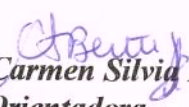


VÂNIA APARECIDA DA COSTA

**CONTRIBUIÇÃO PARA O LEVANTAMENTO DA FREQUÊNCIA
POPULACIONAL DA PERSISTÊNCIA HEREDITÁRIA
DA HEMOGLOBINA FETAL NO BRASIL**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Vânia Aparecida da Costa.

Campinas, 27 de julho de 2001.

*Prof. Dra.  Bertuzzo
- Orientadora -*

CAMPINAS

2001

VÂNIA APARECIDA DA COSTA

**CONTRIBUIÇÃO PARA O LEVANTAMENTO DA FREQUÊNCIA
POPULACIONAL DA PERSISTÊNCIA HEREDITÁRIA
DA HEMOGLOBINA FETAL NO BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
Título de Mestre em Farmacologia.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

CAMPINAS

2001

UNIDADE Be
Nº CHAMADA T/UNICAMP
C823c
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 5.1081
PROC 16.837/02
C _____ DA _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 28/09/02
Nº CPD _____

CM00174433-8

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

BIB ID 259964

C823c

Costa, Vânia Aparecida

Contribuição para o levantamento da frequência populacional da persistência hereditária da hemoglobina fetal no Brasil / Vânia Aparecida da Costa. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Carmen Sílvia Bertuzzo

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Eletroforese. 2. Eletroforese em gel. I. Carmen Sílvia Bertuzzo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

Membros:

Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

Profa. Dra. Iara Duchovni Silva

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/07/01

**À Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, agradeço pela grande orientação,
pelo estímulo, paciência,
que tornaram possível a concretização de um ideal.**

Ao Prof. Ms. Newton Carlos Polimeno, dedico esse trabalho por tudo que me ensinou. Sem ele não chegaria onde estou hoje.

In Memoriam

Com saudades,

Minha lembrança agradecida ao meu colega docente,

Dr. Leonardo Vieira dos Santos,

Sem sua ajuda, não teria realizado este desafio.

Aos meus pais queridos, Ana Stela e Benedito Aristides

Por sempre acreditarem no meu sucesso e terem proporcionado

a realização de um grande sonho

À Vanilda e Waldir, meus irmãos. Aos meus cunhados e sobrinhos,

Pelo apoio que me deram

Pela compreensão e carinho que me dispensaram

Ao meu namorado IVAIR, por sempre fazer acreditar na minha

competência e ter me mostrado o quanto era capaz

À Universidade São Francisco, pelo incentivo, estímulo, confiança e interesse no desenvolvimento desse trabalho.

À Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, sem a qual não seria possível elaboração desse trabalho.

Ao Prof. Ms. Newton Carlos Polimeno, sem ele nada seria.

À Profa. Dra. Mariane Bernadete Compri,
que me incentivou a realizar esse trabalho.

À minha amiga, Maria Júlia por seu apoio, colaboração e incentivo no decorrer de minha pós-graduação.

Aos funcionários do Laboratório Universitário São Francisco, Rosaninha, Viviane e Margareth, pela valiosa colaboração técnica prestada.

Aos funcionários do setor de citogenética do Hemocentro da Unicamp, Aglaê, Maristela e Fernanda, pelo tremendo incentivo em realizar esse trabalho.

Aos funcionários do LUAC e Hemonúcleo Regional de Bragança Paulista, por tudo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, a certeza da minha gratidão.

“O mundo está nas mãos daqueles que têm coragem de sonhar, e correr o risco de viver seus sonhos. Cada qual com seu talento”.

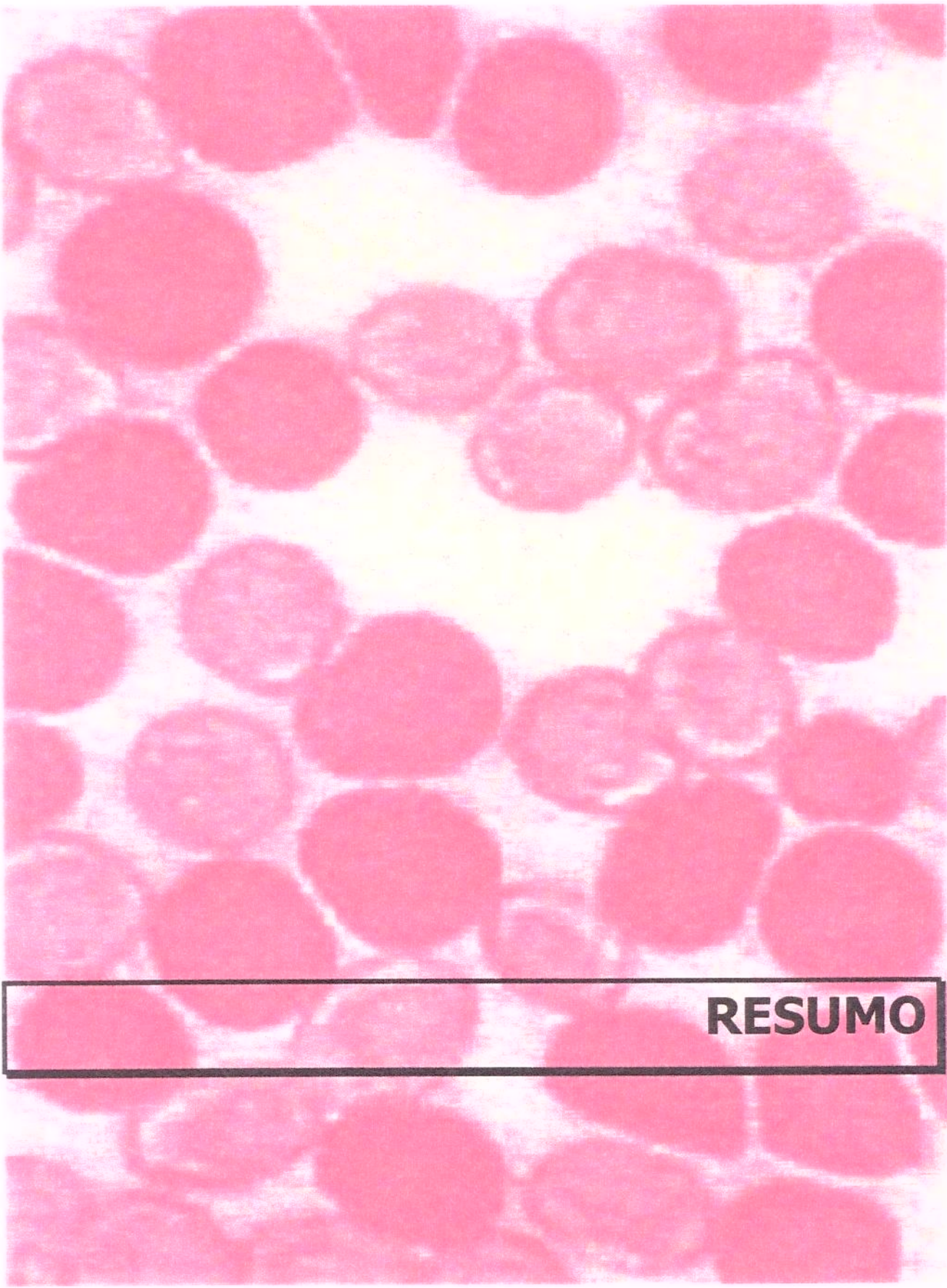
Paulo Coelho

	Pág.
RESUMO	XXV
 1. INTRODUÇÃO.....	 29
1.1. A hemoglobina.....	30
1.2. Classificação e nomenclatura.....	39
1.3. Hemoglobina Fetal.....	40
1.4. Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal.....	43
 2. OBJETIVOS.....	 51
 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	 53
3.1. Casuística.....	54
3.2. Métodos.....	54
3.2.1. Coleta das Amostras.....	54
3.2.2. Parâmetros Hematológicos.....	55
3.2.3. Análise das hemoglobinas.....	55
3.2.3.1. Preparo do Hemolisado.....	55
3.2.3.2. Determinação do Padrão Eletroforético.....	55
3.2.3.3. Dosagem de Hemoglobina Fetal.....	56

3.2.3.4. Análise das Cadeias Gama da Hb F.....	56
4. RESULTADOS.....	58
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÕES.....	67
7. SUMMARY.....	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
9. ANEXOS.....	78

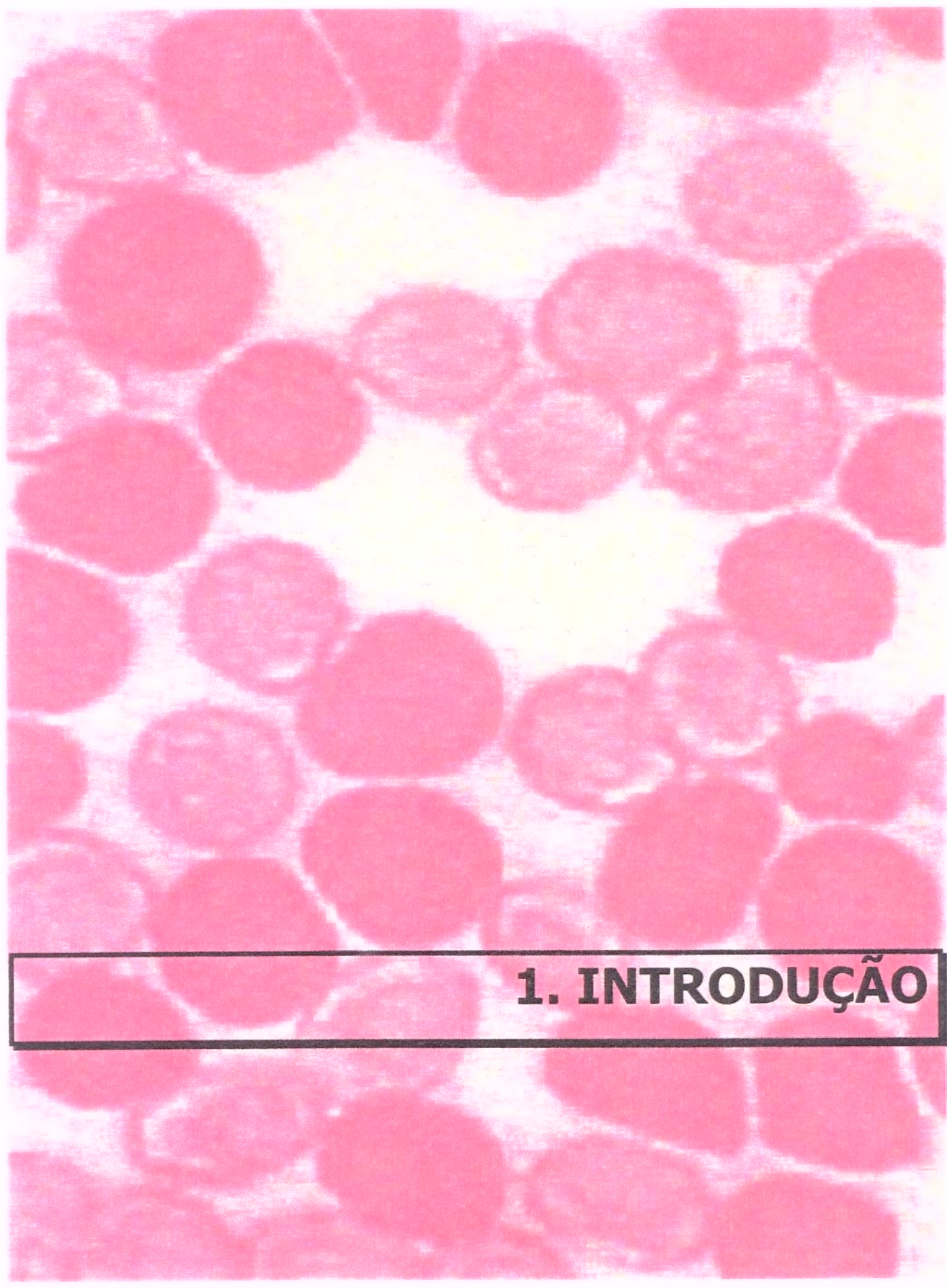
LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Pág.
Figura 1: Esquema da molécula de hemoglobina	33
Figura 2: Desenvolvimento da eritropoiese no feto e lactente humanos.....	35
Figura 3: Genes das globinas humanas.....	38
Figura 4: PHHF por deficiência gênica.....	46
Figura 5: Eletroforese de hemoglobinas (doador 1).....	60
Figura 6: Eletroforese de hemoglobinas (doador 2).....	61
Figura 7: Eletroforese de Globinas.....	62
Tabela 1: PHHF por mutação de ponto.....	50

A microscopic image showing numerous red blood cells (erythrocytes) in a blood smear. The cells are generally circular, with a pinkish-red color and a lighter, central area representing the nucleus. They are distributed across the frame, with some overlapping.

RESUMO

Persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF) é uma condição clinicamente benigna caracterizada pela síntese contínua da HbF na vida adulta, sem alterações hematológicas. A PHHF funciona como um modulador de gravidade em várias hemoglobinopatias, sendo assim, torna-se importante conhecer a sua frequência em nosso meio. Desse modo, através da análise de 1.846 doadores voluntários de sangue da região de Bragança Paulista, procuramos contribuir para o levantamento dessa frequência populacional. Realizou-se uma análise qualitativa das hemoglobinas pela eletroforese em gel de agarose. A análise qualitativa das cadeias γ^G e γ^A foi realizada pela eletroforese em gel de poliacrilamida-Triton-Uréia. Foram encontrados 2 indivíduos com alto índice de fetal. Em um dos indivíduos encontramos um percentual de HbF de 17% e no outro de 18%. Nos dois casos a eletroforese de cadeias mostrou uma ausência da cadeia gama G. Os casos triados indicaram pelas características laboratoriais, pertencerem ao grupo de Persistência hereditária Pancelular do tipo Gama A, por mutação de ponto. Portanto, a frequência encontrada em nossa amostra foi de 1/1000 indivíduos.

A microscopic view of numerous red blood cells, which are biconcave discs, stained with a pink dye. They are densely packed and fill most of the frame. A black rectangular box is positioned in the lower right area, containing the chapter title.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A HEMOGLOBINA - ESTRUTURA E FUNÇÃO

As hemoglobinas humanas compreendem um grupo de moléculas com estrutura e propriedades funcionais similares, cuja principal função é o transporte de oxigênio para os tecidos, feito por intermédio de pigmentos respiratórios localizados no interior dos glóbulos vermelhos. Esses pigmentos, denominados hemoglobinas, transportam o oxigênio de forma muito mais eficiente do que as proteínas plasmáticas encarregadas dessa função em alguns animais inferiores.

Como a principal função das hemácias é, justamente, o transporte de oxigênio, não é de estranhar que as hemoglobinas sejam os seus principais constituintes. Além disso, para que as hemácias atuem de forma eficiente, elas acumulam o maior número possível de moléculas hemoglobínicas em um pequeno volume, o que acarreta uma alta concentração intracelular de hemoglobinas. Essa concentração elevada, apesar de permitir à hemácia atuar com a máxima eficiência, determina uma proximidade indesejável entre as moléculas hemoglobínicas, a ponto de a distância entre elas não chegarem normalmente ao dobro daquela observada em cristais rígidos da mesma proteína. Em consequência desse fato, pequenas alterações moleculares podem determinar modificações tão drásticas da solubilidade hemoglobínica, que já está consagrada a expressão de que o perfeito equilíbrio entre os componentes da hemácia é um verdadeiro convite ao desastre (DEAN, 1978 ; WRITE, 1974).

A síntese das hemoglobinas inicia-se na fase pré-eritoblástica da diferenciação eritrocitária e, curiosamente, pode continuar por alguns dias após a célula da série

vermelha ter perdido o núcleo e se transformado em reticulócito. Esse fato, explicado pela estabilidade dos RNAs mensageiros que comandam a síntese das hemoglobinas (DAVIDSOHN, 1978), permite que estudos in vitro da síntese dessas proteínas, por intermédio da incubação de reticulócitos com isótopos radiativos sejam realizados (CLEGG, 1965).

Durante a vida intra-uterina, o oxigênio transportado pelas hemoglobinas é tirado do sangue materno, ao nível da placenta. Com o nascimento da criança, ocorrem profundas modificações respiratórias e o oxigênio passa a ser coletado nos pulmões, diretamente do ar atmosférico. Assim sendo, não é surpreendente que condições respiratórias tão diversas exijam diferentes tipos de hemoglobinas, características da vida intra e extra-uterina.

Atualmente, são conhecidas três hemoglobinas embrionárias (Gower 1, Gower 2, Portland), duas hemoglobinas fetais (F 136 glicina e F 136 alanina) e duas hemoglobinas adultas (A₁ e A₂).

Essas hemoglobinas são proteínas conjugadas, de peso molecular em torno de 68.000, que apresentam quatro grupos prostéticos tetrapirrólicos contendo ferro (ferroprotoporfirina IX ou heme). A sua fração protéica, ou seja, a globina, é constituída por quatro cadeias polipeptídicas, cada uma das quais ligada a um grupo heme . Essa ligação deve ocorrer logo após a síntese da cadeia, estando ela ainda a nível ribossômico (WINSLOW, 1966).

Os grupos heme, que contêm ferro na forma ferrosa (Fe⁺⁺) são responsáveis pela típica cor vermelha das hemoglobinas. A oxidação desse ferro para a forma férrica (Fe⁺⁺⁺)

leva à formação de metemoglobina, de cor acastanhada, que é um pigmento sem função respiratória.

As hemoglobinas normais diferem entre si pela sua globina, existindo seis tipos de cadeias polipeptídicas que podem entrar na sua composição, ou seja, cadeias alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), épsilon (ϵ) e zeta (ζ). Na maioria das hemoglobinas normais, a fração globínica é constituída por duas cadeias alfa e por duas cadeias não-alfa, regra essa desobedecida por apenas duas hemoglobinas embrionárias.

Para fins didáticos, é usual representar as hemoglobinas normais pela composição da sua globina, ou seja:

Hemoglobina embrionária Gower 1 = $\epsilon_2 \zeta_2$

Hemoglobina embrionária Gower 2 = $\alpha_2 \epsilon_2$

Hemoglobina embrionária Portland = $\gamma_2 \zeta_2$

Hemoglobinas fetais = $\alpha_2 \gamma_2$

Hemoglobina adulta A₁ = $\alpha_2 \beta_2$

Hemoglobina adulta A₂ = $\alpha_2 \delta_2$

A molécula de hemoglobina é globular, com uma cavidade central. Essa cavidade é preenchida com água e permite a entrada de moléculas carregadas eletricamente. Os quatro grupos heme estão escondidos em meio às cadeias globínicas, protegidos contra a oxidação (WINSLOW, 1983).

Cada uma das cadeias hemoglobínicas possui a sua composição primária, secundária e terciária característica. Sendo a molécula de hemoglobina tetramérica, deve-

se considerar, ainda, a sua composição quaternária (figura 1), ou seja, a relação espacial entre as cadeias peptídicas.

