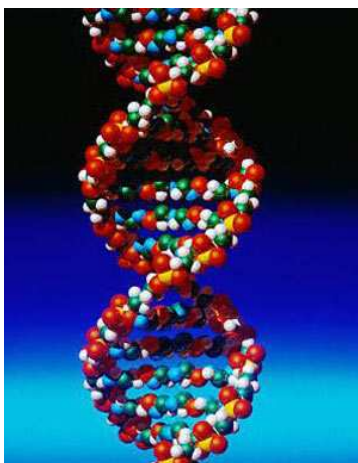
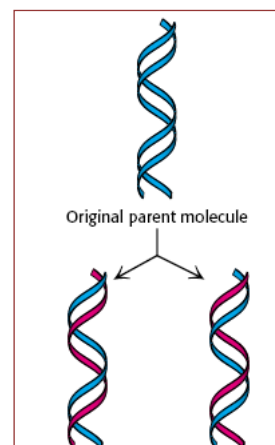
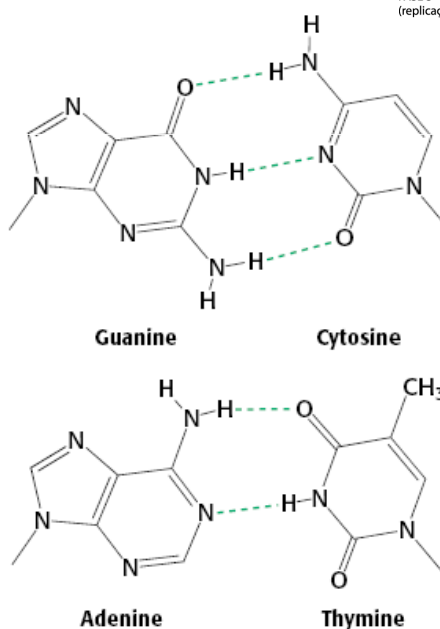
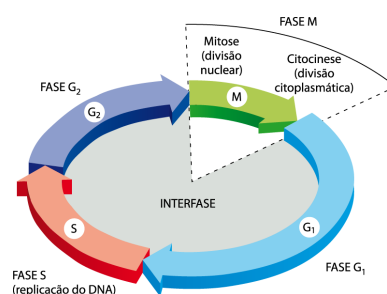
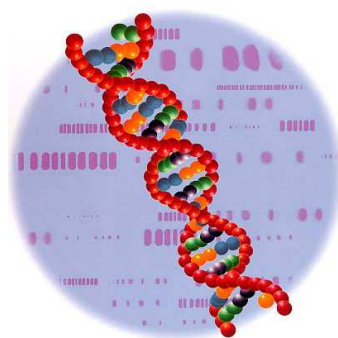
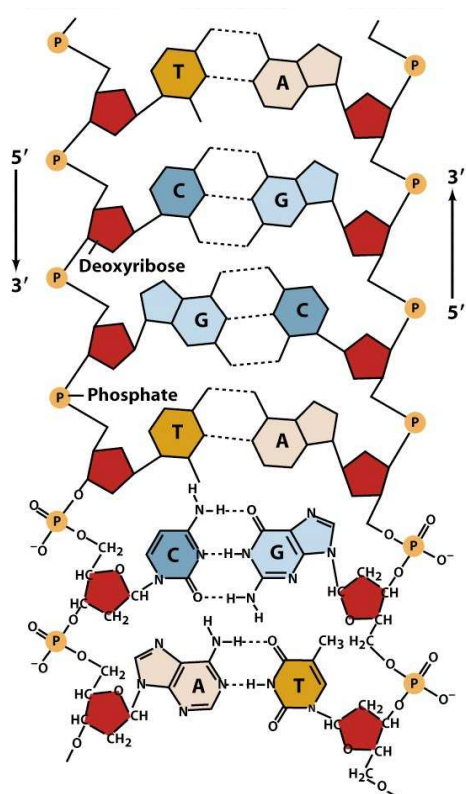
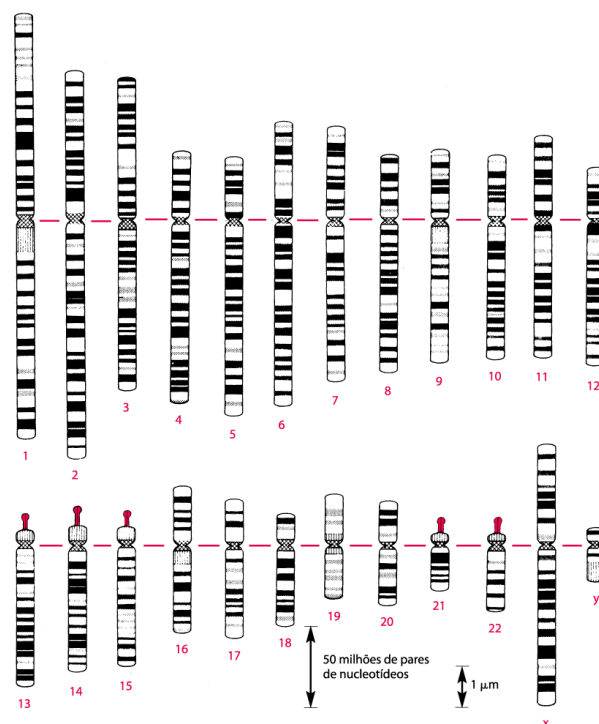
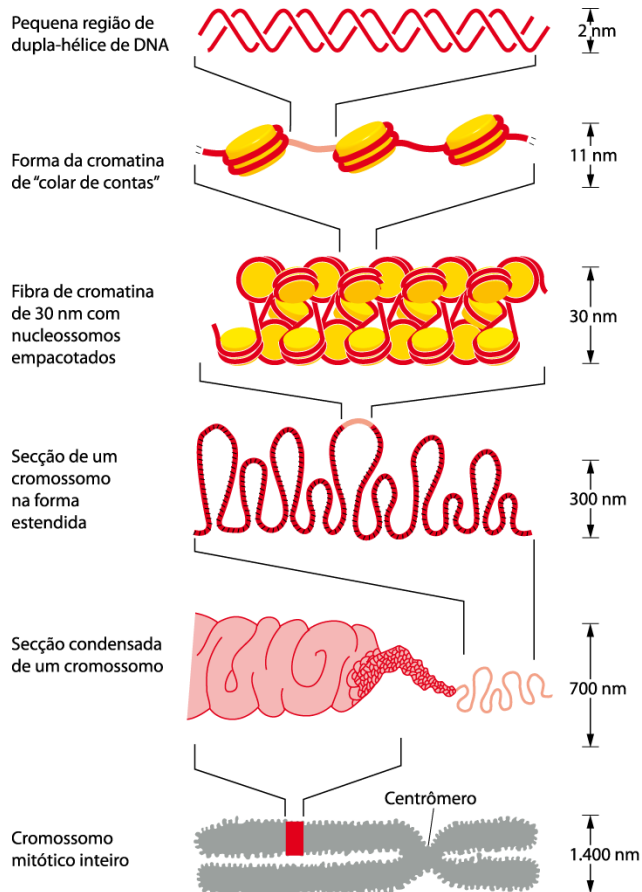


MUTAGÊNESE E CARCINOGÊNESE

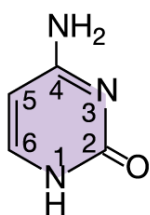


Profa. Lucia Regina R. Martins



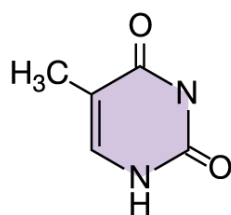


Bases pirimídicas



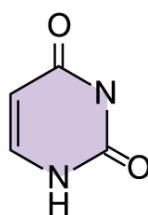
**Citosina
(C)**

DNA
RNA



**Timina
(T)**

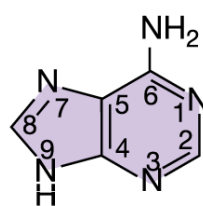
**Somente
no DNA**



**Uracila
(U)**

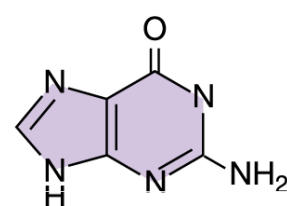
**Somente
no RNA**

Bases púricas



**Adenina
(A)**

DNA
RNA



**Guanina
(G)**

DNA
RNA

MUTAÇÕES

➤ São alterações do material genético, que são transmitidas a outras células.

