

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

MARCOS ROBERTO COCHAK

**ASSOCIAÇÃO DE CROMOSSOMOPATIAS HUMANAS COM USO E OCUPAÇÃO
DO SOLO EM REGIÕES BRASILEIRAS: ESTUDO RETROSPECTIVO DE 2005 A
2015.**

CASCAVEL-PR
Novembro, 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

MARCOS ROBERTO COCHAK

**ASSOCIAÇÃO DE CROMOSSOMOPATIAS HUMANAS COM USO E OCUPAÇÃO
DO SOLO EM REGIÕES BRASILEIRAS: ESTUDO RETROSPECTIVO DE 2005 A
2015.**

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: fatores que Influenciam a Morfofisiologia Orgânica

Orientadora: Prof^a Dr^a Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro

Coorientadora: Prof^a Dr^a Ana Tereza Bittencourt Guimarães

Assinatura do Orientador (a):

CASCAVEL–PR,
Novembro, 2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARCOS ROBERTO COCHAK

ASSOCIAÇÃO DE CROMOSSOMOPATIAS HUMANAS COM USO E OCUPAÇÃO DO SOLO EM REGIÕES BRASILEIRAS: ESTUDO RETROSPECTIVO DE 2005 A 2015.

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientadora: Prof. Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro
UNIOESTE - Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dra. Ana Tereza Bittencourt Guimarães
UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dra. Rose Meire Costa Brancalhão
UNIOESTE - Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dra. Maria Leandra Terencio
UNILA - Universidade Federal da Integração Latino-Americana

CASCAVEL-PR
Novembro, 2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas – UNIOESTE – Campus Cascavel)

C593a Cochak, Marcos Roberto.
Associação de cromossomopatias humanas com uso e ocupação do solo em regiões brasileiras: estudo retrospectivo de 2005 a 2015./ Marcos Roberto Cochak. --- Cascavel: UNIOESTE, 2017.
70 f.: il.
Orientadora: Profª. Drª. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro
Co-orientadora: Profª. Drª. Ana Tereza Bittencourt Guimarães
X'
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017.
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.
Inclui Bibliografia

1. Genética médica. 2. Alterações cromossômicas . 3. Máxima entropia. 4. Ocupação e uso do solo. 5. Agrotóxicos. I. Ribeiro, Lucinéia de Fátima Chasko. II. Guimarães, Ana Tereza Bittencourt. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 576.542

A definição dos pesticidas, portanto, deve constituir preocupação de todos nós. Uma vez que vamos viver tão intimamente ligados a tais substâncias químicas – comendo-as e bebendo-as
- deixando que elas entrem na própria medula dos nossos ossos
- será melhor que saibamos alguma coisa a respeito de sua natureza e da sua potência.

Rachel Carson
Primavera Silenciosa, 1962

Dedico este trabalho à minha Família, Professoras e Colegas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por me oportunizar o conhecimento e ser a luz para minhas conquistas.

Aos meus pais, Cecília e Miguel, pela dedicação, carinho e apoio para a vida.

À minha esposa, Rosane, minhas filhas Eduarda e Emanuelle, pela compreensão, incentivo e carinho nesta minha trajetória.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde e à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pelo acolhimento e oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Às minhas professoras, às quais tenho imensa gratidão e admiração.

À minha orientadora, Prof^a Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, pela amizade, paciência, sendo incansável na dedicação deste trabalho, por acreditar em mim e ter a percepção das minhas limitações, moldando a pesquisa e enriquecendo cada nova situação enfrentada.

À minha coorientadora, Prof^a Ana Tereza Bittencourt Guimarães, por disponibilizar seu talento neste trabalho, contribuindo de forma valiosa no estudo estatístico, esclarecendo e melhorando as informações obtidas nesta pesquisa.

À Prof^a Rose Meire Costa Brancalhão, por acreditar neste trabalho desde o início e compartilhar suas sugestões enriquecedoras.

Prof^a Célia Cristina Lima Beu, pelas contribuições e apontamentos na qualificação.

À colega Marília, muito obrigado pela prontidão em conceder seus conhecimentos em bioestatística e por sua dedicação na elaboração dos dados.

Ao Laboratório Álvaro (DASA), e à minha coordenadora, Regina Kuhbauche, pela seção dos dados e viabilização deste trabalho.

Às colegas da Citogenética, Amanda, Flávia, Juliana, Jhuliana, Renata e Roberta, que além de me apoiarem, deram suporte durante minhas ausências.

A todos os colegas do mestrado, pelo companheirismo, amizade, incentivo e cooperação.

E respeitosamente aos pacientes que, através de seus resultados, permitiram a realização deste trabalho.

E a todos que me incentivaram e colaboraram.

Muito obrigado!

RESUMO

As alterações cromossômicas são doenças genéticas representativas na população, responsáveis por abortamentos espontâneos, problemas relacionados à infertilidade e grande número de anomalias congênitas, que causam impacto psicossocial e econômico nas famílias e no sistema de saúde. Estão presentes em cerca de 1% dos nativos, 2% das concepções conhecidas em mulheres com idade acima de 35 anos e quase a totalidade dos abortos ocorridos no primeiro trimestre de gestação. Estas anomalias envolvem alterações no conjunto ou estrutura dos cromossomos e são denominadas como síndromes, dentre elas a de Down, ou trissomia do 21, é a mais conhecida, correspondendo à quarta causa mais frequente de anomalias congênitas. As alterações cromossômicas podem ser herdadas ou originadas *de novo*, tendo influência biológica ou associadas a fatores ambientais, como a exposição a agentes físicos e químicos, como os resíduos industriais e agrotóxicos. O diagnóstico é feito através da análise do cariótipo, e o seu conhecimento é a base para o tratamento clínico subsequente, prognóstico e dados sobre o risco de recorrência para o aconselhamento genético. Assim, o objetivo desta pesquisa foi analisar através de estudo retrospectivo as cromossomopatias humanas oriundas de regiões brasileiras no período de dez anos (2005 a 2015), e correlacioná-las com o uso e ocupação de solo através do programa MaxEnt (máxima entropia), um modelo preditivo para avaliação de associação de ocorrência de casos em função do uso e ocupação do solo. Para tanto, foi realizado um estudo documental, no banco de dados dos resultados de cariótipos, de amostras enviadas para o estudo citogenético de um laboratório clínico de abrangência nacional. Dos 43.672 resultados de cariótipo, 83% (n=36.435) foi normal, sendo 52% (n=18.946) do sexo feminino e 48% (n=17.489) masculino. Cariótipos com alterações cromossômicas foram encontradas em 17% (n=7.237), onde 52% (n=3763) do sexo feminino e 48% (n=3474) do sexo masculino, sendo as aneuploidias as mais frequentes (77%; n=5.558). As alterações estruturais somaram 16% (n=1.163) e alterações numéricas e estruturais concomitantes, 7% (n=516). Das alterações, 79,2% envolvia cromossomos autossômicos, 20,3% cromossomos sexuais e 0,48% envolvia ambos autossômicos e sexuais. Dentre os casos alterados, 9% (n=663) foi detectado em mosaico. Caracterizando as cromossomopatias por regiões do Brasil, a maior proporção de alterações por habitantes foi na região Sul, com 6/100.000, seguida pelas regiões Centro-Oeste e Norte, com 4/100.000. As regiões Nordeste e Sudeste apresentaram as menores proporções, 3/100.000 e 2/100.000, respectivamente. Ao caracterizar as frequências por regiões do Brasil, foi possível observar que em número absoluto, as maiores ocorreram nas regiões Norte e Nordeste. As alterações autossômicas estruturais na região Sudeste, e numéricas e estruturais concomitantes na região Norte. Alterações em mosaicos foram mais frequentes nas regiões Sul, Nordeste e Centro-Oeste e as de linhagem única foram mais significativamente na região Sudeste. Em relação ao

uso e ocupação de solo, as áreas urbanizadas apresentaram uma maior probabilidade de ocorrência de cromossomopatias (50 a 90%), e seguida por áreas de lavouras permanentes (40 a 50%). Esta pesquisa demonstra as prevalências das alterações cromossômicas e suas distribuições geográficas no Brasil sendo de grande valia, pois estudos deste gênero são escassos no País e, poderão servir de ferramenta para identificar o risco de incidência e recorrência de doenças cromossômicas, possibilitando o aconselhamento genético e informações para a elaboração de políticas públicas que melhorem a qualidade de vida dos pacientes.

Palavras-chave: Genética Médica. Alterações cromossômicas. Máxima entropia. Ocupação e uso do solo. Agrotóxicos

ABSTRACT

A LAND USE AS AN EFFECT FACTOR ON THE OCCURRENCE OF CHROMOSOMAL DISEASES IN BRAZIL

Chromosomal alterations are genetic diseases that are very representative in the population, responsible for spontaneous abortions, problems related to infertility, and a large number of congenital anomalies that cause psychosocial and economic impact in families and also in the health system. They are present in about 1% of the liveborn, 2% of the conceptions known in women over the age of 35 years and almost all the abortions occurred in the first trimester of gestation. These anomalies involve changes in the set or structure of the chromosomes and are referred to as syndromes, such as Down syndrome or trisomy 21 is the best known, corresponding to the fourth most frequent cause of congenital anomalies. Chromosomal changes may be inherited or *de novo* originated, having biological influence or associated with environmental factors such as exposure to physical and chemical agents such as industrial wastes and agrochemicals. Diagnosis is made through karyotype analysis, and their knowledge is the basis for subsequent clinical treatment, prognosis, and risk-of-recurrence data for genetic counseling. Thus, the objective of this research was to analyze, through a retrospective study, human chromosomal disorders from regions of Brazil in the period of ten years (2005 to 2015), and correlates them with the use and occupation of soil through MaxEnt (maximum entropy) a predictive model for evaluation of association of occurrence of cases of chromosomal alterations as a function of soil use and occupation. In order to do so, a documentary study was carried out in the karyotype database of samples sent to the cytogenetic study of a national clinical laboratory. Of the 43,672 karyotype results, 83% (n= 36,435) were normal, 52% (n= 18,946) female and 48% (n= 17,489) male. Karyotypes with chromosomal abnormalities were found in 17% (n= 7,237), where 52% (n= 3763) female and 48% (n= 34740) male, were the most frequent aneuploidies (77% 5.558), structural changes totaled 16% (n = 1,163) and concomitant numerical and structural changes 7% (n= 516). 79.2% of the alterations involved autosomal chromosomes and 20.3% sex chromosomes, and 0.48% involved both autosomal and sexual. Among the altered cases, 9% (n= 668) were detected in mosaic. Characterizing chromosomal diseases by regions of Brazil, the highest proportion was in the South region, with 6 cases changed/100,000 inhabitants, followed by the Midwest and North regions, with 4 cases/100,000 inhabitants. The Northeast and Southeast regions presented the lowest proportions (3 cases changed/100,000 inhabitants and 2 altered cases/100,000 inhabitants respectively). When characterizing chromosomal diseases by regions of Brazil, it was possible to observe that in absolute numbers the highest frequencies occurred in the North and Northeast regions. Structural autosomal alterations were more frequent in the Southeast region, and numerical and structural concomitants

were more frequent in the Northern region. Changes in mosaics were more frequent in the South, Northeast and Center-West regions, and those of single lineage were significantly more frequent in the Southeast region. Regarding land use and occupation, urbanized areas had a higher probability of occurrence of chromosomal diseases (50 to 90%), followed by areas using permanent crops (40 to 50%). This research demonstrates the prevalence of chromosomal diseases and their geographic distributions in Brazil being of great value, since studies of this genre are scarce in Brazil and, can serve as a tool to identify the incidence and recurrence risk of chromosomal diseases, enabling genetic counseling and information for the elaboration of public policies that improve the patients quality of life.

Keywords: Medical Genetics. Chromosomal alterations. Maximum entropy. Occupation and land use. Pesticides.

SUMÁRIO

RESUMO	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	13
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	16
INTRODUÇÃO GERAL.....	16
OBJETIVOS	19
a. Geral:.....	19
b. Específicos:.....	19
REVISÃO DE LITERATURA.....	20
Cromossomos	20
Citogenética humana	23
Análise Cromossômica e Cromossomopatias	26
Análise e Principais alterações Cromossômicas.....	27
Fatores ambientais e sua relação com as cromossomopatias	32
REFERÊNCIAS	34
ARTIGO	37
ANEXOS.....	63

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo esquemático dos níveis de compactação da molécula de DNA. Mostra a dupla hélice associada com as histonas, sua organização nos nucleossomos, formação do solenoide, alças e o cromossomo, constituído pelas cromátides (GERSEN; KEAGLE, 2013)	22
Figura 2: Fotomicrografias dos cromossomos e suas características para identificação e classificação em grupos e números baseados no tamanho, padrão de bandas e posição do centrômero (MALUF; RIEGEL, 2011).	23
Figura 3 - Esquema das Fase da Mitose (SCHAEFER; THOMPSON, 2015).	24
Figura 4 - Esquema comparativo entre as divisões da meiose (A) e comparando com as fases da mitose (B) (ALBERTS et al., 2011).	25
Figura 5 – Esquema dos passos do cultivo celular na obtenção de células em metáfase para análise do cariótipo (SNUSTAD; SIMMONS, 2012).	28
Figura 6 - Desenho do idioagrama mostrando o padrão de bandas G para cromossomos, baseado no ISCN, 2005 (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2007).	28
Figura 7- Fotomicrografia de cromossomos em metáfase e cariótipo humano feminino (46,XX) (ZNEIMER, 2014).	29
Figura 8 – Esquema das alterações cromossômicas estruturais. A) Deleções terminal e intersticial. B) Crossing-over desigual entre homólogos originando material deletado e duplicado. C) Cromossomo em anel. D) Isocromossomo. E) Translocação Robertsoniana entre acrocêntricos. F) Inserção de um segmento de um cromossomo em outro não homólogo (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2007).	31

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 TIPOS DE ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS	30
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figuras do artigo

- Figura 1 Proporção de exames de cromossomopatias por 100.000 habitantes em cada região do Brasil. * A população de cada região foi baseada no censo IBGE de 2010.....47
- Figura 2 Mapa com a probabilidade de crianças nascerem com mutações cromossômicas em função do uso e ocupação do solo.49

LISTA DE TABELAS

Tabelas do Artigo

Tabela 1. % de uso e ocupação do solo por região do Brasil	43
Tabela 2 Caracterização Geral das Alterações Cromossômicas (n=7244).....	45
Tabela 3 Frequências absolutas dos tipos de alterações e comparação entre as regiões brasileiras. P-valor do teste de Qui Quadrado para Independência.	47
Tabela 4 Distribuição da probabilidade de pessoas com mutação cromossômica em função do tipo de uso e ocupação do solo do IBGE [19].	50

INTRODUÇÃO GERAL

As cromossomopatias representam uma das principais causas de doenças genéticas que levam a alterações no genoma do indivíduo e, estão presentes em cerca de 1% dos recém-nascidos vivos e em 2% dos diagnósticos pré-natais em mulheres com idade acima de 35 anos. Cerca de 50% dos abortos espontâneos no primeiro trimestre apresentam alterações cromossômicas (ASTBURY, 2011; NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2007). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015), estima-se que, no mundo, 276.000 recém-nascidos morrem nas primeiras 4 semanas, devido a anomalias congênitas, especialmente as relacionadas à Síndrome de Down, e no Brasil, em 2013, foram registradas 17.674 mortes por anomalias congênitas de crianças com até 4 anos de idade (WHO, 2013).

