

**MICHELLE MARCONDES MAZZI**

**INVESTIGAÇÃO DA FERTILIDADE DIFERENCIAL  
DAS HETEROZIGOTAS COMO UM EVENTUAL  
MECANISMO HOMEOSTÁTICO DE MANUTENÇÃO  
DO POLIMORFISMO DA HEMOGLOBINA S  
E DA TALASSEMIA BETA**

**CAMPINAS**

**2002**

**MICHELLE MARCONDES MAZZI**

**INVESTIGAÇÃO DA FERTILIDADE DIFERENCIAL  
DAS HETEROZIGOTAS COMO UM EVENTUAL  
MECANISMO HOMEOSTÁTICO DE MANUTENÇÃO  
DO POLIMORFISMO DA HEMOGLOBINA S  
E DA TALASSEMIA BETA**

*Dissertação de Mestrado à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas, para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

**ORIENTADOR – PROF. DR. ANTONIO SÉRGIO RAMALHO**

**CO-ORIENTADOR – PROF. DR. LUÍS ALBERTO MAGNA**

**CAMPINAS**

**2002**

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

M459i      Mazzi, Michelle Marcondes  
Investigação da fertilidade diferencial das heterozigotas como um eventual mecanismo homeostático de manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e talassemia beta / Michelle Marcondes Mazzi. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientadores : Antonio Sérgio Ramalho, Luís Alberto Magna  
Dissertação ( Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Reprodução Humana. 2. Polimorfismo genético. 3. Hemoglobinopatias. 4. Genética de populações. I. Antonio Sérgio Ramalho. II. Luís Alberto Magna. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CM001B0719-4

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TUNICAMP M459i
V	EX
TOMBO BC/	521603
PROC.	16-124/03
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	13-03/02
Nº CPD	

81510 283920

---

## **Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Antonio Sérgio Ramalho**

---

**Co-Orientador: Prof. DR. Luís Alberto Magna**

---

---

### **Membros:**

---

**1. Profa. Dra. Rosa C. Teixeira**

---

**2. Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho**

---

**3. Prof. DR. Roberto Benedito de Paiva e Silva**

---

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 02/12/2002**

---

## ***DEDICATÓRIA***

*À minha mãe, Lucia, por ter me ensinado todos os caminhos que me levaram a crescer. E pela sua dedicação toda especial a todo momento de minha vida.*

*Ao meu pai, Rosário, por ter nos passado sua educação e honestidade. O seguirei como exemplo por toda a minha vida.*

*Ao meu irmão, Neto, a quem me espelho por toda sua garra e determinação na luta por seus ideais. A quem devo gratidão pelo incentivo e conselhos, além do amparo a todo momento.*

*Ao Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho, agradeço a oportunidade, orientação e constante apoio oferecido durante a realização do trabalho.*

*Dedico este trabalho à Profª Drª Rosa Chelminsky  
Teixeira, por todo seu empenho e determinação na  
realização e desenvolvimento de programas  
comunitários, visando o bem estar da população.*

## **AGRADECIMENTOS**

---

À Profª Drª Rosa Chelminsky Teixeira, pela oportunidade, conselhos e incentivo durante toda a minha formação acadêmica e na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Alberto Magna, pelo auxílio na análise estatística e pelo apoio e colaboração.

À Profª Drª Christine Hackel, pelo apoio.

À Profª Drª Ione M. R. Morais, pela colaboração.

À amiga Margareth Pagotti, pela amizade, colaboração, incentivo e apoio durante toda a realização do trabalho.

À minha querida Tia Nilze, pelo apoio, incentivo e especial ajuda.

À Evandra, pela amizade e apoio.

A todos amigos e familiares que acreditaram e colaboraram de alguma forma durante toda a realização do trabalho.

À Profª Drª Miriam de M. O. Levada, pela compreensão e incentivo.

À Secretaria de Saúde de Araras, pela oportunidade na realização deste trabalho.

À Célia Figueiredo de O. Scanavini, pela cooperação.

A todos meu sincero agradecimento pelo incentivo e colaboração.

	<i>PÁG.</i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xiii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xv</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1. A Hemoglobina S e a talassemia beta.....	18
1.2. A manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta: a hipótese da malária.....	24
1.3. Outros mecanismos homeostáticos sugeridos para explicar a manutenção da hemoglobina S e da talassemia beta.....	33
1.4. A fertilidade diferencial como um eventual mecanismo homeostático de manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta.....	37
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	40
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	42
3.1. Casuística.....	43
3.2. Métodos.....	44
3.2.1. Metodologia Laboratorial.....	44
3.2.1.1. Investigação laboratorial do traço falciforme.....	45
3.2.1.1.1. Eletroforese de hemoglobinas em fita de acetato de celulose, pH alcalino.....	45
3.2.1.1.2. Teste de Solubilidade para confirmação da hemoglobina S.....	46
3.2.1.2. Investigação laboratorial do traço talassêmico beta.....	47

3.2.1.2.1. Hematimetria.....	47
3.2.1.2.2. Análise da morfologia das hemácias em esfregaço sangüíneo.....	48
3.2.1.2.3. Quantificação de hemoglobina A <sub>2</sub> , pelo método da eluição após eletroforese de hemoglobinas.....	48
3.2.1.2.4. Dosagem da hemoglobina fetal pelo método da desnaturação alcalina.....	48
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>69</b>

	<i>PÁG.</i>
<b>TABELA I:</b> Comparação da proporção de mulheres com e sem filhos entre as heterozigotas AS e as suas irmãs AA.....	50
<b>TABELA II:</b> Comparação da proporção de mulheres com e sem filhos entre as heterozigotas AT e as suas irmãs AA.....	50

## ***LISTA DE ANEXOS***

---

	<b><i>PÁG.</i></b>
Irmãs AS de propóritas AS.....	70
Irmãs homozigotas AA – Controles (AS).....	72
Irmãs AT de propóritas AT.....	73
Irmãs homozigotas AA – Controles (AT).....	75



***RESUMO***

Os mecanismos homeostáticos de manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta ainda não estão totalmente esclarecidos, admitindo-se a existência de mecanismos complementares ou alternativos, em relação à hipótese de seleção favorável dos heterozigotos pela malária. O aumento de fertilidade das heterozigotas é um dos processos sugeridos, embora só tenha sido testado até o momento em estudos indiretos e/ou realizados em áreas malarígenas, onde é difícil afastar a influência dessa parasitemia sobre o comportamento reprodutivo das heterozigotas.

No presente trabalho, a fertilidade de portadoras do traço falciforme (heterozigotas AS) e do traço talassêmico beta (heterozigotas AT) foi comparada de forma direta à de suas irmãs com hemoglobina normal (homozigotas AA), em região não malarígena (Araras, SP).

Foram estudadas 53 heterozigotas AS e 43 irmãs AA, casadas ou com parceria estável com maridos AA, bem como 68 heterozigotas AT e 45 irmãs AA, igualmente casadas com indivíduos com hemoglobina normal. As heterozigotas e as suas irmãs-controle foram comparadas quanto à idade, pelo teste de Mann-Whitney, sem diferença significativa. O número médio de filhos das heterozigotas AS e AT (3,0755 e 2,7647, respectivamente) não diferiu significativamente do observado nas amostras-controle (3,0000 e 2,3778, respectivamente). Além disso, não foi observada diferença significativa entre heterozigotas e controles, no que diz respeito à proporção de mulheres casadas sem filhos, quando comparadas pelo teste exato de Fisher.

Tais resultados não favoreceram, portanto, a hipótese de o aumento de fertilidade das heterozigotas ser um mecanismo homeostático de manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta.



***ABSTRACT***

Homeostatic mechanisms that maintain hemoglobin S and beta thalasemia are not completely clear so far, being considered the presence of mechanisms either complimentary or alternative concerning the hypothesis of favorable selection of heterozygous by malaria. Increased fertility of heterozygous women is one of the suggested processes, though it has only been tested so far in indirect surveys and/or ones that have been carried out in areas with endemic malaria, which makes it difficult to split apart the influence of this disease over the reproductive behavior of heterozygous women.

In the present work, the fertility of sickle-cell trait women (heterozygous AS) and thalasemic trait (heterozygous AT) was directly compared to the fertility of their sisters carrying normal hemoglobin (homozygous AA). The samples were obtained in a non-endemic malaria area (Araras, SP).

It has been studied 53 AS women and their 43 AA sisters, both either married or sharing a stable relationship with their husband AA, as well as 68 AT women and their 45 AA sisters, also married with normal hemoglobin husbands. The average number of children per heterozygous AS and AT women (3.0755 and 2.7647 respectively) did not differ significantly from those observed among their control sisters (3.0000 and 2.3778 respectively). In addition, it was not observed a significant difference between the proportion of married women without children between the heterozygous women and their control sisters.

The results herein presented hence does not support the hypothesis of increased fertility of heterozygous women as being a homeostatic mechanism able to maintain the polymorphism of either hemoglobin S and beta thalasemia.



## ***1. INTRODUÇÃO***

## 1.1. A HEMOGLOBINA S E A TALASSEMIA BETA

As hemoglobinopatias estão classificadas dentre as alterações genéticas mais freqüentes nas populações humanas, afetando cerca de 250 milhões de pessoas em todo o mundo (Cao et al., 1990). Cerca de 4,5% da população mundial manifesta, portanto, uma hemoglobinopatia. Em decorrência da composição étnica das populações brasileiras, as hemoglobinopatias também são muito freqüentes em nosso país, atingindo algumas delas, como a hemoglobina S, a hemoglobina C e a talassemia beta importância a nível de saúde pública (Ramalho, 2000).

O polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta vem sendo estudado em populações brasileiras pelo orientador da presente tese e seus colaboradores há mais de 25 anos. Como foi referido anteriormente por Duchovni-Silva (1998), a hemoglobina S e a talassemia beta estão incluídas entre os polimorfismos genéticos humanos mais profundamente estudados na literatura dos pontos de vista clínico, bioquímico, molecular e populacional. Ambas afetam a cadeia de globina beta da hemoglobina adulta normal A (Hb A= $\alpha_2\beta_2$ ), cujo gene está localizado no terço distal do braço curto do cromossomo 11 (especificamente em 11p 15.5) (Deisseroth et al., 1976; 1978). Embora causadas por mutações do mesmo gene, elas pertencem a classes distintas de hemoglobinopatias hereditárias, uma vez que a hemoglobina S apresenta uma alteração de estrutura da cadeia de globina beta, enquanto a talassemia beta decorre de uma deficiência de síntese parcial ou total dessa cadeia.

A hemoglobina S foi a primeira hemoglobinopatia estrutural descrita (Pauling et al., 1949), inaugurando uma vasta classe de hemoglobinopatias hereditárias, representadas hoje por mais de 600 hemoglobinas humanas anômalas (Wajcman et al., 1991; Weatherall et al., 1995). Ela difere da hemoglobina adulta normal A por apenas um resíduo aminoácido da posição número seis das cadeias  $\beta$ , apresentando a valina em lugar do ácido glutâmico (Ingram, 1957). Essa única troca aminoácida é a base de toda fisiopatogenia da hemoglobina S, uma vez que ela é diretamente responsável pelo fenômeno de falcização ou falciformação das hemácias. De fato, as moléculas de hemoglobina S, quando desoxigenadas, têm a propriedade de se agregarem, formando

longos polímeros (fibras de hemoglobina S), que deformam a hemácia. Essa, por sua vez, assume a forma que lembra a de uma foice, daí ter recebido o nome da primeira letra da palavra inglesa sickle, que quer dizer foice.