- somáticas: mutações passam às células-filhas
- germinativas: transmissão aos descendentes

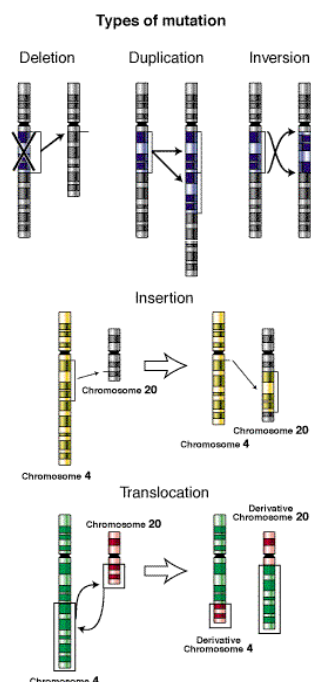
Consequência do funcionamento normal/interação com o meio:

- ✓ quando deletérias: mecanismos de reparo → eliminação
- ✓ vantagens adaptativas são conservadas: seleção natural

MUTAÇÕES

➤ Tipos:

1. **Microlesões:** afetam apenas 1 par de bases (“pontuais”)
2. **Macrolesões:** envolvem grandes extensões do DNA (translocações, deleções, inserções, duplicações, inversões) → em geral associadas à carcinogênese, na fase de progressão tumoral.

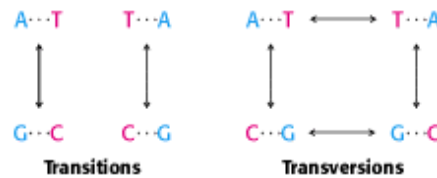


MUTAÇÕES PONTUAIS:

➤ **Tipos**: substituições, perdas, adições de bases.

Substituições: Transição (purina→purina ou pirimidina→pirimidina)

Transversão (pirimidina→purina ou purina→pirimidina)



➤ Efeitos da mutação:

- 1) **substituições de bases**: - *mis-sense* (codifica para outro aa)
 - *non-sense* (códon de finalização: UAA, UAG, UGA)
 - silenciosa (códon “sinônimo”)

- 2) **adição ou perda**: altera o quadro de leitura

➤ **Origem**: falhas em mecanismos endógenos (replicação e reparo)
 modificações químicas direta em uma das bases do DNA

➤ As modificações químicas podem ser ***espontâneas*** ou ***induzidas***.

		2ª LETRA					
		U	C	A	G		
1ª LETRA	U	UUU Fenilalanina	UCU Serina	UAU Tirosina	UGU Cisteína	U	3ª LETRA
	C	UUC Fenilalanina	UCC Serina	UAC Tirosina	UGC Cisteína	C	
	A	UUA Leucina	UCA Serina	UAA Parada	UGA Parada	A	
	G	UUG Leucina	UCG Serina	UAG Parada	UGG Triptofano	G	
L E T R A	C	CUU Leucina	CCU Prolina	CAU Histidina	CGU Arginina	U	L E T R A
	U	CUC Leucina	CCC Prolina	CAC Histidina	CGC Arginina	C	
	A	CUA Leucina	CCA Prolina	CAA Glutamina	CGA Arginina	A	
	G	CUG Leucina	CCG Prolina	CAG Glutamina	CGG Arginina	G	
L E T R A	A	AUU Isoleucina	ACU Treonina	AAU Asparagina	AGU Serina	U	L E T R A
	U	AUC Isoleucina	ACC Treonina	AAC Asparagina	AGC Serina	C	
	A	AUA Isoleucina	ACA Treonina	AAA Lisina	AGA Arginina	A	
	G	AUG Metionina	ACG Treonina	AAG Lisina	AGG Arginina	G	
L E T R A	G	GUU Valina	GCU Alanina	GAU Aspartato	GGU Glicina	U	L E T R A
	U	GUC Valina	GCC Alanina	GAC Aspartato	GGC Glicina	C	
	A	GUA Valina	GCA Alanina	GAA Glutamato	GGA Glicina	A	
	G	GUG Valina	GCG Alanina	GAG Glutamato	GGG Glicina	G	

MUTAÇÕES PONTUAIS:

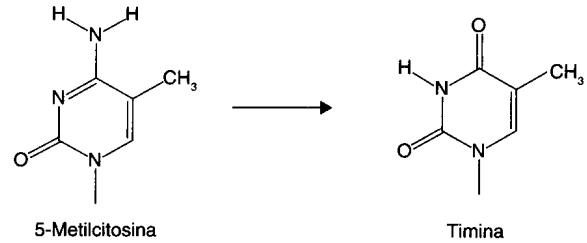
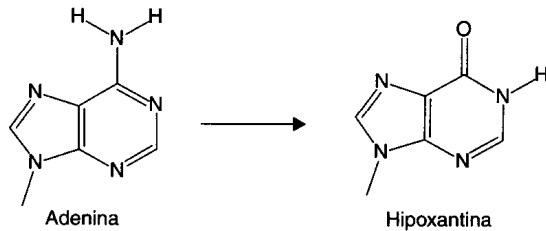
☐ Modificações Químicas Espontâneas:

✓ **despurinações:** quebra de ligação N-glicosídica (A e G) com a desoxirribose
causa: variações térmicas (~10.000 por dia!!)

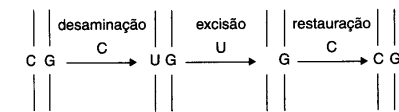
✓ **desaminações:** adenina → hipoxantina; citosina → uracila

(reconhecimento e reparo)

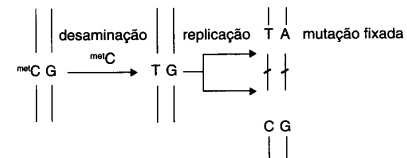
citosina metilada → timina (**não reconhece!**) há substituição: G → A



a) desaminação de sítio com citosina não metilada



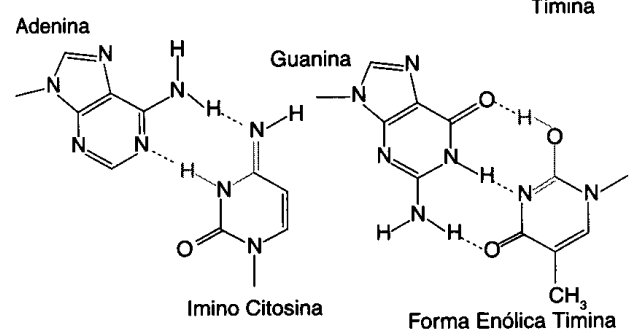
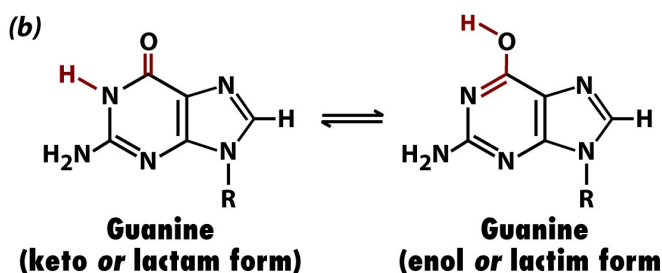
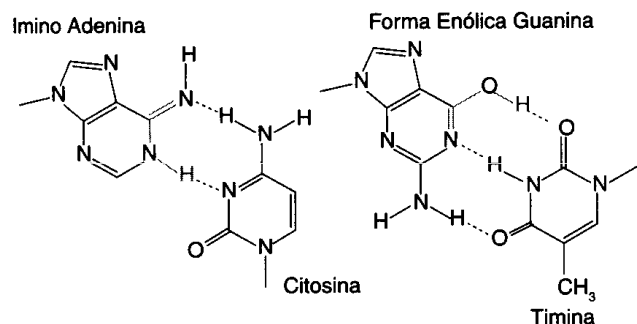
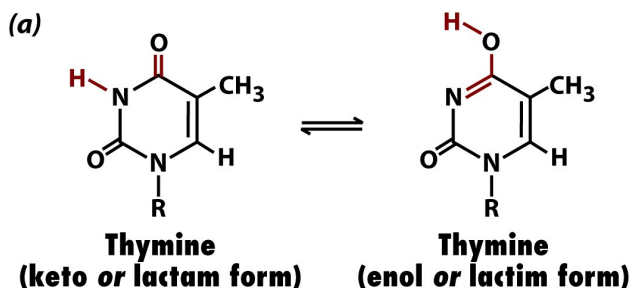
b) desaminação de sítio com citosina metilada



