

FREQUÊNCIA DE ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS EM INDIVÍDUOS ATENDIDOS EM UM LABORATÓRIO DE ANÁLISES MOLECULARES EM MARINGÁ - PR

Ayla Carolina de Almeida

Discente do 4º ano do Curso de Biomedicina da UNICESUMAR - Centro Universitário de Maringá, PR

Sara Macente

Mestre em Biociências Aplicadas a Farmácia pela Universidade Estadual de Maringá – UEM; Doutoranda no Programa Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP; Docente e Coordenadora do curso de Biomedicina na UNICESUMAR - Centro Universitário de Maringá, PR.

Karen Brajão de Oliveira

Doutora em Patologia Experimental pela Universidade Estadual de Londrina - UEL; Mestre em Patologia Experimental pela Universidade Estadual de Londrina – UEL; E-mail: karen_brajao@hotmail.com.

RESUMO: As anormalidades cromossômicas são hoje as doenças genéticas mais frequentes e responsáveis por alta porcentagem de morte e abortos espontâneos. Desta forma o objetivo deste estudo foi determinar a frequência de anormalidades cromossômicas em todos os indivíduos atendidos em um laboratório de análises moleculares em Maringá - PR, durante o período de julho de 2011 a junho de 2012, que foram dirigidos para realização dos exames a partir de suspeita médica para alguma alteração; e ainda avaliar a necessidade de encaminhamento para aconselhamento genético, após o diagnóstico. Os resultados mostraram que, de 202 pacientes atendidos, 32 (15,8%) apresentaram algum tipo de alteração. Deste total, 23 (71,8%) apresentaram alterações numéricas e 9 (28,1%) apresentaram alterações estruturais. O mosaïcismo também foi encontrado em 13 (6,43%) dos pacientes atendidos. Conclui-se que é de extrema importância o diagnóstico citogenético para identificação das alterações e o encaminhamento dos pacientes e sua família para o aconselhamento genético.

PALAVRAS-CHAVE: Aconselhamento Genético; Alterações Cromossômicas; Citogenética; Idade Materna.

FREQUENCY OF CHROMOSOME ABNORMALITIES IN PEOPLE ATTENDED IN A LABORATORY OF MOLECULAR ANALYSES IN MARINGÁ PR BRAZIL

ABSTRACT: Chromosome abnormalities are currently the most frequent genetic diseases and responsible for high death rates and spontaneous abortions. Current analysis determines the frequency of chromosome abnormalities in all people attended at the laboratory of molecular analyses in Maringá PR Brazil between July 2011 and June 2012 who underwent tests due to a medical suspicion of changes and to evaluate the need to have genetic counseling after the diagnosis. Results showed that out of the 202 patients attended to, 32 (15.8%) had signs of changes, with 23 (71.8%) presenting numerical changes and 9 (28.1%) structural alterations. Mosaicism was also revealed in 13 (6.43%) patients. Results show that cytogenetic diagnosis is highly important for the identification of changes and genetic counseling of the patient and relatives.

KEY WORDS: Genetic Counseling; Chromosome Alterations; Cytogenetics; Mother's Age.

INTRODUÇÃO

Dentre as doenças genéticas, as alterações cromossômicas são as mais frequentes, sendo responsáveis por diversos problemas associados, como retardo mental, déficit ponderal, estatural e várias malformações congênitas. Além disso, elas são responsáveis também por metade dos abortamentos espontâneos que ocorrem durante o primeiro trimestre de gestação, sendo que, de todas as gestações em que o feto possui alguma anormalidade cromossômica, 99% são direcionadas para este tipo de aborto (SOUZA et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2007; ROLNIK et al., 2010; SOUZA et al., 2010). Segundo Borges-Osório e Robinson (2001) essas alterações são decorrentes de qualquer mudança na estrutura ou no número de cromossomos, durante os processos mitóticos e meióticos, que levam a uma modificação na expressão gênica, produzindo um indivíduo fenotipicamente anormal.