A ocorrência das cromossomopatias causam impacto psicossocial e econômico nas famílias e no sistema de saúde, pois seus portadores demandam cuidados especiais, sendo necessário realizar adequações estruturais na moradia, mudar de domicílio para um local próximo ao serviço de saúde, gastos com medicamentos e transporte, dispor de um cuidador ou a saída do emprego de algum membro da família para assumir esta função (ASTBURY, 2011; HOROVITZ; LLERENA JR; MATTOS, 2005; HOROVITZ et al., 2006). No caso dos serviços públicos, há gastos com os exames, tratamentos, medicamentos, cirurgias, educação especial e aposentadorias. Além disso, muitos locais não estão equipados para receber portadores de necessidades especiais e, por vezes, há falta de preparo de profissionais em escolas e instituições que recebem pessoas com estas condições (HOROVITZ et al., 2006).

Vários fatores podem promover a ocorrência das cromossomopatias, entre eles estão os hereditários, a idade materna avançada (principalmente cromossomopatias numéricas), a exposição a teratógenos como álcool, drogas, medicamentos, infecções virais e ainda os ambientais, exposição a agentes físicos e químicos, como os resíduos industriais e agrotóxicos (UEKER et al., 2016).

Xenobióticos podem influenciar na saúde humana e diversos fatores ambientais têm sido associados ao aumento da frequência de alterações cromossômicas, tanto em células somáticas como germinativas. A exposição a xenobióticos pode ser ocupacional, mas há outros riscos como os indiretos, por estar inserido em áreas próximas de lavouras, indústrias e de seus despejos ou ainda, através de alimentos, ar, água e produtos ou em locais de acidentes ambientais (DOLK; VRIJHEID, 2003; PIGNATI; MACHADO; CABRAL, 2007).

Dependendo do tempo de exposição e dose, podem afetar a saúde reprodutiva, por exposição paterna ou materna nos períodos pré ou pós-concepcional, e se associados com características socioeconômicas, culturais e biológicas, podem intensificar este risco (BUDD et al., 2015; GHOSH et al., 2011; JI et al., 2012). Especificamente no contexto da relação das cromossomopatias e os fatores ambientais, Silva et al. (2011) e Ueker et al. (2016) mostraram que há uma relação entre o aumento na frequência de malformações congênitas e a exposição a pesticidas, e que a manipulação, ou exposição de pesticidas por progenitores com baixo nível educacional aumenta este risco.

Ainda, estudos correlacionam os riscos de nascimento com alterações cromossômicas de mulheres com residência nas proximidades de indústrias poluentes, atividades ocupacionais ou a exposição a pesticidas (BRENDER et al., 2008; HEEREN; TYLER; MANDEYA, 2003; UEKER et al., 2016).

Sendo assim, a realização e divulgação de estudos sobre as cromossomopatias trazem inúmeros benefícios, pois proporciona a compreensão da incidência, herdabilidade, efeito de fatores ambientais e recorrência de alterações cromossômicas na população, sendo dados fundamentais para o aconselhamento genético e, na elaboração de políticas públicas que promovam uma melhora da qualidade de vida de seus portadores (CHRISTIANSON; HOWSON; MODELL, 2006; HOROVITZ et al., 2006).

No entanto, ainda são escassas as pesquisas desta natureza no Brasil, em especial pesquisas que correlacionem as cromossomopatias e sua relação com o uso e ocupação do solo (OLIVEIRA et al., 2014; SILVA et al., 2011). Neste sentido, considerando a importância de se conhecer as prevalências das cromossomopatias nas regiões brasileiras, bem como a relação da ocorrência com fatores ambientais, em especial relacionado com o uso e ocupação do solo, foi desenvolvido este estudo retrospectivo que, contempla 10 anos de análises e mais de quarenta mil resultados de cariótipos humanos.

OBJETIVOS

a. Geral:

- Analisar a associação do uso e ocupação do solo, através de estudo retrospectivo, com as cromossomopatias humanas oriundas de regiões brasileiras no período de dez anos (2005 a 2015);

b. Específicos:

- Categorizar e caracterizar as alterações cromossômicas em numéricas e estruturais, em relação ao grupo populacional e distribuição geográfica;
- Estimar a prevalência e a distribuição geográfica das cromossomopatias no Brasil;
- Associar a prevalência de cromossomopatias ao uso e ocupação do solo de diferentes regiões do Brasil.

REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão abrange várias áreas, como o conhecimento da estrutura básica dos cromossomos, as técnicas de obtenção de metáfases e as cromossomopatias, detalhando as principais alterações numéricas e estruturais, os fatores ambientais correlacionados com as cromossomopatias e o uso e utilização do solo no Brasil.

Cromossomos

Um dos principais avanços da genética humana foi a descoberta, em 1956, do número cromossômico humano de 46, sendo 22 pares autossômicos e 1 par sexual XX (sexo feminino) ou XY (sexo masculino). Esta descoberta contribuiu para a evolução das técnicas em citogenética humana, baseadas em métodos utilizados em plantas, insetos e em estudos de tumores de animais (MALUF; RIEGEL, 2011; TJIO; LEVAN, 1956).

Nos anos seguintes, as análises cromossômicas permitiram identificar os cromossomos e relacioná-los a doenças e anomalias congênitas, tais como as síndromes: de Down (trissomia do 21), Turner (45, X), Klinefelter (47, XXY), triplo X, de Patau (trissomia do 13) e de Edwards (trissomia do 18) (FERGURSON-SMITH, 2015; LUTHARDT; KEITGES, 2001). Após a identificação das alterações através da citogenética, foi possível estabelecer uma ligação entre estas anomalias e as perdas gestacionais, infertilidade, anomalias congênitas, distúrbios da diferenciação sexual e outras doenças genéticas (LUTHARDT; KEITGES, 2001).

Na identificação cromossômica, é fundamental o conhecimento de sua estrutura. O cromossomo é formado por uma única molécula de DNA associada a proteínas, como as histonas e não histonas, e que se encontra condensado no núcleo celular. Ao longo do ciclo celular, o DNA tem diferentes graus de compactação. Na interfase, o complexo DNA e proteínas é denominado cromatina; enquanto que na divisão celular, fase na qual o DNA está duplicado e condensado, constituindo o cromossomo (Figura 1) (GERSEN; KEAGLE, 2013). Especificamente na metáfase, os cromossomos estão em grau máximo de compactação, facilitando sua visualização. O cromossomo metafásico consiste de duas cromátides-irmãs unidas pelo centrômero e por coesinas (Figura 2) (FERGURSON-SMITH, 2015; MALUF; RIEGEL, 2011; STRATCHAN; READ, 2002).

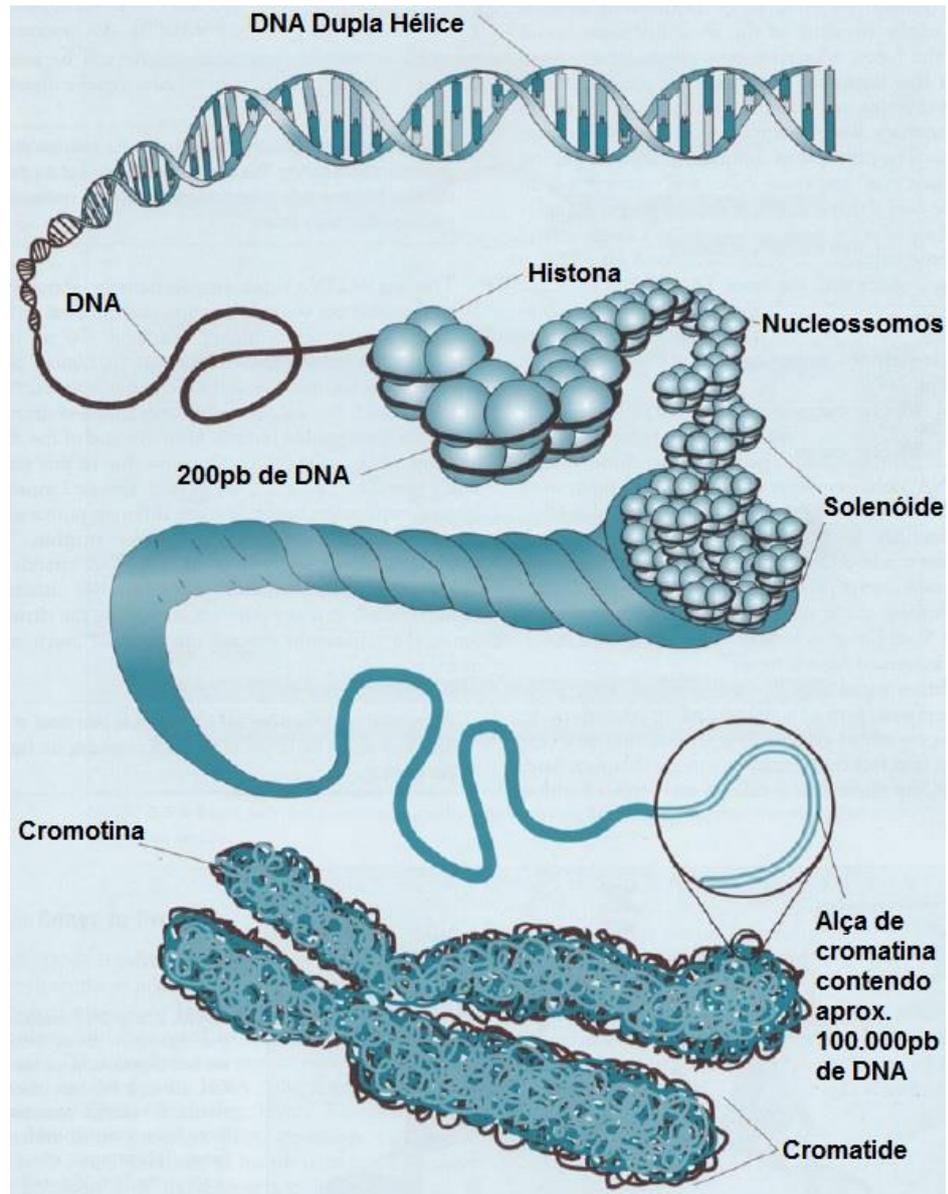


Figura 1 - Modelo esquemático dos níveis de compactação da molécula de DNA. Mostra a dupla hélice associada com as histonas, sua organização nos nucleossomos, formação do solenoide, alças e o cromossomo, constituído pelas cromátides (GERSEN; KEAGLE, 2013)

Nos cromossomos dos eucariotos, o DNA armazena cópias de informações do genoma e a funcionalidade dos cromossomos está vinculada a três partes essenciais: telômeros, centrômeros e cinetócoros (Figura 2). Os telômeros se localizam na extremidade dos braços dos cromossomos e são regiões especializadas em manter e garantir estabilidade para a replicação do DNA. O centrômero, ou constrição primária, onde as cromátides-irmãs estão ligadas, delimita os braços curtos (p) e longos (q) do cromossomo, sendo fundamental na divisão celular na segregação

das cromátides (MALUF; RIEGEL, 2011; STRATCHAN; READ, 2002; SWANSBURY, 2003).

A posição do centrômero determina a classificação dos cromossomos em: acrocêntricos, submetacêntricos e metacêntricos (Figura 2) (MALUF; RIEGEL, 2011; STRATCHAN; READ, 2002; SWANSBURY, 2003). Já o cinetócoro, região específica no centrômero, é o local de ligação das fibras do fuso mitótico na divisão celular (MALUF; RIEGEL, 2011; STRATCHAN; READ, 2002).

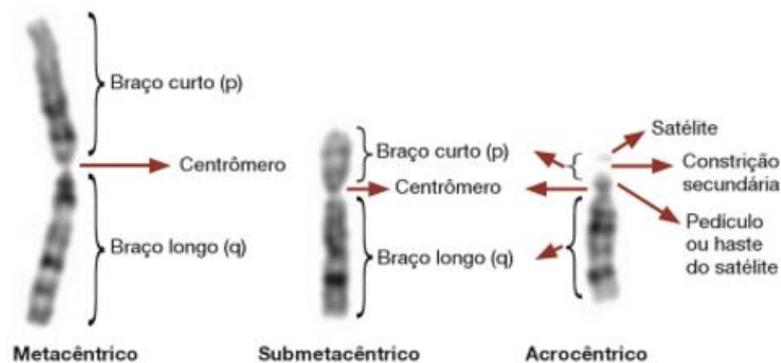


Figura 2: Fotomicrografias dos cromossomos e suas características para identificação e classificação em grupos e números baseados no tamanho, padrão de bandas e posição do centrômero (MALUF; RIEGEL, 2011).

Citogenética humana

O estudo da citogenética humana se baseia no conhecimento da estrutura cromossômica e no entendimento da divisão celular que, nas células somáticas é conhecida como mitose e nas germinativas, meiose. A divisão é uma das fases do ciclo de vida das células, na qual durante a interfase, período marcado por alterações no metabolismo que levam a divisão do núcleo e do material genético, e a divisão do citoplasma, formando células filhas (ALBERTS et al., 2011; SWANSBURY, 2003).

Na mitose, a célula duplica seu material genético e dá origem a duas células, com número cromossômico idêntico ao da célula precursora. O processo se inicia na fase de prófase, quando os cromossomos consistem de duas cromátides irmãs ligadas ao centrômero (Figura 3). O citoesqueleto organiza o fuso mitótico, responsável pelo alinhamento dos cromossomos em direção ao plano equatorial da célula e pela segregação dos mesmos na anáfase (ALBERTS et al., 2011;

NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2007; SCHAEFER; THOMPSON, 2015; SWANSBURY, 2003).

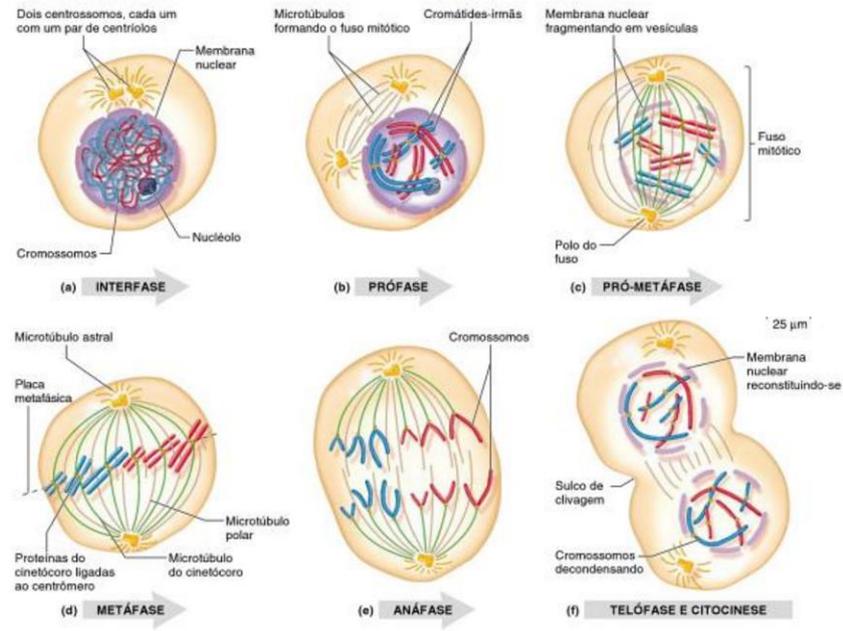


Figura 3 - Esquema das Fase da Mitose (SCHAEFER; THOMPSON, 2015).

A meiose ocorre apenas nas células germinativas, uma etapa reducional na qual ocorrem duas divisões nucleares seguidas, que formam quatro novas células haploides, genética e cromossomicamente diferentes entre si e distintas da célula mãe (Figura 4). No processo de fertilização para que seja formado o zigoto com número cromossômico diploide ($46 \text{ cromossomos} = 2n$) a partir de duas células germinativas haploides ($23 \text{ cromossomos} = n$), o ovócito e o espermatozoide. A meiose está envolvida na evolução e adaptação das espécies pois é quando ocorre a recombinação gênica (MALUF; RIEGEL, 2011; STRATCHAN; READ, 2002; SWANSBURY, 2003; THERMAN; SUSMAN, 1996).