MUTAÇÕES PONTUAIS:

☐ Modificações Químicas Espontâneas:

✓ **tautomerismo:** ceto-enólico (timina e guanina) e amino-imínico (adenina e citosina) → pareamento incorreto das bases



MUTAÇÕES PONTUAIS:

Agentes químicos

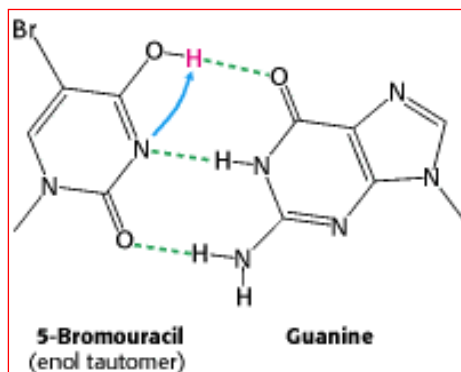
Agentes físicos

☐ Modificações Químicas Induzidas:

Agentes Mutagênicos:

1. Químicos:

- a) metabólitos reativos (ex.: ERO's → oxidações com alterações de pareamento, quebras ou ligações covalentes entre filamentos)
- b) análogos de base: semelhança estrutural; incorporadas ao DNA durante replicação → pareamento errôneo no próximo ciclo
ex.: 5-bromouracila (~ timina) → pareamento incorreto



MUTAÇÕES PONTUAIS:

☐ Modificações Químicas Induzidas:

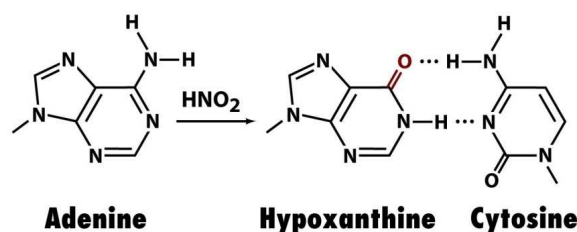
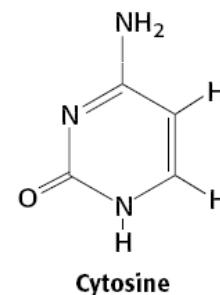
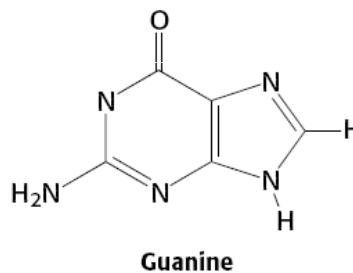
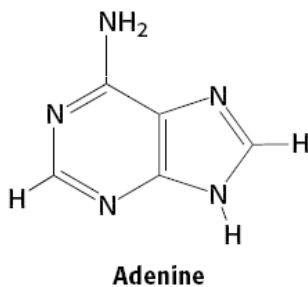
Agentes Mutagênicos:

1. Químicos:

- c) agentes de ação direta:

ex.: HNO_2 (desaminação oxidativa: adenina, citosina e guanina)

transições: $\text{G-C} \leftrightarrow \text{A-T}$



MUTAÇÕES PONTUAIS:

☐ Modificações Químicas Induzidas:

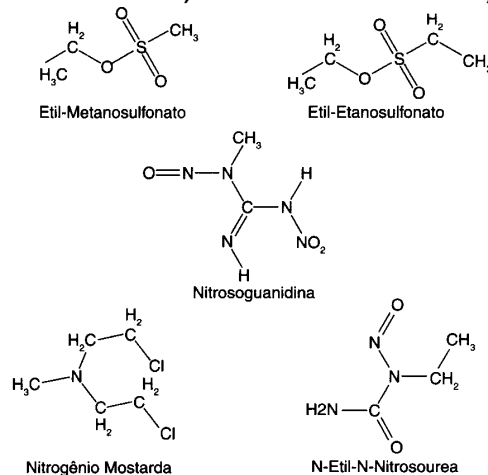
Agentes Mutagênicos:

1. Químicos:

d) agentes alquilantes: espécies muito reativas, adicionam grupos alquila em várias posições do DNA;

Consequências: pareamento incorreto (substituição) ou perda de bases alquiladas (sítios *apurínicos* ou *apirimidínicos*)

ex.: etil-metanossulfonato, etil-etanosulfonato, nitrosoguanidina, ...



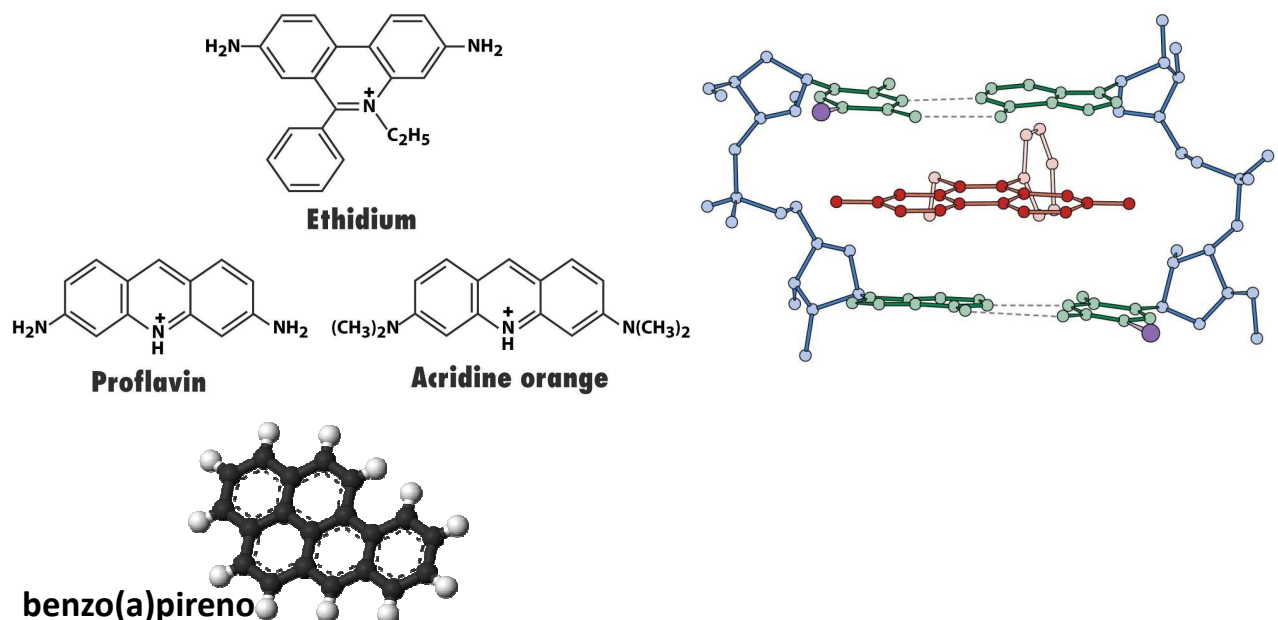
MUTAÇÕES PONTUAIS:

☐ Modificações Químicas Induzidas:

Agentes Mutagênicos:

1. Químicos:

e) agentes intercalantes: promovem distorções do DNA, adição ou eliminação de bases (modificam a sequência de leitura)



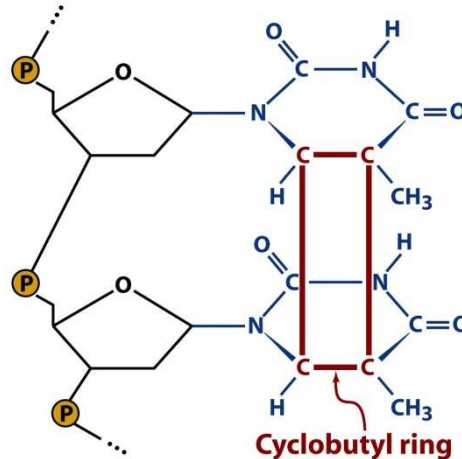
MUTAÇÕES PONTUAIS:

❑ Modificações Químicas Induzidas:

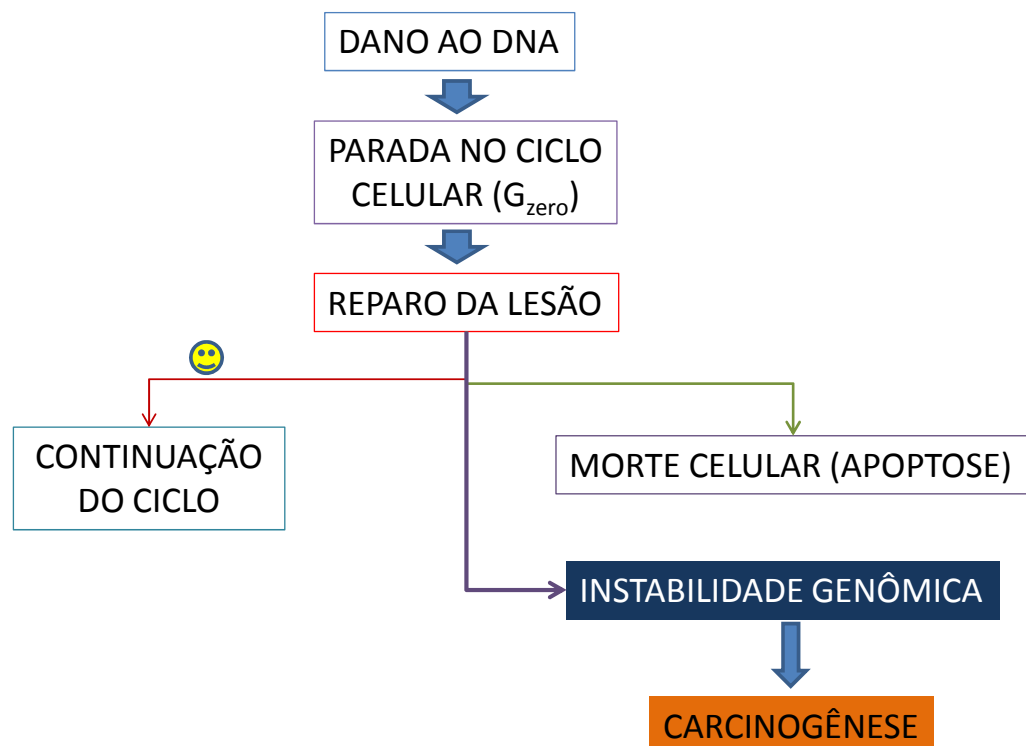
Agentes Mutagênicos:

2. Físicos:

- ✓ Radiações ionizantes (raios X, γ e partículas atômicas): formação de espécies reativas → mutações pontuais, quebras, rearranjos cromossômicos
- ✓ Radiação UV (250 – 400 nm): transições eletrônicas e formação de dímeros de pirimidinas (efeitos na replicação e transcrição; mutação ocorre durante mecanismo de reparo)



CARCINOGÊNESE



- processo multifatorial (exógenos e endógenos);
- em geral são necessárias várias mutações para seu desenvolvimento e progressão

CARCINOGÊNESE

Fases:

1 – Iniciação:

- induzida por mutação química/física (radiação): **ação genotóxica**
- agentes biológicos (vírus)
- célula com mutação permanece “dormente” por tempo variável

2 – Promoção

- duração variável
- fatores epigenéticos (ativação da expressão gênica e da atividade mitótica) envolve indução da proliferação celular desordenada → aumenta número de células com mutação e início do dano tecidual
- substâncias promotoras: alcalóides do indol, ciclamato, sacarina, TCDD, etc.

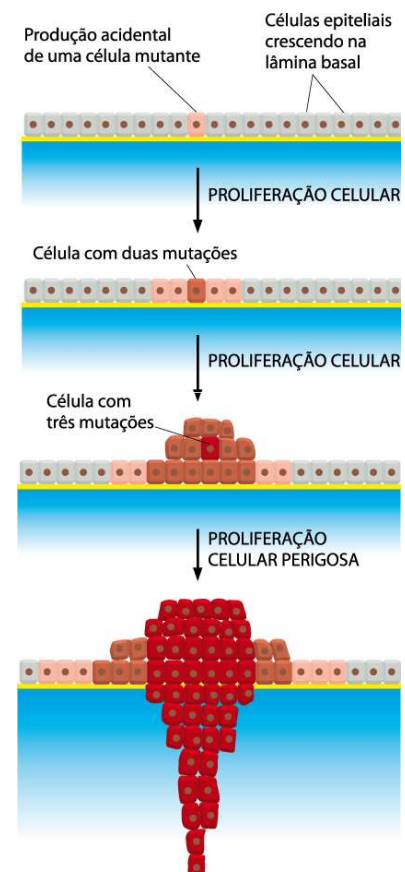
3 – Progressão tumoral

- baixa estabilidade genética
- mutações adicionais e seleção
- perda da diferenciação celular (morfologia e função)
- malignidade

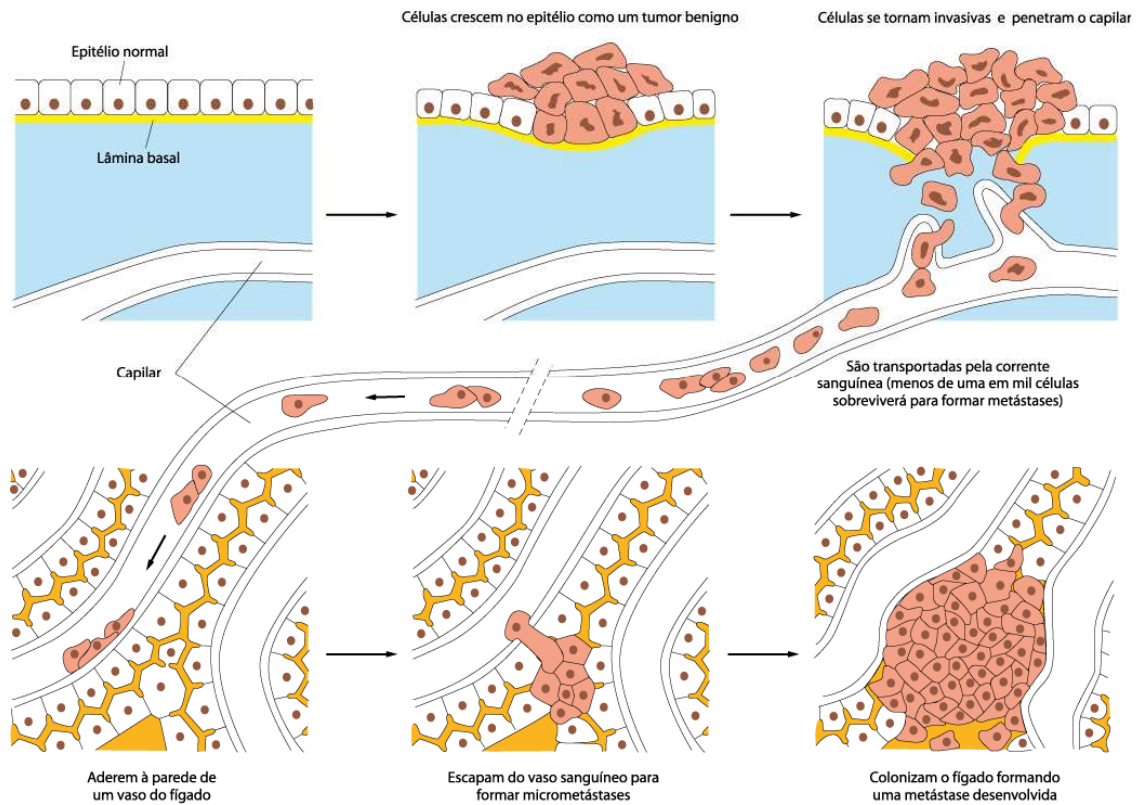
CARCINOGÊNESE

Formação do Tumor:

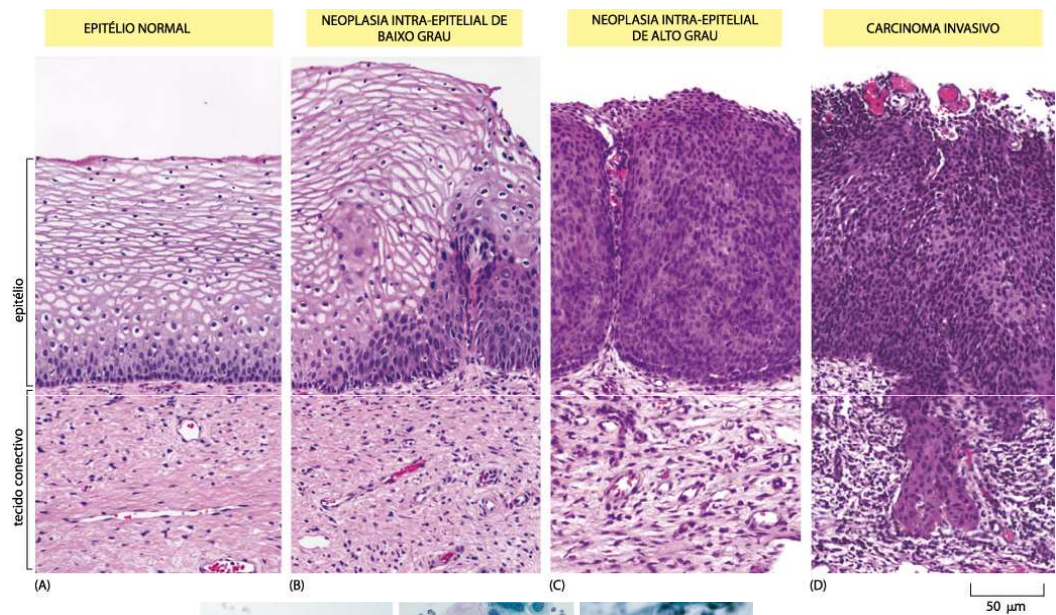
- ✓ expansão clonal acelerada de 1 célula
- ✓ formação de clone com vantagem proliferativa
- ✓ baixa estabilidade genética: novas mutações com elevada frequência
- ✓ Progressão Tumoral: ciclos de mutação e seleção (alteração do comportamento celular, expansão da massa tumoral, invasão de tecidos adjacentes)
- ✓ progressão final: malignidade (invasão de tecidos e metástases)



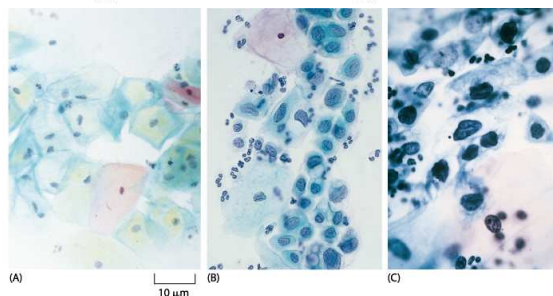
Metástase tumoral:



Estágios de progressão do câncer; ex.: colo uterino



Mutações sucessivas:
 ➤ aparecimento de células indiferenciadas



Carcinógenos Químicos:

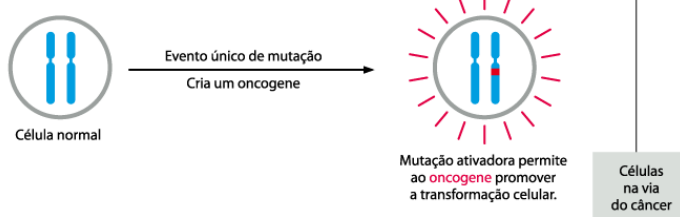
- ✓ **Genotóxicos:** agentes mutagênicos iniciadores (espécies reativas)
 - carcinógenos primários: reação direta com DNA (ex.: óxido de etileno, peróxidos, sulfonas, elementos radioativos ...)
 - carcinógenos secundários: produtos do metabolismo (ex.: aminas aromáticas, HAP's, nitrosaminas, corantes, hidrocarbonetos clorados)
- ✓ **Imunossupressores:** facilitam a progressão do câncer
- ✓ **Epigenéticos (promotores):** não se ligam ao DNA; ex.: ésteres de forbol, hormônios naturais ou sintéticos, fibras de amianto.

Carcinógenos Químicos:

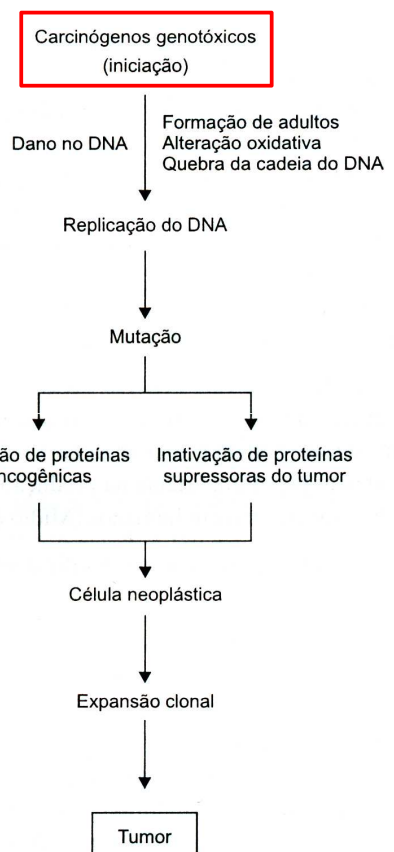
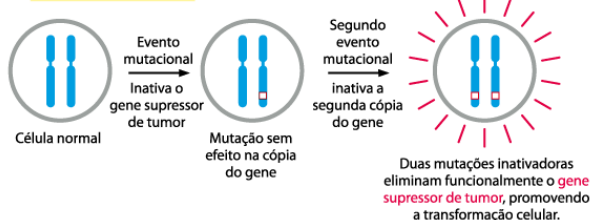
Mutações que levam ao câncer podem ocorrer em:

- ✓ **proto-oncogenes** (codificam proteínas que estimulam o ciclo celular; mutação dominante).
- ✓ **genes supressores de tumores** (codificam proteínas que controlam o ciclo celular; mutação recessiva).

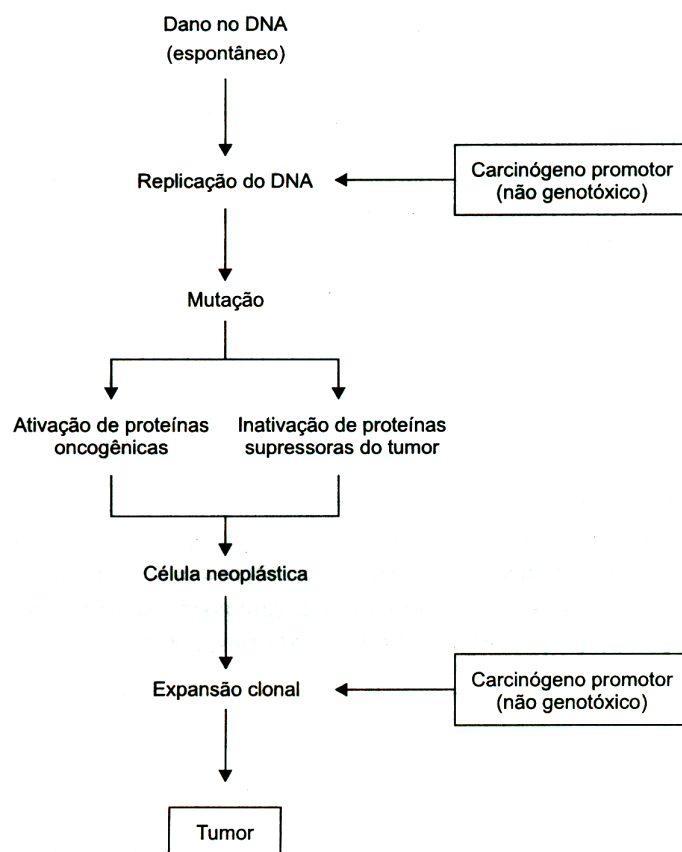
(A) **Mutação de hiperatividade** (ganho de função)



(B) **Mutação de hipoatividade** (perda de função)