Em termos de classificação existem dois tipos de alteração: numérica e estrutural. As numéricas são as mais comuns e correspondem ao aumento ou diminuição de um ou mais cromossomos no genoma e podem ser do tipo euploidia, que envolve todo o genoma ou aneuploidia, que envolve um ou mais cromossomos de cada par. As aneuploidias resultam da não disjunção, ou seja, de uma falha na separação de um cromossomo no momento da divisão e as mais conhecidas são monossomia ($2n-1$), trissomia ($2n+1$) e tetrassomia ($2n+2$). A não disjunção pode ocorrer também nas divisões após a formação do zigoto, no início do desenvolvimento embrionário. Isso pode levar à presença de dois ou até mais cariótipos diferentes no mesmo indivíduo, o que é caracterizado como mosaïcismo. As euploidias são menos comuns que as aneuploidias, visto que os indivíduos com essa alteração não sobrevivem, assim elas passam a ser detectadas somente em materiais de abortos espontâneos e dentre elas, as mais conhecidas são as triploidias, que ocorrem por uma falha na divisão na maturação dos gametas e as tetraploidias, que resultam de uma falha na divisão inicial do zigoto (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2001; VASCONCELOS et al., 2007).

Segundo Borges-Osório e Robinson (2001) e Vasconcelos et al. (2007), as alterações estruturais são

mudanças na estrutura do cromossomo, através de quebras ou rearranjos e podem ser dos tipos balanceado ou não balanceado. Os rearranjos balanceados aparecem quando não existe alteração nas informações do cromossomo, enquanto os rearranjos não balanceados aparecem quando existe alguma informação a mais ou a menos no cromossomo. De todas as alterações estruturais existentes, as mais comuns são as deleções, que são a perda de uma parte do cromossomo; existe, ainda, a duplicação, que é a repetição de um fragmento do cromossomo; a inversão, a reorganização dos genes devido a quebras no cromossomo e a translocação, que é a troca de segmentos de um cromossomo para outro.

Atualmente, estima-se que as alterações cromossômicas são responsáveis por mais de 60 síndromes, atingindo cerca de 7,5% de todas as gestações, porém, cerca de 50% dessas gestações não chegam a termo, devido a ocorrência de abortos espontâneos. Com isso, a frequência entre natimortos é de 6% e entre nativos é de somente 0,6% (MORAES et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2009; BALKAN et al., 2010; MOREIRA et al., 2011).

Segundo Nakadonari e Soares (2006), os principais distúrbios são os autossômicos e eles estão intimamente ligados com a idade materna, uma vez que as mulheres nascem com a quantidade de ovócitos que irão ovular durante a vida, já definida. Esses ovócitos começam a se desenvolver no ovário materno e, após o nascimento, ficam bloqueados na meiose I, até que a mulher chegue na puberdade e comece a ovular. Assim, pode-se entender que os óvulos possuem a mesma idade da mulher, o que os torna “velhos”, podendo levar na fertilização, a uma não disjunção, causada pela destruição das fibras cromossômicas ou por deterioração do centrômero (BURNS; BOTTINO, 1991; GUSMÃO; TAVARES; MOREIRA, 2003; NAKADONARI; SOARES, 2006; ZAGO et al., 2011). Existe ainda outra causa responsável pelo maior aparecimento de alterações cromossômicas em filhos de mulheres com mais idade, que é a incapacidade que essas mulheres possuem de abortar espontaneamente fetos com algum tipo de alteração (NAKADONARI; SOARES, 2006). Ainda, segundo Nakadonari e Soares (2006), a variação no acometimento de filhos de mulheres mais jovens ou

mais velhas é extremamente significativa. Entre mulheres abaixo de 25 anos, a porcentagem de alteração é de 2% de todas as concepções, já entre mulheres acima de 40 anos, esse valor sobe para 35%.

Dentre os diversos tipos de síndromes causadas por alterações cromossômicas existem as que levam a defeitos mais brandos e as que levam a grandes problemas, resultando na morte do feto, antes do nascimento ou com pouco tempo de vida. Devido ao aumento das taxas dessas alterações, é necessário o seu diagnóstico precoce, facilitando o encaminhamento da família ao aconselhamento genético (PEREIRA et al., 2009).

