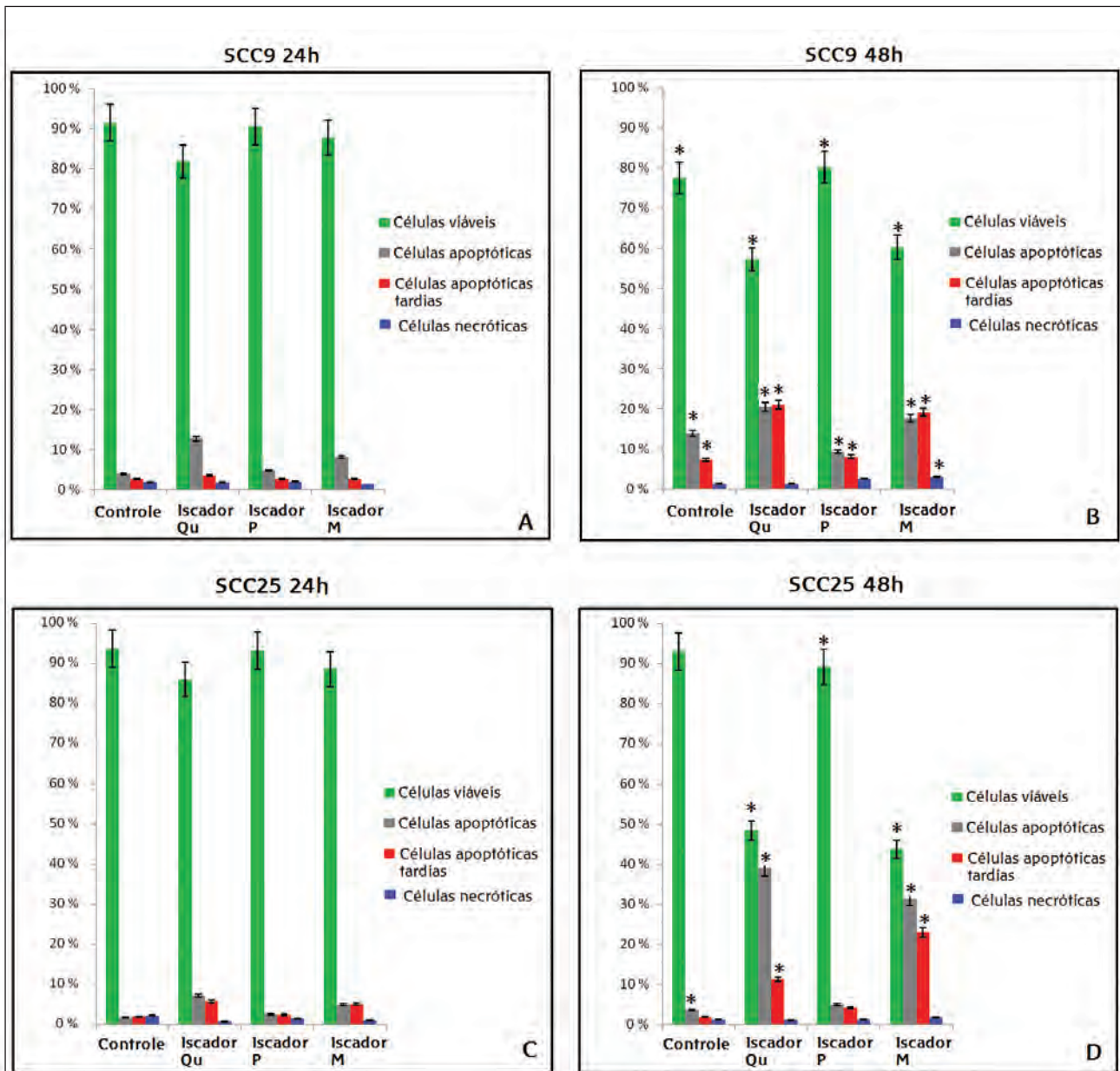


Figura 1. Células viáveis, apoptóticas, apoptose tardia e necróticas, após 24 e 48 horas de incubação com os fármacos: Annexin V-FITV/PI após as análises por citometria de fluxo. $P < 0.05$ (*) comparado os dois tempos 24 e 48 horas. A e B: SCC9 24 e 48 horas respectivamente; C e D: SCC25 24 e 48 horas respectivamente²¹ – reprodução autorizada.