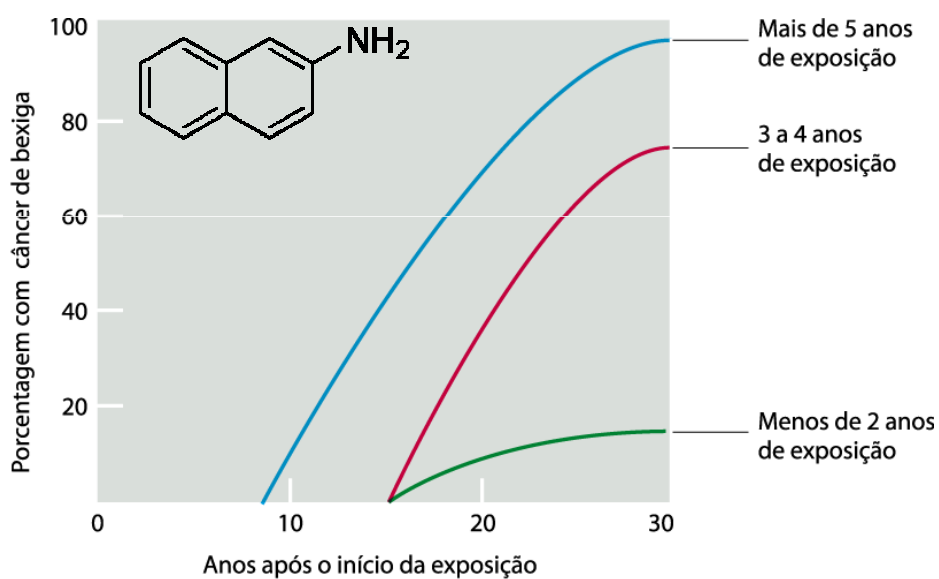


Promoção da carcinogênese química



CARCINOGENESE QUÍMICA

- ✓ desenvolvimento do câncer: *processo lento e gradual*
- ✓ ex.: 2-naftilamina e câncer de bexiga em operários de indústria química (incidência dependente do período de exposição)



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE AGENTES QUÍMICOS

➤ Testes *in vivo*:

- espécies mais usadas: roedores
- dificuldades/limitações:
 - a. testes muito demorados (exposição → consequências)
 - b. custo
 - c. informações nem sempre válidos para humanos ($\neq$ intraespécies)
 - d. equivalência entre doses de testes e níveis de exposição humana

➤ Epidemiologia:

- estimativa de carcinogenicidade baseada na exposição humana
- fundamenta a extrapolação dos ensaios com animais

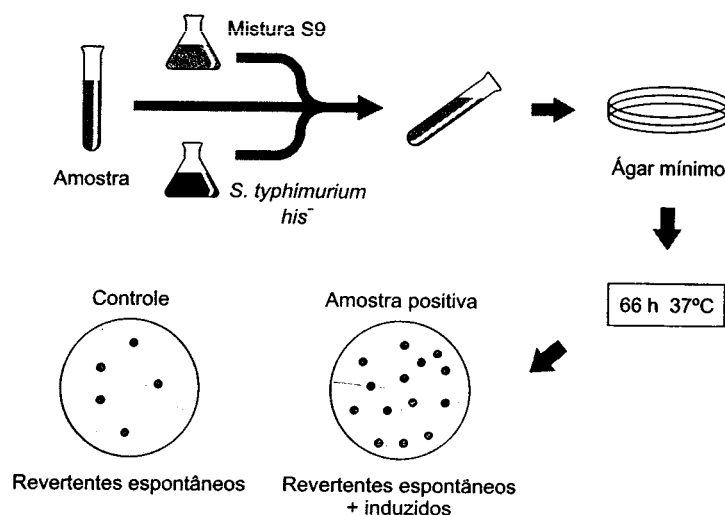
➤ Estimativa do risco carcinogênico ao homem:

- HERP (*Human Exposure/Rodent Potency*):
exposição humana/potencial carcinogênico em roedores

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE AGENTES QUÍMICOS

1. TESTE DE AMES

- avaliação *in vitro* de mutações devido a genotoxicidade
- reversão da mutação em cepas de *Salmonella typhimurium* em relação à auxotrofia para histidina
- variações: adição de microssomas hepáticos de mamíferos (ativação metabólica)
- potencial mutagênico: contagem de colônias (comparado com nº de revertentes espontâneos)





AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DA TALIDOMIDA PELO TESTE DE AMES

Evaluation of thalidomide mutagenic activity by Ames test

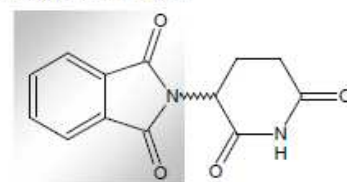
Jean L. Santos^{1*}, Eliana A. Varanda², Lidia M. Lima³, Chung M. Chin¹

¹Lapdesf – Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP Araraquara - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Depto. Fármacos e Medicamentos

² Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP Araraquara - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Depto. Ciências Biológicas

³LASSBio – Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas – Universidade Federal do Rio de Janeiro - Faculdade de Farmácia

subunidade ftalimídica



talidomida

- linhagens: *Salmonella typhimurium* TA100 e TA102;
- presença e ausência de ativação metabólica (fração microsomal S9 de homogeneizado de fígado de ratos)

Tabela 1: Avaliação mutagênica da talidomida nas linhagens TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* na presença e ausência de ativação metabólica (S9) representada pelo número médio de revertentes por placa, desvio padrão e razão de mutagenicidade.

$$RM = \frac{\text{média nº revertentes por placa teste (espontâneos + induzidos)}}{\text{média nº revertentes por placa do controle negativo (espontâneos)}}$$

composto	concentração μmol/placa	TA100		TA102	
		+S9	-S9	+S9	-S9
talidomida	0 ^a	103,7±7,4	139±9,5	323,3±10,02	303,6±14,5
	0,0309	109,3±9 (1,05)	145,7±6,9 (1,04)	288,7±8,1 (0,89)	330±17 (1,09)
	0,155	121±35,3 (1,16)	148±9,1 (1,06)	253,7±37 (0,78)	364±14,5 (1,2)
	0,774	120,7±20 (1,16)	145±8,5 (1,04)	341,3±36 (1,05)	357,8±21 (1,17)
	3,87	104,3±8 (1)	131±4,9 (0,94)	258,5±0,8 (0,8)	292±22 (0,96)
	19,4	102,5±31 (0,98)	122±9,6 (0,87)	197±29,6 (0,6)	230±5,6 (0,75)
Controle positivo		592±6,3 (5,7) ^b	1584±8,9 (11,4) ^c	1713±18,9 (5,3) ^d	825±15,1 (2,71) ^e

a) controle negativo: DMSO (100 μL); b) 2-antramina: 1,25 μg/placa (50 μL); c) azida sódica: 1,25 μg/placa (100 μL); d) 2-aminofluoreno: 1,25 μg/placa (50 μL); mitomicina: 0,5 μg/placa (100 μL).

- Resultados negativos para atividade mutagênica da talidomida.
- RM < 2,0

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE AGENTES QUÍMICOS

2. ANÁLISE CITOGENÉTICA

- análise de cromossomos e presença de micronúcleos em linfócitos
- Efeitos: clastogênicos (aberrações devido à quebras cromossômicas) ou aneugênicos (número alterado de cromossomos)

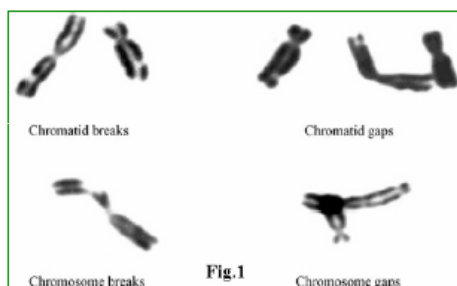


Fig.1

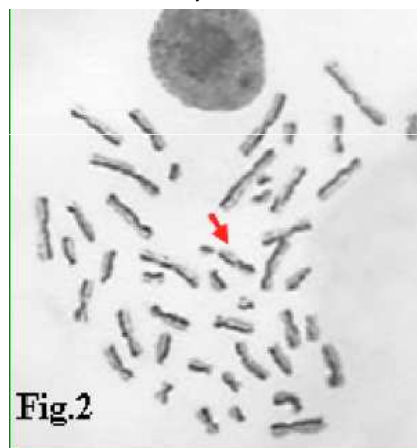
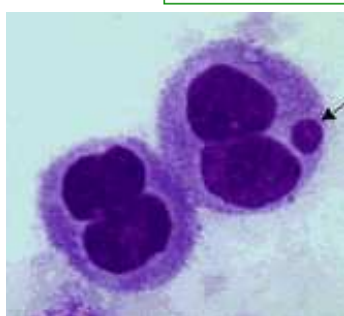