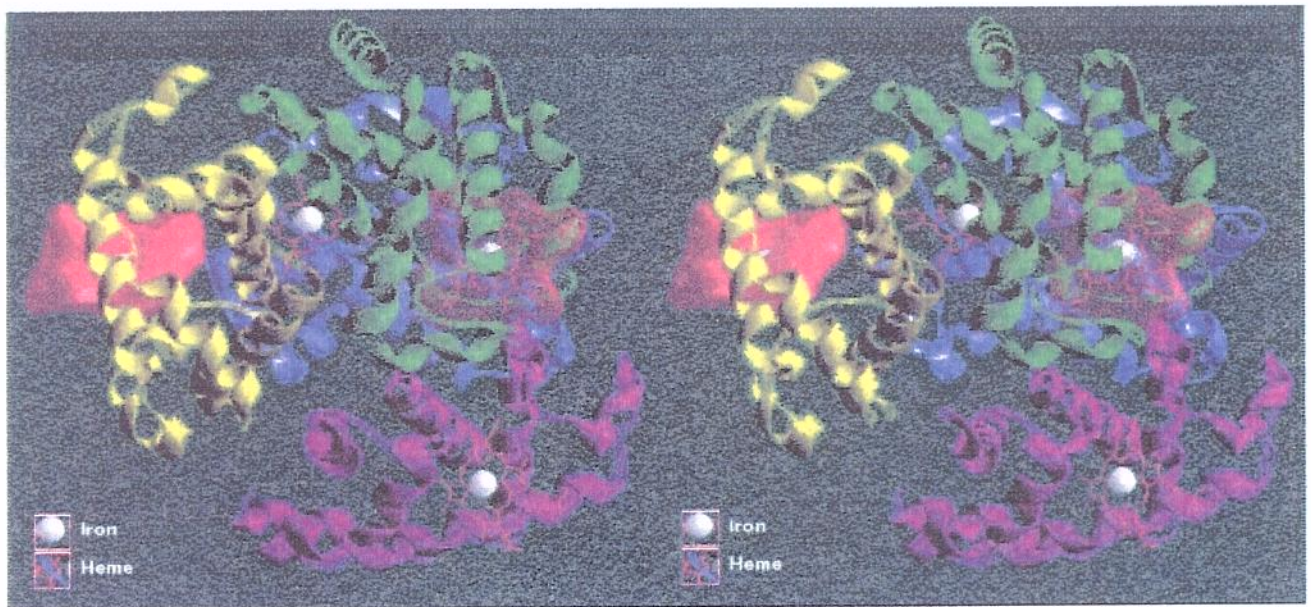


Figura 1 - Esquema da molécula de hemoglobina A

A composição das cadeias α , β , γ , δ , ϵ e ζ é perfeitamente conhecida. Assim, por exemplo, sabe-se que as cadeias α são constituídas por 141 aminoácidos, enquanto que

as cadeias β , γ , δ são compostas por 146 aminoácidos, sendo a seqüência deles, em todos os casos, conhecida.

As hemoglobinas não são, portanto, o produto primário de genes, mas o resultado da combinação de cadeias polipeptídicas. Essas sim podem ser interpretadas como sendo o produto primário de genes, possuindo, cada cadeia hemoglobínica um par de dois loci genéticos alelos, com exceção da cadeia alfa com dois pares alélicos.

O locus correspondente à cadeia α permanece em atividade durante toda a vida do indivíduo e o seu ritmo normal de síntese é bastante elevado, uma vez que ela entra na composição de quase todas as hemoglobinas. As perturbações graves desse ritmo de síntese podem ser incompatíveis com a sobrevivência.

A cadeia α parece exigir a ligação com outro tipo de cadeia peptídica para poder desligar-se dos ribossomos. Assim sendo, são formados dímeros $\alpha\epsilon$, $\alpha\gamma$, $\alpha\beta$ e $\alpha\delta$ que formam, posteriormente, as moléculas das hemoglobinas Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$), fetais ($\alpha_2\gamma_2$) e adultas ($\alpha_2\beta_2$ e $\alpha_2\delta_2$).

Existem provas da estreita união entre os loci das cadeias β e δ , bem como de existir mais de um locus genético comandando a síntese das cadeias γ (loci γ^G e γ^A)(WINSLOW,1983). Sabe-se hoje que os loci das cadeias β , δ , γ^G e γ^A e ϵ estão localizados na porção distal do braço menor do cromossomo número 11, enquanto, que os loci das cadeias α e ζ estão localizados no cromossomo número 16.

A ontogenia dos genes da globina é esboçada na Figura 2. A mudança da expressão dos vários genes durante o desenvolvimento, denominada mudança da globina, é um exemplo clássico da regulação ordenada da expressão gênica no desenvolvimento (Stamatoyannopoulos e Nienhuis, 1987). Os genes de cada um dos dois grupos de genes da globina são expressados sequencialmente e há uma produção equimolar das cadeias de globina semelhantes a α e a β .

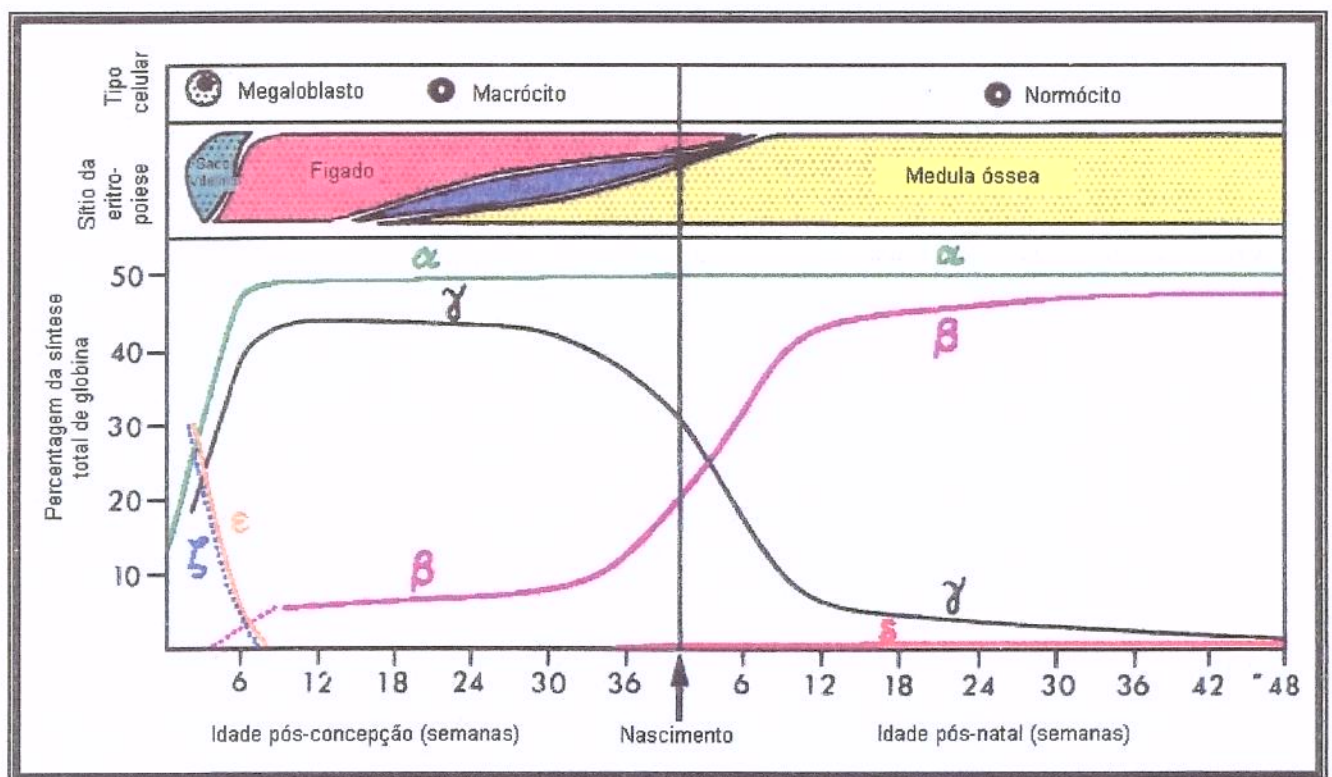


Figura 2 - Desenvolvimento da eritropoiese no feto e lactente humanos.

As mudanças temporais da síntese de globina são acompanhadas de alterações no principal local da eritropoiese. A síntese de globina embrionária ocorre no saco vitelino da terceira à oitava semana de gestação, com a produção das hemoglobinas embrionárias contendo as globinas ζ semelhantes a α e globinas ε semelhantes a β . Em combinação uma com a outra e as cadeias α ou γ , estas duas globinas embrionárias formam as três hemoglobinas embrionárias : Hb Gower 1, Hb Gower 2 e Hb Portland. Aproximadamente na quinta semana de gestação, a sede da hematopoiese começa a mover-se gradualmente do saco vitelino para o fígado fetal. Ao mesmo tempo, a síntese muda de globina ζ para α , bem como há uma mudança da síntese de ε para γ , formando a principal hemoglobina fetal, $\alpha_2\gamma_2$ (Hb F) (Thompson 1993) .

A hemoglobina fetal é a hemoglobina predominante ao longo da vida fetal e constitui cerca de 70% da hemoglobina total ao nascimento, mas na idade adulta representa menos de 1% da hemoglobina total. Embora as cadeias β sejam detectáveis no início da gestação, sua síntese torna-se significativa apenas próximo à época do nascimento; aos 3 meses de idade, quase toda a hemoglobina presente é do tipo adulto, Hb A. A síntese da cadeia δ começa no final da vida fetal e continua após o nascimento, mas a Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) nunca atinge mais de 3 % da hemoglobina adulta.

A expressão do gene da β -globina é apenas em parte controlada pelo promotor e dois acentuadores no DNA flanqueador imediato. Diversos estudos mostraram que a expressão normal dos genes no grupo da β - globina requer seqüências adicionais de um domínio denominado região de controle do locus (LCR), localizado 6 a 20 kb à montante do gene da ε -globina. A LCR é responsável pela expressão em alto nível do gene da β -

globina nos tecidos apropriados, e também pela sincronização correta da expressão durante o desenvolvimento (VAN Assendelft et al.,1989), (figura 3) .

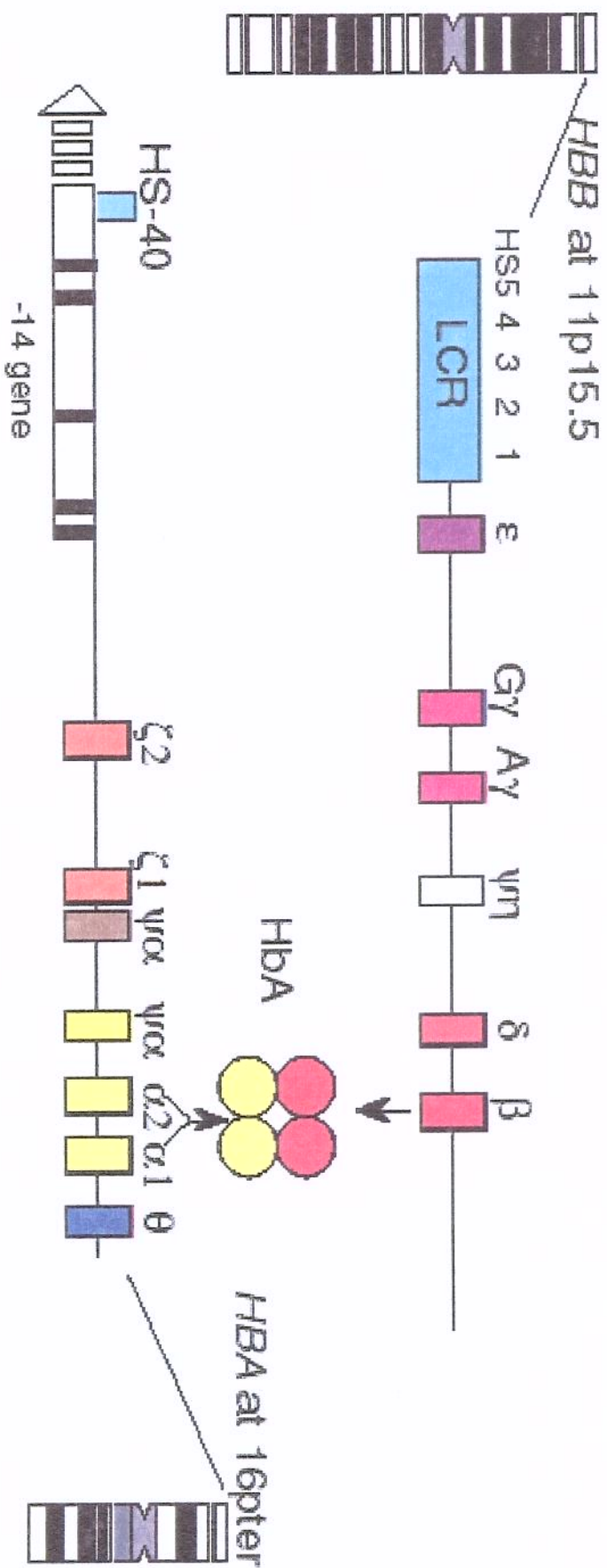


Figura 3 - Genes das globinas humanas

1.2. CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA

As alterações na sequência de aminoácidos de uma das cadeias de globina originam o que são geralmente designadas como hemoglobinopatias. As anormalidades em que não existem cadeias anormais de globina, mas, em vez disto, diminuição no número de cadeias normais de globina produzidas, são em geral conhecidas como talassemias. Temos mutações durante a leitura, como na hemoglobina Constant Spring, que produz uma cadeia de globina maior que a normal porque um códon de parada é perdido e nas hemoglobinas Lepore, em que um gene de fusão, composto por uma porção do gene da cadeia δ e uma porção do gene da cadeia β , forma muito pouca globina. Temos a doença da hemoglobina E, onde a união anormal do RNAm acontece como consequência da mesma mutação que produz a substituição de um aminoácido.

As cadeias de globina são representadas por letras gregas, sendo que as mutações são mostradas como sobrescrito. O sobrescrito A é usado para a hemoglobina normal, sendo que para um hemoglobina anormal comum, a hemoglobina falciforme, a designação β^S é comumente empregada. Também a alteração no aminoácido é utilizada. Quando nenhuma cadeia de globina é elaborada, como por exemplo a beta que ocorre na beta talassemia major usamos β^0 ou quando somente uma parte da cadeia é produzida usam β^+ .

A herança de hemoglobinas anormais segue a genética mendeliana. Os heterozigotos para hemoglobinas anormais ou talassemia apresentam o traço correspondente ao distúrbio homozigótico. Assim, uma pessoa com um gene de globina β normal e um gene de globina β falciforme terá o genótipo β^A/β^S que apresenta o traço falciforme e o β^A/β^C apresenta o traço de hemoglobina C.

1.3. HEMOGLOBINA FETAL

A hemoglobina fetal representa o principal componente hemoglobínico da vida intra-uterina. No período de aproximadamente 8 a 28 semanas de gestação o fígado se torna o maior sítio de eritropoiese. Após a sexta semana gestacional, a Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) responde por todo o complemento da hemoglobina.

Entre a 12ª e a 35ª semana pós-natal, a proporção relativa de Hb F diminui de cerca de 100 para 85% e a partir de então, continua em queda num ritmo de 3 a 4% por semana, até cerca de 6 meses pós-natal, chegando a menos de 1%. Observa-se um aumento correspondente na Hb A ($\alpha_2\beta_2$). Assim, o nível de Hb F ao nascimento é determinado em parte pela idade gestacional, com os bebês prematuros apresentando uma maior quantidade que os bebês a termo. Por si mesmo, entretanto, o nível de Hb F ao nascimento constitui uma medida insatisfatória da idade gestacional, já que é influenciado por outros fatores, incluindo anemia fetal.

A cadeia humana γ difere da β em 39 de seus 146 resíduos. Ao contrário de outras sub unidades de globina humana, a cadeia γ tem uma heterogeneidade estrutural. Em recém nascidos, cerca de 2/3 da cadeia γ tem glicina na posição 136, enquanto o restante dessas cadeias tem alanina. Essa razão diminui durante a mudança da produção da cadeia γ para a cadeia β . As cadeias G_γ e A_γ são produtos de genes adjacentes localizados entre os genes ϵ e δ . Elas são estruturalmente heterogêneas na posição 75, onde em certas populações, a cadeia γ contém treonina no lugar da isoleucina. A incidência dessa substituição ocorre na extensão de 0 a 40%. Somente a cadeia A_γ é portadora desse polimorfismo.

Cerca de 20% da Hb F no desenvolvimento do feto tem uma modificação pós-tradução modificação: o resíduo N terminal da cadeia γ é acetilado (HbF). Em contraste, nenhuma outra subunidade de globina humana é acetilada, exceto para variantes que tem substituição do resíduo N-terminal.

As hemácias fetais tem uma elevada afinidade por oxigênio, sendo maior que a do adulto. E esse fenômeno, o qual tem sido observado em um número de espécies mamalianas, pode facilitar o transporte de oxigênio através da placenta. Em humanos, essa discrepância em afinidade relativa pelo oxigênio é devida a uma diminuição da interação da Hb F com fosfatos orgânicos das hemácias. Hemoglobina F tem uma especial propriedade de se tornar resistente a desnaturação nos extremos de pH.

A hemácia do recém-nascido contém cerca de 80% de Hb F, 20% de Hb A e menos que 0,5% de Hb A₂. Ocasionalmente a Hb Bart's (γ_4) pode ser detectada em pequena quantidade de um neonato normal. Um aumento do nível de Hb Bart's em uma

hemácia de recém-nascido é útil no diagnóstico de α Talassemia. A mudança a partir de Hb F para Hb A é retardada em crianças de mães diabéticas devido ao aumento do nível de hidroxibutirato.

A Hemoglobina F está aumentada para uma variável extensão de desordens hereditárias, incluindo β talassemia, persistência hereditária de hemoglobina fetal e anemia falciforme. Em adição, um aumento do nível de hemoglobina fetal pode ser vista em uma variedade de desordens hematológicas adquiridas, incluindo anemia megaloblástica, anemia aplástica e leucemias, particularmente leucemia mieloide crônica em crianças. Em indivíduos homozigotos para a talassemia β e anemia falciforme a sobrevivência de células F é seletivamente melhorada e a concentração circulante de hemoglobina fetal é dessa forma aumentada. A produção de células F podem estar aumentada pela administração de várias drogas quimioterápicas como a hydroxyureia e por certos metabólitos, como o butirato e altas doses de eritropoetina.

1.4. PERSISTÊNCIA HEREDITÁRIA DA HEMOGLOBINA FETAL

A persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF) é uma condição clinicamente benigna caracterizada pela contínua produção da HbF na vida adulta, sem alterações hematológicas e com uma relação equilibrada entre a síntese de cadeias α e não- α (Wiley-Liss,1998; Weatherall & Clegg,1981; Wood et al,1979). As PHHF são caracterizadas como condições que possuem um fenótipo similar, mas que resultam de defeitos moleculares múltiplos e complexos.

As PHHF são classificadas pela análise dos parâmetros hematológicos e da lesão molecular existente. Entre os dados hematológicos, são de importância os níveis relativos das cadeias γ^G , γ^A , β e δ , a percentagem de HbF e seu padrão de distribuição nas hemácias. Com isso, tem-se basicamente descrito a PHHF como as pancelulares, aquelas caracterizadas por elevados níveis de síntese de HbF e distribuição uniforme entre todas as células vermelhas, e heterocelulares aquelas com distribuição irregular de hemoglobina fetal entre as hemácias .

Em relação à lesão molecular, as PHHF são classificadas em dois grandes grupos: PHHF por deficiências ou deleções gênicas e por mutações de ponto. As deficiências gênicas envolvem grande parte do grupo de genes β e as mutações de ponto são encontradas na região promotora dos genes γ (Stamatoyannopoulos et al, 1987).