do fármaco. Após 48 horas notou-se (pelos núcleos corados) uma variação na quantidade de células entre os campos analisados. A quantidade de células totais, de ambas as linhagens, em presença dos fármacos Iscador Qu e Iscador M, é menor quando comparada com as células do controle e do Iscador P. Essa diferença é mais acentuada nas células SCC25, ao que parece, pelo motivo de que a SCC9 demonstra ser mais resistente. O efeito que os fármacos exercem sobre cada tipo de célula pode ser diferente.¹⁶ Ao observarmos a Figura 2 notamos que a quantidade de células presente no campo H ainda é menor do

que nos campos N e P. Além da maior sensibilidade das células SCC25, esses resultados confirmam que o Iscador Qu, comparado com o Iscador P e com o Iscador M, muito provavelmente por possuir a maior quantidade de lectinas e viscotoxinas, demonstrou possuir efeito mais citotóxico.^{16,17,19,20} Existem células em apoptose em todos os campos, porém nos campos com menor quantidade de núcleos viáveis a quantidade de células em apoptose é a mesma. Nessas análises observa-se uma diferença morfológica dessas células em ambas as linhagens nos campos contendo o fármaco Iscador P após 48 horas de

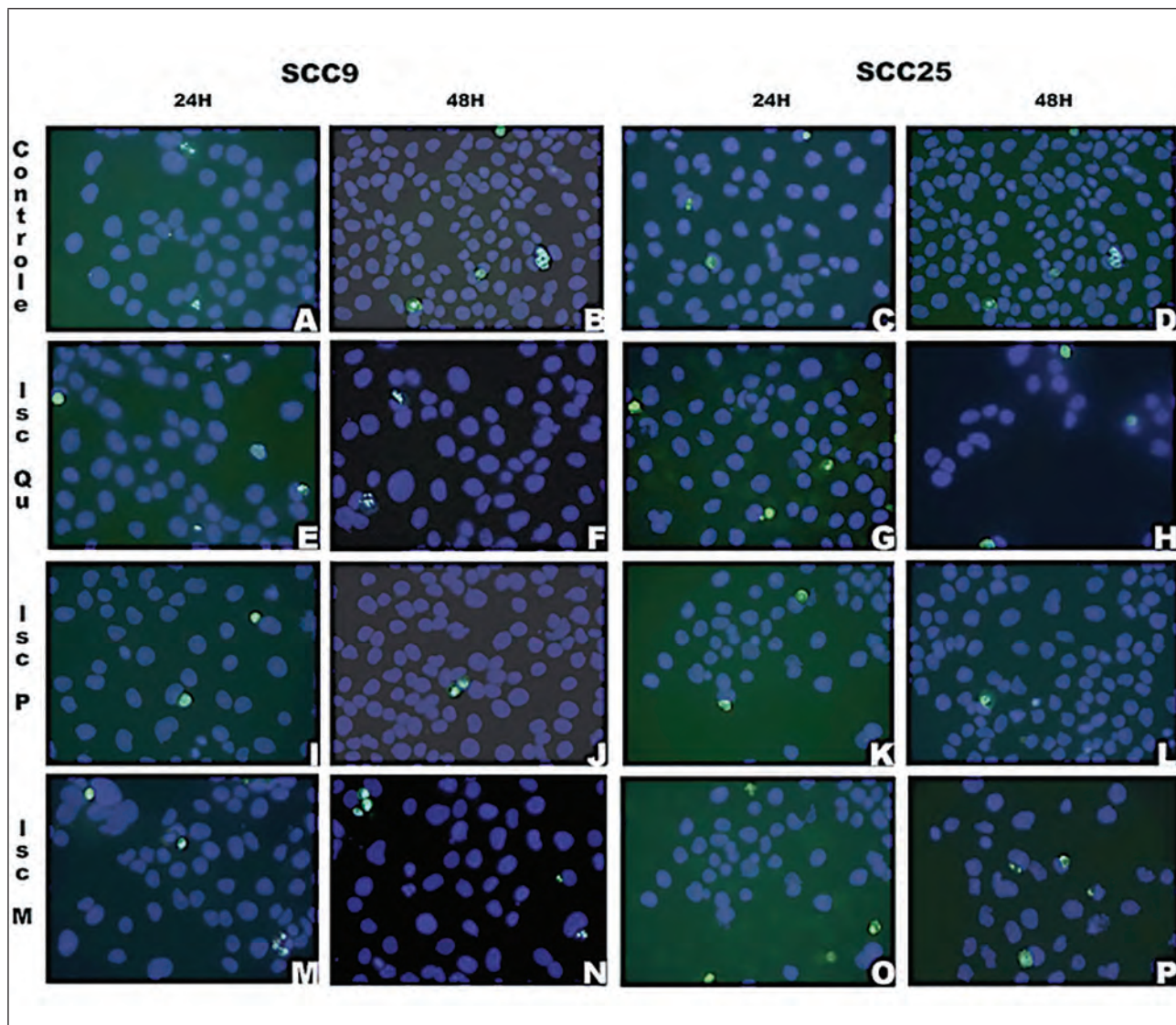


Figura 2. Fotomicrografias das células das linhagens de carcinoma epidermoide de língua SCC9 e SCC25 (x 400), após a detecção de apoptose pelo método TUNEL. A e B: SCC9 controle 24 e 48 horas respectivamente; C e D: SCC25 controle 24 e 48 horas respectivamente; E e F: SCC9 Iscador Qu 24 e 48 horas de incubação respectivamente; G e H: SCC25 Iscador Qu 