Fig.2

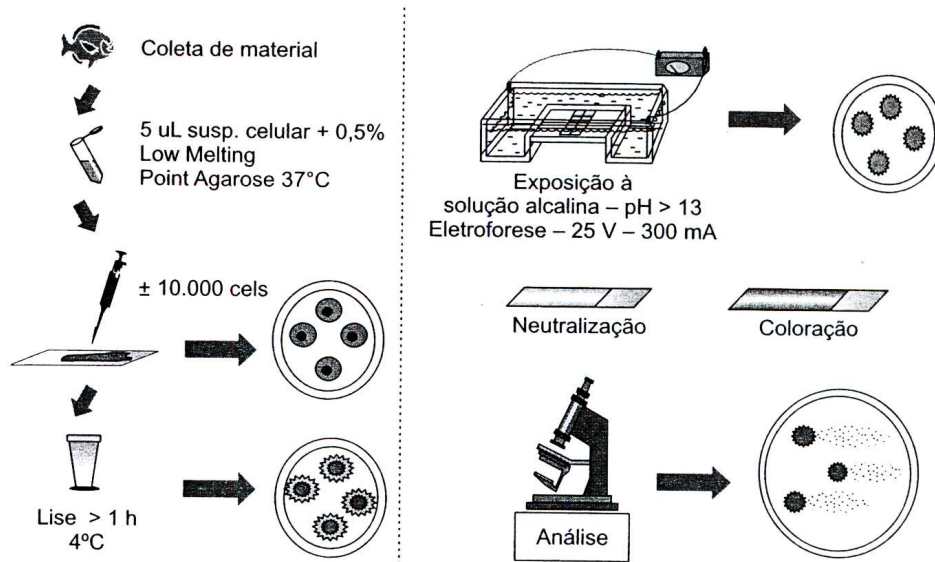


Micronúcleo: são núcleos pequenos, separados e adicionais ao núcleo principal das células, produzidos durante a telófase da mitose por perda de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE AGENTES QUÍMICOS

2. TESTE DO COMETA

- detecta danos cromossômicos em células individuais
- alta sensibilidade, diversas aplicações
- eletroforese em microgel e coloração (observação em M.O. fluorescência)
- migração do DNA: formação de “cometa”
- ✓ tamanho e intensidade de coloração da “cauda” → proporcional ao dano ao DNA



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE AGENTES QUÍMICOS

2. TESTE DO COMETA

Classificação do dano pela forma e tamanho da cauda

Imagem Observada	Cauda/Cabeça	Classes de Danos
	sem cauda	0
	≤1	1
	1 – 2	2
	≥2	3
	sem cabeça	4

Testes de Genotoxicidade Ambiental

- poluentes ambientais e a etiologia do câncer: 90% são carcinomas (células epiteliais → contato com o ambiente)
- Evidências: alta incidência de tumores em função de exposições ocupacionais
 - ex.: angiosarcoma de fígado → operários de indústrias de cloreto de vinila
 - câncer de pulmão → operários de fábricas de amianto
 - em peixes: maior incidência de tumores, aberrações cromossômicas, câncer em ambientes contaminados.
- **Apenas 10% dos compostos químicos sintéticos foram avaliados quanto à capacidade de causar mutação.**
- No meio ambiente... diversas misturas podem ser formadas (composição complexa) → importância dos testes de genotoxicidade (~200 tipos atualmente)

Testes de Genotoxicidade Ambiental

- **Testes Microbianos:** Teste de Ames é o mais usado
 - padronizações: USEPA, OECD, ISO;
 - Brasil: CETESB (norma técnica L5.620)
 - em amostras ambientais: resultados expressos em número de revertentes por litro ou grama equivalente de amostra e, quanto maior esse número, maior a quantidade ou a potência de compostos mutagênicos na amostra analisada.



Efluentes e resíduos sólidos industriais

Classificação da genotoxicidade	Potência – teste de Ames	
	Revertentes/L	Revertentes/mg*
Baixa	100-1000	10-100
Moderada	1.000-100.000	100-10.000
Alta	$10^5 - 10^7$	104 - 106
Extrema	$> 10^7$	$> 10^6$

* mg de material orgânico extraído

Águas superficiais

Classificação da genotoxicidade	Potência – teste de Ames
	Revertentes/L
Baixa	< 500
Moderada	500 – 2.500
Alta	2.500 – 5.000
Extrema	> 5.000

Alguns compostos orgânicos cancerígenos detectados pelo teste de Ames

Composto orgânico	Classificação de acordo com a IARC (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
4-Aminobifenila Benzidina 2-Naftilamina Aflatoxina	Grupo 1 (composto comprovadamente cancerígeno para humanos)
Benzo[a]antraceno Benzo[a]pireno 4-cloro-o-toluidina Dibenzo[a,h]antraceno Metilmetano sulfonato N-nitrosodimetilamina N-etil-N-nitrosouréia N-metil-N-nitrosouréia N-nitrosodietilamina	Grupo 2A (composto provavelmente cancerígeno para humanos)
Benzo[b]fluoranteno 3,3'-Dimetoxibenzidina 4-Cloro-o-fenilenediamina CI Acid Red 114 CI Basic Red 9 Citrus Red N.º 2 Disperse Blue 1 3,3'-Dimetilbenzidina HC Blue N.º 1 2-Nitrofluoreno 2-Nitroanisol	Grupo 2B (composto provavelmente cancerígeno para humanos)

Testes de Genotoxicidade Ambiental

Outros Testes Microbianos:

- ✓ **Induteste:** indução do fago λ em *Escherichia coli* lisogênica (WP2)
- ✓ **Cromoteste:** linhagem de *E.coli* (PQ37) com mutação no gene lacZ → produção de β -galactosidase é proporcional ao potencial mutagênico da amostra
- ✓ resultados rápidos e complementares ao Teste de Ames

Organismos-sentinela e ambientes aquáticos:

- mexilhões, ouriços, animais bentônicos, esponjas, anfíbios e peixes
- análise citogenética em vários tipos celulares:
 - ✓ contagem de aberrações cromossômicas, trocas de fragmentos, micronúcleos.
- monitoramento ambiental: organismos de locais contaminados
 - testes com animais de laboratório;
 - culturas de células *in vitro*.

Testes de Genotoxicidade Ambiental

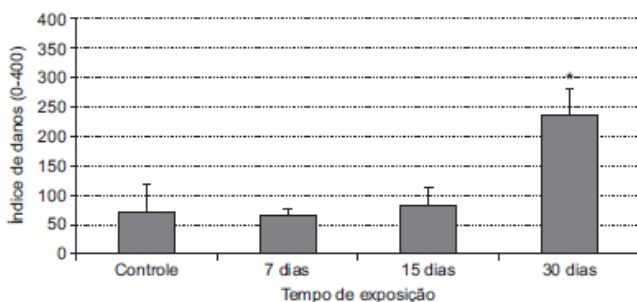
➤ *Cantareus aspersus*: exemplo de organismo-sentinela bioindicador



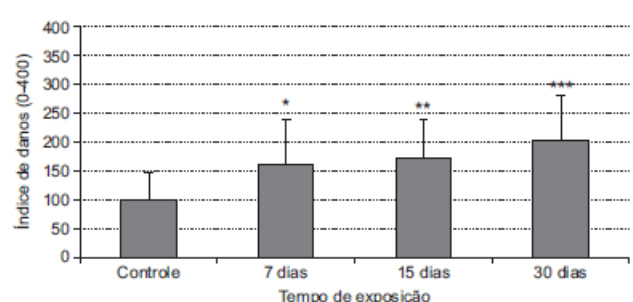
- exposição de moluscos a poluentes atmosféricos em Canoas/RS:
 - ✓ período: 7, 15 e 30 dias (inverno e verão)
- mostras analisadas: células de pulmão e hemolinfa
- classificação de danos (tamanho da cauda, n = 100 céls./amostra): 0 – 400
- controle positivo: sangue exposto a radiação UV por 4 s.
- controle negativo: organismos mantidos no laboratório durante mesmo período