PHHF POR DEFICIÊNCIAS GÊNICAS

São usualmente caracterizadas por grandes deficiências no grupo dos genes β , na presença dos genes codificadores das cadeias γ^G e γ^A da HbF. Os indivíduos heterozigotos possuem níveis de HbF entre 20 e 30% com uma distribuição uniforme nas hemácias e valores de HbA₂ ligeiramente diminuídos ou normais. Em homozigose estão associadas com hemácias ligeiramente microcíticas e hipocrômicas, uma relação de aproximadamente 0,5 na síntese das cadeias α/γ e cerca de 100% de HbF. Uma vez que esta Hb possui uma alta afinidade pelo oxigênio, pode ocorrer uma policitemia moderada (Charache et al, 1976; Forget et al, 1976).

Foram descritas cinco formas diferentes de PHHF (Figura 4). A PHHF-1 encontrada em negros dos USA e a PHHF-2 negros de Ghana possuem uma deficiência gênica que envolve quase 105Kb de DNA. A PHHF-1 compreende uma deficiência gênica que começa 3,75Kb antes do gene δ e abrange 95Kb depois do gene β . A PHHF-2 possui os pontos de quebra nas posições 5' e 3' localizados 5 a 6 Kb antes dos descritos para a PHHF-1 (Collins et al, 1987; Feingold & Forget, 1989; Fritsch et al, 1979; Henthorn et al, 1990; Henthorn et al, 1990; Jagadeeswaran et al, 1982; Tsai et al, 1989; Tuan et al, 1989, 1980 e 1983; Van Der Ploeg et al, 1980; Vanin et al, 1983).

A PHHF-3, descrita em indianos, tem o início da sua deficiência gênica a uma curta distância do descrito para a PHHF-2 e se estende até aproximadamente 30Kb após o gene β (Anagnou et al, 1988; Henthorn et al, 1986; Kutlar et al, 1984; Vanin et al, 1983). A PHHF-4, descrita em italianos, tem o início da sua deficiência quase na mesma posição

da PHHF-1 e o seu término próximo ao da PHHF-3 (Ottolenghi et al, 1982; Saglio et al, 1986). A PHHF-5, também descrita em italianos, possui uma deficiência que começa cerca de 3,2Kb antes do gene δ e termina somente 0,75Kb fora do gene β , dentro de um elemento ativador ou "enhancer" (Camaschella et al, 1990).

Algumas hipóteses foram feitas na tentativa de explicar o fenótipo de PHHF nestas condições. A primeira delas refere-se à presença de um elemento silenciador localizado entre os genes γ^A e δ e que exerceria o controle transcricional dos genes γ . Este elemento seria perdido nas várias deficiências gênicas, desencadeando a síntese aumentada dos genes γ e consequentemente da HbF (Huisman et al, 1974). Uma Segunda hipótese é a de que elementos regulatórios localizados nas proximidades do ponto de quebra da posição 3' das deleções sejam trazidos para a proximidade dos genes γ em decorrência dos eventos recombinatórios subsequentes à deleção, exercendo desse modo o controle diferencial no mecanismo de expressão destes genes (Feingold & Forget, 1989).

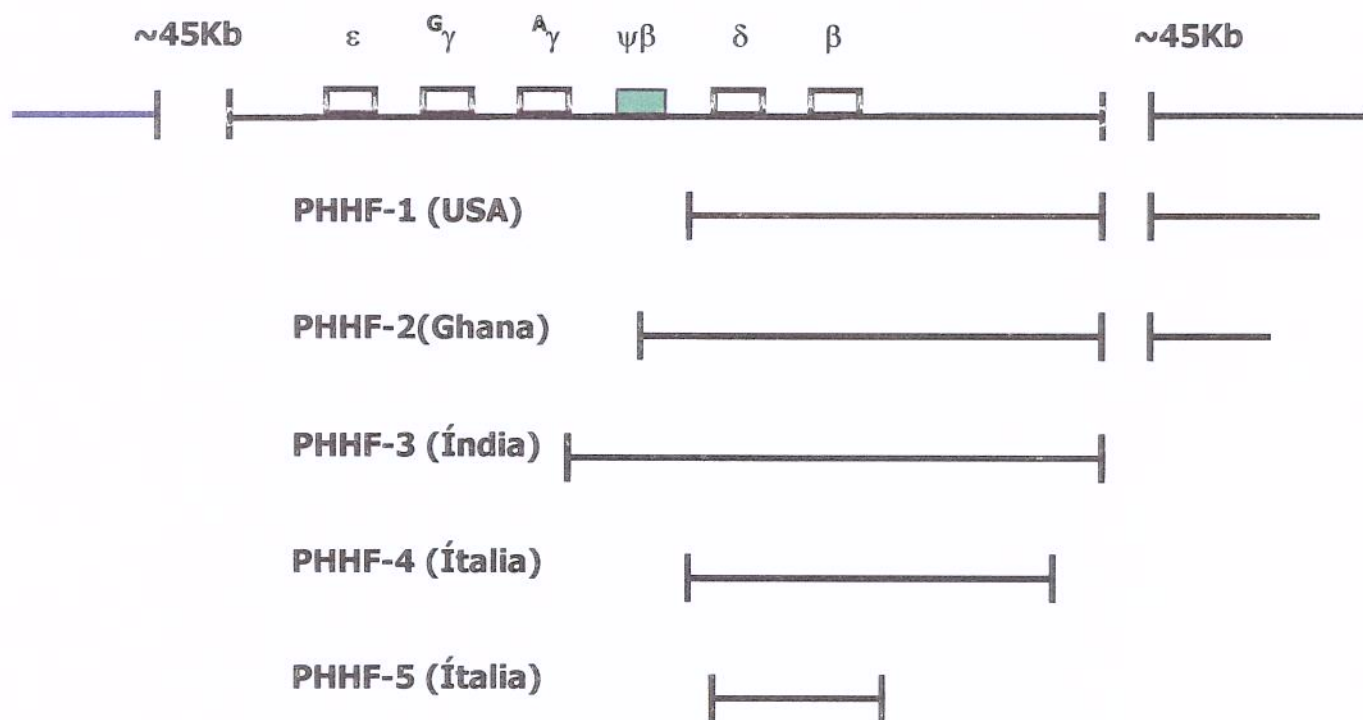


Figura 4 - PHHF por deficiência gênica

PHHF por mutações de ponto

Algumas formas de PHHF são caracterizadas pela substituição de um único nucleotídeo localizado em locais específicos da região promotora dos genes γ e na ausência de deficiências gênicas (Tabela 1). Estas formas de PHHF também são classificadas em pancelulares e heterocelulares de acordo com o padrão de distribuição da HbF nas hemácias (Bollekens & Forget, 1991)

As PHHF pancelulares são subdivididas segundo o tipo de cadeia γ presente. A PHHF do tipo γ^A foi primeiramente descrita em um paciente proveniente da Grécia (γ^A PHHF-Grega)(Collins et al, 1985; Fessas & Stamatoyannopoulos, 1964 ; Sofroniadou et al, 1975) e subseqüentemente em indivíduos originários da Sardenha (Giglioni et al, 1984), China (Farquhar et al, 1983) e África(Huang et al, 1987). Nos heterozigotos os níveis de HbF variam entre 10 e 20% com uma relação equilibrada entre as cadeias α /não- α , na presença de índices hematimétricos normais. Em homozigose, os valores de HbF são encontrados ao redor de 24% com cerca de 75% de HbA e HbA₂ ligeiramente diminuída (Camaschella et al, 1989). As PHHF pancelulares do tipo γ^G ocorrem predominantemente em negros, com valores de HbF entre 15 e 20% em heterozigotos (Collins et al, 1984 a e b: Friedman & Schwartz, 1976; Higgs et al, 1979; Huisman et al, 1975).

Nas PHHF do tipo heterocelulares são detectados níveis de HbF entre 2 e 10% nos vários tipos descritos (Boyer et al, 1975; Wood et al, 1975). No tipo suíço, os valores de HbF estão ligeiramente aumentados entre 2 e 3 % na presença de ambas as cadeias γ^G

e γ^A (Weatherall & Clegg, 1981). Níveis mais elevados de HbF podem ser observados quando a PHHF está associada à homozigose para talassemia β ou hemoglobina S (Gianni et al, 1983; Miyoshi et al, 1988; Old et al, 1982; Popovich et al, 1986; Wood et al, 1976 e 1977;). Este aumento na produção de HbF, em geral resulta numa evolução clínica menos grave nos pacientes homozigotos para essas hemoglobinopatias e concomitante PHHF (Stamatoyannopoulos et al, 1987). O conhecimento dessa particularidade indica há longo tempo que o aumento na síntese de cadeias γ poderia representar terapêutica eficaz nas doenças falciformes e talassemias.

Algumas formas de PHHF heterocelulares contendo níveis de HbF maiores que os encontrados no tipo suíço foram descritas em famílias negras. Em indivíduos portadores do tipo Seattle foram descritas cadeias γ^G e γ^A em proporções normais (Stamatoyannopoulos et al, 1987; Stamatoyannopoulos et al, 1975) e naqueles do tipo Atlanta e Georgia, ocorre o predomínio de cadeias γ^G com níveis de Hb F variando de 2,4 a 6,0% (Altay et al, 1977; Stoming et al, 1989). Em indivíduos com a PHHF do tipo britânico ocorre o predomínio de cadeias γ^A e os níveis de HbF variam entre 5 e 13 % nos heterozigotos e entre 19 e 21% nos homozigotos (Tate et al, 1986; Weatherall et al, 1975), ao passo que em pacientes com PHHF do tipo brasileiro (Costa et al, 1990) os níveis de HbF variam de 4,5 a 7% com predomínio de cadeias γ^A . A PHHF do tipo saudita é freqüentemente descrita em concomitância com homozigose para HbS ou em portadores de Talassemia-S β° e está associada a evolução clínica moderada com quantidades elevadas de HbF, geralmente entre 25 e 40% (Pembrey et al, 1978; Perine et al, 1978).

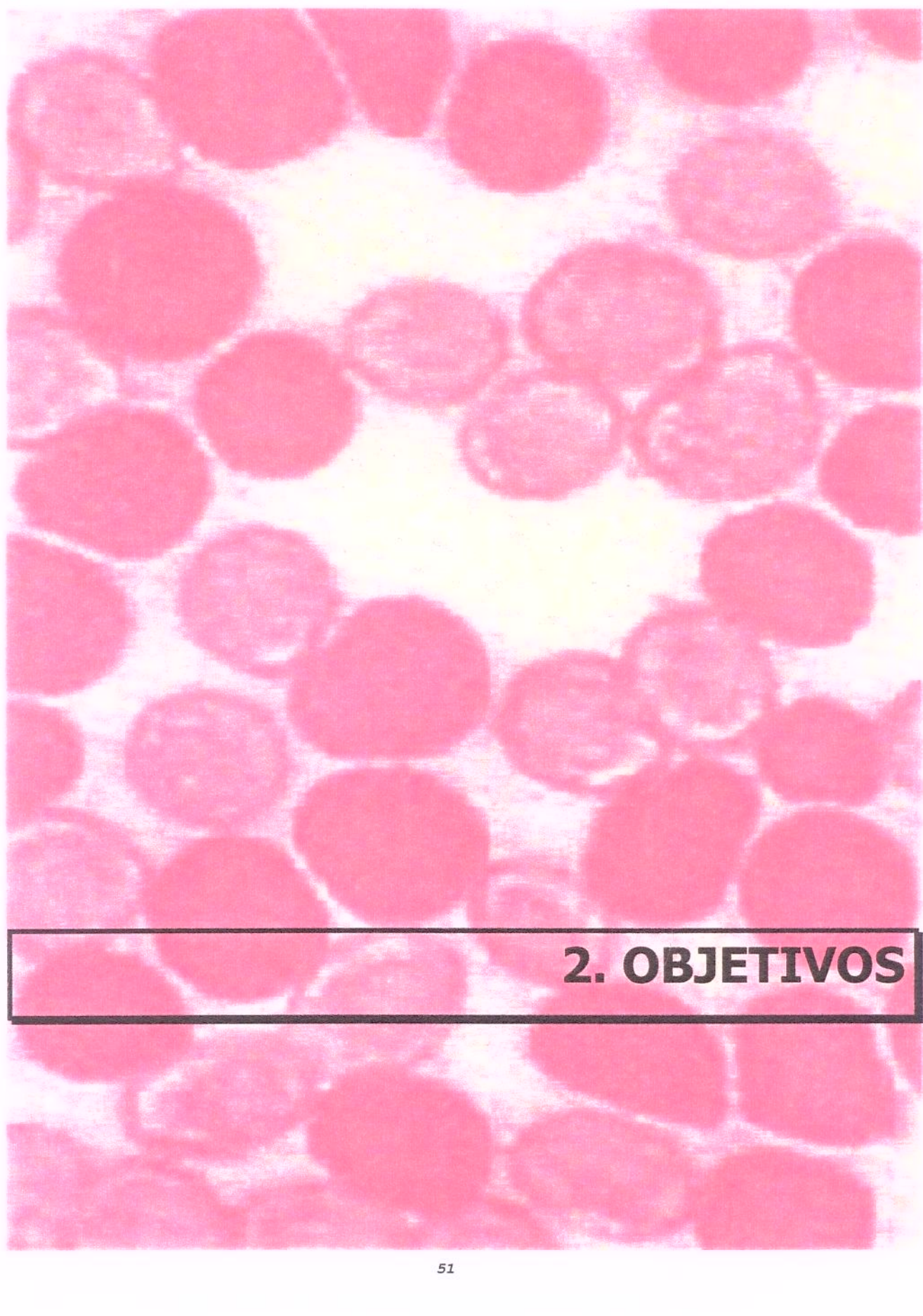
Estas poucas mutações já identificadas permitiram caracterizar a importância relativa de diferentes locais da região promotora que interagem com os “trans-acting factors” e controlam o grau de ajuste fino existente no controle da transcrição. Assim na γ^A -PHHF grega a mutação é na região -117 com substituição G→A e resulta na produção de 15% de HbF, por outro lado na γ^A -PHHF-britânico a mutação está localizada na posição -198, T→C, e resulta em 3,5 a 10% de HbF.

Vários sítios para ligação de fatores “trans” nesta região foram descritos. Entre os quais encontra-se o Sp1, um poderoso ativador transcripcional que possui afinidade às regiões -200 (seqüência GGGGC), -140 (seqüência CACCC), -50 (seqüência GC); o fator CPI descrito pela sua interação com a região CCAAT-box; o CDP, uma proteína de deslocamento da interação com a região CCAAT-box; o octâmero-1 (Oct-1) responsável pela interação com a região ATGCAAAT e os fatores para células eritróides, o GATA-1 e o NFE-3 (Fisher & Novock, 1990; Fucharon et al, 1990; Gumucio et al, 1988; Gumucio et al, 1991; Johnson & Mc Knight, 1989; Mantovani et al, 1988; Martin et al 1989; Mitchell & Tjian, 1989; Ottolenghi et al, 1989; Ponez et al, 1989; Ronchi et al, 1989; Stoeckert, 1991; Super-Furga et al, 1988)

Tabela 1. PHHF por mutação de ponto

TIPO	MUTAÇÕES	HbF (%)Heterozigoto
Pancelular γ^G		
Negros	γ^G , -202 C→G	15-25
Negros	γ^G , -175 T→C	20-30
Sardenios	γ^G , -175 T→C	17-21
Japoneses	γ^G , -114 C→T	11-14
Pancelular γ^A		
Sul da Itália	γ^A , -196 C→G	12-16
Chineses	γ^A , -196 C→T	14-21
Negros	γ^A , -175 T→C	36-41
Gregos	γ^A , -117 G→A	10-20
Sardenios	γ^A , -117 G→A	12-16
Negros	γ^A , -117 G→A	11-16
Pancelular $\gamma^G \gamma^A$		
Chineses	Desconhecida	20-25
Heterocelular γ^G		
Negros(Atlanta)	$\gamma^G \gamma^A$, -158 C→T	2,4-3,8
Heterocelular γ^A		
Negros	γ^A , -202 C→T	1,6-3,9
Britanicos	γ^A , -198 T→C	3,5-10
Brasileiros	γ^A, -195 C→G	4,5-7
Heterocelular $\gamma^G \gamma^A$		
Suiça	Desconhecida	1-4
Negro(Seattle)	Região promotora dos genes γ normal	3-8
Negros(Georgia)	Desconhecida	2,6-6

Obs: Uma deficiência contendo valores de HbF de 30-32%, situada entre as posições -102 a -114 na região promotora do gene γ^A foi descrita em negros.

A microscopic view of numerous red blood cells, which are biconcave discs, stained with a pink dye. They are densely packed and fill most of the frame. A black rectangular box is overlaid on the lower right portion of the image, containing the section title.

2. OBJETIVOS

Como a Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal funciona como um modulador de gravidade em várias hemoglobinopatias, torna-se essencial conhecer a sua frequência em nosso meio. Portanto, nosso objetivo é contribuir para o levantamento dessa frequência populacional com a procura dessa entidade entre doadores voluntários de sangue da região bragantina.

A microscopic image of red blood cells, showing numerous circular cells with a reddish-pink hue and a lighter center, arranged in a dense pattern. A black rectangular box is overlaid on the lower portion of the image, containing the chapter title.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

O estudo foi realizado em 1.846 doadores voluntários de sangue do período de outubro de 1998 até abril de 1999 no Hemonúcleo da Universidade São Francisco na cidade de Bragança Paulista, interior de São Paulo. A amostra foi constituída por 1507 homens e 339 mulheres, com idade média de 34,66 anos com desvio padrão de 10,17 anos.

3.2. MÉTODOS

A parte laboratorial foi realizada junto ao Laboratório Universitário de Análises Clínicas do Hospital Universitário São Francisco da USF.

3.2.1. COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue venoso (4,5ml) foram colhidas em Vacutainers® com EDTA (sal disódico do ácido etilenodinitrotetracético) como anticoagulante, na concentração de 1,5mg/ml(Dacie & Lewis, 1984) .

3.2.2. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os dados hematológicos foram determinados com a utilização do equipamento HemoCue® Blood Hemoglobin.

3.2.3. ANÁLISE DAS HEMOGLOBINAS

3.2.3.1. PREPARO DO HEMOLISADO

As hemácias foram lavadas três vezes em solução salina 0,9% e lisada em 1.0 volume de água e 1.0 volume de tetracloreto de carbono (CCl_4) à temperatura ambiente após agitação vigorosa. O estroma foi removido por centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos e o hemolisado obtido foi utilizado para as análises eletroforéticas.

3.2.3.2. DETERMINAÇÃO DO PADRÃO ELETROFORÉTICO

Realizou-se uma análise qualitativa das hemoglobinas pela corrida eletroforética do hemolisado em fitas de gel de agarose e tampão barbital 0,05 M pH 8,6, por 20 minutos a 240 V.

3.2.3.3. DOSAGEM DE HEMOGLOBINA FETAL

A técnica consiste na adição de 0,2 ml do hemolisado a 3,2 ml da solução de NaOH 0,083N e 6,8 ml de solução de Sulfato de Amônia saturada a 50% . Após filtração foi realizada a leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 415 nm (Betke et al, 1959).