24 e 48 horas de incubação respectivamente; I e J: SCC9 Iscador P 24 e 48 horas de incubação respectivamente; K e L: SCC25 Iscador P 24 e 48 horas de incubação respectivamente; M e N: SCC9 Iscador M 24 e 48 horas de incubação respectivamente; O e P: SCC25: Iscador M 24 e 48 horas de incubação respectivamente.

incubação. A quantidade de células parece igual ao controle, entretanto essas células possuem um aumento volumétrico, indicando um estágio de diferenciação mais avançado.²⁶ Com base nesses resultados, podemos afirmar que a quantidade de lectinas e viscotoxinas presentes nesses três fármacos possui atividades citotóxicas distintas para cada linhagem celular analisada.^{27,28}

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o Iscador Qu Spezial e o Iscador M são capazes de induzir à apoptose em linhagens celulares SCC9 e SCC25, enquanto que o Iscador P foi menos efi-

ciente em ambas as linhagens. As células da linhagem SCC9 parecem ser mais resistentes à apoptose induzida pelo VA, quando comparadas com as da linhagem SCC25. Nossos resultados sobre os efeitos do VA corroboram outros obtidos anteriormente e sugerem que este fármaco poderia ser utilizado na terapia do carcinoma epidermoide da cavidade bucal, na tentativa de reverter seu prognóstico pobre, ao mesmo tempo melhorar a qualidade de vida do paciente.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Dr. Michael Werner do Instituto Hiscia (Arlesheim, Suíça) por ter fornecido todas as ampolas dos medicamentos testados no presente trabalho.

Declaração de conflito de interesses

Nada a declarar.