➤ *Cantareus aspersus*: exemplo de organismo-sentinela bioindicador

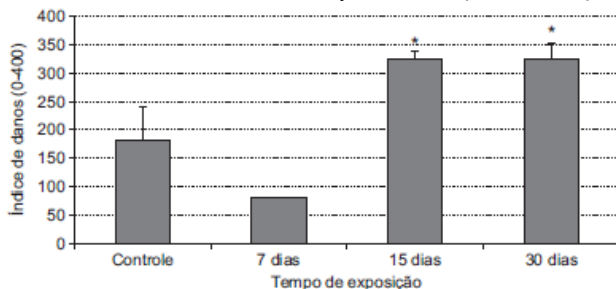
Danos em células de hemolinfa (inverno)



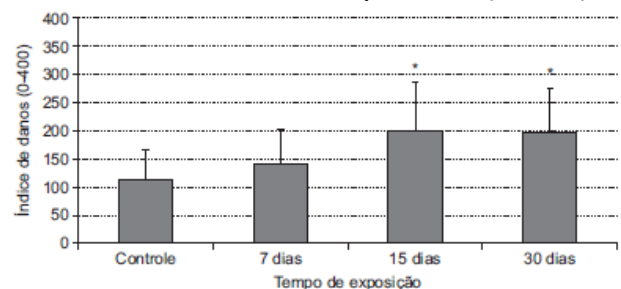
Danos em células de hemolinfa (verão)



Danos em células de pulmão (inverno)



Danos em células de pulmão (verão)



- ✓ maior sensibilidade de células pulmonares à poluentes atmosférico
- ✓ efeito proporcional à exposição
- ✓ pouca influência da estação do ano (temperatura, umidade); IQAr semelhantes

Testes de Genotoxicidade Ambiental

❖ Plantas Superiores como Organismos Indicadores



- *Tradescantia sp.*: organismo bioindicador de genotoxicidade
 - ✓ efeitos de radiações ionizantes
 - ✓ poluentes atmosféricos
 - ✓ efluentes industriais e amostras de solo contaminadas
- vantagens: planta de fácil adaptação e cultivo, perene, ampla distribuição
- Brasil: *Tradescantia pallida* é a espécie mais comum

Micronúcleos: visualizados em células-mãe de grãos de pólen em estágio de tétrade; detecção de agentes clastogênicos (quebra cromossômica)



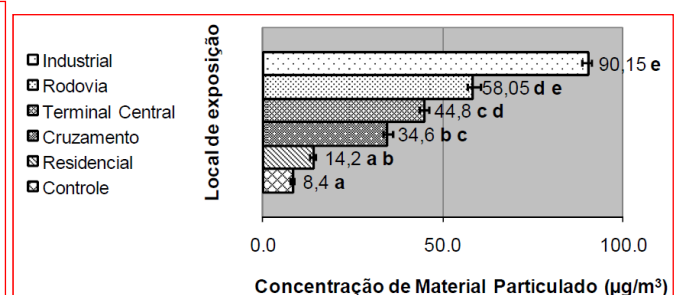
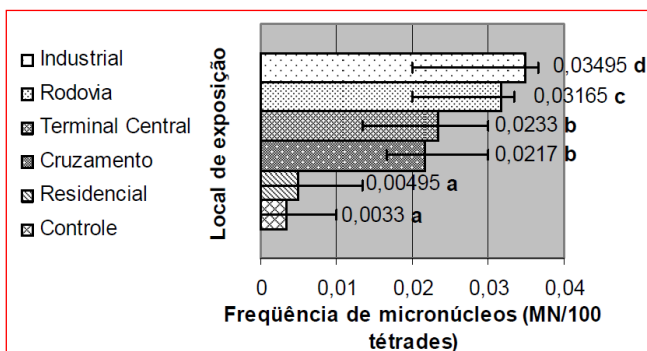
❖ Plantas Superiores como Organismos Indicadores

Teste de micronúcleo com *Tradescantia Pallida* aplicado ao Biomonitoramento da qualidade do ar da cidade de Uberlândia

CAMPOS JUNIOR, E.O; KERR, W. E

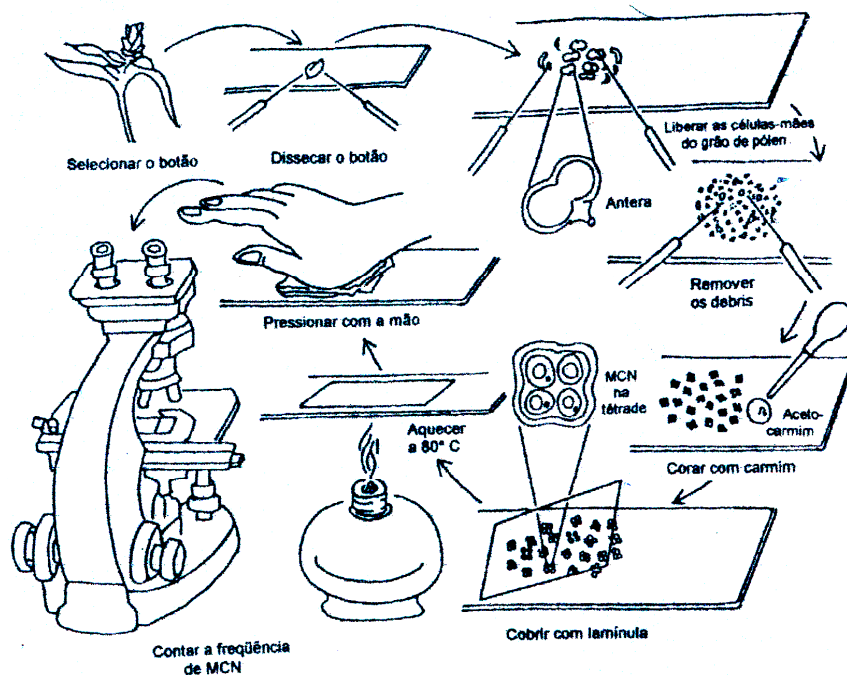
- plantas cultivadas e mantidas em laboratório
- exposição em locais da cidade com tráfego intenso
- n = 20 plantas, exposição por 30 horas
- inflorescências colhidas e fixadas (etanol: ác. acético, 3:1 v/v) por 24 h
- preparo das lâminas e contagem (300 tétrades por lâmina)

Resultados: frequência de micronúcleos e relação com material particulado ($r = 0,94$)



❖ Plantas Superiores como Organismos Indicadores

- ❑ Preparo de lâminas de botões florais de *Tradescantia pallida* para visualização de micronúcleos



❖ Plantas Superiores como Organismos Indicadores

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CLASTOGÊNICO DE EFLUENTES DE LATICÍNIO UTILIZANDO BIOENSAIO DO MICRONÚCLEO DE *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. var. *purpurea* Boom (COMMELINACEAE) (TRAD – MCN)

Autores: Stela Maris Pagnussat (Universidade do Oeste de Santa Catarina)
Márcia Bundchen (Universidade do Oeste de Santa Catarina)



Revista Brasileira de Farmacognosia
Brazilian Journal of Pharmacognosy
17(3): 444-447, Jul./Set. 2007

Recebido em 26/06/06. Aceito em 25/04/07

Divulgação

Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais

Margarete Dulce Bagatini¹, Antonio Carlos Ferreira da Silva², Solange Bosio Tedesco^{2*}

¹Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Cidade Universitária, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil,

²Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Cidade Universitária, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.



ELSEVIER

Mutation Research 426 (1999) 183–188



Fundamental and Molecular
Mechanisms of Mutagenesis

www.elsevier.com/locate/molmut

Community address: www.elsevier.com/locate/mutres

Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays

I.S. Grover ^{*}, Satwinderjeet Kaur

Department of Botanical Sciences, Guru Nanak Dev University, Amritsar, 143 005, India

Braz. J. Biol., 69(3): 837-842, 2009

Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the River Paraíba do Sul, in Brazil, with the *Allium cepa* L. test

Barbério A.^{a,b}, Barros L.^a, Voltolini JC.^b and Mello MLS.^a

^aDepartamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, 255, Cidade Universitária Zeferino Vaz, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brazil

^bDepartamento de Biologia, Universidade de Taubaté – UNITAU, Av. Tiradentes, 500, Bom Conselho, CEP 12030-180, Taubaté, SP, Brazil