3.2.3.4. ANÁLISE DAS CADEIAS GAMA DA Hb F

SEPARAÇÃO DE GLOBINAS

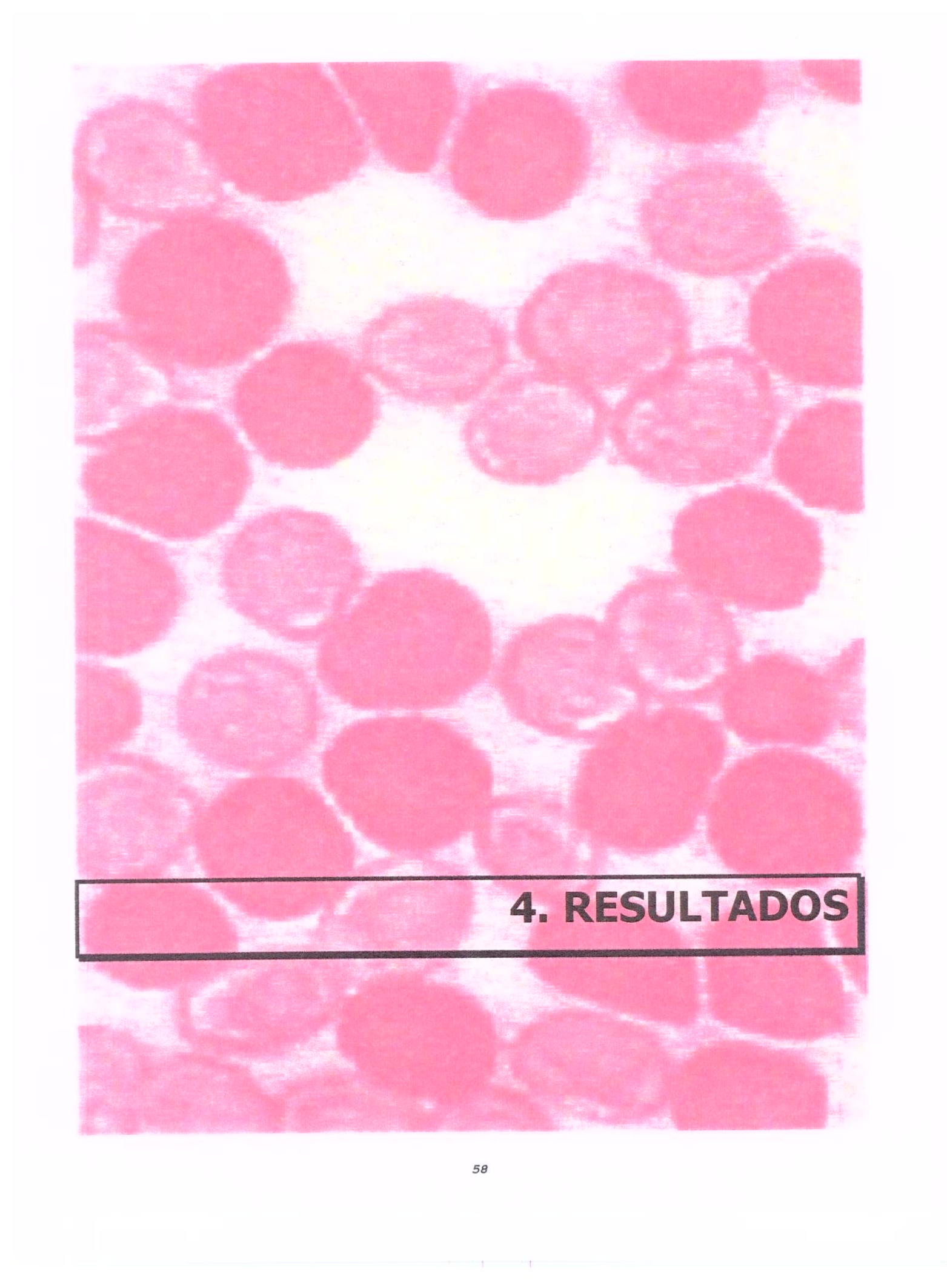
A globina foi precipitada de uma solução de hemoglobina, adicionando 20 volumes de HCl 2% em acetona a 20 °C, agitando violentamente.

A solução foi centrifugada a 1500 rpm por um minuto e trinta segundos, em seguida desprezou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o precipitado em acetona a 20 °C. Novamente foi centrifugado a 1500 rpm por um minuto e trinta segundos. Repetindo a operação três vezes. Secar lavando com éter a 2000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado novamente e secou-se a solução.

ELETROFORESE DE GLOBINAS

A análise qualitativa das cadeias γ^G e γ^A foi realizada pela eletroforese em gel de poliacrilamida-Triton-Uréia com corrente constante de 6mA durante 12 horas, após concentração das cadeias γ por diálise em água destilada.

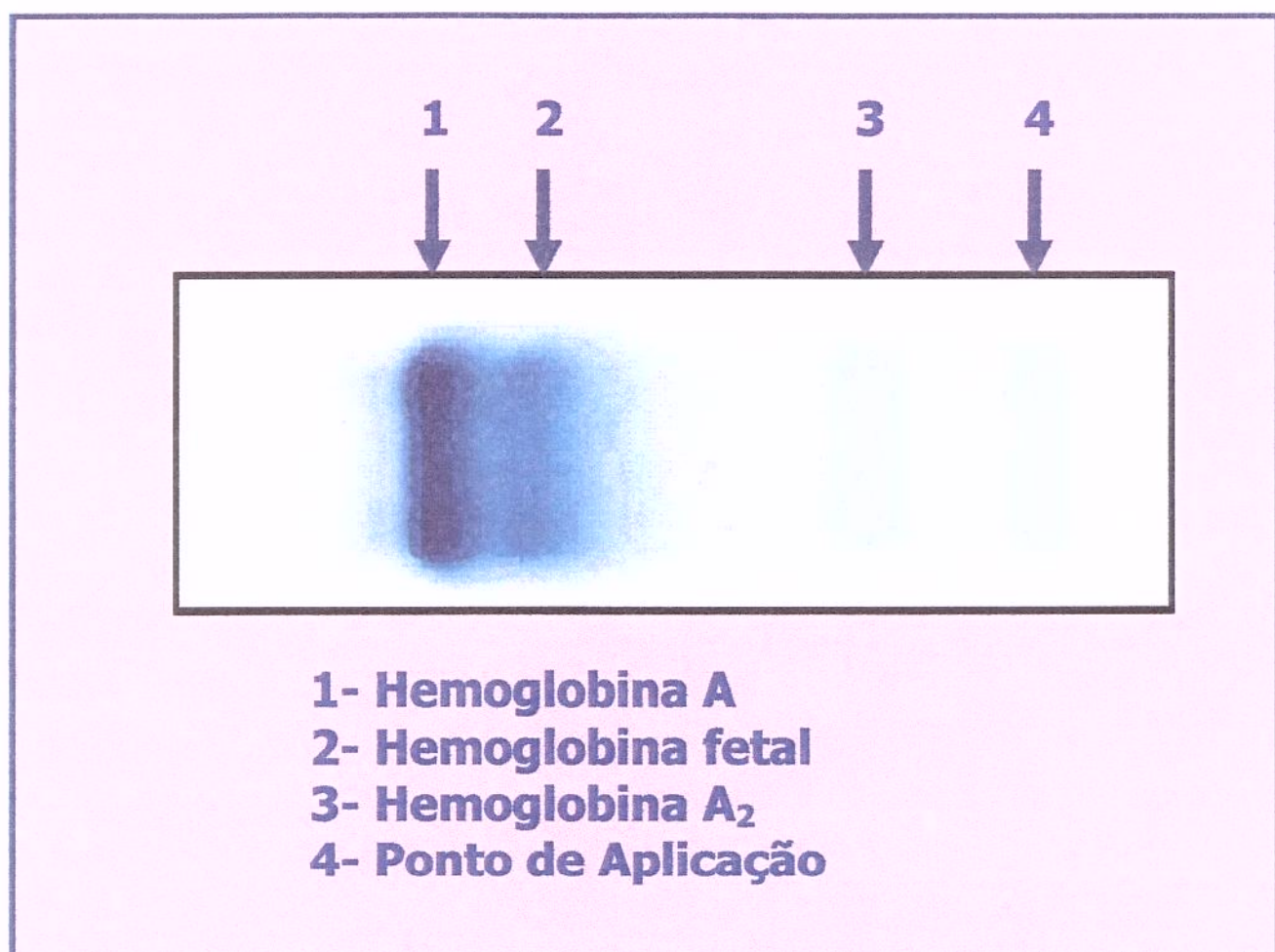
Na corrida eletroforética foram utilizados 20 μ l do hemolisado previamente diluído em tampão contendo uréia 8M – 5 ml; ácido acético glacial – 0,5 ml e pironina Y – 2 mg. Após todo o procedimento , o gel foi corado em Coomassie Brilliant Blue (Alter et al 1980).

A microscopic image of red blood cells, showing numerous circular cells with a reddish-pink hue and a lighter center, arranged in a dense pattern. The cells are set against a light, slightly textured background.

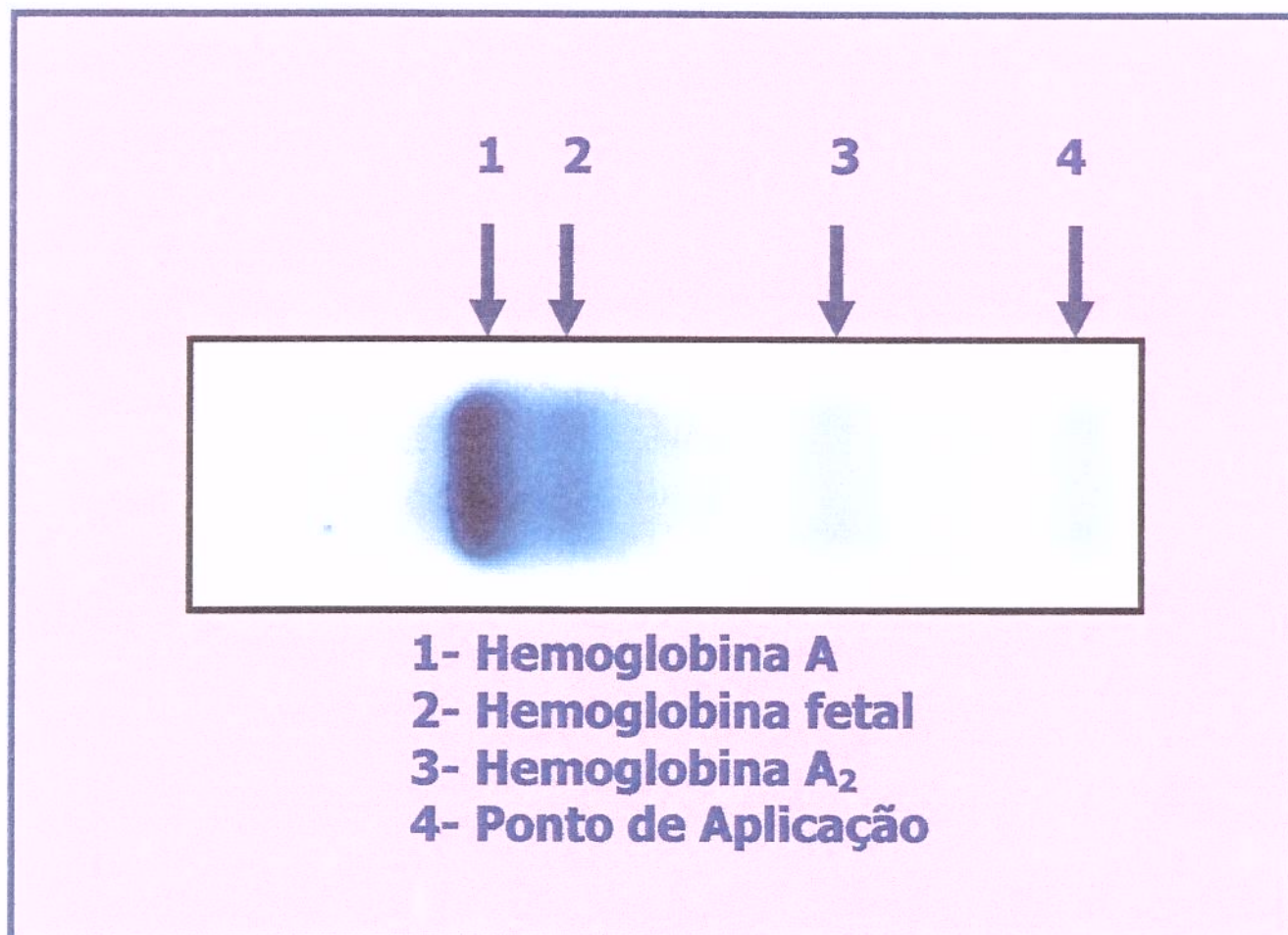
4. RESULTADOS

Foram encontrados 2 indivíduos não aparentados com alto índice de fetal (0.1%). Em um dos indivíduos encontramos um percentual de HbF de 17% (eletroforese 1) e no outro de 18% (eletroforese 2). Nos dois casos a eletroforese de cadeias mostrou uma ausência da cadeia gama G (eletroforese 3).

DOADOR	SEXO	Hemoglobina g/dl	Hb fetal %
1	Masculino	16,6	17
2	Feminino	13,5	18



**Figura 5 - Eletroforese de hemoglobinas
Doador 1**



**Figura 6 - Eletroforese de hemoglobinas
Doador 2**

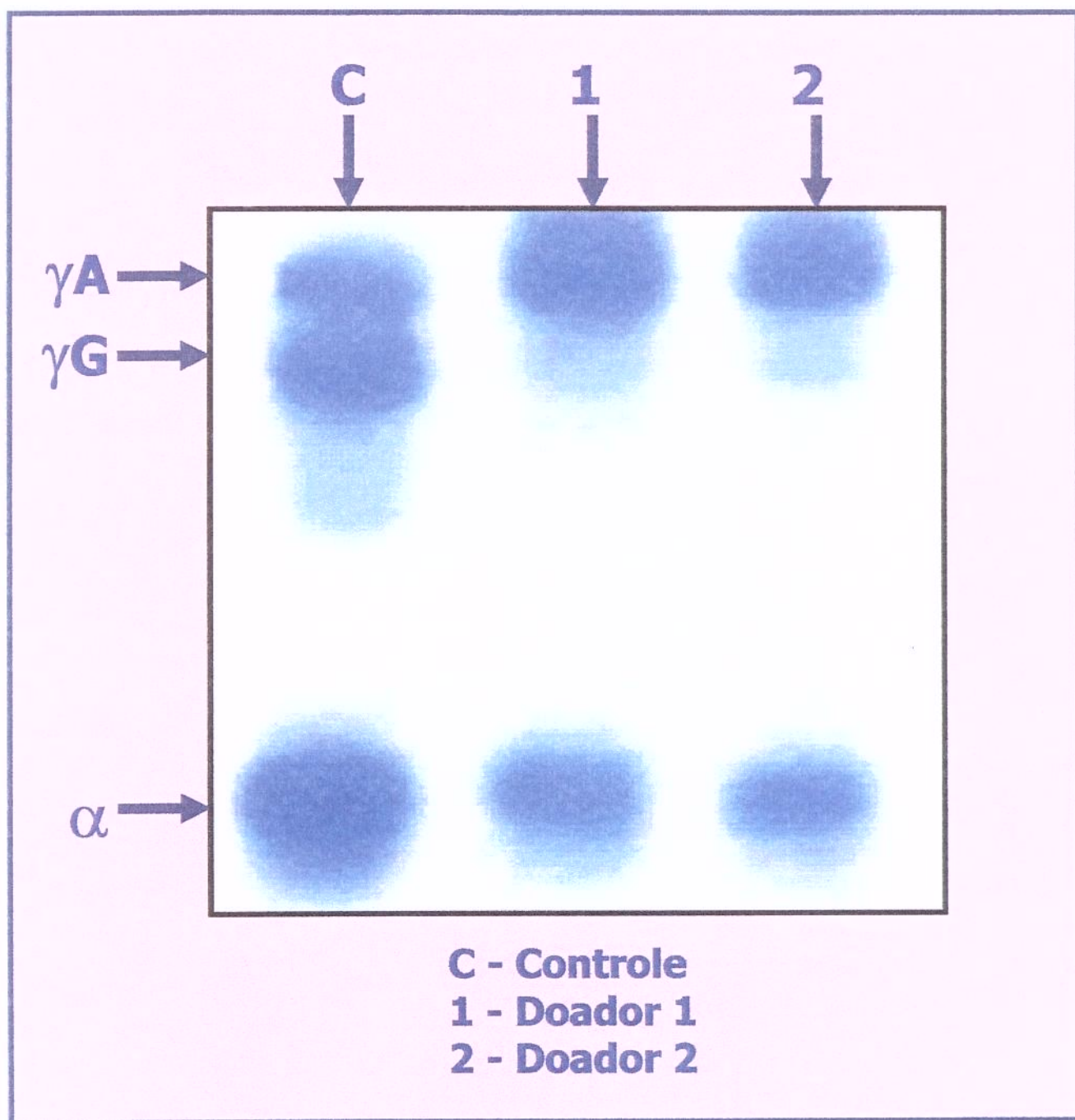
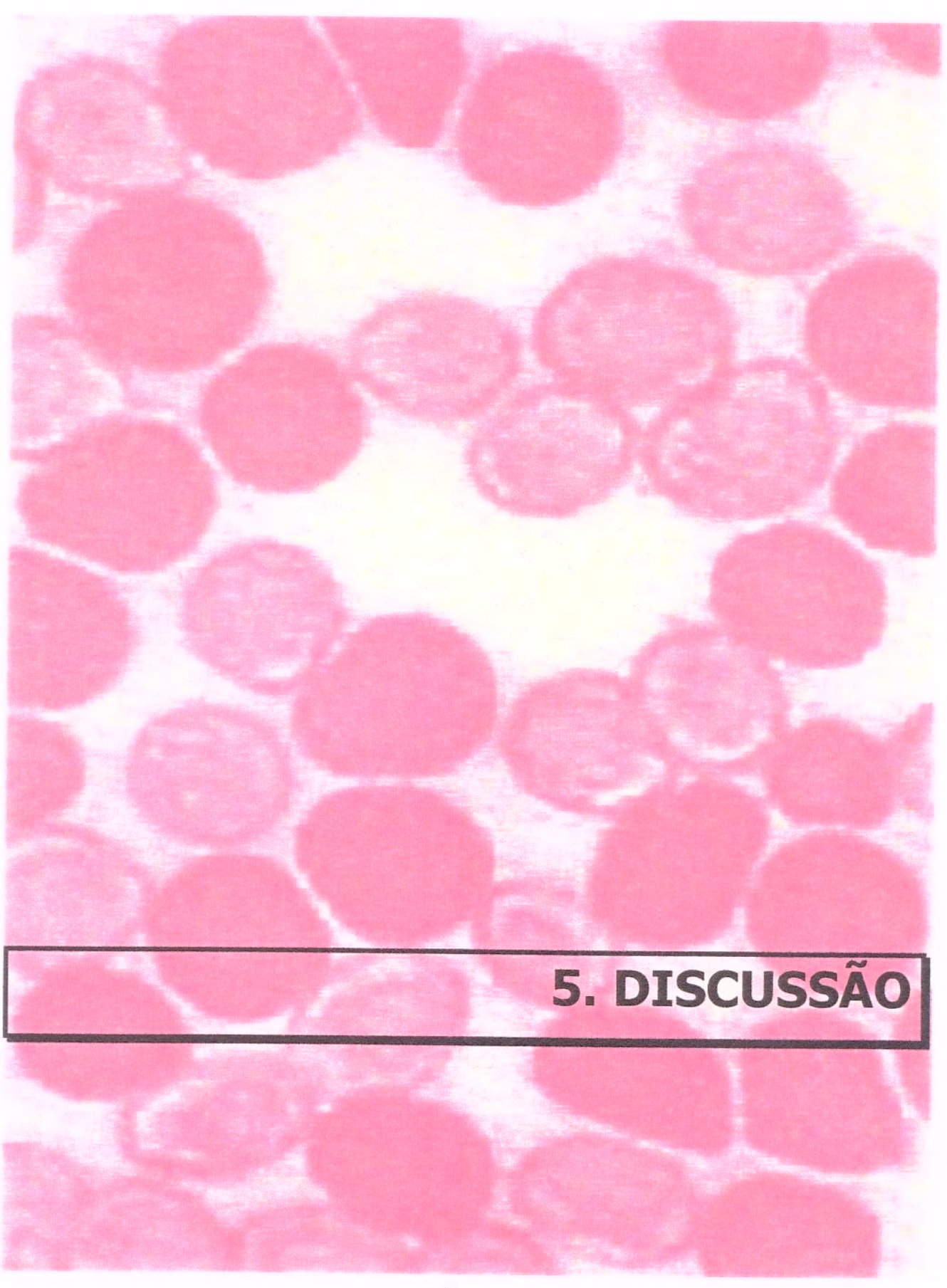


Figura 7 - Eletroforese de Globinas

A microscopic image of numerous red blood cells, appearing as pinkish-red, biconcave discs. They are densely packed, with some cells overlapping. The background is a light, yellowish-pink color.