O aconselhamento genético, segundo Pina-Neto (2008), é um processo de comunicação que cuida dos problemas humanos quando esses estão relacionados com a ocorrência de uma doença genética em membros de uma família. Ele é um dos ramos da genética, cujo objetivo é focalizado nos pais e no paciente portador de alguma anomalia. Os pais são conscientizados a respeito da doença, do prognóstico, do diagnóstico, do possível tratamento e dos cuidados necessários com o portador, que são indispensáveis para o seu desenvolvimento. Além disso, são orientados sobre a recorrência dessa alteração em outros descendentes na família, levando-os a entender como funciona um planejamento reprodutivo, tentando evitar que apareça em algum outro membro da família. Outra grande atuação do aconselhamento genético é no sentido de amenizar o sofrimento dos pais, que carregam consigo a culpa pela doença do filho (NAKADONARI; SOARES, 2006; PEREIRA et al., 2009; SOUZA et al., 2010).

O aconselhamento genético é dividido em 5 fases importantes, sendo a primeira a da confirmação do diagnóstico, onde será explicado aos pais do portador tudo sobre a patologia do filho. A segunda fase envolverá o cálculo dos riscos genéticos, na qual será avaliado o porquê da doença naquela família, o que a gerou e as chances de recorrência em algum outro membro da mesma família. A terceira fase é a de comunicação com a família, quando será passado para eles tudo sobre o diagnóstico e sobre os riscos genéticos que foram avaliados anteriormente. Na quarta fase serão determinadas quais as ações que devem ser tomadas a respeito do portador, em relação aos cuidados, tratamento, relacionamento e outros; e, por fim, a última fase, que é a de seguimento,

pois o aconselhamento genético terá de ser contínuo e não somente momentâneo, visto que o portador deverá ser acompanhado durante toda a sua vida por profissionais especializados (PINA-NETO, 2008).

Segundo Souza et al. (2010) e Rosado et al. (2012), o diagnóstico precoce de uma alteração cromossômica é de extrema importância. Esse diagnóstico é feito, usualmente, por citogenética clássica, uma área da ciência que estuda a célula através dos cromossomos que ali se encontram. Essas técnicas podem ser utilizadas para estudos pré-natais, pós-natais e ainda em investigações para casos de câncer. Inúmeras modificações ocorreram com as técnicas ao longo do tempo, o que permitiu reduzir os custos e o tempo para obtenção de resultados, o qual demora em média 20 dias.

A citogenética clássica envolve principalmente a cultura de linfócitos obtidos de sangue periférico ou cultura de produtos obtidos de abortos espontâneos. Após a cultura é feito o bandeamento G com tripsina e Giemsa (GTG), que possibilita análise de 450-550 regiões cromossômicas. Além desse método rotineiro para detecção de anormalidades, atualmente utiliza-se a citogenética molecular, que envolve a citogenética clássica com técnicas de biologia molecular, principalmente a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Esses novos métodos possuem a vantagem de elevar o nível de sensibilidade na detecção de anormalidades e diminuir o tempo de espera pelo resultado para 24 – 48 horas. E possuem as desvantagens de serem técnicas muito caras e não identificarem alguns tipos de alterações, como o mosaicismos (MORAES et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2007; KISS et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2009; BALKAN et al., 2010).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é determinar a frequência de anormalidades cromossômicas numéricas, estruturais e anormalidades de cromossomos sexuais em indivíduos atendidos em um laboratório de análises moleculares em Maringá - PR, que são dirigidos para realização dos exames a partir de suspeita médica para alguma alteração e avaliar a real necessidade de encaminhamento do paciente e da família para aconselhamento genético, após o diagnóstico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho trata-se de um estudo retrospectivo, de natureza experimental, onde foi determinada a frequência de alterações cromossômicas que acometem indivíduos atendidos em um laboratório de análises moleculares em Maringá - PR.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, através do parecer nº 16.967.

A coleta de dados foi realizada no período de maio a junho de 2012, sendo que foram analisados os resultados de exames de todos (n=202) os indivíduos atendidos no laboratório de análises moleculares para realização de cariótipo, no período de julho de 2011 a junho de 2012.

O laboratório realiza o exame de cariótipo através de análise citogenética, que envolve a cultura de linfócitos obtidos a partir de sangue total, seguida pela técnica de bandeamento GTG.