O gene da hemoglobina S apresenta, evidentemente, uma alteração molecular muito simples, ou seja, a mutação do códon  $\beta^6$  de GAG, que codifica o ácido glutâmico, para GTG, que codifica a valina. Conseqüentemente, a identificação de tal gene pela análise direta de DNA também é muito simples, seja pelo uso de enzimas de restrição, como a Mst II, seja pelo emprego de oligonucleotídeos sintéticos alelo-específicos. Apesar disso, como veremos adiante, a expressão do gene da hemoglobina S é influenciada significativamente pelos haplótipos do grupamento gênico  $\beta^S$  e pela ação de proteínas repressoras, como a BP<sub>1</sub>.

Os homozigotos do gene da hemoglobina S (homozigotos SS) manifestam uma anemia hemolítica crônica e incurável, embora tratável, denominada anemia falciforme. Além do processo hemolítico, causado pela destruição de hemácias falcizadas, tais homozigotos manifestam complicações vaso-oclusivas, com isquemia, dor, enfartamento, necrose e fibrose em vários órgãos. Ossos e articulações, baço, rins, pulmões e coração apresentam-se quase que invariavelmente comprometidos na anemia falciforme. Trata-se, portanto, de uma doença crônica que evolui por crises, que podem ser hemolíticas, dolorosas, aplásticas e de seqüestramento de hemácias falcizadas em órgãos, como o baço e o fígado (Serjeant, 1974; 1985; Ramalho, 1986; Embury et al., 1995). O diagnóstico e o tratamento precoce (sobretudo a administração profilática de penicilina entre os seis meses e os cinco anos de idade) aumentam a sobrevivência dos pacientes, diminuindo a mortalidade infantil por doenças infecciosas, sobretudo as septicemias fulminantes por pneumococos e outras bactérias encapsuladas. Apesar disso, cerca de 20% das crianças brasileiras com a anemia falciforme ainda falecem antes dos cinco anos de idade (Araújo et al., 1993). Já nos E.U.A. e na Europa, a esperança média de vida desses pacientes é de cerca de quarenta anos, existindo casos bem documentados de grande longevidade (Ramalho, 1986).

São conhecidos atualmente, entretanto, vários “fatores modificadores” do quadro clínico da anemia falciforme, tanto de origem ambiental (cuidados médicos, tipo de alimentação, clima) quanto de origem genética (concomitância com a talassemia alfa,

haplótipos de DNA). Assim, por exemplo, as características polimórficas do DNA adjacente ao gene da hemoglobina S podem variar de um indivíduo para outro, caracterizando vários haplótipos específicos. Dessa forma, enquanto o haplótipo Bantu ou CAR, freqüente na África Central, está associado a uma forma clínica grave de anemia falciforme, os haplótipos Benin e Senegal estão associados, respectivamente, às formas clínicas moderada e leve da doença. Estudos moleculares realizados no Brasil mostram, por exemplo, que o haplótipo Bantu é mais freqüente no Estado de São Paulo, enquanto o haplótipo Benin é mais encontrado entre doentes falciformes da Bahia (Costa et al., 1992; Zago et al., 1992). Essas diferenças regionais traduzem diferentes padrões de tráfico de escravos. Já o haplótipo Senegal, raro no Brasil, é freqüente nos EUA e no Caribe (Zago et al., 1992).

Os polimorfismos do DNA do grupamento (“cluster”) do gene  $\beta^S$ , próximos dos genes de cadeias  $\gamma$  (Hb F= $\alpha_2\gamma_2$ ), regulam a síntese de hemoglobina fetal, a razão de hemoglobina S para a hemoglobina fetal nas hemácias falcizadas e a taxa de decréscimo de hemoglobina fetal durante o início da infância. Uma vez que a hemoglobina fetal interfere na polimerização da hemoglobina S, sendo um dos mais potentes inibidores da falcização das hemácias, a modulação de gravidade da anemia falciforme exercida pelos haplótipos de DNA baseia-se, em grande parte, nos níveis de hemoglobina fetal. De fato, enquanto nos pacientes falciformes adultos com o haplótipo Bantu são encontrados níveis de hemoglobina fetal abaixo de 5%, naqueles com haplótipo Benin tais níveis oscilam entre 5% e 15% e nos com o haplótipo Senegal eles superam a taxa de 15% (Powars et al., 1990; Powars, 1991). Verificou-se, também, que a ligação da proteína repressora BP<sub>1</sub>, capaz de reprimir a expressão do gene  $\beta^S$ , é variável nos vários haplótipos de DNA, sendo decrescente entre os haplótipos Senegal, Benin e Bantu (Elion et al., 1992). Assim, por exemplo, os pacientes falciformes com a composição haplotípica Bantu/Bantu, que são os mais comuns no Estado de São Paulo, além de apresentarem baixos níveis de hemoglobina fetal, ainda apresentam pequena ligação com a proteína repressora BP<sub>1</sub> e, portanto, alta concentração intracelular de hemoglobina S, do que resulta uma expressão clínica de máxima gravidade.

Os heterozigotos do gene da hemoglobina S, portadores do traço falciforme ou siclêmico (heterozigotos AS) possuem um percentual de hemoglobina anômala que varia de 22% a 45% da hemoglobina total. As suas hemácias apresentam a capacidade de se tornarem falciformes, embora, para tanto, devam ser submetidas a menores tensões de oxigênio do que as hemácias dos pacientes homozigotos, que possuem maior potencial de falcização (Ramalho, 1986).

A real morbidade do traço falciforme é um assunto bastante controvertido. Segundo alguns autores, as complicações clínicas nos heterozigotos AS são muito raras, enquanto que, para outros, elas são relativamente freqüentes, conferindo ao traço falciforme uma significativa importância clínica. Analisando a literatura especializada, no entanto, é possível separar as alterações mórbidas dos heterozigotos AS em dois grandes grupos. No primeiro deles podem ser reunidos os casos de complicações agudas, muitas vezes fatais, geralmente associadas à exposição a fatores predisponentes da produção de hemácias falciformes. Nesse grupo estão incluídas, por exemplo, as complicações ocorridas por anestesia geral, mudança brusca de altitude, vôo em avião não pressurizado, esforço físico excessivo, insuficiência respiratória, infecção grave, acidose, desidratação, etc. No segundo grupo podem ser reunidas as manifestações mais insidiosas, de evolução crônica, que geralmente não se mostram associadas a fatores precipitantes detectáveis, embora muitas vezes possam representar meras complicações das lesões agudas mencionadas no grupo anterior. Dentro desse grupo merecem destaque as alterações renais (sobretudo hematúria), ósteo-articulares, dermatológicas e neurológicas (Ramalho, 1979).

A opinião mais comum, no entanto, é a de que essas complicações ocorram muito raramente, pois o baixo potencial de falcização das hemácias dos heterozigotos AS exige fatores desencadeantes (hipóxia, acidose, desidratação) muito intensos. Assim, por exemplo, estudos de avaliação da morbidade do traço falciforme realizados na UNICAMP não constataram uma associação estatisticamente significativa entre essa condição clínica e as dores ósteo-articulares (Gonçales e Ramalho, 1985), as úlceras de membros inferiores (Ramalho et al., 1985), a hematúria (Gonçalves et al., 1989) e a úlcera duodenal (Nomura et al., 1992).

Embora a hemoglobina S tenha uma ampla distribuição geográfica, ela atinge frequências particularmente altas em populações africanas. Índices falcêmicos de até 40% foram observados em tribos da Uganda, na Tanzânia e em Moçambique. Na Guiné, na Nigéria, no Congo, em Serra Leoa, em Gana e em Angola, foram encontrados índices falcêmicos entre 20% e 30%, enquanto no Senegal, na Libéria, em Gâmbia e no Sul do Sudão foram observados índices mais baixos, variando entre 10% e 20% (Cezar et al., 1974; Serjeant, 1974; 1985).

Nas populações negróide do continente americano, também foram encontrados índices falcêmicos relativamente altos, embora geralmente inferiores aos observados nas populações africanas. Na revisão realizada por Ramalho (1986), por exemplo, foram registrados em negróides brasileiros valores entre cerca de 6% a 10%, valores esses que não diferem muito dos encontrados na população negróide norte americana, bem como na da Colômbia, da Venezuela, do México, de Cuba e de outros países americanos (Serjeant, 1974; 1985; Embury et al., 1994; Weatherall et al., 1995).

A frequência do traço falciforme pode ser estimada em 6,6% nas populações negróides do Sul e Sudeste brasileiros (Ramalho e Beiguelman, 1977; Salzano, 1979), o que permite estimar a frequência de nascimento de homocigotos SS em, aproximadamente, 0,1% nessas populações. Pode-se dizer, portanto, que a anemia falciforme é um problema de Saúde Pública entre nós, sendo a doença hereditária monogênica mais freqüente no Brasil (Ramalho, 1986).

Apesar de a hemoglobina S ser mais comum em negróides, ela não é exclusiva desse grupo racial, sendo encontrada também em altas frequências em populações não negróides da região do Mediterrâneo, da Índia e da Ásia Menor. No Brasil, frequências apreciáveis dessa hemoglobinopatia também são encontradas em algumas populações caucasóides que receberam, pela miscigenação, fluxo gênico negróide importante (Ramalho, 1986).

Ao contrário do que ocorre com a hemoglobina S, a talassemia beta possui bases moleculares extremamente heterogêneas, podendo ser causada por mais de 600 tipos de mutações (Weatherall et al., 1995). Tais mutações determinam uma depressão parcial

(mutações  $\beta^+$ ) ou total (mutações  $\beta^0$ ) da síntese da cadeia beta da hemoglobina A. Essa deficiência de síntese, por sua vez, pode ser determinada por vários tipos de alterações moleculares, as quais, em resumo, afetam a transcrição, a maturação, a liberação, a estabilidade ou a tradução do RNA mensageiro. Assim, entre as mutações talassêmicas, podem ser encontradas as dos tipos “nonsense”, “frameshift”, as que afetam o “splicing”, a região promotora, a cauda de poli-A, etc. (Gelehrter e Collins, 1990; Weatherall et al., 1995). No Brasil, entretanto, quatro tipos de mutações perfazem 97% dos casos de talassemia beta heterozigótica, ou seja, a  $\beta^{0\ 39}$  (64%), a  $\beta^{+ \text{IVS1-110}}$  (20%), a  $\beta^{+ \text{IVS1-6}}$  (7%) e a  $\beta^{0 \text{IVS1-1}}$  (6%) (Martins et al., 1993). Infelizmente, dentre elas, apenas a  $\beta^{+ \text{IVS1-6}}$  pode ser considerada uma mutação “benigna”, causando uma forma mais leve de talassemia.

Os homozigotos da talassemia beta (homozigotos TT) geralmente apresentam uma anemia hemolítica intensa, dependente de transfusões sucessivas, denominada talassemia major, talassemia maior ou anemia de Cooley. No entanto, os homozigotos de mutações  $\beta^+$  “benignas” podem apresentar uma anemia hemolítica moderada, não dependente de transfusões sanguíneas, denominada talassemia intermédia ou intermediária. Além da hemólise crônica, os talassêmicos homozigotos também manifestam esplenomegalia, hepatomegalia, alterações ósseas, tendência a sangramento, etc. Até há pouco tempo, os pacientes com as formas graves de talassemia beta homozigótica geralmente faleciam na infância. Com a introdução da terapia por hipertransfusão de papa de hemácias lavadas, acompanhada de quelação contínua do ferro pela desferroxamina, a sobrevivência e a qualidade de vida desses pacientes melhorou bastante (Ramalho, 1986).