5. DISCUSSÃO

Assim, um dos primeiros estudos realizados no Brasil com respeito a PHHF foi realizado por Gonçalves (1994), onde a compreensão dos mecanismos envolvidos na ontogênese das cadeias de globina humana apresenta importância ímpar não só pelos avanços que pode proporcionar no entendimento dos fatores determinantes da expressão gênica como pelo potencial terapêutico nas hemoglobinopatias, representado pela possível manipulação da expressão dos genes da globina gama (Bunn & Forget, 1986). Por isso os estudos que convergiram para as possíveis seqüências gênicas responsáveis por esses mecanismos advieram da identificação e caracterização molecular de indivíduos portadores da PHHF e $\alpha\text{-}\delta\beta$. Estas duas condições representam um grupo raro de hemoglobinopatias quando comparado ao das alterações talassêmicas e as variantes estruturais da hemoglobina (Weatherall & Clegg, 1981). Desta forma, os relatos de indivíduos afetados por essas condições são relativamente pouco freqüentes nas diversas populações do mundo. Daí os poucos trabalhos de prevalência dessa alteração nas diversas populações.

A origem étnica da população brasileira apresenta aspectos únicos que a distinguem dos demais países da América. Seus diversos componentes estão distribuídos de forma geograficamente irregular no país. Assim, no nordeste predominam os descendentes de africanos, ao passo que no sul apresentam maior freqüência aqueles oriundos de imigração européia. Além dos colonizadores portugueses, o Brasil recebeu elevado número de escravos africanos e imigrantes da Itália, Espanha, Japão, Alemanha e Oriente Médio. Todos esses grupos raciais estão submetidos a um progressivo processo de miscigenação. A intensidade desse evento é de difícil avaliação no país com um todo, mas

a análise conduzida por Azevedo et al (1981) na Ilha de Itaparica no Estado da Bahia mostrou que a proporção de mulatos praticamente duplicou, ao passo que a de brancos foi reduzida a um terço em cerca de 90 anos (1889 – 1980). Estes dados reforçam a idéia de que a frequência de anormalidades hereditárias das hemoglobinas devem variar nas diferentes regiões do país e refletem as origens étnicas e o grau de miscigenação envolvidas.

Em estudo molecular realizado por Gonçalves (1994) que investigou 5 famílias brasileiras que apresentavam diferentes formas de PHHF e/ou Talassemia $\delta\beta$, foram encontrados dois heterozigotos para PHHF por mutação de ponto (γ^A , - 195 C→ G e γ^G , - 202 C→ G), duas formas de PHHF por deficiência gênica (tipo I e tipo II) e um último paciente com uma forma de talassemia $\delta\beta$.

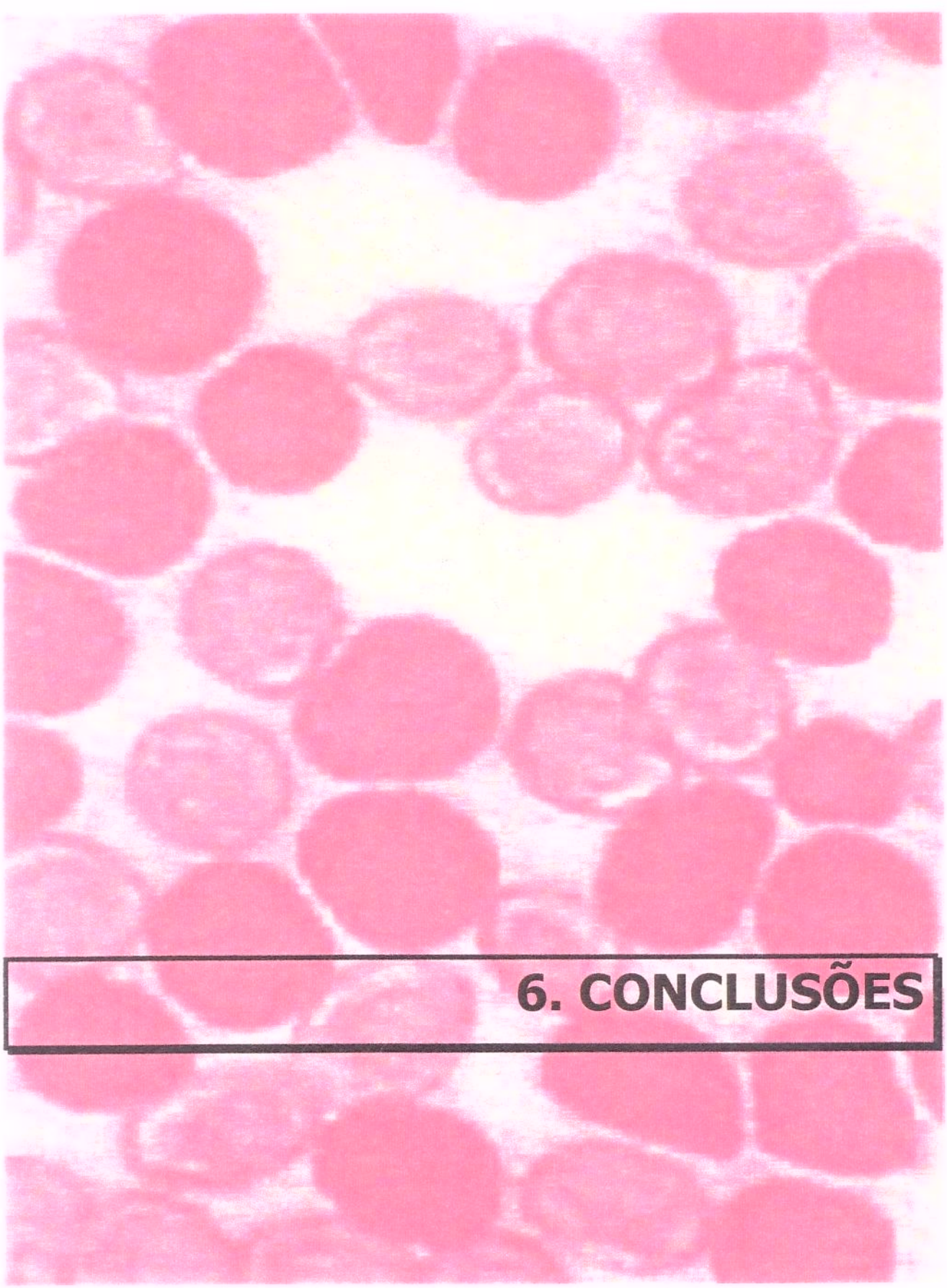
Em 2000, Kimura et al, relatou um estudo em que 47.468 pacientes adultos do HC/Unicamp foram avaliados com relação ao seu perfil hemoglobínico. Encontrou-se 0,1 % de indivíduos com PHHF, sendo que o nível de Hb F variou de 2,1 a 29,2 %. Em 52% dos casos de PHHF havia uma proporção normal entre as cadeias γ^G e γ^A sugerindo PHHF por deleção gênica. Em 23% $\gamma^A > \gamma^G$, 9 % $\gamma^G > \gamma^A$ e em 16 % apenas γ^A estava presente, sugerindo mutação em região promotora do gene γ^A .

Em nosso estudo, triamos 1846 doadores de sangue e encontramos 2 indivíduos com aumento de HB F (17, 18%) dando uma prevalência de 0,1%, exatamente a encontrada por Kimura em Campinas.

Imaginávamos encontrar indivíduos com a mutação brasileira, mas mesmo sem fazer os estudos moleculares essa possibilidade foi descartada pelo fato de no caso da

mutação brasileira os níveis de Hb F encontrados serem mais baixos do que os apresentado pelos indivíduos triados por esse trabalho. De qualquer modo, estudos moleculares irão elucidar a questão.

Ao analisarmos os estudos realizados em nossa região, verificamos que a prevalência da PHHF é em torno de 0,1 % e suas bases moleculares são extremamente heterogêneas.

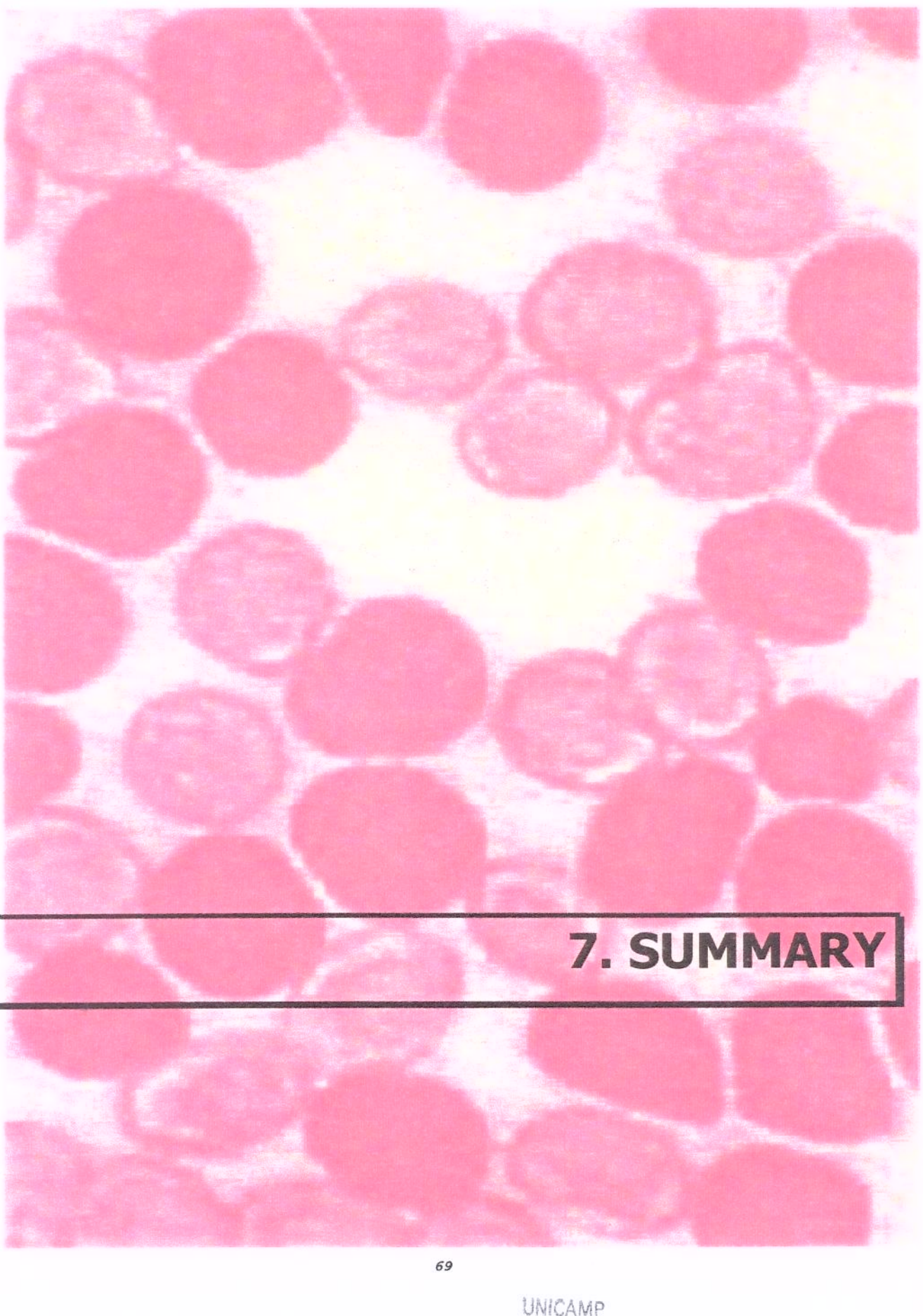
A microscopic image showing numerous red blood cells (erythrocytes) in a blood smear. The cells are generally circular, with a pinkish-red color and a lighter, central area (pale center) indicating the nucleus. They are distributed across the field of view, with some overlapping.

6. CONCLUSÕES

Na região de Bragança Paulista encontramos indivíduos portadores de Persistência hereditária da hemoglobina fetal.

Os casos triados, baseando-se nas características laboratoriais , provavelmente são de Persistência hereditária Pancelular do tipo Gama A, por mutação de ponto.

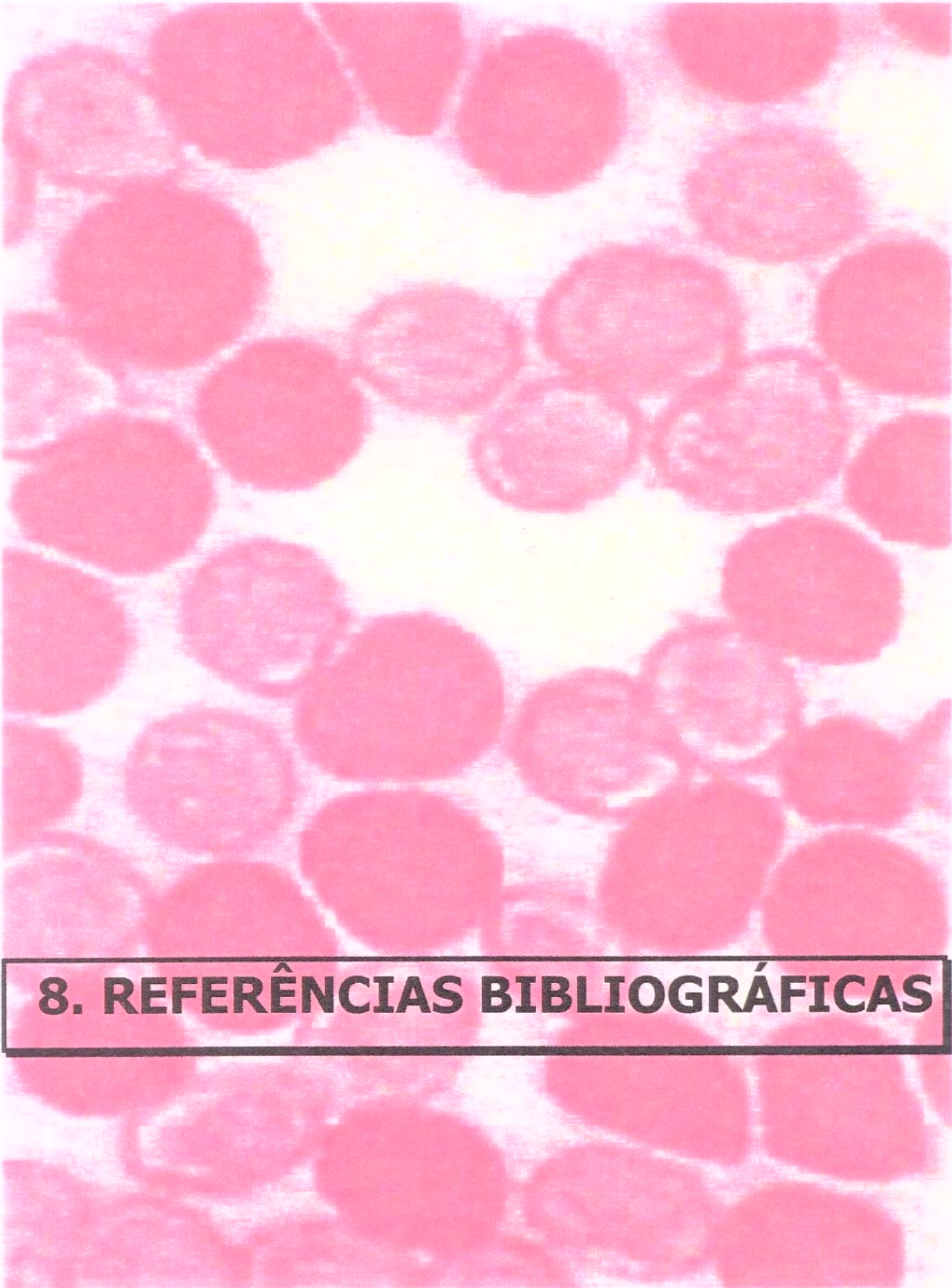
A frequência encontrada em nossa amostra foi de 1/1000 indivíduos.

A microscopic image of numerous red blood cells, appearing as bright red, circular structures with a slightly granular texture, set against a lighter, pinkish background. The cells are densely packed, filling most of the frame.

7. SUMMARY

Hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) is a benign clinical condition which is characterized by the synthesis of HbF and continues without hematological changes during adult life. As the function of HPFH in many hemoglobinopathies is that of a severity modulator, it is important to find out its frequency. In order to obtain this information, a study was conducted on 1,846 blood donors from Bragança Paulista. The hemoglobin was qualitatively analyzed by having hemolytic electrophoresis in the agarose gel tapes. The qualitative analysis of the γ^G and γ^A chains was performed by electrophoresis in polyacrylamide –triton – urea. Two individuals were found to have a high fetal index (0.1%). The percentage of Fhb in one individual was 17% and in the other 18%. The gamma A chain was found to be missing in both electrophoretic chains. The cases screened according to laboratory characteristics were of the hereditary persistence type Gamma A Pancellular due to mutation. Therefore, the frequency obtained in this sample was 1/1000 individuals.

Key words: Fetal hemoglobin, HPFH, Bragança Paulista

The background of the page is a microscopic image of numerous red blood cells (erythrocytes). These cells are roughly spherical and have a characteristic biconcave appearance, with a lighter center and a darker, more intense red periphery. They are densely packed across the entire page, creating a textured, cellular pattern.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTER, B.P.; GOLL, S.C.; FRENOY, G.D.; GRAVELEY, E.; HUISMAN T.H.J., 1980. Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the γ^G/γ^A ratio of globin synthesis., *Brazilian Journal Haematology*, c. 44: p. 525-534.

ANAGNOU, N.P.; PAPAYANNOPULOU, T.; NIENHUIS, A.W.; et al. Molecular characterization of a novel form of ($^A\gamma\delta\beta$)^o – Thalassemia deletion with a 3 breakpoint close to those of HPFH-3 and HPFH-4: insights into a common regulatory mechanism. *Nucl. Acids.Res.*, 16:6057-6066,1988.

AZEVEDO E. S.; Silva K.M.C.; Silva M.C.B.O.; Lima A.M.U.M.; Fortuna C.M.M.; Santos M.G. Genetic and anthropological studies in the Island of Itaparica Bahia, Brazil. *Hum. Her.* 31: p.353-357,1981.

BOYER, S.H.: The emerging complexity of genetic control of persistent fetal hemoglobin biosynthesis in adults. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 565: p. 23-36,1989.

BAUER, C.I., et al.: Different effects of 2,3-DPG e adenosine triphosphate on the oxygen affinity of adult and fetal human hemoglobin. *Life Sci*, 1968

BETKE, K.; MARTI,H.R. & SCHLICHT,I.,1959. Estimation of small percentage of foetal hamoglobin. *Nature*,184:1977-1878.

BOYER, S.H.: The emerging complexity of genetic control of persistent fetal hemoglobin biosynthesis in adults. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 565: p. 23-36,1989.