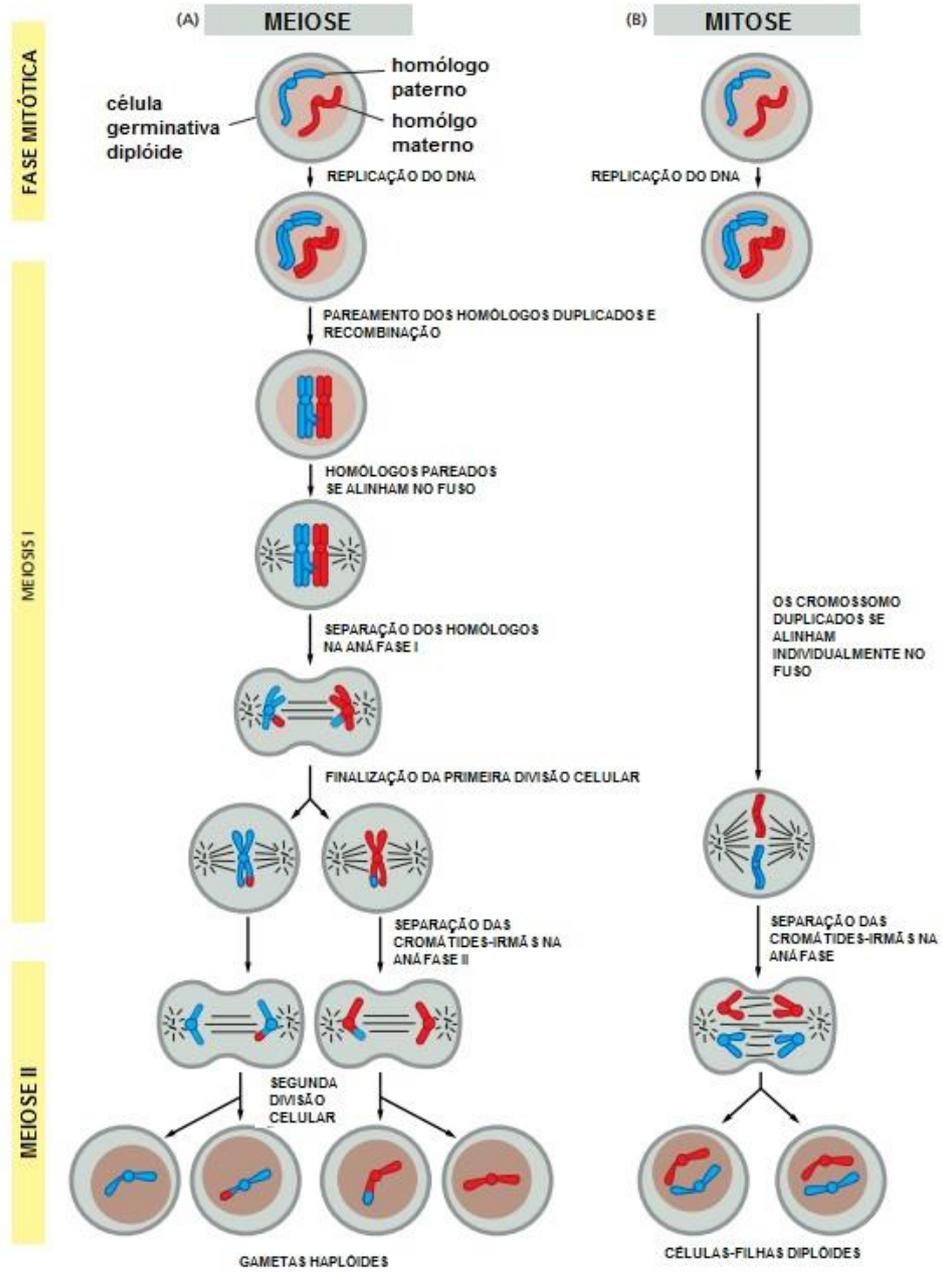


Figura 4 - Esquema comparativo entre as divisões da meiose (A) e comparando com as fases da mitose (B) (ALBERTS et al., 2011).

É importante ressaltar que falhas em qualquer fase do processo de divisão celular ou quebras no DNA vão originar as alterações cromossômicas que podem ser numéricas e/ou estruturais (MALUF; RIEGEL, 2011; SWANSBURY, 2003).

Análise Cromossômica e Cromossomopatias

O estudo cromossômico pode ser efetuado no pré-natal e no pós-natal e várias são as suas indicações baseadas, geralmente, em dados clínicos, como:

- **Problemas de crescimento ou no desenvolvimento:** como retardo mental, fáceis dismórficas, malformações, baixa estatura, genitália ambígua (ASTBURY, 2011; HOROVITZ; LLERENA JR; MATTOS, 2005);
- **Natimorto ou morte neonatal:** aproximadamente 0,7% dos nascidos vivos e em torno de 10% dos natimortos apresentam alterações cromossômicas, sendo recomendado que seja realizado análise citogenética de todos os natimortos para investigar uma possível razão para a perda (ASTBURY, 2011; HOROVITZ; LLERENA JR; MATTOS, 2005; NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2007);
- **Problemas de fertilidade:** casais com duas ou mais perdas gestacionais têm uma proporção de 3% a 6% de serem relacionadas com alterações cromossômicas dos pais (ASTBURY, 2011; HOROVITZ; LLERENA JR; MATTOS, 2005; NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2007);
- **Histórico familiar:** em algumas circunstâncias, abortamento recorrente, retardo mental, é indicado o estudo de cariótipo familiar para causas conhecidas ou suspeitas (ASTBURY, 2011; HOROVITZ; LLERENA JR; MATTOS, 2005; NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2007);
- **Neoplasias:** cânceres estão associados a alterações cromossômicas e o estudo cromossômico pode ser realizado para diagnosticar ou dar informações sobre o prognóstico da doença (ASTBURY, 2011; HOROVITZ; LLERENA JR; MATTOS, 2005; NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2007);
- **Gravidez em mulheres com idade avançada:** há um risco aumentado para ocorrência de alterações cromossômicas, como as aneuploidias, principalmente a trissomia do 21, em fetos de mulheres com idade acima de

35 anos (ASTBURY, 2011; HOROVITZ; LLERENA JR; MATTOS, 2005; NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2007).

Análise e Principais alterações Cromossômicas

Diferentes tipos de tecidos biológicos podem ser usados para o estudo cromossômico, tais como células amnióticas, vilosidades coriônicas, sangue fetal, restos de abortos, medula óssea, material de tumor, pele e outros fluidos biológicos, sendo o sangue periférico o mais utilizado na rotina devido a facilidade técnica e de obtenção (ZNEIMER, 2014). A identificação de alterações cromossômicas fornece um diagnóstico consistente, sendo a base para o tratamento clínico subsequente, assim como prognóstico e dados sobre o risco de recorrência para o aconselhamento genético (TURNPENNY; ELLARD, 2007).

Os estudos cromossômicos de doenças constitucionais¹ presentes no pós-natal são feitos a partir de linfócitos obtidos de sangue periférico, que são cultivados para obtenção de maior número de células em metáfase (ZNEIMER, 2014). O cultivo dos linfócitos é efetuado a uma temperatura controlada, 37°C, por 72 horas, no qual as células são estimuladas a se proliferam com adição de um agente mitógeno (fitohemaglutinina). Posteriormente, ocorre a adição da colchicina, um inibidor das fibras do fuso mitótico, que possibilita a obtenção de um grande número de linfócitos em metáfase. As células mitóticas passam por um tratamento com solução hipotônica (KCl 0,075 mM) para separar os cromossomos, sendo fixadas em Carnoy. A suspensão celular resultante é então gotejada em lâminas, o que promove o espalhamento dos cromossomos, e posteriormente, estas lâminas são coradas em Giemsa e observadas à microscopia de luz (Figura 5) (Moorhead et al., 1960, citado por SWANSBURY, 2003).

¹ Presente desde a formação do zigoto (TURNPENNY; ELLARD, 2007).

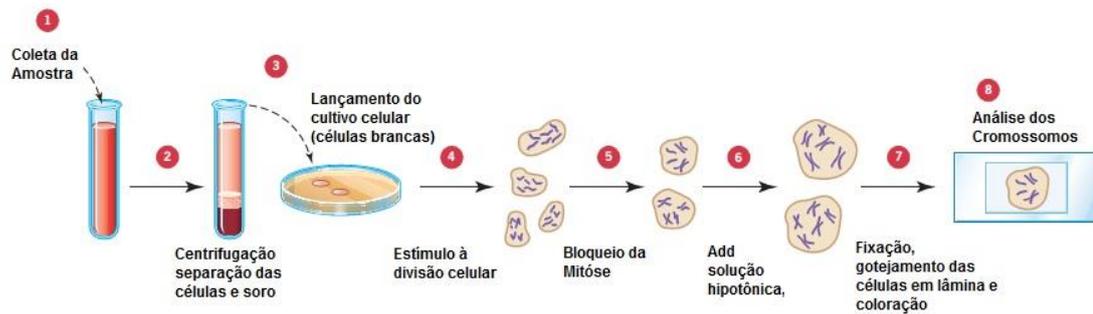


Figura 5 – Esquema dos passos do cultivo celular na obtenção de células em metáfase para análise do cariótipo (SNUSTAD; SIMMONS, 2012).

Na análise dos 46 cromossomos humanos, além de sua identificação, de acordo com a posição do centrômero, é necessária também sua classificação em grupos, baseados no tamanho (A, B, C, D, E, F e G). Entretanto, com o avanço da citogenética e o aumento do número de laboratórios dedicados a análises cromossômicas, surgiu a necessidade de padronizar a classificação cromossômica e a descrição de resultados através do *International System Cytogenetic Nomenclature* (ISCN), que definiu um padrão de bandas denominado idiograma (Figura 6), em que os cromossomos exibem bandas claras e escuras, identificadas numericamente em ordem crescente, iniciando no centrômero e terminando nos telômeros em cada um dos braços (GERSEN; KEAGLE, 2005; LUTHARDT KEITGES, 2001; ZNEIMER, 2014).

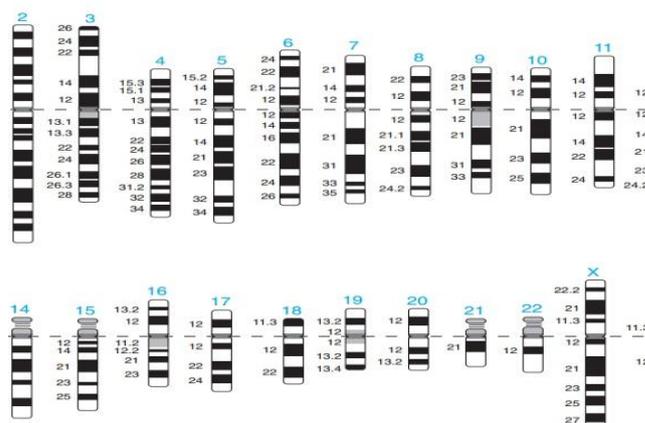


Figura 6 - Desenho do idiograma mostrando o padrão de bandas G para cromossomos, baseado no ISCN, 2005 (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2007).

Na produção das bandas, os cromossomos são tratados com tripsina, uma enzima proteolítica, e na sequência, corados em corante Giemsa (técnica GTG²), utilizado na visualização e identificação inequívoca dos cromossomos de acordo com o padrão de bandas, tamanho e posição do centrômero (Figura 7) (SWANSBURY, 2003; ZNEIMER, 2014).

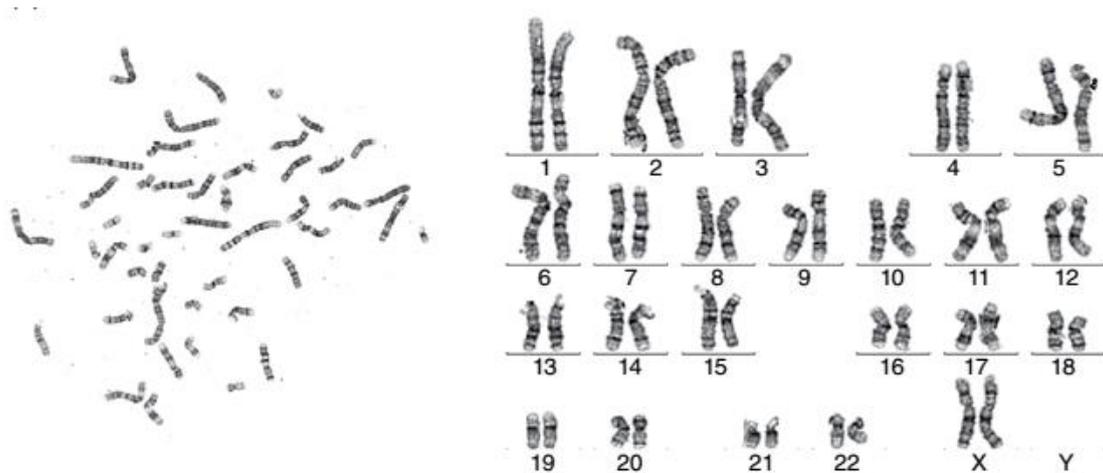


Figura 7- Fotomicrografia de cromossomos em metáfase e cariótipo humano feminino (46,XX) (ZNEIMER, 2014).

Na descrição do resultado do cariótipo, especifica-se primeiro o número de cromossomos, seguido de vírgula e os cromossomos sexuais (46,XX cariótipo feminino normal ou 46,XY cariótipo masculino normal). Variações no número ou tamanho ou heteromorfismos nas anomalias cromossômicas são descritos após os cromossomos sexuais, seguindo a nomenclatura ISCN, por exemplo, 47,XX,+21 (síndrome de Down) (VAN DYKE; SWANSBURY, 2003).

As anomalias cromossômicas são classificadas como numéricas ou estruturais, envolvendo os autossômicos, sexuais ou ambos. Elas podem ter origem parental (somática ou gamética) ou mutação nas células somáticas durante a divisão mitótica no desenvolvimento do zigoto, podendo ter todas as células afetadas ou uma proporção delas (Quadro 1). Alterações do número ou estrutura dos cromossomos podem afetar os genes e, geralmente, interferem no funcionamento do organismo,

² GTG: Bandamento-G ou Bandamento Giemsa é uma das técnicas utilizadas de rotina para bandamento cromossômico (Bandas G produzidas pela ação da Tripsina e coradas por Giemsa).

resultando em mudanças funcionais (GRIFFITHS et al., 2008; TOBIAS; CONNOR; FERGURSON-SMITH, 2011).

Quadro 1 TIPOS DE ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS			
NUMÉRICAS			
Aneuploidias:	Monossomias	Trissomias	Tetrassomias
Poliploidias:	Triploidias	Tetraploidias	
ESTRUTURAIS			
Translocações:	Recíprocas	Robertsonianas	
Deleções:	Terminais	Intersticiais	
Inserções			
Inversões:	Paracêntricas	Pericêntricas	
Anel			
Isocromossomos			
DIFERENTES LINHAGENS CELULARES			
Mosaicismo			
Quimerismo			
Fonte: Adaptado de TURNPENNY; ELLARD (2007, pag. 45).			

Das alterações numéricas, as aneuploidias, que envolvem ganhos ou perdas de cromossomos, são as que mais ocorrem e com maior significância clínica, presente em 5% das gestações conhecidas. A perda de um homólogo é denominada de monossomia e o ganho de um homólogo é denominado de trissomia, dois homólogos extras é tetrassomia. As trissomias são o tipo de aneuploidia mais frequente (TURNPENNY; ELLARD, 2007). Estas aneuploidias geralmente ocorrem em gametas, sendo originadas por erros no processo de segregação cromossômica na meiose I ou II por não-disjunção ou por anáfase tardia (MALUF; RIEGEL, 2011; STRATCHAN; READ, 2002).