Já os heterozigotos do gene da talassemia beta (heterozigotos AT), que manifestam o traço talassêmico beta, talassemia minor, ou talassemia menor, são indivíduos assintomáticos ou oligossintomáticos, que podem manifestar, em alguns períodos de suas vidas, uma anemia hipocrômica e microcítica leve ou moderada (Ramalho et al., 1985).

Embora a talassemia beta tenha uma distribuição geográfica praticamente universal, ela atinge as suas maiores frequências nos países que circulam o Mar Mediterrâneo (“talassa”, em grego, significa mar). Assim, taxas de heterozigotos superiores

a 20% foram descritas em algumas regiões da Itália, da Grécia e de Chipre (Silvestroni e Bianco, 1975; Weatherall et al., 1995).

Os heterozigotos do gene da talassemia beta são freqüentes no Sul e no Sudeste do Brasil, em decorrência da maciça imigração de origem italiana e de outros povos do Mediterrâneo para essas regiões. Estudos realizados em populações de grandes centros urbanos, como Campinas, SP (Ramalho, 1976, 1979), Ribeirão Preto, SP (Zago, 1981; Zago et al., 1981; Zago e Costa, 1985) e Porto Alegre, RS (Freitas e Rocha, 1983) constataram prevalências dessa alteração em torno de 1% dos caucasóides. A freqüência da talassemia beta deve atingir, no entanto, valores ainda mais expressivos naquelas comunidades brasileiras de origem italiana que, por razões diversas, permaneceram mais refratárias à miscigenação. De fato, investigações realizadas entre paulistas descendentes não miscigenados de italianos encontraram prevalências de talassemia beta heterozigótica em torno de 6,5% (Ramalho, 1976; 1979; Zago et al., 1981; Ramalho et al., 1983).

Concluindo este item, é interessante ressaltar que a hemoglobina S e a talassemia beta coexistem em alta freqüência em algumas regiões do Brasil, como é o caso, por exemplo, do Estado de São Paulo. Tendo em vista a alta taxa de miscigenação entre caucasóides e negróides observada em nosso meio, não é raro o aparecimento de pacientes com a interação das duas anomalias genéticas, os quais manifestam uma anemia hemolítica crônica denominada S/ $\beta$  talassemia ou microdrepanocitose (Ramalho, 1986).

## **1.2. A MANUTENÇÃO DO POLIMORFISMO DA HEMOGLOBINA S E DA TALASSEMIA BETA: A HIPÓTESE DA MALÁRIA**

Um aspecto que sempre despertou o interesse dos geneticistas foi o de algumas hemoglobinopatias, como é o caso da hemoglobina S e da talassemia beta, atingirem freqüências extremamente elevadas em certas populações, a despeito do alto coeficiente seletivo dos genes que as determinam. De fato, “salta à vista que a taxa de mutações ou de casamentos preferenciais seria incapaz de contrabalançar a eliminação dos genes dessas hemoglobinopatias, feita pela seleção praticamente total dos homozigotos antes da idade

reprodutiva, que ocorria na maioria das populações, pelo menos até há bem pouco tempo” (Beiguelman, 1981; Ramalho, 1986). Em outras palavras, a gravidade da anemia falciforme e da talassemia maior torna difícil explicar a manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta por mutações recorrentes, em determinadas populações. Assim sendo, é forçoso pensar em outros mecanismos homeostáticos mantendo o polimorfismo dessas hemoglobinopatias.

A teoria da maior resistência dos portadores do traço falciforme e do traço talassêmico beta frente à malária causada pelo *Plasmodium falciparum* é o exemplo clássico de mecanismo homeostático de manutenção de polimorfismo genéticos humanos por seleção favorável dos heterozigotos.

O aparecimento da malária endêmica causada pelo *Plasmodium falciparum* foi um desastre ecológico que provavelmente matou mais pessoas do que qualquer outra doença. Tal endemia é atribuída à mudança de hábitos das populações de áreas tropicais e sub-tropicais, que passaram da vida nômade de caçadores para a vida sedentária de agricultores. De fato, a destruição das florestas, a criação de povoados com cabanas cobertas por folhas e o estabelecimento de condições propícias à estagnação da água e à reprodução do *Anopheles gambiae*, principal mosquito vetor do *Plasmodium falciparum*, foram fatores fundamentais para o aparecimento da malária endêmica em áreas tropicais e sub-tropicais. Na África, esse desastre ecológico teve início há cerca de 2.000 anos, embora provavelmente ele seja mais antigo em algumas regiões da Europa e da Ásia (Eaton, 1994). Estimativas técnicas situam a mortalidade pela malária causada pelo *Plasmodium falciparum* em torno de 20% nessas populações africanas (Livingstone, 1971), o que ressalta a importância dessa força seletiva em relação às condições genéticas benignas (traço falciforme, traço talassêmico beta, deficiência de G-6PD) que eventualmente conferissem aos seus portadores alguma resistência adicional contra o *Plasmodium falciparum*.

Haldane (1949), verificando a semelhança das distribuições geográficas da talassemia beta e da malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, sugeriu a hipótese de que os heterozigotos da talassemia beta teriam vantagem seletiva em relação aos normais, no que diz respeito a esse tipo de malária. Assim sendo, os indivíduos com a talassemia

beta homozigótica morreriam antes da idade reprodutiva em virtude da própria doença, enquanto os homozigotos normais seriam mais eliminados pela malária do que os heterozigotos, cuja frequência então aumentaria nas populações.

O mesmo raciocínio de Haldane em relação à malária e à talassemia beta foi empregado para explicar o polimorfismo da hemoglobina S na África (Allison, 1954 a, b). Além disso, a existência de associação entre a malária e a deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6PD) foi sugerida por Motulsky (1960). De fato, observa-se, de modo geral, correlação geográfica evidente entre a distribuição da malária causada pelo *Plasmodium falciparum* e a distribuição desses três caracteres genéticos, ou seja, da talassemia beta, da hemoglobina S e da deficiência de G-6PD.

Na Grécia, no entanto, observou-se correlação negativa entre os traços falciforme e talassêmico (Barnicot et al., 1963), ou seja, nos locais em que a talassemia beta era mais frequente, a prevalência do traço falciforme era menor. Uma correlação negativa similar foi observada na Tailândia entre a talassemia beta e os heterozigotos da hemoglobina E (Lie-Injo, 1969). Por outro lado, uma correlação positiva foi observada na Sardenha entre a talassemia beta e a deficiência de G-6PD (Sinicalco et al., 1961), o mesmo ocorrendo entre a deficiência de G-6PD e o traço falciforme em várias populações (Motulsky, 1964).

A correlação negativa entre a talassemia beta e as hemoglobinopatias estruturais de cadeia  $\beta$ , tais como a hemoglobina S e a hemoglobina E, pode ser interpretada como decorrente de um efeito deletério condicionado pela interação dos dois genes detrimentais no mesmo indivíduo, ao passo que a interação de cada um desses genes com o da deficiência de G-6PD, em um mesmo indivíduo, não causa danos maiores.

A hipótese de Haldane a respeito da talassemia beta foi testada em várias populações, recebendo evidências favoráveis em algumas e desfavoráveis em outras. Assim, por exemplo, Carcassi e colaboradores (1957) constataram maior prevalência de talassemia beta nas zonas pantanosas baixas da Sardenha do que nas regiões montanhosas, onde, obviamente, havia menor incidência da malária. A mesma distribuição foi observada por Curtain e colaboradores (1962) nas ilhas da Oceania. Já na Grécia (Choremis et al.,

1963; Fraser et al., 1964; Fessas et al., 1966), em Chipre (Plato et al., 1964) e na Tailândia (Lie-Injo, 1969), as relações observadas entre a malária e a talassemia beta não se mostraram muito evidentes.

Na ilha de Chipre, Plato e colaboradores (1964), embora tenham encontrado uma frequência bem maior de deficiência de G-6PD nas zonas de malária endêmica do litoral do que nas zonas montanhosas do interior, não observaram, em relação à talassemia, diferença significativa entre as suas frequências no litoral e nas regiões altas. Para explicar esse fato, os autores sugeriram a hipótese de que o gene da talassemia beta, presente há mais tempo na ilha, deveria ser, inicialmente, muito freqüente nas populações do litoral. Com a invasão da ilha por conquistadores, que trouxeram o gene da deficiência de G-6PD, essas populações litorâneas primitivas refugiaram-se, em grande parte, nas regiões montanhosas da ilha, levando consigo o gene da talassemia. Os genes da talassemia beta que permaneceram nas populações do litoral, bem como os genes da deficiência de G-6PD, sofreram seleção positiva pela malária nessa região de Chipre. Isso explicaria a frequência praticamente igual da talassemia no litoral e nas regiões montanhosas da ilha. Por outro lado, a presença da hemoglobina S na maioria das áreas com malária endêmica da Grécia, do mesmo modo que a presença da hemoglobina E na Tailândia, poderiam ser responsáveis, pelo menos em parte, pela correlação menos evidente entre a malária e a talassemia nesses países.

Como comenta Ramalho (1986), “sendo a distribuição geográfica da talassemia beta correspondente àquela da malária causada pelo *Plasmodium falciparum* e sendo as regiões de maior prevalência de talassemia, geralmente, zonas hiperendêmicas de malária no passado, parece plausível aceitar que o traço talassêmico beta confira, realmente, certa proteção contra a malária. Reforça essa idéia o fato de não poder ser afastada a possibilidade de interferência de outros fatores (hemoglobina S, hemoglobina E, fluxos migratórios) nas áreas onde as relações entre a malária e a talassemia não se mostram muito evidentes”. De fato, na ampla revisão bibliográfica realizada por Weatherall e Clegg (1981), a coincidência da distribuição geográfica da talassemia beta e de áreas hiperendêmicas de malária no passado é demonstrada em vários estudos.

Apesar dessas evidências geográficas, os mecanismos de proteção dos talassêmicos beta heterozigotos contra o *Plasmodium falciparum* ainda não estão esclarecidos (Lehmann, 1982; Nagel e Roth, 1989; Lisa et al., 1994). Realmente, a suposição de que o mecanismo protetor contra a malária decorra da presença de microcitose, hipocromia, anisocitose e poiquilocitose nos talassêmicos heterozigotos não passa de simples especulação teórica, sem qualquer evidência experimental. Friedman (1979), Pasvol e Wilson (1982) e Roth e colaboradores (1983) constataram, *in vitro*, um desenvolvimento normal do *Plasmodium falciparum* em hemácias de heterozigotos da talassemia beta.

Na revisão bibliográfica de Nagel e Roth (1989), as seguintes teorias são sugeridas para explicar a maior resistência dos talassêmicos heterozigotos frente à malária: a) deficiência intra-eritrocitária de ferro; b) interação com deficiências nutricionais; c) aumento da suscetibilidade ao estresse oxidante; d) aumento da vulnerabilidade à fagocitose do parasita; e) aumento dos níveis de hemoglobina fetal na infância; f) baixa atividade da oxidase de fosfato de piridoxina e g) baixa concentração de hemoglobina intra-celular. Todas elas são, no entanto, hipóteses teóricas, sem qualquer comprovação experimental convincente.