BOYER, S.H., et al.: Variations in the frequency of fetal hemoglobin-bearing erythrocytes (F cell) in well adults, pregnant women and adult leukemics. *Johns Hopkins Me. J.* 1975

BOYER, S.H., et al.: Fetal hemoglobin restriction to few erythrocytes (F cell) in normal human adults. *Science*, 1974

BUNN, HF, Forget BG (1986) Hemoglobin; molecular, genetic, and clinical aspects. *WB Saunders*, Philadelphia.

CAMASCHELLA, C.: Deletion and non deletion hereditary persistence of fetal hemoglobin in Italy. *Haematológica*, 75 Supple. 5: p. 26-30, Sep- Oct 1990.

COMPRI, M.B., 1995. *Programa comunitário de saúde pública em hemoglobinopatias hereditárias: Abordagem populacional a partir dos estudantes de Bragança Paulista*. Dissertação de Mestrado, São Paulo: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

DEAN, J. e SCHECHTER, A.N. "Sickle-cell anemia: molecular and cellular basis of therapeutic approaches". *N. Engl. J. Med.*, 299: p. 752, 1978.

DACIE, J.V. & LEWIS, S.M., 1984. *Practical Haematology*. Edinburgh, London, Mulbourne, New York, 6th ed. Churchill Livingstone.

DAVIDSOHN, I. e HENRY, J. B. "Diagnostico clínico por el laboratorio". Salvat, Barcelona, 1978.

EGBERTS, J.: Improved method for determining fetal hemoglobin (Hb F) by alkali desnaturation. *Clin. Chem.*, 41 (12 pt 1): p. 1778-1780, Dec. 1995.

FISCHER, K.D. & NOWOCK, J. The T→C substitution at 198 of the A γ -globin gene associated with the British form of HPFH generates overlapping recognition sites for two DNA-binding proteins. *Nucl. Acids Res.* Cap. 18: p. 5685-5692, 1990.

FESSAS, P. & STAMATOYANNOPOULOS, G.: HPFH in Greece. A study and a comparison. *Blood*, 24: p. 223-240, 1964.

GARBY, L., et al.: Studies on erythrokinetics in infancy. II. The relative rate of synthesis of hemoglobin F and haemoglobin A during the first months of life. *Acta Paediatr.* 1962

GONÇALVES, M.S., 1994. *Contribuição ao estudo das anormalidades moleculares da persistência hereditária da hemoglobina fetal e da delta-beta talassemia no Brasil*. Dissertação de doutorado, Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas

G. RICHARD Lee, JOHN N. Lukens et al.: *Wintrobe's clinical Hematology*, ninth edition

INGRAM, V. M. "Gene evolution and the hemoglobins". *Nature*, 189: p. 704, 1961

HAZMI, M.A.: Fetal hemoglobin level – effect of gender, age and hemoglobin disorders. *Molecular Cell Biochem*, 29; 135(2): p. 181-186, Jun 1994.

HORIUCHI, K.: Estimation of fetal hemoglobin levels in individual red cells via fluorescence image cytometry. *Cytometry*, 1;20(3): p. 261-267, Jul. 1995.

KAZAZIAN, H.: Concordance of a mutation 5' to the γ^G globin gene with $\gamma^G\beta^+$ HPFH in black population. *Blood*, 64: p. 1292-1296, 1984a.

KIMURA, E.M.; DUARTE,D.F.; SANTANA,S.C.; et al. 2000. Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH) and Structural Alterations of γ globin in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 23 (3): p. 573, abs.

KOOP, H.P.: The clinical relevance of fetal hemoglobin in IDDM and NIDDM patients [letter]. *Diabetes Care*, 18(6): p. 883-884, Jun.

LIAKOPOULOU, E.: Stimulation of fetal hemoglobin production by short chain fatty acids. *Blood*, 15; 86(8): p. 3227-3235, Oct. 1995.

LITTLE, J.A.: Metabolic persistence of fetal hemoglobin. *Blood*, 1 85(7): p. 1712-1718, Apr. 1995.

MCKUSICK, VA (1990) Mendelian inheritance in man, 9th ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

MELETIS, J.: Quantitation of hemoglobin in single erythrocytes with and without fetal hemoglobin. *Eur.J.Hematology*, 39(4):331-338, Oct. 1

NIENHUIS, A.W., and Maniatis, T.: Structure and expression of globin genes in erythroid cell, Philadelphia, W.B.Saunders, 1987, p.28

PERUTZ, M.F. "Submicroscopic structure of the red cell. *Nature*, 161 : p. 204, 1948

PERUTZ, MF (1987) Molecular anatomy, physiology, and pathology of hemoglobin. In Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus PW (eds) The molecular basis of blood diseases. WB Saunders, Philadelphia, p. 127 – 178.

RAMALHO, A. S., As hemoglobinopatias hereditárias, um problema de saúde pública. *Revista brasileira de genética*. 1986.

RICCO, G., MAZZA, B., et al.: Significance of a new type of human fetal hemoglobin carrying a replacement isoleucine-threonine at position 75 of the γ chain. *Hum. Genet*, 1976

SCHROEDER, E.^a Evidence of multiple structural genes for γ chain of human fetal hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1968

STAMATOYANNOPOULOS, G.; NIENHUIS, AW.; LEDER, P. & MAJERUS, P.W., 1987 . *The Molecular Basis of Blood Diseases*. Philadelphia, PH: WB. Saunders Company.

SCHROEDER, W.A. et al.: Na improved method for quantitative determination of human fetal haemoglobin. *Anal. Biochem*. 1970

TYUMA, I.: Different response to organic phosphates of human fetal and adult hemoglobins. *Arch. Biochem. Biophys*, 1968

WILLARD, T.M.: *Genética Médica*. 5 ed. 1993.

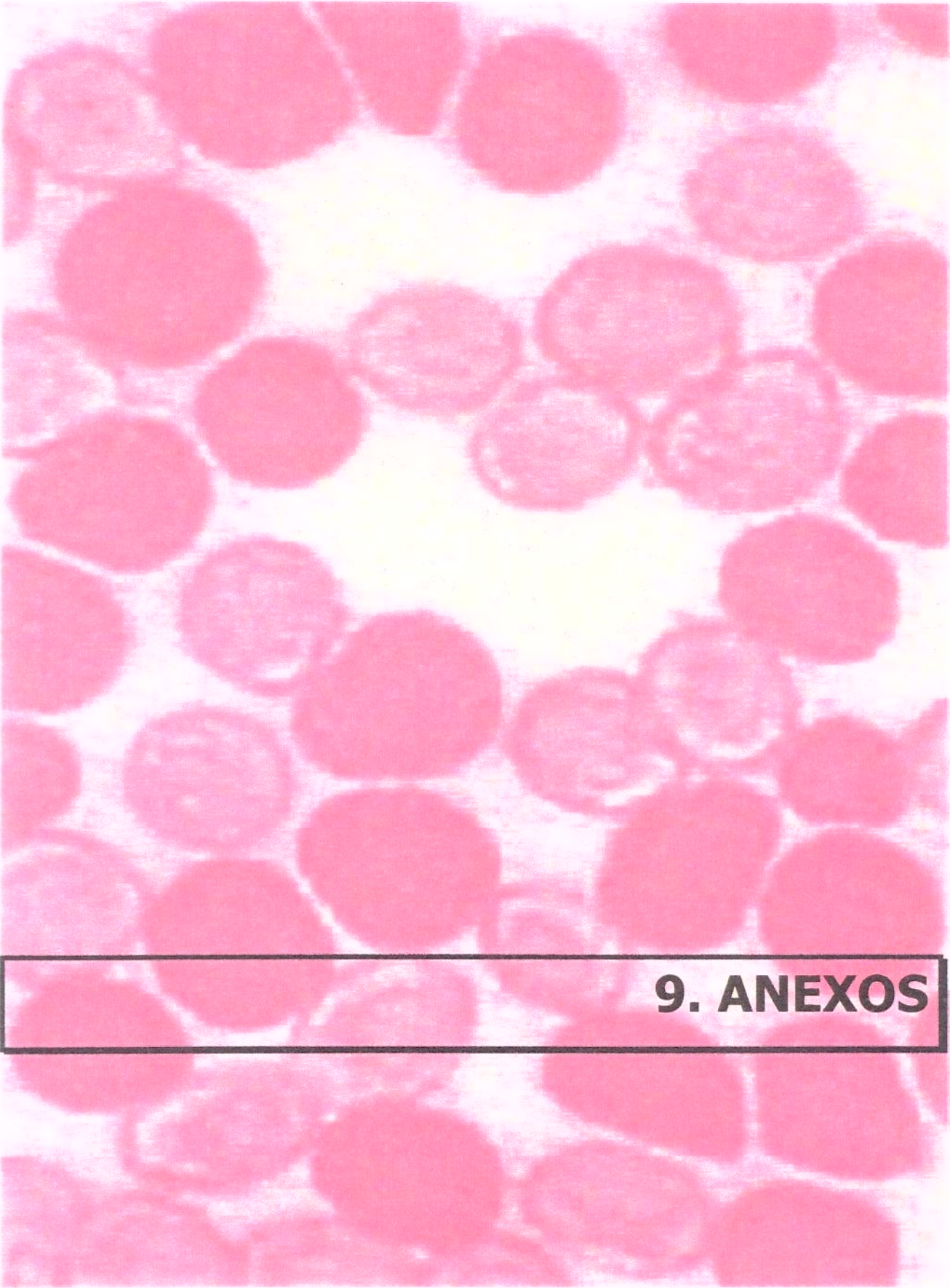
WEATHERALL, D.J. & CLEGG, J.B., 1981. *The Thalassemia Syndromes*. Oxford, England, Blackwell, eds.3.

WHITE, J.G. "Ultrastructural features of erythrocyte and hemoglobin sickling". *Arch. Intern. Med.*, 133: p.545, 1974

WINSLOW, R. M. e Anderson, W.F. – "The hemoglobinopathies". In: Stanbury, J.B.; Wyngaarden, J.B. e Fredrickson, D.S. (Eds.). "The metabolic basis of inherited disease"- N. York, McGraw-Hill, 1983.

WOOD, W.G., 1993.Increased HbF in ault life. *Baillieres Clinic Hematology*, v. 6(1): p.177-213.

ZAGO, M.A., et al.: Genetic control of F cell in human adults. Blood 1979 Nathan and Oski. *Hematology of infancy and childhood*, 4th Edition

A microscopic image of a blood smear showing numerous red blood cells (erythrocytes). The cells are generally round, with a pinkish-red color and a lighter center, indicating they are stained. They are densely packed across the field of view.

9. ANEXOS

Nº Doador	Sexo	Idade	Hb	Nº Doador	Sexo	Idade	Hb
001893	M	24	14,3	018930	F	21	14,2
018106	M	34	16,4	018936	M	21	17,6
018105	M	39	15,7	018942	M	48	15,4
018103	M	33	15,3	018943	F	42	15,5
003902	M	38	18,3	018941	M	20	17,8
018102	M	30	16	100039	M	34	18
010353	M	54	14,7	018938	M	43	15,5
015884	M	26	16,3	018935	M	22	14,9
018109	M	25	17,6	018937	M	36	16,2
018107	M	46	17,1	018940	M	33	15,8
101618	M	41	14,9	018931	M	49	14,5
017374	M	27	18,1	018952	M	29	16,8
101710	M	23	14,6	018953	M	27	14,3
018108	M	29	15,9	018954	M	31	16,3
011692	M	26	16,3	018955	M	22	16
016759	M	33	15,1	018956	M	25	14,8
101765	M	54	18,1	018960	M	42	14,5
016227	M	21	14,6	018961	M	22	17
016419	M	21	17,4	018944	M	38	17,3
016565	M	21	15,8	015972	M	21	15,7
018110	M	27	16,8	010132	M	29	16
018111	M	39	14,6	100134	M	36	14,7
018112	M	40	15,8	018939	M	38	15,3
018113	M	41	16,7	019237	M	49	13,4
018118	M	37	15,5	016323	M	30	16,9
018119	M	26	15,1	010269	M	25	16,7
018114	M	36	16,2	013985	F	34	14
005989	M	27	16,1	016881	F	47	14,9
018115	M	41	17,8	018945	M	29	18,4
018116	M	42	16	018946	M	55	14
011819	F	24	13,9	018947	F	51	13,1
016093	M	21	14,8	018948	M	30	14,7
000159	M	25	16,5	018949	M	48	14,7
101062	M	45	17,5	018950	M	58	15,8
101541	M	35	15,7	018951	F	21	15
018146	M	46	15,3	003847	M	30	16
018143	M	37	16,9	018975	M	29	17
018150	M	44	16,8	018969	M	29	17,9
018151	M	31	15,7	009747	M	47	15
012323	M	59	16	014053	M	31	16
011334	M	37	16,4	008459	M	56	17,5
011205	M	59	16,1	018971	M	43	16,6
014559	M	47	16	018982	M	28	15
018139	M	24	17,6	018976	M	24	15,1
018138	F	36	15,5	004973	M	25	15,4
018125	F	40	14	018977	M	41	16,4
009955	M	27	16,8	018974	M	46	16,4
012362	F	42	15	004973	M	25	15,4
018154	M	58	16,6	000873	M	52	14,3
018156	M	62	17,7	018978	F	28	14,5
011018	M	42	16	018980	M	39	16,6
015981	F	22	15	018979	M	26	15
009954	M	38	14,5	018983	M	38	16,7
006608	M	34	15,3	018981	M	29	15,6
011420	M	49	16	018984	M	26	16,6

018126	M	21	18	018985	M	40	16,3
004334	M	46	15,5	018990	M	41	14,3
007050	M	22	16,2	013150	M	33	16,8
001413	F	50	15,8	018987	M	33	16,8
018155	F	55	13,2	003131	M	23	15,6
018153	M	55	14,4	018992	M	34	14,1
011059	M	30	15,3	018989	F	31	14
015464	M	55	18	012998	M	59	16,9
018131	M	39	15,6	013544	M	42	18,4
018132	M	43	16,7	018994	F	22	13,4
018133	M	28	13,7	017725	M	27	19,7
018130	M	50	18,7	011044	M	23	15,9
014336	M	48	13,6	017829	M	20	13,3
101159	M	34	17,8	018973	F	44	13
018127	F	34	15,7	013211	F	28	14,8
017967	M	55	15,3	018993	F	24	14,7
017966	M	54	15,1	006046	M	41	15,8
018135	M	25	16,4	008204	M	37	17,7
018137	F	20	17,4	018995	M	31	17,7
009492	M	35	21,4	018999	F	44	15,6
018142	M	30	17	018997	F	37	14,7
008734	M	35	17,9	016875	M	26	17,6
100402	M	54	18,3	019000	M	37	17,1
008017	M	53	17,2	018414	M	53	14,6
014563	M	42	16,5	100557	M	47	15,2
018144	M	25	16,1	017484	M	49	16,2
014558	M	43	16,1	019006	M	55	14,3
018145	M	28	17,5	019015	F	25	14,9
018147	M	21	16,4	019009	M	39	15,4
018149	M	45	15,6	008167	M	40	16,4
000732	M	56	17,7	019001	M	31	15,5
014650	M	39	18	019014	M	30	17,6
015111	M	36	16,1	019007	M	34	16,9
010167	M	55	14,5	019012	M	46	14,1
003320	M	23	16,1	019011	M	48	15,8
101412	M	39	14,9	019008	M	42	15,6
017961	M	22	16,6	019016	M	27	19
007156	M	55	16,6	006853	M	22	17,5
015104	M	26	15,6	019003	M	32	14,1
012023	F	34	14,4	019004	M	29	17,8
018185	M	36	13,7	015980	M	26	15,8
011227	M	24	17,6	019017	F	27	15
101188	M	37	16,3	013929	F	21	12,2
100050	M	35	17,7	018425	M	25	16,4
017250	M	34	15,2	019025	M	37	15,2
100048	M	29	18,6	019026	M	41	17,8
018188	F	34	14,1	019005	M	43	16
018193	M	31	16,3	019023	F	37	15,4
012318	M	46	15,4	019024	F	22	13,2
008270	M	57	13,8	014089	M	47	15,7
018190	F	48	15,3	000253	M	44	15
018189	M	24	17,6	000260	M	32	14,7
018191	F	42	16,5	000269	M	52	16
018186	M	29	15,7	000545	M	29	15,5
006497	M	46	15,7	002413	F	35	15,3
018192	M	31	16,3	002978	M	29	16

018187	M	38	17	004933	M	47	14,4
018195	M	30	14,7	004980	M	29	15
015372	M	52	16	005650	M	35	16
018199	F	20	14,5	005886	F	45	14,4
018197	M	26	16,2	006135	M	32	15
015444	M	27	14,6	006142	F	41	13,5
018198	M	30	15,2	006639	M	28	14,9
008436	M	53	18,4	008393	M	26	15
018196	M	53	18,4	012476	M	33	16
004192	M	24	15,3	016003	M	39	14,9
008353	F	36	13,3	016176	M	20	15
008354	F	36	14,4	019019	M	24	16
013603	M	24	15,4	019020	M	21	15,6
018200	F	43	16,4	019021	F	24	13,9
018201	F	40	17,8	008205	M	24	15,3
018202	F	31	16,3	018998	M	51	17
018208	M	38	15,2	016224	F	24	13
015684	F	21	16,4	014164	M	32	13
016954	M	26	17,4	012365	M	48	14,6
003408	F	34	13,6	011033	M	27	15
013012	M	31	17,1	014067	M	28	16
018204	M	34	18,5	014444	M	44	15
003116	M	24	18,8	005895	M	43	14,6
018203	F	39	17,7	100858	M	41	15,5
018209	F	25	15	101328	M	46	14,3
008062	M	34	13,9	010854	M	57	13,9
011164	F	26	13,2	000241	F	36	15,1
018210	M	24	16,5	010267	M	32	15,1
011942	M	30	15,9	013611	M	49	15,7
018225	M	31	16,7	019029	M	41	15
018227	M	33	14,4	019030	F	30	13,6
018222	M	40	18,9	019031	F	33	13,2
012203	F	43	13,7	019032	M	40	17,2
018228	M	41	16	019037	M	24	13,7
018229	M	40	17	019039	M	26	16
018216	M	41	17,4	019040	M	24	15,1
018232	M	43	15,3	019041	M	27	15,6
018234	M	32	16,3	019043	M	23	14,9
018220	M	25	15,5	019044	M	45	16,3
018212	M	38	15,8	019045	F	40	14
018223	M	25	17,1	019046	M	27	13,8
018214	M	22	14,5	019050	M	20	16,3
011961	M	22	14,6	019051	M	45	15,4
018215	M	28	16,3	019052	M	52	17,2
018226	M	37	19,2	019053	M	59	17,7
018218	M	49	16	012900	M	39	14,5
018231	M	33	16	013365	F	32	14,3
018221	F	35	17,1	006283	M	22	16,1
018230	M	23	14,9	016257	M	22	17,3
018213	M	34	16,5	006946	M	22	13,9
000833	M	29	17,2	019056	M	42	16,1
018211	M	51	16,1	019057	M	48	16,3
018219	M	34	17,7	019058	M	27	15,9
018224	M	30	15,3	018467	M	22	13,8
009813	M	29	15,2	014369	M	26	16,9
010446	M	25	17	015347	F	25	13,9