As alterações estruturais (Figura 8) ocorrem, normalmente, durante a interfase, quando as cromatinas estão mais vulneráveis a sofrerem lesões, como fraturas na sua estrutura, podendo originar alterações quando estas fraturas e rearranjos anormais não são reparadas pelos mecanismos celulares de reparos. As alterações estruturais podem ser balanceadas quando não há perda de material genético ou desbalanceada quando houver perda ou ganho. Os portadores de

rearranjos balanceados podem transmitir cromossomos não balanceados para seus descendentes (STRATCHAN; READ, 2002).

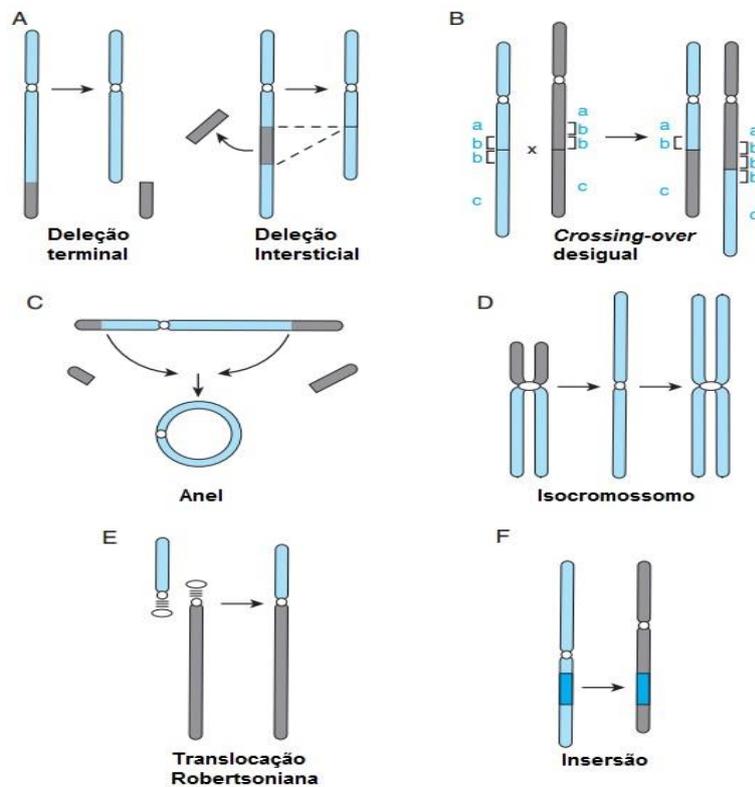


Figura 8 – Esquema das alterações cromossômicas estruturais. A) Deleções terminal e intersticial. B) Crossing-over desigual entre homólogos originando material deletado e duplicado. C) Cromossomo em anel. D) Isocromossomo. E) Translocação Robertsoniana entre acrocêntricos. F) Inserção de um segmento de um cromossomo em outro não homólogo (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2007).

Rearranjos balanceados geralmente não apresentam efeitos clínicos, por outro lado, nos desbalanceados, estes são graves, supostamente por inativação de genes importantes, prejudicando sua expressão (STRATCHAN; READ, 2002).

As alterações estruturais são menos frequentes que as aneuploidias, mas têm uma incidência estimada de 1 a cada 375 nascimentos. Estes rearranjos podem ser induzidos por exposição a agentes clastogênicos, como radiação ionizante, algumas infecções virais e produtos químicos (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2007). Sendo que estas podem ser classificadas em deleções, cromossomos em anel, inversões, translocações, duplicações, isocromossomos, cromossomos marcadores.

Fatores ambientais e sua relação com as cromossomopatias

As causas das alterações cromossômicas são multifatoriais, havendo indícios de que impactos específicos sobre o ambiente podem influenciar na ocorrência de cromossomopatias. Um longo período de exposição aos impactos antrópicos adicionalmente ao tipo de exposição ocupacional parental, poluição do ar, outras exposições químicas, tais como solventes domésticos e pesticidas, radiação, nutrição, fatores imunológicos, idade, sexo, nível socioeconômico e predisposição genética, podem elevar o risco de ocorrência das cromossomopatias (DOLK; VRIJHEID, 2003; NICOLOPOULOU-STAMATI; HENS; HOWARD, 2007).

Exposições a agentes nocivos, seja pela atividade ocupacional ou ainda exposições indiretas, tais como residir ou trabalhar no entorno de indústrias ou áreas rurais, por vezes, trazem danos genotóxicos imperceptíveis ao longo da vida, mas que representam riscos à saúde reprodutiva, impactando na redução da fertilidade, malformações congênitas ou abortamentos (DEJMEK; VOJTASSK; MALOVA, 1992; HOUK, 1992; NICOLOPOULOU-STAMATI; HENS; HOWARD, 2007). Estudos cromossômicos feitos em grupos de pessoas, plantas ou animais têm evidenciado que a exposição a diversos tipos de agentes xenobióticos oriundos de despejos industriais, indústrias de borracha, minas de carvão, curtumes de couro, petroquímicos, postos de gasolina, fábricas de celulose e papel, aumentam as frequências de alterações cromossômicas (RUBEŠ et al., 1992; SAŠIADEK, 1992).

Um aspecto bastante estudado na atualidade é sobre os efeitos genotóxicos dos agrotóxicos utilizados em larga escala no mundo. De acordo com o dossiê ABRASCO – 2015:

Designar os agrotóxicos como defensivos agrícolas é o artifício retórico mais elementar para dissimular a natureza nociva desses produtos. Por um lado, ele sugere que os agrotóxicos supostamente protegem os cultivos; por outro, oculta os efeitos deletérios desses produtos sobre a saúde humana e o meio ambiente (CARNEIRO, 2015, p. 28).

Na agricultura há uma diversidade de agrotóxicos largamente utilizados para o controle de pragas, sendo compostos formulados por ingredientes químicos que representam riscos genotóxicos à saúde humana e animal, principalmente

quando a exposição ocorre a longo prazo (COSTA et al., 2006; KUMAR; PANNEERSELVAM, 2008). Os agrotóxicos são potenciais mutagênicos que atuam ao nível molecular nas células, havendo uma possível associação com o surgimento de alguns tipos de cânceres, assim como com o risco de problemas reprodutivo e na indução de malformações congênitas (KUMAR; PANNEERSELVAM, 2008; PIGNATI et al., 2014).

A produção agrícola brasileira vem crescendo a cada ano, sendo que, estima-se que a safra 2016/2017 alcance 213,7 milhões de toneladas (IBGE, 2016). Para o cultivo da grande maioria das plantas, atualmente se utiliza uma grande variedade de agrotóxicos. Com a busca pela alta produtividade agrícola e a liberação dos transgênicos em 2009, o Brasil consumiu mais de um milhão de toneladas de agrotóxicos, e desde então, se tornou o maior consumidor mundial dos agroquímicos, com um consumo equivalente a 5,2 kg por habitante (MILHORANCE, 2015). O uso intenso de agrotóxicos pode ter como consequência a contaminação do ambiente com seus resíduos, além de oferecer um risco ocupacional para o agricultor, atingindo toda uma cadeia de recursos vitais, como ar, água, solos e o leite materno (INCA, 2015; PALMA, 2011).

Diante de toda esta problemática, sugere-se, então, o estudo desenvolvido a seguir, cujo objetivo principal foi analisar a associação do uso e ocupação do solo, por meio de estudo retrospectivo, com as cromossomopatias humanas oriundas de regiões brasileiras no período de dez anos (2005 a 2015).

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B; BRAY, D; HOPKIN, K; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**. 3. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2011.
- ASTBURY, C. **Clinical Cytogenetics, An Issue of Clinics in Laboratory Medicine**. V. 31, n. 4. Philadelphia, PA: Elsevier, 2011.
- BEIGUELMAN, B. **Citogenética Humana**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 1982.
- BORGES-OSÓRIO, M. R; ROBINSON, W. M. **Genética Humana**. 3. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2013.
- BRENDER, J. D. et al. Residential proximity to waste sites and industrial facilities and chromosomal anomalies in offspring. v. 211, p. 50–58, 2008.
- BUDD, J. L. S. et al. Socioeconomic inequalities in pregnancy outcome associated with Down syndrome: a population-based study. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v. 100, p. 400–404, 2015.
- CARNEIRO, F. F. **Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro - RJ: [s.n.].
- COSTA, C. et al. Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. **Mutagenesis**, v. 21, n. 5, p. 343–350, 2006.
- DEJMEK, J.; VOJTASSK, J.; MALOVA, J. Cytogenetic analysis of 1508 spontaneous abortions originating from south Slovakia. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 46, n. 2–3, p. 129–136, 1992.
- DOLK, H.; VRIJHEID, M. The impact of environmental pollution on congenital anomalies. **British Medical Bulletin**, v. 68, n. 68, p. 25–45, 2003.
- GERSEN, S. L.; KEAGLE, M. B. **The Principles of Clinical Cytogenetics**. 3. ed. New York: Springer, 2013. v. 37
- GHOSH, S. et al. Epidemiology of Down Syndrome: New Insight Into the Multidimensional Interactions Among Genetic and Environmental Risk Factors in the Oocyte. **American Journal of Epidemiology**, v. 174, n. 9, 2011.
- HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. A review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 277, n. 2, p. 91–138, 1992.
- IBGE. **Prognóstico da Produção Agrícola Nacional, dos principais produtos, para 2017**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201612_14.shtm>. Acesso em: 12 fev. 2017.

INCA. **POSICIONAMENTO DO INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**. Disponível em:

<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2017.

Jl, Z. et al. Comparison of aneuploidies of chromosomes 21, X, and Y in the blood lymphocytes and sperm of workers exposed to benzene. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 53, n. 3, p. 218–226, abr. 2012.

KUMAR, L. P.; PANNEERSELVAM, N. TOXIC EFFECTS OF PESTICIDES: A REVIEW ON CYTOGENETIC BIOMONITORING STUDIES. **Medicine and Biology**, v. 15, n. 2, p. 46–50, 2008.

MILHORANCE, F. **Brasil lidera o ranking de consumo de agrotóxicos**. Disponível em:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/comunicacaoinformacao/site/home/namidia/brasil_lidera_ranking_consumo_agrotoxicos>. Acesso em: 7 fev. 2017.

NICOLOPOULOU-STAMATI, P.; HENS, L.; HOWARD, C. V. **Congenital Diseases and the Environment**. 21. ed. Dordrecht: Springer, 2007.

OLIVEIRA, N. P. et al. Malformações congênitas em municípios de grande utilização de agrotóxicos em Mato Grosso, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 10, p. 4123–4130, out. 2014.

PALMA, C. DE A. **Agrotóxicos em leite humano de mães residentes em Lucas do Rio Verde**. [s.l.] Universidade Federal de Mato Grosso, 2011.

PIGNATI, W. et al. Vigilância aos agrotóxicos: quantificação do uso e previsão de impactos na saúde-trabalho-ambiente para os municípios brasileiros. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 12, p. 4669–4678, dez. 2014.

PIGNATI, W. A.; MACHADO, J. M. H.; CABRAL, J. F. Acidente rural ampliado: o caso das "chuvas" de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde - MT. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 105–114, mar. 2007.

RUBEŠ, J. et al. Cytogenetic monitoring of farm animals under conditions of environmental pollution. **Mutation Research Letters**, v. 283, n. 3, p. 199–210, 1992.

SAŠIADEK, M. Cytogenetic studies of workers from the rubber industry. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 279, n. 3, p. 195–198, 1992.

SILVA, S. R. G. E et al. Congenital defects and exposure to pesticides in São Francisco Valley. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 33, n. 1, p. 20–26, 2011.

UEKER, M. E. et al. Parenteral exposure to pesticides and occurrence of congenital malformations: hospital-based case-control study. **BMC pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 125, 12 ago. 2016.

VAN DYKE, D. L; WIKTOR, A. Cap. 25 Cytogenetics, Cap. 26 Clinical Cytogenetics. In: _____.

MCCLATCHEY, K. D. **Clinical Laboratory Medicine**. 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2002. Seção V, cap. 25 – 30.

WHO, 2013, Global Health Observatory (GHO) data: Causes of child mortality, 2013. Disponível em: http://www.who.int/gho/child_health/mortality/causes/en/ (<<http://apps.who.int/gho/data/view.main.ghe100-BRA?lang=en>>). Acesso em 22 nov. 2015.

ZNEIMER, S. M. **Cytogenetic abnormalities**: chromosomal, FISH, and microarray-based clinical reporting. West Sussex, UK: Wiley Blackwell, 2014.

ARTIGO

Uso e ocupação do solo e sua associação na ocorrência de cromossomopatias no Brasil

A land use as an effect factor on the occurrence of chromosomal diseases in brazil

Artigo formatado para a revista Epidemiology and Community Health

Uso e ocupação do solo e sua influência na ocorrência de cromossomopatias no Brasil

Marcos Roberto Cochak¹, Marília Melo Favalesso², Rose Meire Costa Brancalhão¹, Ana Tereza Bittencourt Guimarães^{1,2} e Lucinéia Fátima Chasko Ribeiro¹

¹ Programa de Pós-graduação em Biociências e Saúde. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

² Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

RESUMO

Introdução A ocorrência de cromossomopatias é um problema de saúde mundial. A exploração humana sobre o solo, realizado por meio da agricultura intensiva e uso de agrotóxicos ou pelo processo de urbanização, podem ser fatores preditores da elevação do risco de malformações congênitas. Neste sentido, predizer potencial geográfico da distribuição de cromossomopatias tem elevada relevância para a saúde pública.

Métodos Este estudo teve como objetivo descrever frequências de alterações cromossômicas (prevalência e incidência) em regiões do Brasil, no período de 2005 a 2015, para assim modelar a potencial distribuição de probabilidades de ocorrência de cromossomopatias por meio do modelo de Entropia Máxima (Maxent). As variáveis de “cobertura e uso da terra” do Brasil foi construído pelo IBGE, a partir de informações coletadas no Censo Agropecuário de 1996. O uso da terra apresentou Datum SIRGAS2000, em projeção policônica e escala 1:1.000.000. Ao todo, foram utilizadas 26 categorias relacionadas ao tipo de uso de solo.

Resultados Dados georreferenciados de 43.672 cariótipos detectaram 7.237 casos de cromossomopatias, distribuídas conforme o uso e ocupação do solo no Brasil. O modelo gerado foi acurado com valor de AUC=0,84 sendo estatisticamente significativo, da associação a ocorrência das cromossomopatias com áreas de pastagem, lavouras e sistemas agroflorestais, assim como áreas urbanizadas.

Conclusões Este é o primeiro estudo brasileiro com esta abordagem que parece ser promissora na previsão da distribuição potencial de cromossomopatias e, portanto, pode ser um instrumento eficaz na prevenção de ocorrência destas alterações e, por fim, uma excelente ferramenta de gestão em saúde pública.

Palavras-chave Agrotóxicos; Alterações cromossômicas, Modelagem, Maxent

INTRODUÇÃO

Cromossomopatias podem ter o aumento de sua frequência influenciado por diversos fatores, dentre eles os impactos sobre o ambiente [1]. A exposição descontrolada de organismos não-alvo a compostos xenobióticos podem estar associados à ocorrência das alterações cromossômicas, podendo-se citar, principalmente, os agrotóxicos [2].