Mesmo do ponto de vista da coincidência da distribuição geográfica da talassemia beta e da malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, outros aspectos devem ser considerados. Segundo Lisa e colaboradores (1994), a teoria de Haldane seria plenamente confirmada se fosse constatada uma correlação positiva direta entre a frequência de heterozigotos da talassemia beta e os níveis de incidência e mortalidade da malária. Esse, no entanto, não é o caso das povoações da Sardenha, nas quais a correlação entre os graus de morbidade da malária e a frequência de heterozigotos da talassemia é fraca. Essa observação levou à hipótese de que a malária não seria o fator seletivo de uma mutação talassêmica autóctone na Sardenha, mas o fator de manutenção de uma mutação introduzida por fluxo gênico externo, durante as conquistas fenícias e cartaginesas. De fato, os estudos de Genética Molecular demonstraram que as mutações de talassemia beta mais frequentes na Sardenha são as mesmas encontradas em outras colônias fenícias e cartaginesas. A malária possivelmente foi introduzida na Sardenha no mesmo período das

invasões, como resultado das mudanças ecológicas provocadas pelas extensas plantações de trigo introduzidas pelos cartagineses. No decorrer do tempo, muitos fatores modificadores, tanto de ordem ecológica quanto cultural, poderiam ter afetado intermitentemente a incidência de malária nas diversas povoações. Entretanto, essas flutuações não teriam sido suficientes para modificar a condição de equilíbrio do polimorfismo da talassemia beta.

Do exposto, parece claro que as relações entre a talassemia beta e a malária são extremamente complexas. De fato, quando Haldane elaborou a sua hipótese, ele nunca poderia imaginar que a talassemia beta fosse uma entidade extremamente heterogênea, causada por mais de seiscentos tipos de mutações. Já as relações entre hemoglobina S e a malária são um pouco mais claras e, atualmente, baseadas em mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares de resistência ao parasita comprovados experimentalmente. Mesmo assim, podemos adiantar desde já, a mortalidade pela malária também é insuficiente para, por si só, explicar as altas frequências da hemoglobina S observadas em áreas endêmicas do *Plasmodium falciparum* (Eaton, 1994).

Quando Allison (1954) utilizou a hipótese de Haldane para explicar a manutenção do polimorfismo da hemoglobina S na África, ele baseou-se em quatro considerações principais:

- 1- Uma vez que os homozigotos do gene da hemoglobina S praticamente não se reproduziam, a manutenção das altas frequências do gene da hemoglobina S exigiria, na falta de algum mecanismo homeostático de manutenção do polimorfismo, taxas de mutação inaceitavelmente altas;
- 2- A frequência do gene da hemoglobina S tendia a ser maior nas áreas de malária endêmica;
- 3- A parasitemia em crianças com o traço falciforme era significativamente menor que a observada em crianças com o genótipo AA;
- 4- Em experimentos de inoculação do *Plasmodium falciparum* em indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária, ele observou que apenas 2 em 15 heterozigotos AS desenvolviam a doença, contra 14 em 15 indivíduos com o genótipo AA.

Além disso, Raper (1959) demonstrou que o grau de parasitemia era inversamente proporcional ao conteúdo de hemoglobina S nas hemácias. Outras evidências a favor da hipótese de Allison foram obtidas nos trabalhos de Vandepitte e Delaisse (1957) e de Motulsky (1964).

Esses fatos contribuíram para que a hipótese de Allison ganhasse grande popularidade, passando a ser empregada como exemplo clássico de manutenção de polimorfismo por seleção a favor dos heterozigotos. Apesar disso, tal hipótese também deu início a uma considerável controvérsia. Dois outros estudos não comprovaram diferenças de parasitemia entre falcêmicos e não falcêmicos (Moore et al., 1954; Archibald e Bruce-Chwatt, 1955). Da mesma forma, Beutler e colaboradores (1955) não conseguiram comprovar os resultados dos experimentos de inoculação realizados por Allison (1954). O próprio Raper (1956) levantou dúvidas sobre os resultados do trabalho de Allison (1954), supondo a existência de um viés. Isso porque, como comenta Pinto Jr.(1978), aquele autor não encontrou incidência menor de malária entre indivíduos com o traço falciforme, ao analisar uma amostra populacional cerca de oito vezes maior que a estudada por Allison. Da mesma forma, Ringelham e colaboradores (1976), estudando uma casuística de crianças de uma área endêmica de malária de Gana, encontraram uma taxa de infestação maior entre portadores do traço falciforme.

Após vários estudos com resultados conflitantes é que se percebeu a necessidade de se colocar em jogo uma terceira variável: a imunidade adquirida contra o *Plasmodium falciparum*, a qual poderia confundir-se com o efeito protetor do traço falciforme sobre a malária. Assim, como comenta Serjeant (1985), o efeito protetor do traço falciforme é mais evidente em situações de baixa imunidade, como é o caso, por exemplo, do período crítico da infância situado entre a perda da imunidade obtida passivamente através da mãe e o desenvolvimento da imunidade ativa. Esse período crítico situa-se entre os 6 meses e os 3 anos de idade, aproximadamente.

Estudando o sangue de crianças infestadas naturalmente pelo *Plasmodium falciparum*, Luzzatto e colaboradores (1970) observaram que a falcização de hemácias AS parasitadas era duas a oito vezes mais rápida que a dos eritrócitos não parasitados da mesma amostra sangüínea. Roth e colaboradores (1978) constataram resultados

semelhantes em estudos de falcização realizados em hemácias humanas contaminadas *in vitro*. Isso indica, evidentemente, que a falcização preferencial tem um papel importante na proteção conferida pela hemoglobina S contra a malária, o que poderia ser explicado por algum efeito tóxico da hemoglobina S polimerizada sobre o parasita, ou, mais provavelmente, pela destruição das hemácias falcizadas e parasitadas pelo sistema retículo-endotelial do baço e outros órgãos. Além disso, na malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, as hemácias falcizadas e parasitadas também são seqüestradas no baço e expostas a baixas tensões de oxigênio, com perda do íon  $K^+$  e queda de pH, que são fatores que impedem a reprodução do parasita (Freidman, 1978; Friedman et al., 1979). Pasvol e colaboradores (1978) também sugeriram que a invasão de hemácias AS por merozoítas do *Plasmodium falciparum* poderiam ser prejudicada em condição de baixa oxigenação.

Alguns autores supõem que o consumo de oxigênio pelo parasita causa a falcização da hemácia e a sua conseqüente fagocitose pelo sistema retículo-endotelial, quebrando o ciclo da malária (Luzzatto et al., 1970). É estranho, no entanto, que esse mecanismo protetor limite-se ao *Plasmodium falciparum*, uma vez que a proteção contra o *Plasmodium malariae*, o *Plasmodium vivax* e outros nunca foi demonstrada de forma convincente (Power, 1975).

Verificou-se, por outro lado, que a hemoglobina S pode interferir na formação de algumas excrescências externas ou “knobs” nas células parasitadas, as quais permitem que as formas maduras fiquem aderidas ao endotélio vascular, protegidas do reconhecimento e da destruição pelo sistema retículo-endotelial. Assim sendo, a falcização poderia favorecer o deslocamento das hemácias parasitadas do endotélio vascular, predispondo-as à destruição pelo sistema retículo-endotelial do baço e outros órgãos (Udeinya et al., 1981).

O mecanismo de destruição dos parasitas no interior das células falcêmicas, na verdade, ainda não está completamente elucidado (Nagel e Roth, 1989; Eaton, 1994). A baixa concentração de íons  $K^+$  proposta por Friedman (1978) tem algumas evidências experimentais, já que os seus efeitos deletérios sobre o crescimento do parasita são parcialmente revertidos quando se adiciona potássio ao meio de cultura (Friedman et al., 1979). Outras investigações demonstraram também que a perda de água pela hemácia

falcizada, a formação do polímero de hemoglobina S, que interfere diretamente sobre algumas funções críticas do parasita e que representa um substrato pobre para as proteases produzidas pelo *Plasmodium falciparum*, além da presença de hemoglobina fetal (Hb F), adversa ao parasita, são mecanismos importantes na resistência conferida aos falcêmicos contra a malária (Nagel e Roth, 1989). Quanto à presença da hemoglobina F, convém lembrar, no entanto, que ela se limita, nos adultos, às hemácias dos homozigotos, já que os seus níveis não estão aumentados nos adultos heterozigotos, portadores do traço falciforme. Assim sendo, os efeitos adversos dessa hemoglobina sobre o *Plasmodium falciparum* estariam condicionados à persistência de níveis significativos de hemoglobina fetal por mais tempo nas crianças heterozigotas com o traço falciforme do que nas crianças normais, nas quais ela costuma desaparecer antes dos seis meses de idade (Nagel e Roth, 1989).

É importante ressaltar, porém, que as condições de realização dos estudos *in vitro* podem interferir significativamente nos resultados obtidos. Os agentes utilizados para induzir a falcização *in vitro* e os nutrientes presentes no meio de cultura podem ser relevantes. Normalmente, o *Plasmodium falciparum* adquire seus nutrientes pela digestão da hemoglobina. Quando *in vitro*, ele também os obtém do meio de cultura. Assim, por exemplo, Brockelman e colaboradores (1987) demonstraram que a utilização de meios de cultura ricos ou pobres em aminoácidos, biotina, ácido paraminobenzóico e cobalamina podem levar a resultados diferentes, sobretudo quando as hemácias em estudo possuem baixo conteúdo de hemoglobina. Por outro lado, a falcização de hemácias AS induzida *in vitro* geralmente é muito mais intensa do que a que ocorre em condições fisiológicas.

Na opinião de Eaton (1994), apesar de décadas de estudos epidemiológicos e especulações, o mecanismo de seleção favorável do gene da hemoglobina S ainda é desconhecido. Como já comentamos anteriormente, esse autor ressalta o fato de a mortalidade pela malária ser insuficiente para, por si só, explicar as altas frequências de hemoglobina S observadas em áreas endêmicas do *Plasmodium falciparum*.

De acordo com Flint e colaboradores (1993), dois aspectos parecem enfraquecer a hipótese da malária: em primeiro lugar, a malária e as hemoglobinopatias não são coincidentes em algumas regiões e, em segundo lugar, a hipótese da malária não explica facilmente por que nem sempre as áreas malarígenas do mundo possuem a mesma

hemoglobinopatia ou a mesma associação de hemoglobinopatias. Ainda segundo esses autores, a hipótese da malária deve ser sempre considerada em combinação com outros fatores.

### **1.3. OUTROS MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS SUGERIDOS PARA EXPLICAR A MANUTENÇÃO DO POLIMORFISMO DA HEMOGLOBINA S E DA TALASSEMIA BETA.**

A existência de outros mecanismos homeostáticos muito potentes, além da malária, mantendo o polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta em várias populações é suposta há muito tempo. O próprio Haldane (1949), ao apresentar a sua hipótese clássica da malária, também sugeriu que os heterozigotos da talassemia beta poderiam estar protegidos contra os períodos de diminuição intensa dos depósitos de ferro corporal, hipótese essa já afastada (Bannerman, 1961). Sugeriu-se também que os níveis relativamente baixos de colesterol sérico e da lipoproteína  $\beta$  dos talassêmicos heterozigotos poderiam constituir uma vantagem seletiva importante, ainda que após a idade reprodutiva (Weatherall, 1967).