Nesta técnica os cromossomos são submetidos à ação da tripsina, uma enzima que provoca a desnaturação das proteínas, seguida de uma coloração por giemsa, originando, assim, o padrão de bandas claras e escuras que são visíveis em microscópio comum.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisados os resultados de exames de todos (n=202) os indivíduos atendidos no laboratório de análises moleculares no período de julho de 2011 a junho de 2012, para realização de análise de cariótipo, com material obtido de sangue periférico.

De um total de 202 resultados analisados, 32 (15,8%) apresentaram alterações cromossômicas. Deste total, 23 (71,8%) apresentaram alterações numéricas e nove (28,1%) apresentaram alterações estruturais. De todos os portadores de anormalidades, 19 eram homens e 13 eram mulheres (Tabela 1). O mosaïcismo foi encontrado em 13 (6,43%) dos pacientes atendido, correspondendo ao aumento ou diminuição de um ou mais cromossomos no genoma, o que está de acordo

com os dados encontrados por Borges-Osório e Robinson (2001) e Vasconcelos et al. (2007).

Tabela 1. Cariótipos presentes nos 32 pacientes que apresentaram alterações, observadas no período de maio a junho de 2012.

Alteração	Cariótipo	N (%)
Trissomia 21	47, XY, +21	11 (34,4)
	47, XX, +21	4 (12,5)
Monossomia X	45, X	4 (12,5)
Duplo X	47, XXY	2 (6,3)
Duplo Y	47, XYY	1 (3,1)
Trissomia X	47, XXX	1 (3,1)
Translocação	46, XY, t(9;22)	4 (12,5)
	46, XX, t(9;22)	1 (3,1)
	46, XX, t(17;20)	1 (3,1)
Deleção	46, X, del(X)	1 (3,1)
	46, XY, del(20)	1 (3,1)
Duplicação	46, XX, dup(2)	1 (3,1)

Fonte: Dados da pesquisa

Referente às alterações numéricas autossômicas (Figura 1), a única encontrada foi a Síndrome de Down ocasionada pela trissomia do cromossomo 21 (66%), o que condiz em termos de frequência com outros trabalhos da literatura. Bertola et al. (2006) encontraram em seu trabalho uma frequência menor de pacientes com Síndrome de Down, 32%, próximo do encontrado por Pereira et al. (2009), que foi 37,3%. No estudo de Vasconcelos et al. (2007) foi observado 44,1% dos pacientes com Síndrome de Down, no de Balkan et al. (2010) foi observado 53,2% e no de Moreira et al. (2011) foi encontrado 43,7%. Já Miziara et al. (2011) encontraram uma frequência próxima do presente estudo, 68,1%. Essa síndrome é representada pelo cariótipo 47, XX, +21 ou 47, XY, +21 e possui como principais características mãos

e pés pequenos e grossos, pescoço largo, orelhas com implantação baixa, língua grande e abdômen saliente. A sua frequência na população é bastante alta, sendo cerca de 1/1000 (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2001; SOUZA et al., 2010).

Segundo Bertola et al. (2006), Vasconcelos et al. (2007), Pereira et al. (2009), Balkan et al. (2010) e Moreira et al. (2011), é encontrada também, dentro das alterações autossômicas, a Síndrome de Edwards, o que não foi confirmado neste estudo, provavelmente pelo fato do número de nossa amostragem ser baixo. Essa síndrome possui como cariótipo 47, XX, +18 ou 47, XY, +18, sendo caracterizada por retardo mental, cardiopatias congênitas, genitais externos anormais, orelhas de baixa implantação, dedos superpostos e mãos cerradas.