Os agrotóxicos, por meio do deflúvio superficial de áreas agrícolas, escoam substâncias orgânicas ou inorgânicas, naturais ou sintéticas [3]. São conhecidos por oferecerem riscos à saúde humana e ao meio ambiente, devido a seus efeitos genotóxicos, pois suas moléculas, podem interagir com as bases nitrogenadas presentes nos nucleotídeos, possuem propriedades de fosforilação e alquilação, aumentam as espécies reativas de oxigênio que são tóxicas a nível celular, induzindo alterações cromossômicas e no DNA, além de alterações epigenéticas [4,5].

Entre os danos, ainda contribuem para o surgimento de neoplasias, alteram a homeostase celular [6], interferem na regulação hormonal [7], alteram a morfologia e mobilidade espermática [8] e reduzem a taxa de nascimentos do sexo masculino em relação ao feminino [9]. A exposição ocupacional a diferentes tipos de agrotóxicos pode comprometer a integridade do DNA espermático e contribuir para ocorrência de aneuploidias no espermatozoide, pois, interferem na segregação do cromossomo espermático [10]. A não disjunção dos cromossomos durante a meiose altera o número de cromossômicos no núcleo espermático, aumentando as chances de ocorrência de aneuploidias como a Síndrome de Turner (45,X) e síndrome de Klinefelter. Diante do exposto, bem como a evidência de que a produção agrícola brasileira vem crescendo a cada ano, sendo que se estima que a safra 2016/2017 alcance 213,7 milhões de toneladas [11], há a necessidade de se avaliar a distribuição geográfica de cromossomopatias no território brasileiro e associá-lo ao uso e ocupação do solo.

Com a busca pela alta produtividade agrícola e a liberação dos transgênicos em 2009, o Brasil consumiu mais de um milhão de toneladas de agrotóxicos, e desde então, tornou-se o maior consumidor mundial dos agroquímicos, com um consumo equivalente a 5,2 kg por habitante [12]. Sendo assim, é eminente a necessidade de se conhecer os mecanismos envolvidos na ocorrência de cromossomopatias, mas também, há o interesse epidemiológico em identificar as regiões geográficas brasileiras com maiores probabilidades de ocorrência de alterações cromossômicas.

Para compreender os padrões de distribuição do potencial de ocorrência de alterações cromossômicas, é possível realizar modelagens estatísticas associando cromossomopatias à ocupação e o uso do solo. A contribuição relativa das variáveis na distribuição geográfica

potencial de um evento estudado pode ser analisado utilizando-se o Teste de Importância das Variáveis Ambientais, definido pela modelagem de Entropia Máxima [13] [14]. Os modelos gerados por esta metodologia apresentam uma superfície contínua de valores compreendidos entre zero e 100, em que altos valores indicam uma maior probabilidade de encontrar um evento [15] [13] [14], que neste estudo foram as cromossomopatias.

As informações fornecidas pelas análises dos resultados retrospectivos de cromossomopatias nas regiões geográficas brasileiras podem identificar quais as áreas geográficas são mais susceptíveis a sua ocorrência e correlacioná-las aos fatores ambientais envolvidos. Este tipo de estudo demonstra a importância da pesquisa epidemiológica no sentido de investigar a ocorrência de cromossomopatias, interpolando com as características de uso e ocupação de solo brasileiro, fornecendo, assim, subsídios para entender como a ocupação humana no ambiente tem influência sobre as taxas de ocorrências destas alterações cromossômicas.

METODOLOGIA

Coleta de dados

A pesquisa envolveu um estudo documental retrospectivo de resultados de amostras de pacientes com indicação de exames diagnósticos para alterações cromossômicas, no Laboratório Álvaro (DASA), o qual é referência nacional no segmento de exames laboratoriais. Mais de 4.800 laboratórios parceiros localizados em várias regiões do Brasil, coletam as amostras em sua localidade e enviam para execução neste laboratório de Referência.

Na análise cariotípica, amostras de sangue periférico de pacientes foram coletadas e encaminhadas para os núcleos técnicos operacionais para serem processadas, obtendo-se as imagens das metáfases [16]. As imagens das metáfases foram digitalizadas e analisadas pelos programas Case Data Manager v.7.1 (Ap. Biosystems) e Ikaros Karyotyping System v. 2015 (Metasystem).

Os dados diagnósticos dos cariótipos foram coletados na base de dados do referido laboratório, estabelecendo como critério de inclusão o período correspondente aos anos de 2005 a 2015. Foram inventariadas as variáveis referentes ao procedimento de avaliação genético-clínica, que incluem: local e data de coleta do material biológico; e o cariótipo (normal ou alterado) e a análise crítica das cromossomopatias encontradas, baseados nos padrões do ISCN [16].

Caracterização das cromossomopatias

As cromossomopatias foram avaliadas quanto a suas frequências absolutas e relativas, classificadas por região do Brasil, com o intuito primário de avaliar a prevalência no período estudado. A partir de tais frequências, foi realizada a caracterização por tipos de alteração, classificando-as em autossômicas, sexuais, numéricas ou estruturais.

Após a realização da estatística descritiva, foram realizadas análises de associação por meio de testes livres de distribuição (Teste Permutacional de Monte Carlo) ou que utilizam distribuição de Qui Quadrado. As proporções observadas em cada um dos cruzamentos foram comparadas entre os pares por meio da análise de acompanhamento de Resíduos Ajustados. Todas as análises foram realizadas no programa XLStat versão 2016, utilizando um nível de significância de 0,05.

Variáveis para caracterização espacial

O mapa de “cobertura e uso da terra” do Brasil foi construído pelo IBGE a partir de informações coletadas no Censo Agropecuário de 1996 [17]. Ao total, são três grandes grupos

de uso da terra divididos pela porcentagem de estabelecimentos agrícolas [17]: Grupo 1: áreas que possuem mais de 50% de ocupação pelos estabelecimentos agropecuários, com 21 tipos de uso da terra. Dentro desse grupo temos dois subgrupos de uso da terra, um composto por classificadores simples (um único classificador ocupando mais de 50% da área) e outro por classificadores compostos (quando necessário, dois classificados são somados para chegar ao valor de 50% de uso da terra por estabelecimentos agropecuários); Grupo 2: é formado por tipos de uso do solo que compreendem áreas com predomínio de vegetação; Grupo 3: relacionado ao uso da água.

O uso da terra apresenta datum SIRGAS2000, em projeção policônica e escala 1:1.000.000 [17]. Ao todo foram utilizadas 26 categorias relacionadas ao tipo de uso de solo (Tabela 1).

Preparação dos dados

Para a preparação dos dados, e posterior utilização nas análises, foi realizada a transformação da projeção de todos os arquivos “tipo imagem” para o datum “Sirgas 2000” (modelo policônico). Em seguida, foi realizada a definição do tamanho de pixel das imagens correspondendo a uma área com 1 segundo (~30m²). Por fim, foi realizada a extração dos valores das variáveis por ponto de ocorrência, e com base no centroide. O programa ArcGIS 10.4 foi usado para criar estas camadas espaciais.

Tabela 1. % de uso e ocupação do solo por região do Brasil

Rótulos de Linha	Centro Oeste	Nordeste	Norte	Sudeste	Sul
Área < 10% de ocup./ estabelec. agropecuário	10,38%	14,53%	72,57%	6,50%	3,57%
Área entre 25% e 10% de ocup./ estabelec. agropecuário	5,74%	17,07%	8,87%	9,62%	3,44%
Área entre 50% e 25% de ocup./ estabelec. agropecuário	17,43%	28,07%	7,51%	23,43%	12,81%
Área urbanizada	0,70%	1,01%	0,19%	4,24%	3,07%
Florestas Plantadas	0,00%	0,13%	0,00%	0,61%	0,48%
Lavouras	0,06%	0,32%	0,03%	1,13%	1,06%
Lavouras + Matas e/ou florestas	2,17%	0,68%	0,12%	0,76%	4,95%
Lavouras + Outras coberturas e usos	0,00%	0,08%	0,01%	0,08%	0,24%
Lavouras + Pastagens	1,90%	1,00%	0,04%	3,45%	6,93%
Lavouras + Sistemas agroflorestais	0,00%	0,05%	0,00%	0,08%	0,09%
Lavouras permanentes	0,05%	0,41%	0,06%	0,51%	0,44%
Lavouras temporárias	2,92%	1,74%	0,04%	3,04%	13,59%
Matas e/ou florestas	0,22%	0,11%	0,01%	0,59%	1,50%
Matas e/ou florestas + Lavouras	0,46%	1,38%	0,03%	0,33%	1,54%
Matas e/ou florestas + Outras coberturas e usos	0,04%	0,12%	0,04%	0,06%	0,07%
Matas e/ou florestas + Pastagens	3,70%	3,46%	1,72%	1,74%	2,29%
Matas e/ou florestas + Sistemas agroflorestais	0,00%	0,19%	0,00%	0,04%	0,03%
Matas e/ou florestas naturais	3,54%	3,46%	1,02%	0,71%	0,73%
Outras coberturas e usos	0,00%	0,17%	0,01%	0,03%	0,04%
Outras coberturas e usos + Usos diversificados	0,06%	0,22%	0,00%	0,03%	0,13%
Pastagens	8,64%	2,84%	0,75%	8,55%	4,59%
Pastagens + Lavouras	2,43%	1,95%	0,08%	7,04%	8,57%
Pastagens + Matas e/ou florestas	11,81%	3,95%	2,95%	7,06%	3,49%
Pastagens + Outras coberturas e usos	0,06%	0,33%	0,02%	0,15%	0,18%
Pastagens + Sistemas agroflorestais	0,09%	0,87%	0,06%	0,30%	0,05%
Pastagens naturais	2,51%	2,88%	0,32%	2,70%	10,85%
Pastagens plantadas	20,60%	3,49%	2,49%	7,73%	3,43%
Sistemas agroflorestais	0,05%	0,53%	0,01%	0,16%	0,02%
Sistemas agroflorestais + usos diversificados	0,03%	0,72%	0,03%	0,10%	0,07%
Corpo d'Água costeiro para pesca, aqui., lazer e turismo	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	2,33%
Usos diversificados	4,38%	8,27%	1,01%	9,22%	9,42%

Modelagem espacial

A modelagem foi realizada no programa Maxent, que usa o princípio de Entropia Máxima em modelos de presença-ausência para estimar a probabilidade de distribuição de ocorrência de um determinado fenômeno baseada na influência de variáveis ambientais. O princípio de Entropia Máxima assegura que a aproximação de probabilidade de ocorrência do fenômeno (cromossomopatias) satisfaça qualquer restrição ambiental nos sítios desconhecidos da ocorrência do fenômeno.

No presente estudo, a matriz de variáveis ambientais (covariáveis) foi representada como o vetor z , e a área total estudada como L . Com o procedimento matemático da Entropia Máxima, foi definido que $f(z)$ é a função de densidade de probabilidade definida a partir das covariáveis obtidas para a área de estudo L , $f_1(z)$ é a função de densidade de probabilidade definida a partir das covariáveis obtidas na área de estudo L , quando o fenômeno estava presente. Logo, a probabilidade de presença da cromossomopatia, condicionada às variáveis ambientais, é dada pela fórmula $\Pr(y=1|z)$.

Definição do modelo

A fim de evitar o sobre ajuste dos dados de teste, foi estabelecido o valor do multiplicador de regularização como 1 [13]. O número máximo de pontos de fundo foi de 10.000. Foram utilizados modelos lineares, quadráticos e do tipo “hinge”. Um total de 100 testes foram estabelecidos para a construção de modelos [18]. A área sob a curva (AUC) foi utilizada para avaliar a bondade de ajuste do modelo. O modelo com maior valor de AUC foi considerado como o de melhor desempenho. A contribuição relativa das variáveis ambientais na distribuição geográfica potencial das cromossomopatias estudadas foi analisada utilizando-se o Teste de Importância das Variáveis Ambientais [13][14]. O mapa final de distribuição das cromossomopatias potenciais tinha uma gama de valores de 0 a 1 que foram reagrupados em seis classes de ocorrência de mutações potenciais: 50 – 90%, 40 – 50%, 30 – 40%, 20 – 30%, 10 – 20% e <10%.

RESULTADOS

Caracterização geral

Do total de 43.672 exames avaliados, observou-se que os resultados de cariótipos normais abrangeram 83% ($n=36.435$) dos casos, sendo 52% ($n=18.946$) feminino e 48% ($n=17.489$) masculino. Já as alterações cromossômicas foram encontradas em 17% ($n=7.237$)

dos resultados analisados, 52% (n=3.763) do sexo feminino e 48% (n=3.474) do sexo masculino, seguindo as mesmas proporções dos cariótipos normais.

Alterações numéricas corresponderam a 77% (n=5.558), estruturais, 16% (n=1.163) e ambas, 7% (n=516). Foram encontradas alterações autossômicas em 79,2% (n=5.736), cromossomos sexuais, 20,3% (1.466) e 0,5% (n=35) com ambas (autossômicas e sexuais). A presença de mosaïcismo foi detectada em 9% (n=663) dentre as alterações. As cromossomopatias autossômicas e sexuais detectadas foram subdivididas em numéricas e/ou estruturais, sendo os mesmos apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Caracterização Geral das Alterações Cromossômicas (n=7244)

Variáveis	Categorias	FR (n)
Numéricas e Estruturais	Numéricas	77% (5558)
	Estruturais	16% (1163)
	Mistas	7% (516)
Autossômicas (79,2%; n=5736)	Autossômicas Numéricas	78% (4482)
	Autossômicas Estruturais	17% (989)
	Ambas	5% (265)
Sexuais (20,3%; n=1466)	Sexuais Numéricas (*incluído quimeras 5)	73% (1071)
	Sexuais Estruturais	11% (159)
	Ambas	17% (236)
Autossômicos e Sexuais		0,5% (35)
Mosaïcismo	Mosaïcismo	9% (663)
	Linhagem única	91% (6574)

Caracterização por Região do Brasil

Quanto a ocorrência das cromossomopatias por região brasileira, foi possível observar que em número absoluto, as maiores frequências ocorreram nas regiões Norte e Nordeste ($p < 0,0001$; Tabela 3). Contudo, em relação às proporções de número de cromossomopatias por número de habitantes, foi possível observar que as maiores proporções foram provenientes da região Sul do Brasil, com 6 casos/100.000 habitantes. As regiões Centro-Oeste e Norte apresentaram prevalência de 4 casos/100.000 habitantes, a região Nordeste, 3 casos/100.000 habitantes e a região sudeste com 2 casos/100.000 habitantes ($p < 0,0001$; Figura 1).

Quanto às cromossomopatias autossômicas, foi verificado que as alterações autossômicas numéricas não apresentaram diferenças estatísticas entre as regiões; as estruturais autossômicas foram mais frequentes na região Sudeste, e ambas as alterações ocorreram em maior frequência na região Norte ($p = 0,003$; Tabela 3).

Em relação às cromossomopatias sexuais e as alterações autossômicas e sexuais conjuntas, não foram observadas diferenças estatísticas entre as regiões ($p = 0,262$ e $p = 0,147$, respectivamente; Tabela 3).

Quanto a ocorrência de mosaicismos, foi observado que situações de mosaico foram significativamente mais frequentes nas regiões Sul, Nordeste e Centro-Oeste, enquanto que a linhagem única foi significativamente mais frequente na região Sudeste ($p=0,059$; Tabela 3).

Tabela 3 Frequências absolutas dos tipos de alterações e comparação entre as regiões brasileiras. P-valor do teste de Qui Quadrado para Independência.