101596	M	36	15,5	004270	M	44	17,8
002635	M	23	15,6	100914	M	53	13,4
007007	M	22	14,7	008736	M	51	14,4
009370	M	39	17	012604	M	25	15,6
007509	M	52	16,6	008737	F	44	13,1
008011	M	51	15,7	019060	M	27	15
018237	M	50	17,4	019061	M	24	15,2
018235	M	29	18	019136	M	48	16
018239	M	34	17	019135	M	24	15
101270	M	42	15,2	019134	M	31	16
012613	M	40	16,4	019133	F	33	13,9
018240	M	45	17,9	019131	M	29	15
013315	M	40	17	019130	M	25	15,5
018241	M	48	16,6	019129	M	28	14
017424	M	26	17,3	019128	F	46	14,9
012535	M	30	15,9	019127	M	28	15,2
017140	M	20	15,6	019126	M	27	16,2
018260	M	26	17,4	019125	M	27	15,9
008671	M	27	13,5	019124	F	32	13,9
018259	M	31	16,3	019123	F	51	13,9
001709	M	23	16	019121	M	23	16
000108	M	25	14,8	019120	F	22	14
016494	M	23	16	019119	F	32	13,9
018258	F	21	13	019118	M	31	15
016323	M	30	18,1	019117	F	21	13,9
016849	M	36	16,1	019115	F	29	13,9
018267	F	24	13,3	019113	F	23	14
002266	M	24	15,9	019112	M	44	15
018262	F	40	15,2	019111	M	43	15,1
014611	M	34	17,5	019110	M	55	16,1
013527	M	44	17,3	019109	M	22	15,2
018243	M	59	18,1	019108	F	26	13,8
018242	M	32	16,6	019107	M	40	14,8
018245	M	30	15,6	019106	M	43	15
018247	M	32	15	019105	M	31	16
011055	M	28	16,2	019104	F	41	14,8
016951	M	34	14,9	019103	M	23	15
012928	M	26	14,8	019092	F	42	15
018250	F	37	13,6	019092	F	42	13,9
013234	F	34	13,2	018490	M	39	14,4
016851	M	42	17,8	017844	F	20	13,8
018268	M	26	17,3	017693	M	38	15,1
014931	M	37	15,8	017696	M	25	16
007294	M	35	14,5	017695	M	32	16
014770	M	39	18,5	017694	M	23	15
012135	F	32	15,3	016478	F	21	14,1
005479	M	29	14,5	016201	F	22	14
100024	M	32	15,7	016152	M	51	13,9
010114	M	43	15,2	015396	M	22	15
004132	M	58	16,2	015390	M	27	15,1
010543	M	36	14,6	014972	M	41	16,1
002248	M	29	15,4	014669	M	25	15,8
003416	M	43	18	014351	F	48	14
010550	M	36	14,7	014014	M	26	15
007609	F	44	13,8	013773	M	26	14,9
018278	M	43	16,5	013635	M	43	16

018279	M	39	16,2	013280	F	20	16
018280	M	58	15,3	013141	M	32	15,9
018281	M	52	15,7	012426	M	28	14,9
018284	M	38	16,2	018525	M	32	15
018286	F	33	14	012372	M	48	14,9
018288	F	40	13,5	010935	M	42	15
018292	M	35	15,9	010253	M	38	16
001600	M	56	15,9	009636	F	28	16,2
015851	M	34	17,5	009591	M	42	14,9
006793	M	35	16	009246	M	36	14,8
018269	M	35	16,7	009243	F	38	15,1
018287	M	40	15,2	005292	M	51	16
018270	M	32	17,6	004720	M	47	15,3
018273	M	54	16,2	004704	M	36	15,2
018277	M	49	15,5	004689	M	53	13,9
013186	M	49	14	004023	M	38	14,9
016974	F	21	13,2	002740	M	45	16,1
008024	F	26	13,7	001186	M	35	16
013187	M	46	13,5	001059	M	54	15
018291	M	35	14,3	001056	M	29	14
018292	M	24	15,3	000593	M	32	16
018289	M	25	16,1	000208	M	35	15,1
018290	M	26	16,8	000184	M	46	16
018298	F	44	14,2	005176	M	28	16,5
018300	M	33	14,9	019089	M	34	15,5
000449	M	45	13,3	019099	M	25	16,3
013207	M	21	15,5	019085	M	68	16,2
018303	M	46	15,7	019086	M	32	17
007083	M	22	16,4	019091	M	41	17
012166	M	37	16,1	016179	M	43	14,8
018304	M	58	15,1	019033	F	39	16,3
018306	M	36	18,8	019094	F	42	16,3
018307	M	40	15,6	019095	M	48	16,4
018308	M	27	16,3	005606	M	35	15,9
018309	M	24	17,1	101462	M	30	15,8
018305	F	40	14,9	011673	M	34	15,7
005239	M	25	15,9	006963	M	22	15,6
018296	M	46	17,3	001346	M	38	15,3
008075	F	40	14,8	017413	M	49	15,5
018317	M	54	17,6	001173	M	28	17
018324	M	60	18	008027	M	34	17
000330	F	21	11,5	019077	F	34	15
018313	M	35	14,9	019078	F	25	16
018321	M	35	16,3	019080	M	22	16,8
018319	M	32	17,1	010550	M	36	14,7
018323	F	37	14,9	019079	F	28	14,4
100646	M	40	15	019075	M	31	16,2
018312	M	48	18,6	019081	M	45	16,3
018318	M	30	16	001169	M	39	14
018315	F	41	14,9	000159	M	25	15,3
018316	M	47	15,8	019076	F	25	14,1
016171	M	35	16,5	017629	F	47	13,7
018328	M	21	16,1	101244	M	59	15,6
018327	M	58	16,1	001732	M	35	17
018326	M	53	16,5	017155	M	31	16,8
007900	M	26	17,6	003182	M	34	16

018342	M	27	15,4	008962	M	32	17
006963	M	22	15,4	100564	F	38	14,4
018333	M	48	17,7	100569	M	45	14,5
017384	M	21	16,6	019096	M	51	16,6
007830	M	22	16,3	019100	M	32	15,1
017021	M	34	15,7	019098	M	24	15,7
016098	M	21	16	019101	F	32	14
014192	M	26	16,1	019097	M	24	15,3
018331	M	57	16,9	019141	M	29	16,1
006946	M	22	15,1	002849	M	33	17,9
018340	M	39	18,4	019150	M	49	16,1
015793	M	21	16,5	019151	M	37	15
018335	M	21	16	009990	M	44	14,2
015220	M	21	15,4	005830	M	29	17,6
018341	F	22	14,7	019143	M	39	16,4
018338	F	28	14,8	019144	M	35	14,6
018343	M	21	16,8	019145	M	45	14,7
018346	M	27	16,6	019146	M	31	16,9
101651	M	32	13,5	012538	M	43	14,6
010366	M	49	14,4	016593	M	36	15,7
007923	M	22	15,8	013282	M	31	16,8
016288	M	35	16,1	001470	M	37	15,6
003522	M	25	14,5	017128	F	32	14,4
101014	M	35	15,7	003325	M	27	16,3
016795	M	37	15,9	009598	M	41	13,7
016747	M	33	13,8	011756	M	41	16,7
016798	M	27	16,6	000780	M	24	13,3
016750	M	58	16,6	000838	M	24	15,6
007939	M	28	15,2	014257	M	52	14,2
009560	M	41	17,3	011192	M	32	13,7
101166	M	37	16,2	000774	M	24	16,7
018369	M	53	16,6	000837	M	27	15,6
018361	M	54	15	004760	M	34	16,7
009558	M	42	15,9	101508	M	44	14
018352	F	20	14,4	019138	F	39	15
005810	M	24	15,9	019137	M	21	14,8
009559	M	22	15,7	100604	M	34	16,9
018367	M	20	15,4	011333	M	57	14,5
018350	F	25	13,8	012584	F	43	13,8
017427	M	21	17,2	015882	M	21	17
018359	M	44	16,8	010697	F	31	13,4
018357	M	22	16,9	019139	F	46	14,3
018355	M	47	14,6	017149	M	28	15,1
010314	M	56	16,5	017150	F	26	14,6
013146	F	40	14,8	019152	M	32	16,9
018356	M	28	15,8	018445	M	31	16,3
018358	M	41	15,5	010913	M	31	16,5
013241	M	22	14,6	016685	M	43	15,7
010107	M	41	16	006943	M	23	15,6
018364	F	53	14,8	011662	F	35	13,2
018351	F	34	14,5	011664	F	26	13,8
018366	M	40	15,4	016408	M	34	16,6
018354	M	26	16	019154	M	21	15,2
000345	M	23	16,4	019156	M	24	17,4
100018	M	37	15,3	006372	F	33	13,9
003898	M	23	17,6	012472	F	43	14,4

011977	F	22	14,3	002888	M	25	14,2
018380	M	33	16,2	018542	M	40	17,1
006034	M	46	15,9	010269	M	25	16,7
018374	F	50	13,6	101506	M	40	15,7
018382	M	29	17,3	019157	F	40	14,8
018379	M	21	17,3	019158	M	55	14
018381	F	30	13,4	019159	M	33	16,1
018378	F	26	14,8	014090	M	25	14,6
015126	F	21	14,5	019160	M	32	15,8
018375	M	44	15,3	005503	M	44	15,7
018396	M	24	15,8	004258	M	28	14,8
018348	M	46	14,5	101405	M	42	16,3
018400	M	41	15,8	001734	M	36	17,4
018397	M	42	16,8	017548	M	21	15
018398	F	19	13,7	019169	M	24	15,9
018401	M	31	16,5	019170	F	22	13,5
018403	F	36	14,1	019175	M	21	16,8
008412	M	31	15	015352	M	26	17
012180	M	48	15,1	019164	M	47	14,4
018402	F	27	14,7	019165	M	22	15,6
101135	M	25	16,2	019166	F	29	14
001845	M	23	14,6	000414	M	34	16,2
006548	M	44	15	019174	F	41	14,9
016257	M	22	16,6	101107	M	34	17
016311	M	36	15,8	016161	M	21	15,8
013731	M	49	15,9	000495	M	32	15,7
018416	M	36	17,1	019168	M	28	14,7
001474	M	32	14,2	007522	M	43	16,2
018418	M	31	15,1	019179	M	44	17,4
018415	M	28	15,2	019178	M	35	17,2
018414	M	53	15,2	005116	M	36	16,9
018412	M	22	15,8	019176	F	35	15,4
018413	M	27	17,2	009370	M	39	15,3
018410	M	21	16,4	019177	F	56	13,8
018411	M	24	15,3	001265	M	28	15,6
018409	F	25	14	101636	M	28	16,7
018407	F	47	15,4	011602	M	35	15,6
018406	M	44	16,9	100910	M	28	13,6
018408	M	24	17,2	019186	M	34	13,1
016345	M	29	16,5	019183	M	37	15,5
017410	F	38	13,1	019188	M	20	16,6
013322	F	21	13,7	019180	M	41	16,9
018424	M	30	15,5	019184	M	41	14,6
018425	M	25	18,9	019189	M	57	14,8
014079	F	24	14,6	019181	M	40	15,7
017871	M	22	16,5	019182	F	40	13,2
018422	M	24	15,9	001467	M	23	17,8
018426	M	27	16,7	011924	M	44	16,9
013846	M	50	16,9	101637	M	28	15,7
018427	M	25	13,3	019185	F	30	13,9
014756	M	29	17,5	100909	M	46	15,6
014089	M	47	15,7	100222	M	36	13,6
018420	M	26	18	001480	M	44	14,3
018423	M	39	14,9	015343	M	21	18
018419	M	32	15,7	101115	M	46	17,2
005670	F	42	14,9	016628	M	54	16,7

011362	F	22	14,5	019190	M	26	14,6
018421	F	23	13,7	019191	M	21	16,4
015841	M	32	14,5	019193	F	29	13,5
018432	F	35	14	019194	M	34	16,2
018433	M	21	17	019196	M	32	14,2
010006	M	37	15,2	019197	M	32	18,5
018441	M	39	14,9	019198	M	46	14,3
018430	M	37	14,3	019199	F	26	13,5
016211	F	25	13,6	019200	M	29	15,9
018443	F	21	13,7	019201	F	33	12,9
010198	M	43	16,3	019202	M	47	14,3
018439	M	34	15,5	019203	M	53	16,1
010956	M	26	15,7	011670	M	35	16,1
018440	M	42	16,1	003894	M	32	18,3
011924	M	44	16,8	004345	M	23	15,3
009503	F	31	13,8	015971	M	21	14,6
016458	M	45	16,7	019210	M	49	13,8
014215	M	43	16,9	019209	M	49	15,5
017352	M	35	16,9	019208	M	46	14,1
018436	M	29	15,1	019205	M	25	15,9
018429	M	33	15	019192	M	26	16,3
018434	M	20	14,4	009889	M	44	13,2
010784	M	44	14,8	016594	M	46	14,5
100333	F	57	15,5	019211	F	24	13,7
018442	M	21	17,1	017796	M	28	16,4
009762	M	34	15,4	019213	M	29	15,4
018445	M	31	15,4	019212	M	47	15,7
018444	M	20	15,8	002081	M	24	15,8
007507	M	25	13,9	004579	F	56	14,2
005497	M	65	15,1	009596	F	56	13,1
016520	F	42	14,1	016974	F	21	14,6
016238	M	38	17,4	014001	M	54	14,6
012654	F	33	14,4	017979	M	25	14,9
018448	F	25	13,8	003732	M	36	18,5
018449	F	54	14,1	019215	F	32	13,8
011438	M	38	17,8	016876	M	54	14,1
018450	F	56	13,4	015689	M	27	15
002882	M	46	17,1	019220	F	25	13,2
018462	F	20	14,1	018191	F	42	14,9
017302	M	25	17,3	016323	M	30	16,9
003710	F	24	15,6	019221	F	57	15,3
018461	M	28	15,3	018628	M	37	14,6
018460	F	23	13,9	019217	M	22	17
015542	M	24	15,9	019218	F	25	14,3
016328	M	53	17,1	003988	M	41	16
018463	M	36	16,6	016899	M	50	18,5
018464	M	41	15,6	019219	M	42	16,8
009088	M	22	14,8	100826	M	33	16,5
003687	F	23	13,8	019054	F	49	13,1
018463	M	36	16,6	003419	M	23	16,4
012150	F	33	13,8	009075	F	27	15,8
018467	M	22	14,1	019225	F	30	13,1
011143	M	41	15,4	018639	M	27	15
000478	F	29	13,2	019223	M	21	15,9
000479	F	27	15	019222	M	34	17,5
010218	M	32	15,2	006483	M	22	15,5

018495	M	43	16	018540	M	27	17,8
018496	M	24	14,3	008350	M	46	15,7
018512	M	29	18,8	100544	M	60	14,3
018513	M	35	15,7	009756	M	49	15,6
018514	M	32	14,3	014723	M	39	16
018515	M	25	16	014724	M	61	16,1
018523	F	22	13,4	003716	F	22	13,5
100582	F	35	14,9	019230	M	50	18,3
012035	M	30	16,3	100382	M	32	15,7
018521	M	25	16,1	019234	M	50	16,1
018519	F	26	14,2	019233	M	32	16,3
018517	M	36	14,7	019232	M	20	15,2
004086	M	26	15,3	019231	M	37	15,2
012625	M	30	13,7	019229	M	46	15,8
016340	M	24	15,4	004086	M	26	17,5
018468	F	26	13,1	018188	F	34	13,8
018470	M	27	15,7	019235	M	22	16,4
015184	F	36	13,9	017760	M	27	15,4
018472	M	22	14	006724	M	46	15
015183	M	36	14,9	000213	M	29	15,3
018471	F	33	15,1	009981	M	45	15,8
018473	F	40	14,8	004427	F	39	13,5
018474	M	36	16,8	016261	M	45	15,7
004264	M	34	18,9	015325	M	29	16,7
011053	F	27	14	017639	M	29	14,8
014456	M	33	14	000942	F	30	12,9
003071	M	32	14,5	010748	F	30	13,9
014901	M	32	16,6	006139	M	27	16,4
018535	M	29	16,2	008740	M	36	15,9
004847	M	29	16,1	012484	M	35	15,3
011058	M	40	15	004072	M	48	15,4
018527	M	58	16,3	019237	M	49	13,4
010091	M	57	17	012383	M	49	16,2
018526	M	32	16,6	019244	M	22	16,9
018528	M	23	16,1	019242	M	32	16,6
018525	M	32	15,8	001940	M	43	16,5
002923	M	60	15,3	008031	M	29	16
015332	M	29	15,2	003306	M	23	16,1
101750	M	35	14,9	019241	M	20	15,6
018531	M	37	15,3	019240	M	25	15,5
018532	M	37	15,5	019246	M	25	15,9
018533	M	22	14,2	019245	M	24	16,3
018534	M	30	14,7	019243	M	23	16,2
018529	M	40	17,7	016443	M	42	15,3
018530	M	42	17,9	019253	M	47	15,9
018536	M	23	16,8	019256	M	46	16
007913	M	254	15,4	019255	M	45	16,7
010817	M	36	16,2	019254	M	36	14,5
018541	M	35	17,3	019251	F	35	13,9
100043	M	61	14	019250	F	61	12,2
018539	M	55	14,6	019247	M	27	15,4
018540	M	27	16,9	019257	M	51	16
018538	M	31	17	019249	M	25	15,7
011242	F	22	13,8	001474	M	32	14
013736	F	36	15,5	019252	M	37	17,6
100868	M	40	15,3	014104	M	27	16,1

018469	F	20	14,2	009084	M	25	15,1
009084	M	25	14,7	019269	M	48	17,3
018545	F	20	15	019268	F	32	15,7
004946	M	27	14,8	019267	M	29	16
018552	M	40	13,5	005353	M	33	17,1
100282	M	31	14,5	019265	M	37	16,8
018543	M	23	17,2	019262	M	24	15,6
000432	M	25	15,4	019261	M	24	14,3
018551	F	44	13,6	019260	F	49	13
009082	M	30	15,9	019259	M	32	16,6
018548	M	25	15,4	019258	M	42	17,1
002799	M	37	17,8	015159	M	28	16,9
018372	M	41	18,1	012938	M	49	16,6
018555	M	26	15,6	008104	M	32	15,1
018550	M	33	16,6	006596	M	27	14,3
018547	M	22	16,6	004791	M	28	14,4
013314	M	49	15,4	002959	M	29	15,5
018556	M	49	15,1	002303	M	24	15,1
003476	M	41	16	019276	M	36	16,7
018546	M	52	15	019279	M	26	15,4
008739	M	38	15,4	019280	M	37	15,2
018542	M	40	16,2	019273	M	25	14,2
004628	M	23	15,7	019278	M	47	16,7
009312	M	27	15,4	019270	M	32	16,5
101193	M	46	15,8	019271	M	31	16,5
018563	M	49	13,6	004566	M	23	17,3
007362	M	22	15	011813	M	25	16,3
018561	M	32	14,5	017148	F	24	13,5
018565	M	24	16,4	017973	M	20	15,6
018570	M	24	15,7	019281	F	20	14,2
018569	M	32	13,5	019283	F	19	14,7
018568	M	31	14	019285	M	21	15,4
018567	M	50	15,1	019287	F	20	13,3
018566	M	38	15	019288	F	22	15,2
018572	F	25	13,7	019289	M	21	16,8
018578	M	29	17,1	019292	M	20	15,9
018580	M	29	14,2	019293	M	42	14,4
018579	M	25	15,7	019290	M	21	15,3
018581	F	50	13,8	019296	M	20	16,5
018576	M	45	16,2	019286	M	20	14,2
018577	M	43	16,3	019300	F	20	13,5
013828	F	46	13,9	019304	F	23	13,4
018573	M	40	16	100581	M	36	18
018575	F	40	13,2	018492	M	37	14,5
002131	M	24	16,2	019301	M	22	16
003540	M	44	17,6	019303	F	21	13,9
005013	M	52	16,4	007939	M	28	14,4
011979	M	53	16,1	012739	F	29	14
008542	F	35	14,3	019305	M	20	16,1
018593	F	56	13,8	019306	M	37	14,8
018592	F	46	13,7	019307	M	28	16,9
018590	M	46	17,3	006928	M	22	15,9
018589	M	31	16,9	019309	M	23	13,8
018588	M	28	16,8	019308	M	28	17,1
018587	M	40	16,8	100951	M	27	14,5
100900	M	40	17,3	001932	M	50	17,5