Com relação às alterações numéricas envolvendo cromossomos sexuais (Figura 1), foram encontrados 4 pacientes com Síndrome de Turner (17%), 2 com Síndrome de Klinefelter (9%), 1 com Síndrome do Duplo Y (4%) e 1 com Síndrome do Triplo X (4%). A Síndrome de Turner possui cariótipo 45,X e, dentre as principais complicações, se encontram a malformação das gônadas e a infertilidade. Pacientes com Síndrome de Klinefelter possuem cariótipo 47,XXY e apresentam deficiência dos testículos, baixos níveis de testosterona, características secundárias masculinas pouco desenvolvidas e ginecomastia. A Síndrome do Duplo Y tem cariótipo 47, XYY e se caracteriza por retardo mental, orelhas anormais, hipogonadismo e crises convulsivas frequentes e pacientes com Síndrome do Triplo X têm cariótipo 47, XXX, apresentando retardo mental, esterilidade, incoordenação motora e imaturidade social (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2001; SOUZA et al., 2010).

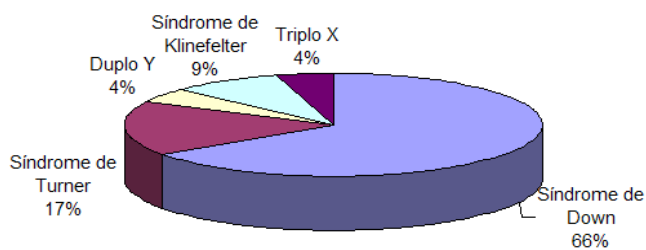


Figura 1. Frequência de alterações numéricas observadas no período de maio a junho de 2012 em um laboratório de análises moleculares de Maringá.

Fonte: Dados da pesquisa

Foram encontrados, dentre as alterações estruturais (Figura 2), seis casos de translocação (67%), dois casos de deleção (22%) e um caso de duplicação (11%). Nas translocações foram encontrados dois tipos diferentes, sendo a do cromossomo nove com o cromossomo 22 em cinco pacientes e a do braço curto do cromossomo 17 com o braço longo do cromossomo 20 em um dos pacientes. Dentre as deleções, ocorreram um caso de deleção do cromossomo X e um caso de deleção do braço longo de um dos cromossomos do par 20; e o caso de duplicação ocorreu no braço curto do cromossomo 2. Assim os resultados diferem do encontrado por outros autores. Balkan et al. (2010) determinaram uma maior frequência de inversão (28,4%), seguida por translocação balanceada (19,6%); Vasconcelos et al. (2007) encontraram deleção na maioria dos pacientes (37,5%) e as demais alterações estruturais em pequena porcentagem; e Bertola et al. (2006) obtiveram resultados com uma maior frequência de deleção do braço curto do cromossomo cinco (4,0%) seguido das translocações (2,6%).

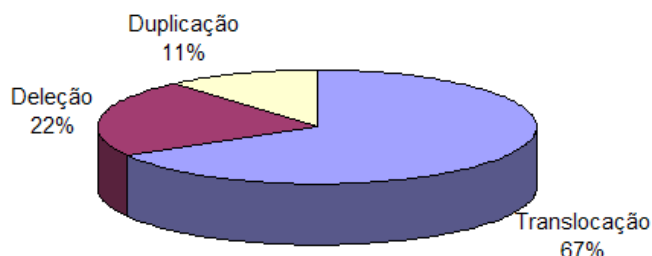


Figura 2. Frequência de alterações estruturais observadas no período de maio a junho de 2012 em um laboratório de análises moleculares de Maringá.

Fonte: Dados da pesquisa

Segundo Pina-Neto (2008), após o diagnóstico é necessário um esclarecimento sobre a etiologia da doença genética, a avaliação da família e a determinação dos riscos de recorrência da patologia. Essas são funções do aconselhamento genético, que também é responsável pelo acompanhamento de pacientes que tenham alterações cromossômicas, sendo de extrema importância para as famílias passarem por esse atendimento. Contudo, no presente estudo não se têm informações a respeito do seguimento dos pacientes após o diagnóstico de qualquer tipo de alteração.