Tendo em vista que a distribuição geográfica do gene da hemoglobina S na África e na Índia não coincide apenas com a de áreas malarígenas, mas, também, com a de antigas zonas hiperendêmicas de lepra, Cezar e colaboradores (1974) julgaram interessante investigar no Brasil se os portadores do traço falciforme não teriam alguma vantagem seletiva frente ao *Mycobacterium leprae*. Esse estudo obteve os mesmos resultados negativos observados anteriormente por Lewis e Chaudhury (1969) em Gana, ou seja, a constatação de que a frequência de portadores heterozigotos da hemoglobina S não diferia significativamente entre hansenianos e indivíduos-controle. Do mesmo modo, resultados negativos similares foram obtidos por Ramalho e colaboradores (1983), ao analisar as relações entre a talassemia beta e a hanseníase no Estado de São Paulo.

Já as relações entre a hemoglobina S e a tuberculose pulmonar vêm sendo investigadas desde a década de 50, com resultados sempre controvertidos. Assim, a existência de uma associação entre a forma heterozigótica da hemoglobina S e a

tuberculose pulmonar foi observada por alguns autores (Weiss e Stecher, 1952; Ramalho e Beiguelman, 1977) e não por outros (Rosenblum et al., 1955; Ryan et al., 1960).

Pinto Jr. (1978), voltando a analisar o problema entre pacientes com tuberculose pulmonar, não encontrou frequências do traço falciforme que diferissem significativamente daquelas usualmente encontradas em negróides do Sul e Sudeste Brasileiros. Da mesma forma que havia sido observado anteriormente por Weiss e Stecher (1952), esse autor também constatou uma maior tendência à forma exsudativa da tuberculose pulmonar entre os pacientes com o traço falciforme, além de observar que o hilo congestionado, a fibrose, os micronódulos e a perda pulmonar volumétrica também eram sinais radiológicos mais freqüentes entre os heterozigotos da hemoglobina S, quando comparados aos controles AA.

Os resultados obtidos por Pinto Jr. (1978) permitiram-lhe aventar a hipótese de que a diversidade de resultados poderia eventualmente depender das características das amostras de negróides examinadas nos diversos trabalhos. Isso porque, na sua opinião, os pacientes com a traço falciforme e com tuberculose pulmonar poderiam responder melhor ao tratamento, pelo fato de geralmente manifestarem uma forma exsudativa da infecção, forma essa mais incômoda e que obrigaria o paciente a procurar atendimento médico mais precocemente. Assim sendo, os trabalhos que só examinassem negróides em início de tratamento poderiam encontrar uma frequência muito alta de portadores do traço falciforme, enquanto que os trabalhos que examinassem negróides em tratamento há mais tempo, encontrariam frequências baixas desse traço hemoglobínico. Dessa forma, caso os falcêmicos realmente apresentassem cura mais rápida e menor mortalidade pela tuberculose pulmonar, a introdução de uma terapêutica efetiva para essa doença teria então criado um novo mecanismo homeostático de manutenção do polimorfismo da hemoglobina S.

Martins, Ramalho e Pinto Jr. (1987), investigando a eventual associação entre a forma heterozigótica da hemoglobinopatias S e o tempo de tratamento da tuberculose pulmonar, não encontraram, no entanto, resultados confirmatórios dessa hipótese. De fato, esses autores não observaram um excesso de heterozigotos AS entre os pacientes com menos de seis meses de tratamento e nem mesmo entre os recém-admitidos nos sanatórios. Além disso, também não se observou menor prevalência de heterozigotos AS na amostra de

pacientes com mais de um ano de tratamento, o que poderia indicar uma cura mais rápida por parte desses portadores do traço falciforme. Esses resultados não favorecem a hipótese, portanto, que o traço falciforme confira algum valor prognóstico à tuberculose pulmonar, antecipando o início do tratamento ou modificando a duração da doença.

A primeira sugestão de que a hemoglobina S poderia oferecer alguma resistência frente à febre reumática foi apresentada por Restrepo e Moore (1968), nos EUA. Esses autores encontraram uma frequência de apenas 4,4% de portadores do traço falciforme entre 266 negróides com febre reumática, contra 11,7% entre 230 negróides da amostra-controle. Além disso, esses mesmos autores observaram que, quando estreptococos  $\beta$ -hemolíticos do grupo A eram cultivados em placas de ágar-sangue contendo apenas hemoglobina S, obtinha-se um número menor de colônias do que quando se usava apenas a hemoglobina normal A. Tais resultados indicavam, evidentemente, que a maior resistência frente ao *Streptococcus pyogenes* poderia ser um mecanismo homeostático de manutenção do polimorfismo da hemoglobina S, sobretudo em regiões temperadas, onde a incidência de febre reumática é maior que a incidência de malária (Markowitz, 1991).

Tendo em vista a importância dos achados laboratoriais de Restrepo e Moore (1968), Calusni e Ramalho (1997) julgaram interessante estudar a interação *in vitro* entre a hemoglobina S e o *Streptococcus pyogenes*, afastando algum possível viés do trabalho daqueles autores, já que o menor crescimento de colônias de *Streptococcus pyogenes* nas placas de ágar-sangue contendo a hemoglobina S poderia estar relacionado a outros fatores do sangue dos pacientes homocigotos, tais como a anemia, a concentração plasmática de antibióticos (sobretudo a penicilina), o título de anticorpos anti-estreptolisina O e a presença da hemoglobina fetal. De fato, eliminando esses possíveis fatores de interferência, Calusni e Ramalho (1997) não observaram diferença significativa entre o número de colônias de *Streptococcus pyogenes*, nem da taxa de hemólise, entre as placas de ágar-sangue preparadas com a hemoglobina S e com a hemoglobina A.

Domingos e colaboradores (1991), investigando a frequência de heterocigotos do gene da hemoglobina S entre brasileiros com a doença de Chagas, também não encontraram diferença significativa em relação à amostra-controle.

Do exposto, parece claro que a hipótese da vantagem seletiva dos portadores dos traços falciforme e talassêmicos frente a alguma outra doença infecciosa ou parasitária endêmica com alta mortalidade, além da malária, nunca foi confirmada.

Mais recentemente, Schiliró e colaboradores (1997) voltaram a chamar a atenção para a importância do estudo das hemoglobinopatias sob uma perspectiva histórica, levando-se em consideração outros fatores além da malária. Nesse contexto, é interessante lembrar, por exemplo, que barreiras geográficas, políticas, religiosas ou culturais fizeram com que algumas tribos africanas e populações mediterrâneas se comportassem como pequenos isolados, estando sujeitas a alguns efeitos, como a deriva genética e, em alguns casos, até mesmo ao “efeito do fundador”. Por outro lado, como enfatiza Beiguelman (1994), nas populações primitivas também era freqüente a diminuição abrupta de seu tamanho em consequência de guerras, epidemias, fome e outras catástrofes. As freqüências gênicas dos sobreviventes nem sempre correspondiam à da população original, de sorte que a população derivada deles podia mostrar uma composição genética diferente da que existia anteriormente. Esse efeito, decorrente do estreitamento da passagem de genes de uma população original para outra, por intermédio de uma geração reduzida, costuma ser denominado efeito do gargalo. Outro fator evolutivo a ser considerado sob a perspectiva histórica é o do fluxo gênico de populações imigrantes, decorrente das múltiplas invasões e conquistas. Só a ilha da Sicília, por exemplo, foi dominada sucessivamente por gregos, fenícios, etruscos, romanos, bizantinos, árabes, normandos e ibéricos (Schiliró et al., 1993).

Um outro fator a ser considerado na discussão do polimorfismo das hemoglobinopatias diz respeito à possibilidade de casamentos preferenciais. Assim, por exemplo, em um estudo realizado entre pais de 882 pacientes com hemoglobinopatias hereditárias seguidos na Clínica Pediátrica da Universidade de Catânia, na Itália, observou-se uma taxa de consangüinidade superior à esperada nos casamentos casuais (Schiliró et al., 1993). Tal resultado levou Schiliró e colaboradores (1997) a concluir que as mutações espontâneas, as migrações, a vantagem seletiva dos heterozigotos frente à malária, a deriva genética, o efeito do fundador e os casamentos preferenciais são os principais fatores genéticos responsáveis pelo alto polimorfismo do sistema da globina beta na população siciliana. Já em outro estudo italiano realizado na região de Ferrara, embora os resultados

sugerissem certo grau de casamentos preferenciais entre os pais de 2.227 talassêmicos, eles não diferiam significativamente dos observados na população geral (Barrai et al., 1987).

Concluindo este item, parece desnecessário enfatizar, frente ao exposto até aqui, que atribuir a manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta nas diversas populações exclusivamente à vantagem seletiva dos heterozigotos frente à malária, seria uma visão inadequadamente simplista de um problema muito mais complexo. Nesse contexto, a pesquisa de outros fatores eventualmente envolvidos nessa questão parece ser um tema bastante atraente em termos de Genética Humana e Evolutiva. De fato, dentre todos os mecanismos homeostáticos propostos até o momento, apenas a reprodução seletiva das heterozigotas por um efeito materno, sugerida por Duchovni-Silva e Ramalho (1996; 1998), obteve o respaldo da significância estatística. Tal mecanismo será discutido com maiores detalhes no Capítulo V desta tese.

#### **1.4. A FERTILIDADE DIFERENCIAL COMO UM EVENTUAL MECANISMO HOMEOSTÁTICO DE MANUTENÇÃO DO POLIMORFISMO DA HEMOGLOBINA S E DA TALASSEMIA BETA.**

Uma explicação alternativa para a manutenção do polimorfismo dessas hemoglobinopatias inclui a possibilidade de aumento de fertilidade dos heterozigotos. De acordo com Livingstone (1957), as mulheres AS estariam menos sujeitas a complicações da gravidez causadas pela malária e por isso seriam mais férteis do que as homozigotas normais. Allard (1955) já havia sugerido que os homens AS teriam aumento da sua capacidade reprodutiva, o que segundo Eaton e Mucha (1971), poderia ser explicado por menor dano à espermatogênese pela febre causada pela malária.

Fleming e colaboradores (1979), no entanto, não observaram em uma região malarígena da Nigéria uma fertilidade maior das mulheres e dos homens heterozigotos AS em relação aos homozigotos normais AA. Da mesma forma, em um estudo realizado na Malásia, Joishy e colaboradores (1988) também não constataram, entre famílias com a hemoglobina S, um número de filhos maior do que em famílias sem hemoglobina anômala.

Fraser e colaboradores (1964) também sugeriram que a fertilidade das talassêmicas heterozigotas poderia estar aumentada por razões desconhecidas. Na verdade, a primeira demonstração de que os heterozigotos poderiam ter aumento de fertilidade foi dada em um trabalho realizado entre talassêmicos italianos, já na época em que a hipótese de Haldane estava sendo formulada. Nesse trabalho, Silvestroni e colaboradores (1950) encontraram algumas evidências, não comprovadas estatisticamente, de maior fertilidade de famílias de Ferrara em que ambos os genitores eram heterozigotos. Posteriormente, um estudo realizado na mesma área confirmou essa tendência, embora o respaldo da significância estatística também não tenha sido obtido (Aguzzi et al., 1978).