Variáveis	Categorias	Sudeste	Sul	Nordeste	Centro-Oeste	Norte	p-valor
Alteração	Normal	12278 ^a	10366 ^{ab}	7817 ^b	3252 ^{ab}	2722 ^b	<0,0001
	Alterado	2018 ^b	2020 ^{ab}	1819 ^a	616 ^{ab}	769 ^a	
Autossômicas	Numéricas	1246	1226	1155	358	497	0,003
	Estruturais	309 ^a	277 ^{ab}	228 ^{ab}	90 ^{ab}	85 ^b	
	Ambas	68 ^{ab}	57 ^b	72 ^{ab}	26 ^{ab}	42 ^a	
Sexuais	Numéricas	297	329	246	93	101	0,262
	Estruturais	37	53	40	17	12	
	Ambas	48	70	68	26	24	
Autossômicos e Sexuais		11	6	6	5	7	0,147**
Mosaicismo	Mosaico	158 ^b	201 ^a	175 ^a	68 ^a	66 ^{ab}	0,059
	Única	1860 ^a	1819 ^b	1644 ^b	548 ^b	703 ^{ab}	

* Monte Carlo

** K proporções



Figura 1 Proporção de exames de cromossomopatias por 100.000 habitantes em cada região do Brasil. * A população de cada região foi baseada no censo IBGE de 2010.

Modelagem Espacial

O modelo preditivo para avaliação de associação de ocorrência de casos de alterações cromossômicas, em função do uso e ocupação do solo, gerou resultados satisfatórios com as bases de dados, chegando a um modelo final com boa acurácia com valor de AUC igual a 0,84.

As cores mais quentes observadas no mapa (Figura 2) representam maiores probabilidades de ocorrência das cromossomopatias. Foi possível observar que as áreas urbanas foram as que apresentaram a maior probabilidade de ocorrência de cromossomopatias (50 a 90%), seguida das áreas de lavouras permanentes (40 a 50%) (Tabela 4).

Na região Sul, onde foi observada a maior prevalência de cromossomopatias/100.000 habitantes, as categorias de ocupação do solo foram representadas principalmente por Usos diversificados, Pastagens + Lavouras, Lavouras + Matas e/ou florestas e Pastagens. As regiões Centro-Oeste e Norte caracterizaram-se por apresentar áreas entre 50% e 10% de ocupação por estabelecimentos agropecuários. A região Nordeste foi caracterizada por apresentar áreas entre 50% e 10% de ocupação por estabelecimentos agropecuários.

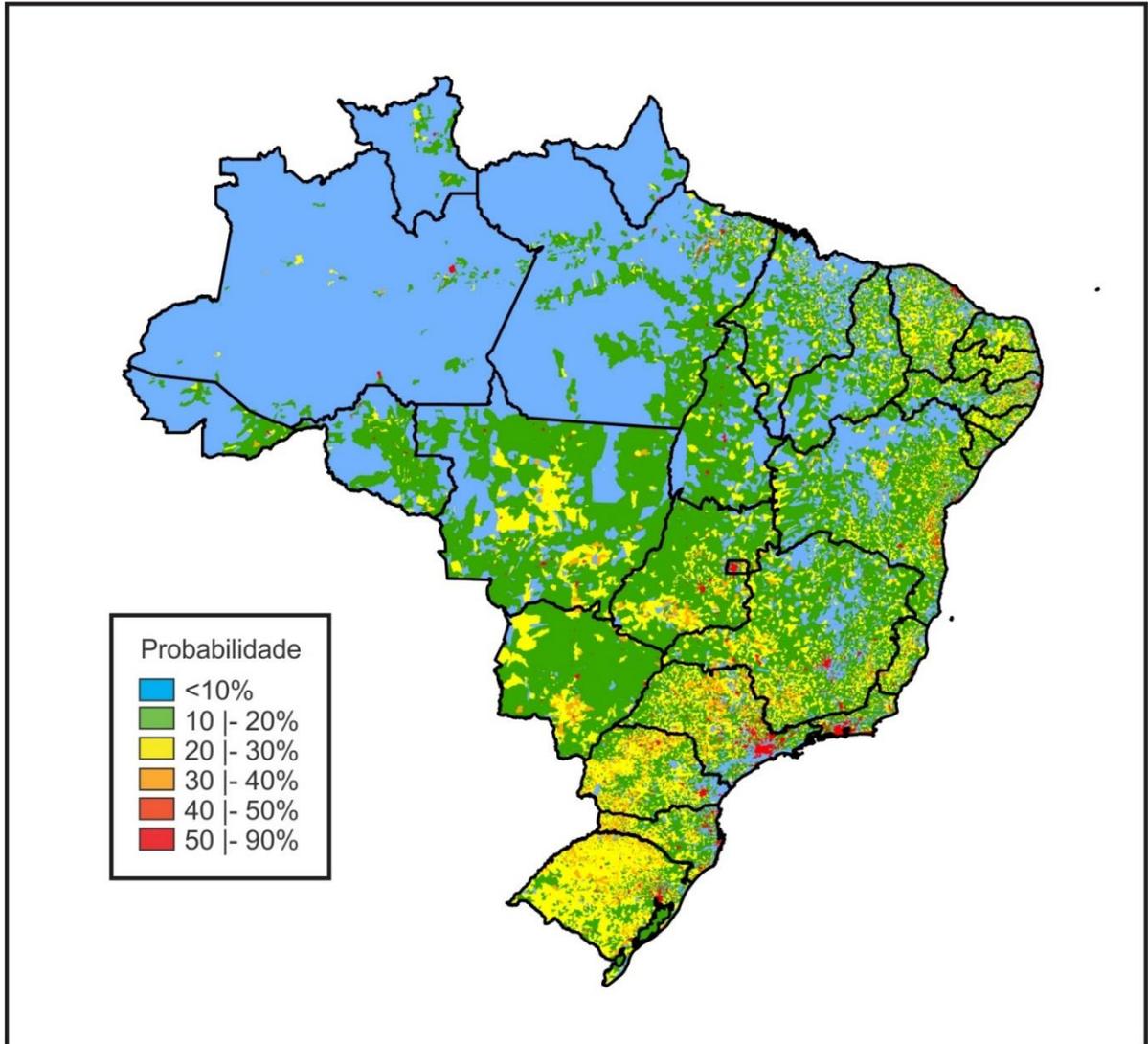


Figura 2 Mapa com a probabilidade de crianças nascerem com mutações cromossômicas em função do uso e ocupação do solo.

Tabela 4 Distribuição da probabilidade de pessoas com mutação cromossômica em função do tipo de uso e ocupação do solo do IBGE [19].

Probabilidades de pessoas com mutação cromossômica	Tipo de uso e ocupação do solo (IBGE)
<10%	Área com <10% de ocupação por estabelecimentos agropecuários
	Área entre 10 e 25% de ocupação por estabelecimentos agropecuários
10 - 20%	Matas e/ou florestas + lavouras
	Matas e/ou florestas + pastagens
	Pastagens + Matas e/ou florestas
	Florestas plantadas
	Matas e/ou florestas
	Matas e/ou florestas naturais
	Pastagens
	Pastagens plantadas
	Uso de corpo d'água costeiro para pesca, aquicultura, lazer e turismo
Área entre 25 e 50% de ocupação por estabelecimentos agropecuários	
20 - 30%	Lavouras + Matas e/ou florestas
	Lavouras + Outras coberturas e usos
	Lavouras + Sistemas agroflorestais
	Matas e/ou florestas + outras coberturas e usos
	Matas e/ou florestas + sistemas agroflorestais
	Outras coberturas e usos + usos diversificados
	Outras coberturas e usos + usos diversificados
	Pastagens + lavouras
	Pastagens + sistemas agroflorestais
	Usos diversificados
	Lavouras temporárias
	Outras coberturas e usos
	Pastagens naturais
Sistemas agroflorestais	
30 - 40%	Lavouras + pastagens
	Pastagens + outras coberturas e usos
	Sistemas agroflorestais + usos diversificados
	Lavouras
40 - 50%	Lavouras permanentes
50 - 90%	Áreas urbanas

DISCUSSÃO

No Brasil, há um predomínio da realização de exames cariótipo pós-natal, o que caracteriza uma medicina curativa. Em alguns países, este padrão difere, sendo o exame geralmente realizado durante o acompanhamento pré-natal, caracterizando uma medicina preventiva. Assim, de forma seletiva, após a realização de tal exame, é possível interromper a gravidez conforme legislação pertinente dependendo do resultado do cariótipo e das cromossomopatias presentes no feto [20–22]. Tal fato torna difícil o encontro de trabalhos científicos que tenham o mesmo tipo de dado, ou seja, exames de cariótipo pós-natal. Sendo assim, este é um dos primeiros estudos neste escopo.

Este estudo teve ampla cobertura temporal, de 2005 a 2015, e territorial, abrangendo todas regiões geográficas do Brasil (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul), com número expressivo de exames de cariótipo pós-natal (n=43.672).

As alterações cromossômicas foram detectadas em 17% do total das análises citogenéticas realizadas no território brasileiro. De forma semelhante, Ghazaey e colaboradores [23], em um estudo retrospectivo (2005 a 2011) em pacientes da região nordeste do Iran, obtiveram valores próximos de 16,7% de alterações (622 casos/3.728 exames). Kim e colaboradores [24], em um estudo na Coreia, obtiveram valores de 17,5% (721 casos/4.117 exames) de alterações em pacientes com suspeita clínica para anomalias cromossômicas.

No presente estudo, as frequências de alterações autossômicas no território brasileiro foram equivalentes a 79,2%, sendo semelhante ao observado por Ghazaey e colaboradores [23] (75,1%) e Kim e colaboradores [24] (73%). Em relação às alterações sexuais observadas no presente estudo foi observado 20,3%, sendo também similares aos trabalhos em comparação (Ghazaey e colaboradores - 24,9% [23] e Kim e colaboradores – 26,9% [24]). As classificações como numéricas, estruturais ou mistas são pouco abordadas nos estudos cujo enfoque geralmente é dado sobre alguma síndrome específica.

Nossos resultados demonstraram que 77% das alterações cromossômicas obtidas foram do tipo numérica, e 16% do tipo estrutural. Em seu estudo, Moreira e colaboradores [25] analisaram 813 exames, onde também foi observada uma alta frequência de alterações numéricas (61,9%) em 77% neste estudo, e frequência similar de alterações estruturais (19,4%), no comparativo 16%. Quanto a ocorrência de mosaïcismo, a prevalência observada foi de 9% do total de casos alterados, havendo uma prevalência de 1,5% dos exames realizados [26].

Na relação com o uso e ocupação do solo, foi verificado que em todos os estados do Brasil, as regiões urbanizadas apresentaram as maiores probabilidades de ocorrência de

cromossomopatias (50 – 90%). Como as amostras são coletadas em laboratórios em endereços fixos ao invés de serem coletadas aleatoriamente no ambiente, o fato do paciente se deslocar de sua região para áreas urbanizadas que ofereça serviços especializados, talvez maximize as chances de ocorrência nas regiões próximas ao laboratório de coleta. O mesmo deve se repetir com relação a outros estudos [27]. Sendo assim, o presente estudo dará maior ênfase em regiões que tenham a caracterização do uso do solo nas categorias de lavouras, pastagens e sistemas agroflorestais.

O Sul do Brasil foi o que apresentou maior prevalência de casos (6 casos/100.000 habitantes), e caracteriza-se por apresentar 85% da população urbanizada, sendo que o Estado do Paraná tem 53% do seu território ocupado por lavouras permanentes, com consumo médio aproximado de agrotóxicos de 5,5 Kg/ha, abaixo da média regional [28]. Nestas regiões, é fato o alto consumo de agrotóxicos. O uso de agrotóxicos de modo excessivo ou sem técnicas para aplicação oferece riscos ao surgimento de doenças congênitas, devido ao potencial genotóxico dos seus ingredientes, de forma a alterar o funcionamento de órgãos, células e danificar proteínas e ácidos nucleicos, DNA ou RNA [29].

Pela avaliação da modelagem preditiva, foi observado que a probabilidade de ocorrência de cromossomopatias foi em média de 20 a 30%, em especial, nas regiões de lavouras, pastagens e sistemas agroflorestais.

Agrotóxicos apresentam propriedades disruptoras endócrinas e, dependendo do tipo de exposição e tempo, podem afetar a espermatogênese, causando danos ao DNA espermático, erros na segregação cromossômica na meiose com consequências na reprodução e na prole [30]. Gibson e Koifman (2008) [31], em estudo ecológico no Paraná, evidenciaram em seus dados a possível influência do consumo e exposição a agrotóxicos, com a tendência de declínio na proporção de nascidos vivos do sexo masculino. Também no estado do Paraná, Dutra e Ferreira (2017) analisaram registros de nascidos vivos num período de 20 anos (1994 a 2014), apontaram uma associação entre o aumento do consumo de agrotóxicos com o aumento na taxa de malformações congênitas, principalmente na abrangência da cidade de Cascavel [32]

Outro fato interessante são os resultados de uma pesquisa sobre o uso de agrotóxicos e eventos adversos na gravidez nos três estados da Região Sul do Brasil, os quais sugerem associação entre a maior frequência de nascidos antes de 22 semanas de gestação e com índice Apgar insatisfatório, e o maior consumo per capita de agrotóxicos [33].

A análise citogenética de indivíduos, de um estado da região Sul, envolvidos no cultivo de soja e trigo expostos a agrotóxicos, demonstrou que houve aumento significativo da frequência de alterações cromossômicas sob a forma de micronúcleos nos indivíduos expostos

em relação ao grupo não exposto [34]. Outro estudo de Silva e colaboradores (2008) [35] avaliaram o dano genético em grupo por exposição ocupacional a agrotóxicos e demonstraram alta taxa de micronúcleos e danos ao DNA pelo teste de cometa.

A região Sudeste, apresentou a prevalência de 2 casos/100.000 habitantes, a probabilidade média de ocorrência de cromossomopatias teve variação entre 10 e 20%, mas em áreas urbanizadas a probabilidade variou entre 50 e 90%. Sendo predominantemente urbana (91,98%), a região é a que mais consome agrotóxicos no Brasil, com uma média aproximada de 9 Kg/ha; sendo o estado de São Paulo o maior consumidor do Brasil com média superior a 10kg/ha, e 30% de suas terras são ocupadas com lavouras permanentes [36]. Neste estado, na cidade de Botucatu, em um estudo realizado em um grupo de trabalhadores rurais expostos a pesticidas foi verificado aumento na frequência de alterações estruturais em relação ao grupo não exposto [37].

Em 2010, um estudo em trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos demonstrou que 58,3% dos indivíduos do grupo exposto apresentaram alterações cromossômicas, mesmo em indivíduos com níveis normais de atividade da enzima colinesterase, que é um biomarcador de exposição a carbamatos e organofosforados [38].

Quanto aos aspectos relativos à urbanização, em regiões com indústrias de produção de calçados e indústrias de cortumes, foi observado que trabalhadores apresentaram maiores frequências de alterações cromossômicas [39]. Em sujeitos expostos à radiação de monitores de vídeo de computadores, prática comum nos grandes centros, foram observadas frequências significativamente maiores de metáfases com anomalias cromossômicas [40]. Em frentistas de postos de combustíveis, a exposição crônica ao benzeno, tolueno e xileno promoveu maiores frequências de anomalias cromossômicas [41].

O Centro-Oeste, apresentou a prevalência de 4 casos/100.000 habitantes, tendo média de probabilidade de ocorrência de cromossomopatias com variação entre 10 – 20%. Esta região apresenta grandes áreas com estabelecimentos agropecuários (23,17% e 16,38%, respectivamente), denotando também o elevado consumo de agrotóxicos. Os Estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul tiveram destaque pelo aumento da comercialização de agrotóxicos entre os anos 2000 e 2012 [42–44].