Referências bibliográficas

- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2004; 54(1):8-29.
- Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009; 45(4-5):309-16.
- Prince ME, Ailles LE. Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26(10):2871-5.
- Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Opinion – profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(2):127-35.
- Burzynski NJ, Firriolo FJ, Butters JM, Sorrell CL. Evaluation of oral cancer screening. *J Cancer Educ*. 1997; 12(2):95-9.
- Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol*. 2007; 43(6):523-34.
- Epstein JB, Stevenson-Moore P. Benzylamine hydrochloride in prevention and management of pain in oral mucositis associated with radiation therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1986; 62(2):145-8.
- Silverman S Jr, Gorsky M. Epidemiologic and demographic update in oral cancer: California and national data - 1973 to 1985. *J Am Dent Assoc*. 1990; 120(5):495-9.
- Kademani D. Oral cancer. *Mayo Clin Proc*. 2007; 82(7):878-87.
- Sklenicka S, Gardiner S, Dierks EJ, Potter BE, Bell RB. Survival analysis and risk factors for recurrence in oral squamous cell carcinoma: does surgical salvage affect outcome? *J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 68(6):1270-5.
- Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*. 2009; 45(4-5):301-8.
- Gold KA, Lee H-Y, Kim ES. Targeted therapies in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 2009; 115(5):922-35.
- Corvo R. Evidence-based radiation oncology in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol: J Eur Soc Therap Radiol Oncol*. 2007; 85(1):156-70.
- Bernier J. Current state-of-the-art for concurrent chemoradiation. *Semin Rad Oncol*. 2009; 19(1):3-10.
- Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2009; 45(4-5):324-34.
- Zuzak TJ, Rist L, Eggenschwiler J, Grotzer MA, Viviani A: Paediatric medulloblastoma cells are susceptible to *Viscum album* (mistletoe) preparations. *Anticancer Res*. 2006; 26(5A):3485-92.
- Goedings P. Über die bildung von *Viscum album* L. Element der Naturwissenschaft. 1997; 67(2):1-23.
- Molassiotis A, Scott JA, Kearney N, Pud D, Magri M, Selvekerova S et al. Complementary and alternative medicine use in breast cancer patients in Europe. *Support Care Cancer*. 2006; 14(3):260-7.
- Eggenschwiler J, Patrignani A, Wagner U, Rehrauer H, Schlapbach R, Rist L, Ramos MH, Viviani A. Gene expression profiles of different breast cancer cells compared with their responsiveness to fermented mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador from oak (*Quercus*), pine (*Pinus*), white fir (*Abies*) and apple tree (*Malus*) in vitro. *Arzneimittelforschung/Drug research*. 2006; 56(6A):483-96.
- Urech K, Buessing A, Thalmann G, Schaefermeyer H, Heusser P: Antiproliferative effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extract in urinary bladder carcinoma cell lines. *Anticancer Res*. 2006; 26(4B):3049-55.
- Klingbeil MF, Xavier FC, Sardinha LR, Severino P, Mathor MB, Rodrigues RV, Pinto DS Jr. Cytotoxic effects of mistletoe (*Viscum album* L.) in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oncol Rep*. 2013; 30(5):2316-22.
- Matthes H, Friedel WE, Bock PR, Zänker KS. Molecular mistletoe therapy: friend or foe in established anti-tumor protocols? A multicenter, controlled, retrospective pharmaco-epidemiological study in pancreas cancer. *Curr Mol Med*. 2010; 10(4):430-9.
- Kelter G, Fiebig HH. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 26 human tumor cell lines by mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador in vitro. *Arzneimittelforschung*. 2006; 56(6A):435-40.
- Urech K, Schaller G, Ziska P, Giannattasio M. Comparative study on the cytotoxic effect of viscotoxin and mistletoe lectin on tumor cells in culture. *Phytother Res*. 1995; 9(1):49-55.
- Maier G, Fiebig HH: Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts in vitro. *Anti-Cancer Drugs*. 2002; 13(4):373-9.
- Barrandon Y, Green H. Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 1985; 82(16):5390-4.
- Ribereau-Gayon G, Dumont S, Muller C, Jung ML, Poindron P, Anton R. Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Lett*. 1996; 109(1-2):33-8.
- Ribereau Gayon G, Jung ML, Frantz M, Anton R. Modulation of cytotoxicity and enhancement of cytokine release induced by *Viscum album* L. extracts or mistletoe lectins. *Anticancer Drugs*. 1997; 8(1S):3-8.

Avaliação: Editor e dois membros do conselho editorial

Recebido em 25/01/2016

Aceito em 08/04/2016