Esse assunto foi retomado por Lisa e colaboradores (1994), que realizaram um estudo indireto de fertilidade na Sardenha, utilizando dados demográficos de 1961. Os autores analisaram os dados de 52 povoações da ilha, classificadas de acordo com a frequência alta ou baixa de heterozigotos da talassemia beta. Os resultados obtidos apoiaram a hipótese de aumento da fertilidade média nos locais onde a frequência de heterozigotos era alta. De fato, um maior número médio de filhos por mulher e uma baixa porcentagem de mulheres casadas sem filhos foram demonstrados nas povoações com alta frequência de heterozigotos. Em tais locais, o número médio de filhos por mulher era 10% a 20% maior do que em áreas com baixa frequência de heterozigotos da talassemia beta.

Ao analisar, no entanto, o aumento da fertilidade média em locais com alta frequência de heterozigotos e alta incidência da malária, dois aspectos devem ser considerados. Em primeiro lugar, a maior fertilidade pode ser realmente atribuída a maior quantidade de heterozigotas na população, as quais teriam, por razões genéticas desconhecidas, maior fertilidade. Em segundo lugar, a maior fertilidade também pode ser atribuída à maior quantidade de mulheres com imunidade à malária, adquirida já na infância e, conseqüentemente, com menor perda fetal por malária. De fato, o efeito de diferentes graus de malária sobre o comportamento reprodutivo já havia sido demonstrado anteriormente por Zei e colaboradores (1990).

Outro aspecto discutível do trabalho de Lisa e colaboradores (1994) é o da média de filhos ter sido comparada entre populações de regiões distintas da Sardenha, nas quais os aspectos sócio-econômicos e culturais (idade média das mulheres por ocasião do

casamento, por exemplo) podem diferir. De fato, sabe-se que as povoações com alta frequência de heterozigotos da talassemia beta situam-se em regiões baixas e pantanosas da Sardenha, onde a malária foi hiperendêmica. Já as povoações com baixa frequência de heterozigotos situam-se, evidentemente, nas zonas montanhosas altas, com baixa incidência de malária no passado (Weatherall, 1967). Na época do censo de 1961, a Sardenha ainda era uma região malarígena.

Esses dados indicam, portanto, a conveniência da realização de estudos diretos de comportamento reprodutivo nas famílias dos heterozigotos, de preferência em região não malarígena. De fato, é possível observar que em todos estudos até agora realizados, o aspecto, da fertilidade diferencial é confundido com a imunidade à malária.



## ***2. OBJETIVOS***

Conforme foi apresentado na parte introdutória do presente trabalho, os mecanismos homeostáticos de manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta ainda não estão totalmente esclarecidos, admitindo-se a existência de mecanismos complementares ou alternativos, em relação à hipótese de seleção favorável dos heterozigotos pela malária. Com a erradicação da malária na maioria das regiões de alta prevalência dessas hemoglobinopatias, tal assunto voltou a ganhar destaque na literatura.

O presente estudo visa esclarecer um assunto controvertido, ou seja, se o eventual aumento de fertilidade das heterozigotas com o traço falciforme e com o traço talassêmico beta é realmente um mecanismo homeostático de manutenção do polimorfismo dessas hemoglobinopatias. Como todos estudos anteriores sobre o assunto foram realizados apenas de forma indireta (correlação entre a média de filhos por mulher e a frequência das hemoglobinopatias em diversas populações) e/ou em áreas malarígenas, a presente tese se propõe a realizar um estudo direto de fertilidade das heterozigotas, em região não malarígena, usando controles da mesma faixa etária, nível sócio-econômico e cultural.



### ***3. CASUÍSTICA E MÉTODOS***

### 3.1. CASUÍSTICA

O projeto da tese foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Parecer N°. 321/2000) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde (Parecer CONEP N°. 143/2001).

O Núcleo de Genética da Prefeitura Municipal de Araras, SP mantém desde 1988 um programa de triagem pré-natal das hemoglobinopatias, no qual as gestantes portadoras da hemoglobina S, da talassemia beta, da hemoglobina C ou de outras hemoglobinopatias são convidadas para uma consulta opcional de orientação genética, na qual é oferecido, também em caráter optativo, o exame laboratorial do cônjuge, dos filhos e de outros parentes (Teixeira e Ramalho, 1994). A partir dos heredogramas, registrados por uma única geneticista (Profa. Dra. Rosa Chelminsky Teixeira), foi realizado um amplo cadastro das famílias portadoras de hemoglobinopatias, residentes na cidade e região, mantendo-se, evidentemente, o sigilo médico e outras precauções de caráter ético. A partir de 1998, a autora da presente tese passou a participar do programa, realizando os exames laboratoriais.

Para a realização do presente estudo de fertilidade, foi relevante a utilização do registro de famílias, não só pelo grande número de pessoas examinadas, como também pelo fato de a cidade de Araras não estar situada em área malarígena. Além disso, tal abordagem permite a utilização do melhor grupo-controle possível, ou seja, as irmãs com hemoglobina normal das heterozigotas, o que minimiza a interferência de fatores sócio-econômicos e culturais.

Com base nesse cadastro, foram escolhidas seqüencialmente, por ordem numérica de registro, 53 portadoras do traço falciforme (heterozigotas AS), casadas (ou com parceria estável) com indivíduos com hemoglobina normal (homozigotos AA), tendo como controles 43 irmãs AA, casadas com indivíduos igualmente AA. A idade das heterozigotas AS (média = 34,6792 anos; desvio-padrão = 9,715 anos) foi comparada com a das suas irmãs AA (média = 31,8372 anos; desvio-padrão = 10,353 anos) pelo teste de Mann-Whitney, sem ter sido observada diferença significativa ( $p = 0,1905$ ).

Da mesma forma, foram escolhidas seqüencialmente 68 portadoras do traço talassêmico beta (heterozigotas AT), casadas (ou com parceria estável) com indivíduos com hemoglobina normal (homozigotos AA), tendo como controles 45 irmãs AA, casadas com indivíduos igualmente AA. A idade das heterozigotas AT (média = 40,1324 anos; desvio-padrão = 12,707 anos) também foi comparada com a das suas irmãs AA (média = 38,0444; desvio-padrão = 14,552) pelo teste de Mann-Whitney, sem ter sido observada diferença significativa ( $p = 0,4868$ ).

Não foram incluídas na casuística, evidentemente, as propósitas dos heredogramas (gestantes a partir das quais as famílias foram identificadas), nem as suas mães, uma vez que isso poderia introduzir um viés em um estudo de fertilidade. Assim sendo, todas as heterozigotas AS e AT estudadas, bem como as controles AA, eram irmãs de propósitas AS e AT.

## **3.2. MÉTODOS**

Tanto nas heterozigotas, quanto nas suas irmãs AA, verificou-se o número total de gestações a termo (filhos vivos, falecidos e natimortos). A análise de fertilidade foi realizada pela comparação das médias de filhos pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, bem como pela comparação das proporções de mulheres com e sem filhos, entre heterozigotas e controles.

O padrão eletroforético normal AA foi confirmado em todos os cônjuges das heterozigotas AS e AT, bem como nas irmãs da amostra-controle e em seus maridos.

Os dados individuais são especificados no Anexo I.

### **3.2.1. Metodologia Laboratorial**

A investigação de hemoglobina S e da talassemia beta foi realizada pela metodologia recomendada por Ramalho (1986), ou seja:

### **3.2.1.1. Investigação laboratorial do traço falciforme**

Para a pesquisa da hemoglobina S, foram realizados os seguintes exames:

#### **3.2.1.1.1. Eletroforese de hemoglobinas em fitas de acetato de celulose, pH alcalino**

Para realizar a eletroforese de hemoglobina, foi necessária a preparação dos hemolisados da seguinte forma: em um tubo de ensaio foram colocados dois ml de sangue total, completando-se com solução salina (NaCl 0,9%) e centrifugando-se por dez minutos a 2000 rpm. Após, o plasma sobrenadante e a camada de glóbulos brancos foram removidos por aspiração com uma pipeta de Pasteur. A seguir, as hemácias concentradas foram lavadas três ou quatro vezes com solução salina, até que o sobrenadante ficasse límpido, sendo hemolisadas com um volume igual de água destilada e 0,5 volume de tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>). Esses hemolisados foram agitados vigorosamente por alguns minutos e centrifugados a 3000 rpm por 20 minutos. Após a centrifugação, foram observadas três camadas: o CCl<sub>4</sub> no fundo do tubo, o estroma na porção intermediária e a solução de hemoglobinas a 10% na porção superior, a qual foi retirada com uma pipeta de Pasteur, recebendo uma gota de cianeto de potássio (KCN 1%), ficando pronta para posterior utilização.

As soluções de hemoglobinas foram analisadas através de eletroforese utilizando-se fitas de acetato de celulose secas e microporosas e os seguintes reagentes:

- Tampão tris-EDTA-borato, pH 8,9 (10,2g de tris; 0,6g de EDTA; 3,2g de ácido bórico em 1000ml de água destilada).
- Corante Ponceau's a 5% (0,5g de Ponceau's em 100ml de ácido tricloroacético 5%).
- Solução descorante (45ml de metanol, 10ml de ácido acético, 45ml de água destilada).

Após manter as fitas de acetato de celulose durante 10 minutos na solução tampão, foi retirado o seu excesso entre duas folhas de papel de filtro, colocando-as em uma cuba de eletroforese com a mesma solução tampão. Com auxílio de um aplicador apropriado ou um pincel fino, foram depositados os hemolisados sobre a fita, realizando-se a corrida eletroforética durante 60 minutos a 250 volts. Sobre cada fita, ao lado dos hemolisados teste, foi aplicado também, um hemolisado controle de um indivíduo normal.

As fitas foram retiradas da cuba de eletroforese e mantidas no corante por alguns minutos, após os quais foi feita a descoloração do fundo, através de lavagens sucessivas com a solução descorante e, por último, em água corrente para retirar o excesso.

#### **3.2.1.1.2. Teste de solubilidade para a confirmação da hemoglobina S**

Para confirmação da hemoglobina S, diferenciando-a de outras hemoglobinas do grupo +1, que ocupam a mesma posição eletroforética, foi utilizado o teste “Sickle-ID”, devido à sua maior eficiência em relação aos testes de solubilidade, além de ser capaz de diferenciar os homozigotos SS dos heterozigotos AS, SC e SD.

Para a realização deste teste, foram utilizados os seguintes reagentes:

- Tampão de sulfato de amônio, pH 7,1 (solução de sulfato de amônio a 280g/l, ajustando-se o pH para 7,1 +/- 0,1 com  $K_2HPO_4$ ).
- Solução de trabalho preparada no momento do uso:
  - o Ditionito de sódio – 1g
  - o Saponina – 1g
  - o Tampão de sulfato de amônio/fosfato – 100ml

Foram pipetados 2ml da solução de trabalho em tubos de ensaio identificados. A cada tubo foi acrescentado 0,1ml de sangue total dos indivíduos a serem diagnosticados, invertendo-se várias vezes o tubo, para homogeneizar o seu conteúdo. Após, foram mantidos em repouso, à temperatura ambiente, por 5 minutos. Em seguida, os tubos teste, juntamente com o tubo controle de sangue de um indivíduo normal, foram centrifugados a 4000 rpm durante 3 minutos. Os tubos foram, então, retirados e examinados contra uma fonte de luz, para serem feitas as leituras:

**a) tubo com hemoglobina S**

Heterozigoto AS = sobrenadante vermelho claro e um pequeno precipitado vermelho escuro no fundo.

Homozigoto SS = sobrenadante límpido amarelado e um grande precipitado vermelho escuro.

**b) tubo controle**

Homozigoto AA = sobrenadante límpido vermelho e um pequeno precipitado branco (estroma de hemácias).