Análises de águas demonstraram a contaminação com resíduos de agrotóxicos em uma determinada região do Mato Grosso, sendo detectados tais resíduos em 83% das amostras de poços artesianos, 81% das amostras de córregos e rios e 56% das amostras de águas das chuvas. Além destes resultados, o mesmo estudo apresentou uma espécie de anuros com malformações,

fato que também pode estar correlacionado com a exposição por agrotóxicos no seu ambiente [45].

Nesta região Centro-Oeste, a opção pelas monoculturas e a dependência do agrotóxico traz consequência para o meio ambiente e para a saúde, pois as pulverizações não somente atingem a lavoura alvo, mas a névoa se espalha afetando ambiente e população humana [46].

Estudos sobre malformações congênitas foram realizadas nesta região, associando a sua ocorrência à exposição aos agrotóxicos [8]. Resultados em amostras de leite humano, em um município da região Centro-Oeste, apresentaram que 100% das amostras estudadas tinham contaminação por algum tipo do agrotóxico e 85% das amostras apresentaram mais de uma substância, o que demonstra um risco para mãe e para criança [47].

A região Nordeste apresentou a prevalência de 3 casos/100.000 habitantes, tendo média de probabilidade de ocorrência de cromossomopatias com variação entre 10 – 20%. Esta região tem aproximadamente 50 milhões de habitantes, e a agricultura ainda não tem expressiva representatividade na produção nacional, pois o clima apresenta períodos de estiagem, há desgaste do solo e escassez de água, o que promove impacto negativo sobre o ambiente e, consequentemente, piora as características socioeconômicas e culturais [48].

Em uma maternidade em Campina Grande, Paraíba, que atende principalmente população de baixa renda, como agricultores de pequenas áreas de subsistência, a síndrome de Down foi a segunda maior causa de malformações fetais e, preponderou entre mães com menos de 21 anos, solteiras e com baixo nível socioeconômico e educacional [49]. Outros estudos realizados nesta região demonstraram a associação da maior idade materna com a síndrome de Down [50,51].

Apesar da precariedade de solo, dois estados desta região estão entre os dez maiores consumidores de agrotóxicos no Brasil: a Bahia (9º) e o Maranhão (10ª). Nesta região há o uso intensivo de agrotóxicos na produção da fruticultura irrigada para exportação e na produção de algodão, cana-de-açúcar, soja e castanha de caju [42,43].

Em algumas áreas, os produtores de tomate aumentam o número de aplicações de agrotóxicos preventivamente e, sem rigor ao uso de equipamento de proteção individual, aumenta o número de intoxicações [43,52]. A exposição de genitores no período pré-concepcional a agrotóxicos elevam a probabilidade de filhos apresentarem defeitos congênitos, atrelando tal fato ao baixo nível sócio econômico dos pais [53].

A contaminação do solo e da água são fatores preocupantes, sendo que, no estado do Ceará, foram realizadas análises de água de poços profundos que revelaram contaminação por três a dez ingredientes ativos de agrotóxicos em todas as amostras [52,54].

O Norte do Brasil apresentou a prevalência de 4 casos/100.000 habitantes, tendo média de probabilidade de ocorrência de cromossomopatias com variação entre 0 – 20%. As áreas com menor probabilidade de ocorrência (<10%) caracterizam-se por apresentarem menos de 10% de ocupação por estabelecimentos agropecuários e áreas entre 10 e 25% de ocupação por estabelecimentos agropecuários. Possivelmente isso se deva não a baixa contaminação ambiental, mas pela falta da procura do atendimento especializado, ou ainda, a ocorrência de maior probabilidade no centro urbano por ser um centro de referência.

Na Amazônia brasileira, foi realizado um estudo sobre a exposição humana ao mercúrio utilizado no garimpo de ouro, observando-se alterações cromossômicas em maior frequência em garimpeiros [55]. Amorim e colaboradores [56] também demonstraram que a contaminação por metil mercúrio tem relação com danos cromossômicos em uma população amazônica vivendo às margens do rio Tapajós, no estado do Pará. De acordo com Bastos e Lacerda [57], contaminação pelas atividades de mineração, principalmente utilizando o mercúrio para extração de ouro, trazem riscos à saúde humana pela bioacumulação.

Nas demais regiões, onde há maior uso do solo na forma de lavouras, pastagens e sistemas agroflorestais, acredita-se que ocorra maior contaminação das águas e solo pelos agrotóxicos. Um estudo realizado com um grupo de produtores de hortaliça de Boa Vista, Roraima, demonstrou que 98% afirmaram utilizar algum tipo de agrotóxico, e apenas 41% destes consultam técnicos para compra do produto, 53% desconhecem a simbologia das cores das tarjas das embalagens, e 89,33% afirmam não utilizar nenhuma forma de proteção e quase a totalidade não dão a destinação correta às embalagens [58], aumentando ainda mais a probabilidade de casos de cromossomopatias. Estudos de Waichman [59] e Gregolis e colaboradores [60] também apresentaram resultados similares, demonstrando a falta de conhecimento dos riscos de uso de agrotóxicos pela população de agricultores.

No presente estudo, foi possível realizar a associação do uso e ocupação do solo com as cromossomopatias humanas oriundas de regiões brasileiras no período de 2005 a 2015, compreendendo dez anos de registros de análises laboratoriais. As maiores frequências de alterações cromossômicas, em número absoluto, ocorreram nas regiões Norte e Nordeste. As alterações autossômicas numéricas e estruturais foram mais frequentes na região Norte, estando associado principalmente às condições socioeconômicas, assim como a contaminação do solo por metais e agrotóxicos. Nestas regiões, a probabilidade de ocorrência de cromossomopatias variou entre 0 – 20%. O Centro-Oeste é uma região caracterizada pela ampla área de monoculturas, e elevado uso de agrotóxicos.

A região Sul apresentou as maiores proporções de cromossomopatias e probabilidade de ocorrência de alterações, caracterizada por apresentar grandes áreas de pastagens e lavouras, e dos principais consumidores de agrotóxicos do Brasil. A região Sudeste é a mais urbanizada, apresentou maiores frequências de alterações estruturais autossômicas, é alto o uso de agentes mutagênicos do tipo industriais. Porém, é a região com maior consumo de agrotóxicos, o que gerou uma probabilidade de ocorrência de cromossomopatias variável entre 10 e 20%.

Em conclusão, estas informações demonstram fortes associações de maior probabilidade de ocorrência de cromossomopatias em áreas com elevado uso de agrotóxicos, tendo risco ampliado em áreas urbanizadas. Contudo, vale ressaltar que as amostras do presente estudo foram coletadas em laboratórios de endereços fixos, e não exatamente no ambiente de procedência do paciente que se desloca de sua região para áreas com infraestrutura laboratorial e clínica, o que certamente maximiza as chances de ocorrência nestas regiões.

REFERÊNCIA

- 1 Dolk H, Vrijheid M. The impact of environmental pollution on congenital anomalies. *Br Med Bull* 2003;**68**:25–45. doi:10.1093/bmb/ldg024
- 2 Da Silva J, Moraes CR, Heuser VD, *et al.* Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis* 2008;**23**:415–22. doi:10.1093/mutage/gen031
- 3 Resende AV de. Agricultura e qualidade da água: contaminação da água por Nitrato. 2002.
- 4 Ozkan D, Yüzbaşıoğlu D, Unal F, *et al.* Evaluation of the cytogenetic damage induced by the organophosphorous insecticide acephate. *Cytotechnology* 2009;**59**:73–80. doi:10.1007/s10616-009-9195-y
- 5 Garbellini GS, Uliana C V., Yamanaka H. Interaction of Organophosphorus Pesticides with DNA Nucleotides on a Boron-Doped Diamond Electrode. *J Braz Chem Soc* 2013;**24**:1942–9. doi:10.5935/0103-5053.20130242
- 6 Hanke W, Jurewicz J, Hanke W. The risk of adverse reproductive and developmental disorders due to occupational pesticide exposure: an overview of current epidemiological evidence. *IJOMEH Int J Occup Med Environ Heal* 2004;**17**:223–43.[http://www.cybra.lodz.pl/Content/9828/IJOMEH_2004_Vol_17_No_2_\(223-243\).pdf](http://www.cybra.lodz.pl/Content/9828/IJOMEH_2004_Vol_17_No_2_(223-243).pdf) (accessed 26 May 2017).
- 7 Meyer A, Sarcinelli PN, Moreira JC. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à ação de disruptores endócrinos? *Cad Saúde Pública* 1999;**15**:845–50.http://acpo.org.br/biblioteca/03_interferentes_hormonais/armando_paula_josino.pdf (accessed 28 May 2017).
- 8 Ueker ME, Silva VM, Moi GP, *et al.* Parenteral exposure to pesticides and occurrence of congenital malformations: hospital-based case-control study. *BMC Pediatr* 2016;**16**:125. doi:10.1186/s12887-016-0667-x
- 9 Gibson G, Koifman S. Consumo de agrotóxicos e distribuição temporal da proporção de nascimentos masculinos no Estado do Paraná, Brasil Investigación original / Original research. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal Bras Rev Panam Salud Publica* 2008;**24**:240–7.<http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v24n4/v24n4a03.pdf> (accessed 24 May 2017).
- 10 Recio R, Robbins WA, Borja-Aburto V, *et al.* Organophosphorous pesticide exposure increases the frequency of sperm sex null aneuploidy. *Environ Health Perspect*

- 2001;**109**:1237–40.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11748030> (accessed 5 Jun 2017).
- 11 IBGE. Prognóstico da Produção Agrícola Nacional, dos principais produtos, para 2017. 2016.http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_2016_12_14.shtm (accessed 12 Feb 2017).
 - 12 Milhorce F. Brasil lidera o ranking de consumo de agrotóxicos. INCA - Ist. Nac. Câncer. 2015;**2**.http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/comunicacaoinformacao/site/home/namidia/brasil_lidera_ranking_consumo_agrotoxicos (accessed 7 Feb 2017).
 - 13 Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol Modell* 2006;**190**:231–59. doi:10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026
 - 14 Prati, R. C.; Batista, G. E. A. P. A. ; Monard MC. Curvas ROC para avaliação de classificadores. *Rev IEEE América Lat* 2008;**6**:215–22.
 - 15 Souza HJ De. Modelando a distribuição geográfica potencial de espécies vegetais arbóreas indicadoras de matas ciliares da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Candombá* 2011;**7**:65–75.
 - 16 Swansbury J. *Cancer Cytogenetics: Methods and Protocols*. Totowa, New Jersey, USA: : Humana Press 2003. doi:10.1385/1592593631
 - 17 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Manuais técnicos em geociências, manual técnico da vegetação brasileira*. 2 ed. Rio de Janeiro-RJ: : Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2012.
 - 18 Vandevijvere S, Chow CC, Hall KD, *et al*. Increased food energy supply as a major driver of the obesity epidemic : a global analysis. 2015;**446**–56.
 - 19 IBGE. Mapa da Cobertura e Uso da Terra. 2010.ftp://geoftp.ibge.gov.br/informacoes_ambientais/cobertura_e_uso_da_terra/uso_atual/mapas/brasil/uso_da_terra_2010.pdf (accessed 9 Jan 2017).
 - 20 Forabosco A, Percesepe A, Santucci S. Incidence of non-age-dependent chromosomal abnormalities: a population-based study on 88965 amniocenteses. *Eur J Hum Genet* 2009;**17265**:897–903. doi:10.1038/ejhg.2008.265
 - 21 Han SH, An JW, Jeong GY, *et al*. Clinical and cytogenetic findings on 31,615 mid-trimester amniocenteses. *Korean J Lab Med* 2008;**28**:378–85. doi:10.3343/kjlm.2008.28.5.378
 - 22 Wellesley D, Dolk H, Boyd PA, *et al*. Rare chromosome abnormalities, prevalence and

- prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *Eur J Hum Genet* 2012;**20**:521–6. doi:10.1038/ejhg.2011.246
- 23 Ghazaey S, Mirzaei F, Ahadian M, *et al.* Pattern of Chromosomal Aberrations in Patients from North East Iran. *CELL JOURNAL(Yakhteh)* 2013;**15**:258–65.
- 24 Kim SS, Jung SC, Kim HJ, *et al.* Chromosome abnormalities in a referred population for suspected chromosomal aberrations: A report of 4117 cases. *J Korean Med Sci* Published Online First: 1999. doi:10.3346/jkms.1999.14.4.373
- 25 Moreira LM de A, Santo LD do E, Rodrigues MO, *et al.* Alterações cromossômicas em 813 atendimentos em serviço universitário de genética comunitária. *Rev Ciências Médicas e Biológicas* 2011;**10**:26–8.
- 26 Luthardt FW, Keitges E. Chromosomal Syndromes and Genetic Disease. *Encycl Life Sci* 2001;:1–12. doi:10.1038/npg.els.0001446
- 27 Groisman B, Gili J, Giménez L, *et al.* Geographic clusters of congenital anomalies in Argentina. *J Community Genet* 2017;**8**:1–7. doi:10.1007/s12687-016-0276-2
- 28 IBGE. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável: Brasil 2015. *Inst Bras Geogr e Estatística* - *IBGE* 2015;**10**:352.<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94254.pdf> (accessed 21 Mar 2017).
- 29 Costa C, Teixeira JP. Efeitos genotóxicos dos pesticidas. *Rev Ciências Agrárias* 2012;**35**:19–31.
- 30 Perry MJ. Effects of environmental and occupational pesticide exposure on human sperm: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2008;**14**:233–42. doi:10.1093/humupd/dmm039
- 31 Gibson G, Koifman S. Consumo de agrotóxicos e distribuição temporal da proporção de nascimentos masculinos no Estado do Paraná, Brasil. *Rev Panam Salude Publica* 2008;**24**:240–7. doi:10.1590/S1020-49892008001000003
- 32 Dutra LS, Ferreira AP. Associação entre malformações congênitas e a utilização de agrotóxicos em monoculturas no Paraná, Brasil. *SAÚDE DEBATE* 2017;**41**:241–53. doi:10.1590/0103-11042017S220
- 33 Cremonese C, Freire C, Meyer A, *et al.* Exposição a agrotóxicos e eventos adversos na gravidez no Sul do Brasil, 1996-2000. *Cad Saúde Pública* 2012;**28**:1263–72.<http://www.scielo.org/pdf/csp/v28n7/05.pdf> (accessed 6 Apr 2017).
- 34 Pacheco A de O, Hackel C. Instabilidade cromossômica induzida por agroquímicos em trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad Saude*

- Publica* 2002;**18**:1675–83. doi:10.1590/S0102-311X2002000600022
- 35 Silva G, Canova T, Guimarães ATB, *et al.* INFLUÊNCIA SAZONAL SOBRE A FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E EDEMAS BRAN-QUIAIS EM *Scleromistax barbatus* (SILURIFORMES : CALLYCHTHIDAE) COLETADOS EM RIOS DA SERRA DO MAR - PR , BRASIL . *Rubs* 2008;**1**:84–90.
- 36 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. Rio de Janeiro - RJ: 2015.
- 37 Bréga SM, Vassilieff I, Almeida A, *et al.* Clinical, cytogenetic and toxicological studies in rural workers exposed to pesticides in Botucatu, São Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica* 1998;**14**:S117–23. doi:10.1590/S0102-311X1998000700011
- 38 Pereira a. ES, Santos NZP, Fraceto LF, *et al.* Análise citogenética em trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos. *Bioikos* 2010;**24**:57–62.
- 39 Monteiro Neto MAB, Lazaro CCM, Tavares DC, *et al.* Frequency of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of tannery workers in Brazil. *Environ Toxicol Pharmacol* 2010;**29**:3–6. doi:10.1016/j.etap.2009.08.002
- 40 Estécio MRH, Silva AE. Alterações cromossômicas causadas pela radiação dos monitores de vídeo de computadores. *Rev Saude Publica* 2002;**36**:330–6. doi:10.1590/S0034-89102002000300012
- 41 Santiago F, Alves G, Otero U, *et al.* Monitoring of gas station attendants exposure to benzene, toluene, xylene (BTX) using three-color chromosome painting. *Mol Cytogenet* 2014;**7**:15. doi:10.1186/1755-8166-7-15
- 42 SINDIVEG. BALANÇO 2015 Setor de agroquímicos confirma queda de vendas. 2016.<http://www.sindiveg.org.br/docs/balanco-2015.pdf> (accessed 16 Feb 2017).
- 43 IBAMA. Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins: Históricos de Vendas - 2000 a 2012. *Inst Bras do Meio Ambient e dos Recur Nat Renov - IBAMA* 2013;**42**.https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/IBAMA_boletim_de_comercializacao_2000_2012.pdf (accessed 21 Mar 2017).
- 44 IBGE. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável: Brasil 2015. *Inst Bras Geogr e Estatística* - *IBGE* 2015;**10**:325.<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94254.pdf> (accessed 21 Mar 2017).
- 45 Moreira JC, Peres F, Simões AC, *et al.* Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. *Cien Saude Colet* 2012;**17**:1557–68.<http://www.scielo.br/pdf/csc/v17n6/v17n6a19.pdf> (accessed 6 Apr