Além de uma amostra de baixo número, existe outra desvantagem que pode ter sido um dos fatores

determinantes para a variação de resultados encontrados entre o presente estudo e o de outros autores, que é a técnica utilizada. A citogenética clássica, que foi realizada nas amostras coletadas, muitas vezes tem baixa sensibilidade para alguns tipos de alterações genéticas, o que difere da citogenética molecular, utilizada em estudos de outros autores, que aumenta as chances de detecção de anormalidades não tão comuns, mas que podem ser encontradas em alguns pacientes.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A frequência de alterações cromossômicas encontrada demonstra a importância do diagnóstico citogenético em pacientes com algum tipo de malformação. Porém, demonstra ainda que algumas alterações podem não ser detectadas na metodologia utilizada usualmente, levando a necessidade de utilização de outras técnicas, como a citogenética molecular, que consigam detectar uma maior quantidade das alterações. Conclui-se, ainda, pela revisão de literatura, que é de fundamental importância o encaminhamento das famílias para o aconselhamento genético após o diagnóstico, melhorando a vida e facilitando a relação da família com o portador.

5 AGRADECIMENTO

Agradeço ao Grupo São Camilo – Divisão de Biotecnologia e aos colaboradores envolvidos, pela disponibilidade de realização da coleta de dados no local, o que foi de grande importância para desenvolvimento do presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- BALKAN, M. et al. Cytogenetic analysis of 4216 patients referred for suspected chromosomal abnormalities in Southeast Turkey. **Genetics and Molecular Research**, Diyarbair, v. 9, n. 2, p. 1094-1103, 2010.
- BERTOLA, D. R. et al. Perfil dos pacientes atendidos no ambulatório de genética em hospital universitário de assistência terciária. **Revista de Pediatria**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 13-17, 2006.
- BORGES-OSÓRIO, M.R; ROBINSON, W. M. **Genética humana**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- BURNS, G. W; BOTTINO, P.J. **Genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- GUSMÃO, F. A. F.; TAVARES, E. J. M.; MOREIRA, L. M. A. Idade materna e Síndrome de Down no nordeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p.973-978, 2003.
- KISS, A. et al. Anormalidades cromossômicas em casais com história de aborto recorrente. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p. 68-74, 2009.
- MIZIARA, R. C. et al. The Cytogenetic Examination as a Tool for the Diagnosis of Chromosomal Disorders. **International Journal of Morphology**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 57-64, 2011.
- MORAES, A. C. et al. Abordagem citogenética e molecular em material de abortos espontâneos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 9, p. 554-560, 2005.
- MOREIRA, L. M. A. et al. Alterações cromossômicas em 813 atendimentos em serviço universitário de genética comunitária. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 10, n. 1, p. 26-28, 2011.
- NAKADONARI, E. K.; SOARES, A. A. Síndrome de Down: considerações gerais sobre a influência da idade materna avançada. **Arquivos do Mudi**, Maringá, v. 10, n. 2, p. 5-9, 2006.
- PEREIRA, T. M. et al. Frequência das Anormalidades Cromossômicas: Importância para o diagnóstico citogenético. **Revista Arquivos de Ciências da Saúde**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 31-33, 2009.
- PINA-NETO, J. M. Aconselhamento genético. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 4, p. 20-26, 2008.
- ROLNIK, D. L. et al. Análise citogenética em material de abortamento espontâneo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 56, n. 6, p. 681-683, 2010.

ROSADO, L. A. M. et al. Diagnóstico prenatal citogenético mediante la hibridación *in situ* com fluorescência. **Revista Cubana de Ginecologia y Obstetrícia**, Cuba, v. 38, n. 1, p. 1-10, 2012.

SOUZA, M. O. et al. Estudos citogenéticos em casais com abortamentos espontâneos recorrentes. **Revista Arquivos de Ciências da Saúde**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 17-19, 2004.

SOUZA, J. C. M. et al. Síndromes Cromossômicas: uma revisão. **Cadernos da Escola de Saúde**, Curitiba, v. 3, p. 1-12, 2010.

TEIXEIRA, A. C. Z. et al. Estudo citogenético de abortos espontâneos. **Revista Arquivos de Ciências da Saúde**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 59-61, 2009.

VASCONCELOS, B. et al. Anormalidades cromossômicas nos pacientes atendidos em serviço de genética. **Revista de Pediatria**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 26-32, 2007.

ZAGO, M. K. et al. Variáveis maternas e paternas nas síndromes cromossômicas encontradas na base de dados do Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congênitas. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 55, n. 4, p. 345-349, 2011.

Recebido em: 13 de novembro de 2012

Aceito em: 27 de novembro de 2013