**3.2.1.2. Investigação laboratorial do traço talassêmico beta**

Nestas amostras de sangue, foram realizados os seguintes exames:

**3.2.1.2.1. Hematimetria**

Os valores hematimétricos foram determinados eletronicamente (*Coulter Act Dift*), imediatamente após as coletas das amostras.

Neste item, foi valorizada a diminuição do volume corpuscular médio das hemácias (V.C.M., com valores menores que  $70 \mu^3$ ) e da hemoglobina corpuscular média (Hb.C.M., com valores menores que que 27 pg)(Ramalho, 1986).

#### **3.2.1.2.2. Análise da morfologia das hemácias em esfregaço sangüíneo**

Os esfregaços sangüíneos foram examinados quanto à presença e intensidade de microcitose, hipocromia, anisocitose, poiquilocitose e alvocitose.

#### **3.2.1.2.3. Quantificação de hemoglobina A<sub>2</sub> pelo método da eluição após eletroforese de hemoglobinas**

A Hb A<sub>2</sub> foi medida espectrofotometricamente, após eluição das fitas em água destilada. Com a ajuda de um aplicador especial (*Hamilton microliter syringes*) foram colocados sobre as fitas de acetato de celulose 10µl do hemolisado a 10%, deixando-as em uma cuba de eletroforese com tampão tris-EDTA-borato pH 8,9 por 60 minutos a 250 volts. As bandas A<sub>2</sub> e A<sub>1</sub> foram separadas, recortadas e as hemoglobinas eluídas em 3ml de água destilada (Hb A<sub>2</sub>) e 15ml de água destilada (Hb A<sub>1</sub>). Após a eluição, foram medidas as densidades ópticas das duas bandas a 415nm e calculadas a porcentagem correspondente à Hb A<sub>2</sub>.

#### **3.2.1.2.4. Dosagem da hemoglobina fetal pelo método da desnaturação alcalina**

Foi preparada a solução de cianometemoglobina, que foi utilizada tanto para o tubo teste quanto para o tubo padrão, adicionando-se 0,3ml de hemolisado a 10% a 5,7ml de solução de Drabkins (0,20g de ferricianeto de potássio, 0,20g de cianeto de potássio para 1000ml de água destilada).

Foram colocados no tubo teste 2,8ml da solução de cianometemoglobina e 0,2ml da solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1,2N. Após dois minutos de agitação, foi feita a dissolução completa de 2,0ml de solução aquosa saturada de sulfato de amônio. Após 5 minutos de repouso, filtra-se essa solução. Foram determinadas as absorbâncias dos tubos testes e padrão (1,4ml de solução de cianometemoglobina em 8,6ml de água destilada) em um espectrofotômetro a 540 nm.



## ***4. RESULTADOS***

A média de filhos entre as heterozigotas AS (média = 3,0755 filhos) não diferiu significativamente da observada entre as suas irmãs AA (média = 3,000 filhos), uma vez que a probabilidade obtida pelo teste de Mann-Whitney foi igual a 35,24%. Além disso, conforme é possível observar na tabela I, a proporção de heterozigotas AS casadas e sem filhos não diferiu significativamente da observada entre as suas irmãs AA.

**Tabela I** – Comparação da proporção de mulheres com e sem filhos entre as heterozigotas AS e as suas irmãs AA.

Fenótipo	Presença de filhos		Total
	Não	Sim	
Heterozigotas AS	2	51	53
Controles AA	6	37	43
<b>Total</b>	8	88	96

Teste exato de Fisher  $p = 0,13400$

Concordando com os resultados observados em relação à hemoglobina S, a média de filhos entre as heterozigotas AT (média = 2,7647 filhos) não diferiu significativamente da observada entre as suas irmãs AA (média = 2,3778 filhos), uma vez que a probabilidade obtida pela teste de Mann-Whitney foi igual a 12,31%. Da mesma forma, a proporção de heterozigotas AT casadas e sem filhos não diferiu significativamente da observada entre as suas irmãs AA, conforme é possível observar na Tabela II.

**Tabela II** – Comparação da proporção de mulheres com e sem filhos entre as heterozigotas AT e as suas irmãs AA.

Fenótipo	Presença de filhos		Total
	Não	Sim	
Heterozigotas AT	3	65	68
Controles AA	4	41	45
<b>Total</b>	7	106	113

Teste exato de Fisher  $p = 0,43356$



## *5. DISCUSSÃO*

Os resultados obtidos no presente trabalho não favorecem a hipótese de aumento de fertilidade das heterozigotas com o traço falciforme ou com o traço talassêmico beta. Tais resultados, obtidos em estudo direto de fertilidade, em área não malarígena, discordam dos obtidos em relação às heterozigotas AT por Lisa e colaboradores (1994), em estudo indireto de fertilidade, realizado em área malarígena da Sardenha.

O uso de grupos-controle de irmãs com hemoglobina normal, de mesma distribuição etária que as heterozigotas, minimiza a interferência de diversos fatores sócio-econômicos e culturais. Assim, por exemplo, não existe nenhuma hipótese plausível de que os grupos das heterozigotas façam maior uso do que as controles do planejamento familiar e do uso de métodos anticoncepcionais, mascarando a sua maior fertilidade. De fato, além de as heterozigotas AS e AT serem assintomáticas ou oligossintomáticas, elas nem sabiam, em sua maioria, que eram portadoras dessas características genéticas, quando tiveram os seus filhos. Além disso, a orientação genética de heterozigotas AS e AT, casadas com indivíduos AA, muito provavelmente não interfere com a decisão de ter ou não filhos, uma vez que esses casais não correm o risco de gerarem homozigotos com anemia hemolítica.

Outro aspecto que merece ser enfatizado é o de que a entrevista de 366 mulheres casadas em idade reprodutiva atendidas nos Postos de Saúde de Araras revelou que o planejamento familiar é adotado por apenas 30% dos casais (Mazzi e Ramalho, dados ainda não publicados). Como tais casais pertencem ao mesmo nível sócio-cultural dos componentes da casuística estudada, isso demonstra que o planejamento familiar teve pouca interferência no presente estudo.

É interessante mencionar que as famílias com a talassemia beta apresentam, de um modo geral, nível sócio-econômico mais elevado do que o das famílias com a hemoglobina S (Teixeira e Ramalho, 1994). Tal fato está diretamente relacionado à tendência das portadoras do traço talassêmico beta casarem-se mais tarde e terem um menor número de filhos, em relação às portadoras do traço falciforme. Como, no entanto, as suas irmãs geralmente pertencem à mesma classe sócio-econômica, não foi observada diferença significativa entre heterozigotas e controles, tanto quanto à idade, quanto ao número médio de filhos.

Outro aspecto que merece ser discutido é o da não inclusão dos abortamentos no número de filhos concebidos. Realmente, além de os abortamentos não seletivos serem indicadores de infertilidade e não de fertilidade, eles são irrelevantes em relação à hipótese testada no presente trabalho, quanto aos mecanismos homeostáticos de manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta. Além disso, a inclusão dos abortamentos poderia introduzir um viés no trabalho, uma vez que existem evidências de um aumento significativo dessas intercorrências clínicas entre as heterozigotas AS e AT (Duchovni-Silva, 1998).

Outro fato que desfavorece a hipótese de Lisa e colaboradores (1994) é o desses autores atribuírem o aumento de fertilidade não apenas às portadoras do traço talassêmico beta, mas também às heterozigotas do gene da deficiência de G-6-PD. Seria difícil encontrar uma explicação biológica para o aumento de fertilidade das portadoras de uma hemoglobinopatia e de uma enzimopenia tão diferentes. O que essas condições clínicas têm em comum é o provável aumento de resistência frente ao *Plasmodium falciparum* (Motulsky, 1960). Assim, a eventual interferência da malária no comportamento reprodutivo das heterozigotas AT também pode ser atribuída às heterozigotas do gene da deficiência de G-6-PD.

Tendo em vista tais argumentos, não causa surpresa o fato de Compri (1998) não ter observado diferença significativa entre o número médio de filhos de heterozigotas do gene da deficiência de G-6-PD e controles de mesma idade, residentes na cidade de Bragança Paulista, SP.

A existência de mecanismos alternativos ou complementares à hipótese da malária vem sendo sugerida por vários autores, para explicar a manutenção do polimorfismo das hemoglobinopatias (Beiguelman, 1981; Ramalho, 1986; Flint, 1993; Eaton, 1994; Schiliró, 1997, entre outros). Recentemente, Agarwal e colaboradores (2000) demonstraram que também a hemoglobina C é incapaz de proteger totalmente os seus portadores, mesmo que homozigotos, da infecção malárica. De todos os mecanismos alternativos propostos, no entanto, apenas a reprodução seletiva das heterozigotas, sugerida por Duchovni-Silva e Ramalho (1996; 1998), obteve o respaldo da significância estatística.

Os autores acima citados testaram a proporção mendeliana na prole de 201 portadores do traço falciforme e de 138 portadores do traço talassêmico beta, casados com cônjuges com hemoglobina normal. Observou-se um excesso de heterozigotos na prole de 107 mães AS (144AS:89AA,  $X^2 = 12,98$ ,  $p < 0,001$ ) e de 95 mães AT (117AT:66AA,  $X^2 = 14,21$ ,  $p < 0,001$ ) casadas com maridos AA. Já entre os filhos dos pais AS e AT a proporção mendeliana foi respeitada (103AS:101AA,  $X^2 = 0,019$ ,  $p = 0,89$  e 57AT:42AA,  $X^2 = 2,27$ ,  $p = 0,13$ ).

Evidentemente, os mecanismos pré e pós-zigóticos de distorção não podem ser ignorados e merecem ser investigados. Os resultados obtidos devem refletir um efeito biológico, podendo ser atribuídos a um distúrbio de segregação de gametas, ou, mais provavelmente, à sobrevivência seletiva de embriões heterozigotos de mães portadoras. Sob essa última interpretação, um excesso de abortamentos, reconhecidos ou não, de homozigotos AA explicaria o relativo excesso de heterozigotos, que sobreviveriam até o nascimento. Além disso, o fenótipo heterozigoto da mãe deve contribuir de forma importante nesse efeito, uma vez que o excesso de filhos heterozigotos não foi observado a nível significativo quando o genitor heterozigoto foi o pai e não a mãe (Hook, 1996).

Tal hipótese da reprodução seletiva das heterozigotas foi reforçada mais recentemente, quando Duchovni-Silva e Ramalho (1999) demonstraram o mesmo efeito materno entre portadoras da hemoglobina C. Vale a pena ressaltar que os genes da hemoglobina S, da hemoglobina C e da talassemia beta ocupam o mesmo *locus* da globina beta no cromossomo 11.

A somatória da reprodução seletiva e do aumento de fertilidade das heterozigotas constituiria um potente mecanismo homeostático de manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta. O presente trabalho, no entanto, não favoreceu a hipótese de aumento de fertilidade das heterozigotas AS e AT.



***6. CONCLUSÃO***

A fertilidade das portadoras do traço falciforme e do traço talassêmico beta não está aumentada em relação à das suas irmãs com hemoglobina normal, afastando a hipótese de a fertilidade diferencial ser um mecanismo homeostático de manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta.



## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

Agarwal, A.; Guindo, A.; Cissoko, Y.; Taylor, J. G.; Coulibaly, D.; Kone, A.; Kayentao, K.; Djimde, A.; Plowe, C. V.; Doumbo, O.; Wellems, T. E. and Diallo, D. – Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. **Blood**, **96**: 2358 – 2363, 2000.