- 2017).
- 46 Pignati WA, Machado JMH, Cabral JF. Acidente rural ampliado: o caso das "chuvas" de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde - MT. *Cien Saude Colet* 2007;**12**:105–14. doi:10.1590/S1413-81232007000100014
- 47 Palma C de A. *Agrotóxicos em leite humano de mães residentes em Lucas do Rio Verde*. 2011.
- 48 Castro CN De. A AGRICULTURA NO NORDESTE BRASILEIRO: OPORTUNIDADES E LIMITAÇÕES AO DESENVOLVIMENTO. *IPEA Bol Reg urbano e Ambient* 2013;**8**:77–89. http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/5592/1/BRU_n08_agricultura.pdf (accessed 19 Mar 2017).
- 49 Silva M, Felismino D de C, Dantas IC. Malformações fetais: estudo retrospectivo na maternidade da fundação assistencial da Paraíba no município de Campina Grande. *Rev Biol e Ciências da Terra* 2008;**8**:232–9. <http://www.redalyc.org/html/500/50080126/> (accessed 19 Mar 2017).
- 50 Gusmão FAF, Tavares EJM, Maria De Azevedo Moreira L. Idade materna e síndrome de Down no Nordeste do Brasil. *Cad Saúde Pública* 2003;**19**:973–8. <http://www.scielo.br/pdf/csp/v19n4/16847> (accessed 12 Mar 2017).
- 51 Catão MHCDV, Rocha SNDS, Costa RDO. Correlação da idade dos pais dos portadores de Síndrome de Down em instituições privadas de Campina Grande (PB) The age correlation of parents of down syndrome patients in private institutions of Campina Grande (PB). *FOL - Fac Odontol Lins/Unimep* 2014;**24**:21–5. doi:10.15600/2238-1236/fol.v24n1p21-25
- 52 Gomes MAF, Barizon RRM. Panorama de Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e Nitrato de origem Agrícola no Brasil: cenário 1992/2011. Jaguariuna: 2014. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/987245/1/Doc98.pdf> (accessed 21 Mar 2017).
- 53 Silva SRG e, Martins JL, Seixas S, *et al*. Congenital defects and exposure to pesticides in São Francisco Valley. *Rev Bras Ginecol e Obs* 2011;**33**:20–6. doi:10.1590/S0100-72032011000100003
- 54 Carneiro F, Rigotto R, Giraldo L, *et al*. Dossiê ABRASCO - Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na Saúde: Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro: 2012. http://www.ufvjm.edu.br/disciplinas/enf026/files/2013/10/Dossie_Abrasco_01.pdf

- (accessed 21 Mar 2017).
- 55 Gonçalves A, Gonçalves NN da S. Exposição humana ao mercúrio na Amazônia brasileira: uma perspectiva histórica. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal* 2004;**15**:415–
9.<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/8145/23687.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (accessed 25 Mar 2017).
- 56 Amorim MIM, Mergler D, Bahia MO, *et al.* Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. *An Acad Bras Ci* 2000;**72**:497–507.<http://www.scielo.br/pdf/aabc/v72n4/0048.pdf> (accessed 31 Mar 2017).
- 57 Bastos WR, Lacerda LD. A Contaminação Por Mercúrio Na Bacia Do Rio Madeira: Uma Breve Revisão. *Geochim Bras* 2004;**18**:99–114.
- 58 Lima ACS, Souza CZF de, Oliveira AHC de, *et al.* Diagnóstico fitossanitário e de práticas associadas ao uso de agrotóxicos nas hortas em ambiente protegido em Boa Vista - Roraima. *Rev Agro@Mambiente on-Line* 2011;**5**:124–33. doi:10.18227/1982-8470ragro.v5i2.482
- 59 Viviana Waichman A, Eve E, Celso da Silva Nina N. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian Amazon. *Crop Prot* 2007;**26**:576–83. doi:10.1016/j.cropro.2006.05.011
- 60 Gregolis TBL, Pinto W de J, Peres F. Risk perception associated to pesticide use among family agriculture workers in Rio Branco, Acre, Brazil. *Rev Bras Saúde Ocup* 2012;**37**:99–113. doi:10.1590/S0303-76572012000100013

ANEXOS

Anexo A – Carta de concordância da instituição.



DIAGNOSTICOS DA AMERICA – DASA
LABORATORIO DE CITOGENETICA

São Paulo – SP, 25 de Fevereiro de 2015.

Assunto: CONCORDÂNCIA DA INSTITUIÇÃO

A/C:

Marcos Roberto Cochak

Prezado Senhor:

Recebemos sua solicitação para realização da pesquisa utilizando informações do banco de dados do laboratório Alvaro/Cascavel - PR, no que concerne a dados de resultados de Cariotipos, sob a responsabilidade do pesquisador Profa. Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro – UNIOESTE/Campus de Cascavel e somos de parecer favorável a sua realização desta pesquisa.

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemonos.

Atenciosamente,

Regina Kuhbauche
Coordenadora da Citogenética/DASA

Anexo B – Normas da Revista Epidemiology and Community Health



Instructions for authors

Each journal has a very different approach to how they publish research, so we advise you to read the journal-specific instructions for authors by browsing the titles on our Journals website. If you are looking to submit to The BMJ, please visit this section.

Please note: Submission to one of our journals implies that the work described has not been accepted for publication elsewhere, that it is not under consideration for publication elsewhere and does not duplicate material already published.

General guidelines

To maximise the chances of your paper being accepted, it is a good idea to review and follow the instructions for authors carefully. If your paper fits the journal's format, busy editors and reviewers will have a much easier job at considering your paper, and this will save time in the long run. Follow the guidelines below when formatting your paper:

Title page

This excludes the journal BMJ Quality and Safety which has triple-blind peer review.

The title page must contain the following information:

Title of the article.

Full name, postal address, e-mail and telephone number of the corresponding author.

Full name, department, institution, city and country of all co-authors.

Word count, excluding title page, abstract, references, figures and tables.

Keywords

Authors can usually opt to (or are required to) choose keywords relevant to the content of the manuscript during the submission process. This assists in the identification of the most suitable reviewers for the manuscript. Keywords should also be included in the abstract itself.

Manuscript format

The manuscript must be submitted as a Word document. PDF is not accepted.

The manuscript should be presented in the following order:

Title page.

Abstract, or a summary for case reports (Note: references should not be included in abstracts or summaries).

Main text separated under appropriate headings and subheadings using the following hierarchy: BOLD CAPS, bold lower case, Plain text, Italics.

Tables should be in Word format and placed in the main text where the table is first cited.

Tables must be cited in the main text in numerical order.

Acknowledgments, Competing Interests, Funding and all other required statements. Reference list.

Images must be uploaded as separate files (view further details under the Figures/illustrations section). All images must be cited within the main text in numerical order and legends should be provided at the end of the manuscript.

Appendices should be uploaded using the File Designation "Supplementary File" and cited in the main text.

Please remove any hidden text headers or footers from your file before submission.

Style

Abbreviations and symbols must be standard. SI units should be used throughout, except for blood pressure values which should be reported in mm Hg.

Whenever possible, drugs should be given their approved generic name. Where a proprietary (brand) name is used, it should begin with a capital letter.

Acronyms should be used sparingly and fully explained when first used.

Figures/illustrations

Images must be uploaded as separate files. All images must be cited within the main text in numerical order and legends must be provided (ideally at the end of the manuscript).

Video: How to improve your graphs and tables

Colour images and charges

For certain journals, authors of unsolicited manuscripts that wish to publish colour figures in print will be charged a fee to cover the cost of printing. Refer to the specific journal's instructions for authors for more information.

Alternatively, authors are encouraged to supply colour illustrations for online publication and black and white versions for print publication. Colour publication online is offered at no charge, but the figure legend must not refer to the use of colours.

Detailed guidance on figure preparation

File types

Figures should be submitted in TIFF or EPS format. JPEG files are acceptable in some cases. A minimum resolution of 300 dpi is required, except for line art which should be 1200 dpi. Histograms should be presented in a simple, two-dimensional format, with no background grid. For figures consisting of multiple images/parts, please ensure these are submitted as a single composite file for processing. We are unable to accept figures that are submitted as multiple files.

During submission, ensure that the figure files are labelled with the correct File Designation of "Mono Image" for black and white figures and "Colour Image" for colour figures.

Figures are checked using automated quality control and if they are below the minimum standard you will be alerted and asked to resupply them.

Please ensure that any specific patient/hospital details are removed or blacked out (e.g. X-rays, MRI scans, etc). Figures that use a black bar to obscure a patient's identity are NOT accepted.

Tables

Tables should be in Word format and placed in the main text where the table is first cited. Tables must be cited in the main text in numerical order. Please note that tables embedded as Excel files within the manuscript are NOT accepted. Tables in Excel should be copied and pasted into the manuscript Word file.

Tables should be self-explanatory and the data they contain must not be duplicated in the text or figures. Any tables submitted that are longer/larger than 2 pages will be published as online only supplementary material.

References

Authors are responsible for the accuracy of cited references and these should be checked before the manuscript is submitted.

Citing in the text

References must be numbered sequentially as they appear in the text. References cited in figures or tables (or in their legends and footnotes) should be numbered according to the place in the text where that table or figure is first cited. Reference numbers in the text should be inserted immediately after punctuation (with no word spacing)—for example,[6] not [6].

Where more than one reference is cited, these should be separated by a comma, for example,[1, 4, 39]. For sequences of consecutive numbers, give the first and last number of the sequence separated by a hyphen, for example,[22-25]. References provided in this format are translated during the production process to superscript type, and act as hyperlinks from the text to the quoted references in electronic forms of the article.

Please note that if references are not cited in order the manuscript may be returned for amendment before it is passed on to the Editor for review.

Preparing the reference list

References must be numbered consecutively in the order in which they are mentioned in the text.

Only papers published or in press should be included in the reference list. Personal communications or unpublished data must be cited in parentheses in the text with the name(s)

of the source(s) and the year. Authors should request permission from the source to cite unpublished data.

Journals from BMJ use a slightly modified version of Vancouver referencing style (see example below). Note that The BMJ uses a different style.

BMJ reference style

List the names and initials of all authors if there are 3 or fewer; otherwise list the first 3 and add 'et al.' (The exception is the Journal of Medical Genetics, which lists all authors). Use one space only between words up to the year and then no spaces. The journal title should be in *italic* and abbreviated according to the style of Medline. If the journal is not listed in Medline then it should be written out in full.

Check journal abbreviations using PubMed

Check citation information using PubMed

Example references

Journal article

13 Koziol-McLain J, Brand D, Morgan D, et al. Measuring injury risk factors: question reliability in a statewide sample. *Inj Prev* 2000;6:148–50.

Chapter in book

14 Nagin D. General deterrence: a review of the empirical evidence. In: Blumstein A, Cohen J, Nagin D, eds. *Deterrence and Incapacitation: Estimating the Effects of Criminal Sanctions on Crime Rates*. Washington, DC: National Academy of Sciences 1978:95–139.

Book

15 Howland J. *Preventing Automobile Injury: New Findings From Evaluative Research*. Dover, MA: Auburn House Publishing Company 1988:163–96.

Abstract/supplement

16 Roxburgh J, Cooke RA, Deverall P, et al. Haemodynamic function of the carbomedics bileaflet prosthesis [abstract]. *Br Heart J* 1995;73(Suppl 2):P37.

Electronic citations

Websites are referenced with their URL and access date, and as much other information as is available. Access date is important as websites can be updated and URLs change. The "date accessed" can be later than the acceptance date of the paper, and it can be just the month accessed.

Electronic journal articles

Morse SS. Factors in the emergency of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1995 Jan-Mar;1(1). www.cdc.gov/ncidod/EID/vol1no1/morse.htm (accessed 5 Jun 1998).

Electronic letters

Bloggs J. Title of letter. *Journal name Online* [eLetter] Date of publication. url eg: Krishnamoorthy KM, Dash PK. Novel approach to transseptal puncture. *Heart Online* [eLetter] 18 September 2001. <http://heart.bmj.com/cgi/eletters/86/5/e11#EL1>

Legal material

Toxic substances Contro Act: Hearing on S776 Before the Subcommittee of the Environment of the Senate Comm. on Commerce, 94th Congress 1st September (1975).

Washington v Glucksberg 521 US 702 (1997)

Law references

The two main series of law reports, Weekly Law Reports (WLR) and All England Law Reports (All ER) have three volumes a year.

For example:

Robertson v Post Office [1974] 1 WLR 1176

Ashcroft v Mersey Regional Health Authority [1983] 2 All ER 245

R v Clarence [1868] 22 QBD 23

Wimpey Construction UK Ltd v Poole (1984) Times, 3 May

There are good historical precedents for the use of square and round brackets. Since 1891, round ones have referred to the date of the report, square ones to the date of publication of the report. Apart from not italicising the name of the case, we use the lawyers' style; be careful with punctuation. Here are some more examples:

Caparo Industries plc v Dickman and others [1990] 1 All ER 568-608.

R v Clarence [1888] 22 QBD 23.

Finlayson v HMAdv 1978 SLT (Notes) 60

Block v Martin (1951) 4 DLR 121

Official Journal of the European Communities: at the top of the page it gives the No, vol, and page and, at the other side of the header, the date.

The abbreviation for the title is given in parentheses under the title. Jiggle these elements around to get, eg:

Council Directive of 14 June 1989. Official Journal of the European Communities No L 1989 June 28:181/44-6. (89/831/EEC.

Digital Object Identifier (DOI)

A DOI is a unique string created to identify a piece of intellectual property in an online environment and is particularly useful for articles that are published online before appearing in print (and therefore have not yet been assigned the traditional volume, issue and page number references). The DOI is a permanent identifier of all versions of an article, whether raw manuscript or edited proof, online or in print. Thus the DOI should ideally be included in the citation even if you want to cite a print version of an article.

Find a DOI

How to cite articles with a DOI before they have appeared in print

Alwick K, Vronken M, de Mos T, et al. Cardiac risk factors: prospective cohort study. Ann Rheum DisPublished Online First: 5 February 2004. doi:10.1136/ard.2003.001234

How to cite articles with a DOI once they have appeared in print

Vole P, Smith H, Brown N, et al. Treatments for malaria: randomised controlled trial. Ann Rheum Dis2003;327:765–8 doi:10.1136/ard.2003.001234 [published Online First: 5 February 2002].

PLEASE NOTE: RESPONSIBILITY FOR THE ACCURACY AND COMPLETENESS OF REFERENCES RESTS ENTIRELY WITH THE AUTHOR.