000234	M	25	14,5	012150	F	33	13,3
000238	M	42	15,6	013440	M	34	15,2
005488	M	41	17,1	013605	M	22	17,1
008249	F	51	13,8	019261	M	39	15,3
018597	M	23	15,3	019311	M	39	15,7
018596	M	57	14,1	017302	M	25	16,5
015197	F	29	14	019313	F	22	14,5
018595	M	45	16,3	019312	F	23	13,9
014118	M	44	15,9	003740	M	24	16,3
018598	M	27	16,2	019319	F	44	14,6
010401	M	74	17,6	011762	M	45	14,3
011193	M	24	14,9	019320	M	35	14,4
018610	M	36	15,7	007799	M	27	15,1
016473	F	49	13,3	009659	M	49	16,9
000106	M	31	15,2	019321	M	45	15,5
018602	M	30	15,9	019322	M	49	14,4
018603	M	42	14,7	019323	M	39	16,6
018601	M	42	14,8	019325	F	40	15,2
014670	M	35	16,6	018409	F	25	14,4
009981	M	45	16,8	019324	M	26	14,2
018599	M	32	14,1	016311	M	36	15,7
018613	M	35	17,3	017410	F	38	14,5
018614	M	34	18,2	006548	M	44	15,9
015488	M	54	14,7	008739	M	38	15,9
011508	M	42	14,3	012769	M	29	16,8
018612	M	33	17,6	015445	M	32	15
100653	M	58	14,6	019328	M	64	15,9
018604	M	40	14,5	019314	F	24	13,2
000774	M	24	15	019315	M	26	17,4
016474	F	37	14	019318	F	39	13,6
018605	M	36	13,8	006930	M	22	15,8
018607	F	40	13,7	008520	M	26	15,4
017081	M	45	14,9	019317	F	26	13,3
018609	F	41	13,9	004554	M	25	15,6
000781	M	24	16,4	019332	M	38	15,3
017083	M	43	17,5	019339	M	43	15,9
008583	M	46	15,8	010915	M	35	14,1
010619	M	32	16,9	019336	M	32	15,9
017079	M	31	15,5	019340	M	29	15,9
010618	M	48	15,3	017965	M	31	15,3
017698	F	26	13,3	019333	M	30	16,3
017441	F	30	14,2	019338	M	40	16,7
100054	M	24	17,1	019337	M	47	14,4
007836	M	23	15,4	017791	F	43	13
017440	M	34	14,9	018267	F	24	13,7
018617	F	60	13	015526	M	30	16,9
018628	M	37	14,7	014170	M	58	15
009413	M	39	15,7	019277	M	33	16,3
001544	M	23	18,1	019335	F	45	13,1
007841	M	22	17,5	013056	M	34	14,9
006849	M	22	16,2	014977	M	25	17,5
005790	M	37	16,5	019341	M	24	16,2
018629	M	20	14,8	019342	M	31	17,3
018619	M	25	15,5	019334	M	31	15,2
018622	M	38	17,2	011162	M	33	16,5
014714	M	27	16,3	019346	F	22	14,9

014715	M	29	17	019330	F	22	14,1
018626	M	30	18,7	019345	M	35	16,3
018620	M	30	16,5	019343	F	23	14,1
018621	M	24	16,3	011900	F	44	13,1
018618	M	46	17,1	019352	M	31	15,7
018631	M	25	17,5	019354	M	41	15,5
018630	M	24	15,2	019355	M	50	15,6
007974	M	42	17,8	019356	M	42	17
013696	M	35	15,9	019357	M	30	17
018641	M	41	17	019358	M	49	14,4
018632	M	29	15,3	019359	M	28	16,1
018639	M	27	16,3	019360	M	33	15,7
018634	F	22	14,5	017964	M	42	14
004554	M	25	15,1	019361	F	37	14,7
018640	M	38	16,5	019362	F	38	13,8
010713	M	28	15,5	019363	M	35	18,6
012388	M	39	16,8	019364	M	55	15,9
014234	F	31	13,4	019365	M	35	16,7
017086	M	20	13,8	019348	M	21	14,9
018638	F	35	13,5	019350	M	21	16,8
014233	M	46	17,3	100112	M	44	15,5
018637	F	39	13,6	011919	M	37	16,8
005739	M	23	16,4	019367	M	26	16,7
007242	M	22	16,7	019369	F	20	13,7
100371	M	35	15	019370	F	20	14,1
018642	M	30	14,6	011706	M	55	16,1
018643	M	20	15,2	003736	M	23	14
000484	M	38	17,1	007504	M	30	16,7
000259	M	56	14,8	008587	M	22	16,5
001183	M	56	17,1	008588	M	22	15,9
005651	M	36	18,3	019373	M	22	16,7
004259	M	35	18,5	017274	F	24	13,8
002976	M	42	13,1	018087	M	21	13,9
018651	M	45	14,6	019371	F	20	15,7
014119	M	21	17,4	003539	M	39	15,3
018652	M	22	16,3	019366	M	25	16,3
017786	F	22	14,3	019372	M	21	16,9
017789	M	24	15,3	008839	M	38	15,9
005196	M	60	14,1	003641	M	23	15,6
017503	F	27	14,8	100995	M	58	17,1
101727	F	23	13,9	012286	M	37	15,9
018645	M	45	14	007196	M	22	17,4
018644	M	23	13,6	018551	F	44	14,3
016888	M	47	15,8	003320	M	23	16
018453	M	37	16,6	019377	F	23	15,5
005195	M	45	14,4	019374	M	29	16,6
018650	M	24	16,4	019375	M	44	17,2
100382	M	32	15,7	004377	M	44	15,9
018646	M	27	16	012654	F	33	13,4
013279	M	45	15,2	012135	F	32	13,4
013078	F	24	13,6	018469	F	20	13,4
018649	M	47	17,8	001794	M	23	16,4
003794	M	51	15,5	011227	M	24	15,6
014057	F	23	14,7	002163	M	37	15,2
011117	M	44	16,9	013421	F	22	15
018653	M	36	14,6	005459	M	33	17,5

002970	M	36	17,8	017052	M	28	16,9
014570	M	25	14,9	100978	M	39	16,2
018667	F	22	15,7	019378	M	51	15,7
018658	M	41	15,3	019379	M	42	15
000803	M	24	15,5	019380	M	21	16,9
000826	M	24	16,4	019381	M	22	16,1
000827	M	24	15,6	019382	M	29	15,6
008445	M	22	14,8	019383	M	47	16,4
015738	M	36	14,7	019397	M	42	16,1
010488	M	26	15,8	019398	F	19	13,9
100064	M	32	17,1	019400	M	55	16,7
100065	M	27	17	001726	M	23	16,9
018663	M	21	17,4	019388	M	33	16,2
018657	M	28	16,3	019389	M	30	16,6
018659	M	36	14,6	019390	M	56	14,6
018664	M	30	14,7	019391	M	26	15,2
018680	M	31	15	010891	M	30	17,1
018682	M	29	20,3	019395	M	30	16,4
018683	M	33	15,7	019396	M	35	16,4
018684	M	24	18,1	019393	F	31	13,7
018679	M	40	16,4	019394	M	34	16,5
018677	M	31	15,7	019387	M	40	13,5
009195	M	45	14,2	019384	M	34	16,3
018669	M	42	15	019386	M	26	15,8
018670	M	56	14,5	019404	F	51	13,5
018671	M	61	16,8	016384	F	28	15
018672	F	52	15,6	101470	F	27	13,6
018673	M	52	16,2	019403	M	28	15,2
018674	F	37	14,1	010626	M	29	15,7
018675	M	40	15,4	100469	M	49	15,2
018676	M	48	15,4	008876	M	31	17,6
002003	M	23	14,8	011239	M	25	17,5
018678	M	39	15,8	010625	F	40	13,5
018685	M	57	14,5	006191	M	24	15,7
018688	M	40	14,8	019406	M	25	14,7
018690	F	22	13,8	019405	M	20	15,7
018689	M	36	17,2	019409	F	34	14,2
018686	M	27	16,9	019410	M	35	16,1
011401	M	35	16,1	019407	M	44	15,4
007451	M	22	14,8	019408	F	51	14,2
016994	M	41	14,9	011570	M	29	16,6
002879	M	23	16,3	003898	M	23	17,4
018687	M	55	17,8	009377	M	44	15,4
018691	M	39	15,9	100349	M	39	15,9
018692	M	50	17	002608	M	43	18,1
017591	M	38	15	019424	M	46	15,9
004634	M	34	16,7	016111	M	31	16,9
012543	M	32	17,3	019423	M	59	14,7
002324	M	23	14,6	019435	M	25	17,9
008517	M	35	16,1	011743	F	47	13,9
018730	M	50	17,9	019433	M	35	14,9
100389	M	31	14,7	019434	M	29	14,9
018724	M	26	16	019425	F	47	15,9
018734	M	28	17,7	019426	M	39	15,6
018732	M	46	16,5	019428	M	36	16,3
018733	M	50	17,1	019421	M	42	14

018726	M	46	15,7	019412	M	33	16,5
018735	M	33	14,2	019411	M	49	18,8
006317	M	56	15,7	019415	M	38	16,3
015002	M	29	17,4	019413	M	27	15,6
018725	M	25	15,5	019419	M	41	16,4
018729	M	33	16	019422	M	52	14,7
018727	M	43	18,6	001717	M	23	14,7
018749	M	47	17,2	019417	M	52	16,4
009010	M	44	14,7	019420	M	31	15,9
100252	M	51	16,4	019431	M	39	16,5
018746	M	27	15	002674	M	35	16,2
018747	M	54	16,6	019436	M	20	16,4
003111	M	22	16,4	004073	M	31	15,3
018744	M	24	17,3	019437	M	35	15
018748	M	36	15,5	019438	M	21	15,8
018714	M	33	13,9	019431	M	39	16,3
100442	M	61	15,3	019430	M	41	15,8
007263	M	22	18,4	013632	M	37	16,3
015886	M	21	15,6	019446	M	24	15,3
018698	M	20	16	015434	M	21	17,6
012544	M	49	14	101257	M	28	14,8
018694	M	59	15,6	008900	M	21	15,4
018695	F	43	14,1	019445	M	30	18,7
000617	M	34	15,3	019444	M	29	17,7
018710	M	21	16,5	019454	M	28	13
018711	M	45	16,4	019451	M	28	18
018712	M	29	15,1	019453	M	27	16,2
018704	M	37	15	019452	M	21	16,7
018705	M	47	16,5	009846	M	30	14,4
018707	F	59	13,5	019447	M	28	16,6
018703	M	49	16,2	019440	M	25	15,1
017595	F	63	15,5	019448	M	19	15,7
018706	F	40	13,3	019441	M	49	15,4
018476	M	40	15,1	019449	F	21	14,9
018708	M	28	13,7	019442	F	32	14,6
018477	F	28	14	019450	F	30	14,4
018478	M	49	17,3	019443	M	39	16,8
018713	M	40	15,3	100619	M	45	15,6
005336	M	31	15,3	019455	M	54	17,1
007382	M	23	16,2	019456	F	56	14,3
014998	F	35	14,5	019457	M	24	13,8
009810	M	40	16,6	002586	M	31	14,8
003758	M	38	14,8	100613	M	39	16
003759	M	35	16,2	005545	M	53	16,5
007381	M	25	15,4	002442	M	59	15,7
000672	M	35	17,2	017485	F	52	13,3
016528	M	44	15	016093	M	21	14,4
015958	M	25	13,6	012181	M	24	16,7
018753	M	27	17,7	004334	M	46	14,6
013804	M	55	11,5	007900	M	26	16,3
018750	M	60	13,7	010386	M	26	20
017807	F	44	13,7	012762	M	30	16,8
018752	M	24	15,8	012761	M	25	16,8
018751	M	32	16,2	019460	F	22	15,1
012699	F	33	13,7	002021	M	33	17,7
012701	M	45	14,7	019482	M	30	13,9

018754	M	20	17,8	019461	M	23	15,9
018757	M	45	16,4	019463	M	50	16,3
012809	M	41	15,4	100231	M	29	15,5
018755	M	23	16,1	016096	M	21	17,6
018758	F	33	14,9	005140	M	46	16,8
001353	F	37	15,7	004403	M	25	17,1
013897	M	22	16,9	014810	M	35	15,7
003674	M	40	15,9	019480	M	19	15,3
100576	M	44	14,6	019479	F	41	13,7
101681	M	27	16,4	019478	M	20	16,1
100241	M	29	13,9	019477	F	34	16
015190	M	30	13,9	019476	F	48	14,3
018766	M	34	17,8	019467	M	26	16
018769	F	31	16,5	019464	M	32	14,7
101707	M	32	15,1	019462	M	28	16,3
018762	M	20	15,4	009736	M	29	14,7
018761	F	45	14,9	003902	M	38	17,4
015441	M	51	15,6	016382	M	27	16,4
018768	F	39	15	019483	M	34	16,1
018763	M	28	14,3	012081	M	32	17,1
010731	M	36	16,3	013767	M	31	18,6
018760	M	34	13,5	014854	M	38	15,6
014861	M	33	16,1	019475	M	50	19
006808	M	30	14,2	017140	M	20	13,3
018771	M	28	16,7	019290	M	21	15,3
100205	F	38	13	019496	M	20	15,3
101460	M	24	15,7	004235	M	23	16,7
017961	M	22	15	000332	F	25	14
018774	M	30	16,5	019488	M	50	14,1
003966	M	31	17,2	005275	M	24	15,7
018775	M	22	16	007480	M	27	17,2
013458	M	54	14,8	011499	M	35	16,6
012152	M	39	15,5	014206	M	36	16
012057	M	35	15,9	019490	M	20	17,6
013160	M	43	16,7	019491	M	21	15,8
018778	F	33	15,9	018226	M	37	16,4
100116	M	47	16,7	019498	M	40	15,8
009310	M	27	15,3	019497	F	23	15,3
006489	M	22	14	019495	M	28	17
018881	M	60	15,7	019500	F	44	13,5
013947	M	26	13,7	019493	M	46	14,7
014986	M	33	14,9	019492	M	39	15,5
012451	F	43	13	010446	M	25	17
007147	F	50	15,6	101391	F	32	13,3
018777	F	22	14,4	100045	M	54	14,3
000420	M	25	14,7	019507	M	38	16,5
018883	F	31	16,2	019505	M	55	15
018884	M	25	16,9	019506	M	19	15,1
013874	M	28	13,4	019513	M	20	13,5
005275	M	24	15,7	013037	M	30	15,6
018882	M	35	14,5	019458	M	48	16,5
017792	M	20	15	000873	M	52	16,1
008140	M	29	16,5	005104	M	26	15,5
017791	F	43	13	019509	M	43	14,4
018880	M	36	15,7	009124	M	37	16
018779	F	32	13,9	019510	M	42	17,3

018889	M	35	16,1	019511	M	53	15,4
018887	M	37	15,9	019512	M	30	16,1
018888	M	24	18,2	011264	M	43	18,6
018885	M	26	13,9	019508	M	46	15,7
009735	M	45	17,2	003912	M	37	16,4
018893	M	26	17,3	009531	M	29	16,3
018028	M	20	13,6	101261	M	29	16
007700	M	27	18,7	014392	M	29	14,6
017115	M	27	17,6	019486	M	43	13,9
000035	M	61	14,7	010750	M	49	16,2
100366	M	32	14,7	010716	M	42	18,9
018898	M	55	16,5	016328	M	53	16
004334	M	46	17,8	008987	M	50	15,2
018896	M	20	15,7	013183	M	30	17,5
018899	F	58	13,5	002743	M	36	16,4
101744	M	44	16,5	019516	M	20	14,9
015969	M	21	15,2	019517	M	30	16,2
010446	M	25	17	008977	M	46	15,9
018901	M	24	14,9	017283	M	35	13,8
017841	F	48	13,3	016575	M	37	14,6
015372	M	52	17,2	016781	M	21	17,5
018902	F	36	12,9	016782	M	22	14,7
007734	M	22	18,7	019520	M	61	14,1
018911	F	28	17,2	019521	M	40	17,9
018910	M	26	13,2	019522	M	20	17,8
003380	M	23	16,2	019523	F	24	13,1
015257	M	21	16,7	019524	M	48	17,5
018908	M	44	18,2	017655	M	40	15
008865	M	37	15,7	005753	M	51	15,3
101145	M	25	17,9	019529	M	30	17
015028	M	41	14,7	019526	M	26	15,4
008866	M	37	18,8	019531	M	51	14,9
017144	M	50	16,3	017942	M	50	13,8
017146	M	20	18	019530	M	45	14,3
018907	M	43	15,7	019376	M	51	16
018906	M	25	15,7	009503	F	31	14,3
018905	M	32	15,6	017786	F	22	14,3
017617	F	44	13,8	013947	M	26	13,7
018922	M	28	16,9	019529	M	30	17
015228	M	22	14,6	101564	M	52	17,8
018925	M	21	14,8	019514	M	20	14,8
018296	M	46	15,9	019536	F	33	13,4
010138	M	29	16	011977	F	22	14
017271	F	50	14	019535	M	24	17
016275	M	34	14,8	101256	M	43	15
015410	M	55	14,9	018724	M	26	16
018921	M	32	16,4	008462	M	54	13,7
016388	M	44	14,4	008462	M	54	13,7
000246	M	47	14,4	019542	M	32	15
013108	M	41	13,8	019540	M	24	17,2
017939	M	30	15,7	019541	M	27	17,6
013915	M	41	14,6	019539	M	36	17,1
004918	M	41	15,5	019537	M	28	15,8
014692	F	41	14	019502	M	21	17,1
004620	M	43	15,5	003614	M	45	13,7
018914	M	28	16	019538	M	46	18,7

007916	M	25	16,2	019544	M	26	17,3
018915	M	25	16,6	019543	F	29	13,3
000354	M	26	16,9	005365	M	37	16,1
018913	M	31	16,9	006582	M	30	17,3
009543	M	46	16,7	013430	F	26	13,9
012537	M	57	17	019567	M	24	15,2
006013	M	28	16,9	019568	M	21	15,5
018916	M	20	15,5	019565	F	25	13,7
018918	M	53	13,5	019566	F	22	17
018919	F	33	14,3	019562	F	36	14,2
006917	M	22	15,7	019563	F	45	14,4
003271	M	23	15,9	019564	M	56	14,7
012871	F	33	16	015740	F	23	15,3
004451	F	51	16	009618	M	46	17,4
000280	M	33	15,4	011776	M	39	16,2
017250	M	34	14,8	019557	M	53	15,8
011717	M	29	16,6	101707	M	32	15,1
013659	M	40	14,6	019546	F	33	14,4
011762	M	45	14,3	008249	F	51	13,7
014610	M	47	16,6	019560	M	43	17,5
018929	M	28	15,3	019545	F	43	15,4
000278	M	53	18,2	019547	F	29	15,1
018928	M	22	15,4	019559	M	42	16,8
018926	F	52	14,4	015969	M	21	15,2
018934	F	36	14,7	019552	F	28	15,1
018933	M	35	15,1	019549	F	27	13,9
018932	F	22	13,4	009762	M	34	14
004488	M	28	16				