Aguzzi, S.; Vullo, C. and Barrai, I. – Reproductive compensation in families segregation for Cooley’s anemia in Ferrara. **Ann. Hum. Genet.**, **42**: 153-160, 1978.

Allard, R. – A propos de las conversation genetique du sickle cell trait. **Ann. Soc. Belge Med. Trop.**, **35**: 649-660, 1955.

Allison, A. C. – Protection afforded by sickle cell trait against subtertian malarial infection. **Br. Med. J.**, **1**: 290-294, 1954a.

Allison, A. C. – The distribution of the sickle cell trait in East Africa and elsewhere and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **48**: 312-318, 1954b.

Araujo, A. S.; Givisiez, C. B.; Guerra, C. C. C.; Tricta Jr., D. V.; Barreto, J. H.; Pereira, J. M. e Naoum, P. C. – “Doença Falciforme: o que é, como diagnosticar, como tratar?”. Publicação avulsa do laboratório Marjan Farmacêutica, 20 pag., 1993.

Archibald, H. M. and Bruce – Chwatt, L. J. – Sickling and malaria. **Brit. Med. J.**, **1**: 970, 1955.

Bannerman, R. M. – **Thalassemia A survey of some aspects**. N. York, Grune e Stratton, 1961.

Barrai, I.; Barbujani, G.; Beretta, M.; Maestri, I. and Russo, A. - Surnames in Ferrara: distribution isonymy and levels of inbreeding. **Ann. Hum. Biol.**, **14**: 415 – 423, 1987.

Barnicot, N. A.; Allison, A. C.; Blumberg, B. S.; Deliyannis, G.; Krimbas, C. and Ballas, A. – Haemoglobin Types in Greek populations. **Ann. Hum. Genet.**, **26**: 229 – 236, 1963.

Beiguelman, B. – **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. Coleção Genética Médica, Vol. 2, São Paulo, EDART, 1981.

Beiguelman, B – **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. Ribeirão Preto, Ed. Sociedade Brasileira de Genética, 460, 1994.

Beutler, E.; Dern, R. J. and Flanagan, C. L. – Effect of sickle cell trait on resistance to malaria. **Brit. Med. J.**, **2**: 1189 – 1191, 1955.

Brockelman, C. R.; Wongsattayanont, B.; Tan-ariya and Fucharoen, S. – Thalassemia erythrocytes inhibit in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. **J. Clin. Microbiol.**, **25**: 56 – 63, 1987.

Calusni, A. L. R. And Ramalho, A. S. – In vitro interaction between *Streptococcus pyogenes* and S hemoglobin. **J. Bras. Patol.**, **33**: 121- 124, 1997.

Cao, A.; Rosatelli, M. C. and Galanello, R. – Prevenção e controle das hemoglobinopatias. **Anais Nestlé**, **58**: 32 – 41, 1999.

Carcassi, V.; Ceppellini, R. e Pitzus. – Frequenza della thalassaemia in quattro popolazioni Sarde e suoi rapporti con la distribuzione dei gruppi sanguigni e della malaria. **Boll. Ist. Suroter**. (Milan), **36**: 206 – 218, 1957.

Cezar, P. C.; Mizusaki, K.; Pinto Jr, W.; Opromolla, D. V. A. e Beiguelman, B. – “Hemoglobina S e lepra”. **Rev. Brás. Pesq. Méd. Biol.**, **7**: 151, 1974.

Choremis, C.; Fessas, P.; Kattamis, C.; Sramatoyannopoulos, G.; Zannos-Mariolea, L.; Karaklis, A. e Belios, G. – Three inherited red cell abnormalities in a district of Greece. **Lancet**, **1**: 907 – 909, 1963.

Compri, M. B. – **Genética Comunitária e deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD): estudo de uma comunidade brasileira (Bragança Paulista, SP) abordada a partir de doadores de sangue**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, Campinas, 1998.

Costa, F. F.; Gesteira, F.; Carvalho, M. H.; Miranda, S. R. P.; Queiroz, I. L.; Arruda, V. R.; Gonçalves, M. S.; Fernandes, D.; Nascimento, M. L.; Saad, S. T. O. e Sonati, M. F. – “Beta S cluster haplotypes in Brazil: the CAR type predominantes in the Southeast and the Benin type in Northeast”. **Abstracts 24<sup>th</sup> Congress of the International Society of Haematology**. Londres, p. 196, 1992.

Curtain, C. C.; Kidson, C.; Gaydusek, D. C. and Gorman, J. G. – Distribution pattern, population genetics and anthropological significance of thalassemia and abnormal hemoglobins in Melanesia. **Am. J. Phys. Anthropol.**, **20**: 475 – 483, 1962.

Deisseroth, A.; Nienhuis, A. W.; Lawrence, J.; Giles, R.; Turner, P. and Ruddle, F. H. – Chromosomal localization of human globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **75**: 1456 – 1459, 1978.

Deisseroth, A.; Velez, R. and Nienhuis, A. W. – “Hemoglobin synthesis in somatic cell hybrids: Independent segregation of the human  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin.” **Science**, **191**: 1262 – 1264, 1976.

Domingos, C. R. B.; Naoum, P. C.; Moreira, H. W.; Bassi, M. G.; Monzato, A. J. e Álvares Filho, F. – Hemoglobinopatias e haptoglobinas em portadores da Doença de Chagas. **Rev. Bras. Patol. Clin.**, **27**: 80 – 87, 1991.

Duchovni-Silva, I – **Evidência de um efeito materno na transmissão hereditária dos traços falciforme e talassêmico beta**. Tese de doutoramento, Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, 1998.

Duchovni-Silva, I. and Ramalho, A. S. – Maternal segregation distortion in sickle cell and beta-thalassemia traits? **Lancet**, **347**: 691 – 692, 1996.

Duchovni- Silva, I. and Ramalho, A. S. – Maternal effect in the sickle cell and beta-thalassemia traits? **Genetics and Molecular Biology**, **21** (Suppl. 3): 322, 1998.

Duchovni-Silva, I. and Ramalho, A. S. – Efeito materno no traço de hemoglobina C. **Genetics and Molecular Biology**, **22** (Suppl. 3): 199, 1999.

Eaton, J. W. – Malaria and the selection of the sickle gene. **In:** Embury, S. H.; Hebbel, R. P.; Mohandas, N. and Steinberg, M. H. (Eds.) **Sickle cell disease. Basic principles and clinical practice.** N. York, Raven Press, pp. 13 – 18, 1994.

Eaton, J. W. and Mucha, J. I. – Increased fertility in males with the sickle cell trait? **Nature**, **231**: 456 – 457, 1971.

Elion, J.; Berg, P. E.; Lapouméroulie, C.; Trabuchet, G.; Mittelman, M.; Schechter, A. N.; Krishnamoorthy, R. and Labie, D. – DNA sequence variation in a negative control region 5' to the  $\beta$ -globin gene correlates with the phenotypic expression of the  $\beta^S$  mutation. **Blood**, **79**: 787 – 792, 1992.

Embury, S. H.; Hebble, R. P.; Mohandas, N. and Steinberg, M. H. – Sickle cell disease. Basic principles and clinical practice. N. York, Raven Press, 1995.

Fessas, P.; Loukopoulos, D. e Katsoya, A. – Peptide analysis of the inclusions of erithroid cells in  $\beta$ -thalassemia. **Biochim. Biophys. Acta**, **124**: 430 – 432, 1966.

Fleming, A. F.; Storey, T. and Molineaux, L. – Abnormal haemoglobins in the Sudan savana of Nigeria. Prevalence of haemoglobins and relationship between sickle-cell trait malaria and survival. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **73**: 161 – 172, 1979.

Flint, J.; Harding, R. M.; Boyce, A. J. and Clegg, J. B. – The population genetics of the haemoglobinopathies. **Baillieres Clin. Haematol.**, **6**: 215 – 262, 1993.

Fraser, G. R.; Stamatoyannopoulos, G.; Kattamis, C.; Loukopoulos, D.; Defarinos, B.; Kitsos, C.; Zannos-Mariolea, L.; Choremis, C. and Motulsky, A. G. Thalassemias, abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Arta area of Greece. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **119**: 415 – 435, 1964.

Freitas, E. M. and Rocha, F. J. – Detection of beta-thalassemia heterozygotes among Caucasians from Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev. Bras. Genet.**, **6**: 185 – 188, 1983.

Friedman, M. J.; Roth, E. F.; Nagel, R. L. and Trager, W. – *Plasmodium falciparum* physiological interactions with the human sickle cell. **Exp. Parasitolog.**, **47**: 73 – 80, 1979.

Friedman, M. J. – Erythrocyte mechanism of sickle cell resistance to malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **75**; 1994 – 1997 – 1978.

Friedman, M. J. – Oxidant damage mediates variant red cell resistance to malaria. **Nature**, **280**: 245 – 250, 1979.

Gelehrter, T. D. and Collins, F. S. – **Principles of Medical Genetics**, Baltimore, Williams e Wilkins, pp. 113 – 119, 1990.

Gonçales, N. S. L. e Ramalho, A. S. – Alterações hemoglobínicas e dores ósteo-articulares. **Rev. Brás. Reumatol.**, **25**: 128 – 130, 1985.

Gonçalves, M. S.; Cavallari, S. R.; Martins, C. S. B.; Garlipp, C. R.; Bottini, P. V. e Ramalho, A. S. – Síndromes falcêmicas e hematúria. **Rev. Brás. Patol. Clin.**, **25**: 121 – 127, 1989.

Haldane, J. B. S. – Disease and evolution. **Ric. Sci.**, **19** (Suppl.): 68 – 76, 1949.

Hook, E. B. – Selective embryonic survival of conceptuses with sickle cell and beta-thalassemia traits? **Lancet**, **347**: 1269, 1996.

Ingram, V. M. – Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. **Nature**, **180**: 326, 1957.

Joishy, S. K.; Hassan, K.; Lopes, M. and Lie-Injo, L. E. – Clinical, genetic and fertility studies of Indians with beta S-globin gene and the influence of Hbs on *Plasmodium falciparum* malaria infection. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **82**: 515 – 519, 1988.

Lehmann, H. – **The history of thalassemia. Birth Defects. Original Articles Series**, **18** (7): 1 – 11, 1982.

Lewis, R. A. and Chaudhury, D. S. – Anemia of leprosy patients in West Africa. **Internat. J. Leprosy**, **37**: 288 – 295, 1969.

Lie-Injo, L. E. – Distribution of genetic red cells defect in Southeast Asia. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **63**: 664 – 674, 1969.

Lisa, A.; Astolfi, P.; Degioanni, A.; Pasquale, C. D. and Zei, G. – Differential fertility as a mechanism maintaining balanced polymorphism in Sardinia. **Hum. Biol.**, **66**: 683 – 698, 1994.

Livingstone, F. B. – Malaria and human polymorphism. **Ann. Rev. Hum. Genet.**, **5**: 33 – 64, 1971.

Livingstone, F. B. – Sickling and malaria. **Br. Med. J.**, **1**: 762 – 763, 1957.

Luzzato, L.; Nwachuku, J. E. S. and Reddy, S. – Increased sickling of parasited erythrocytes as a mechanism of resistance against malaria in the sickle cell trait. **Lancet**, **1**: 319 – 321, 1970.

Markowitz, M. – Streptococcal disease in developing countries. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **10**: 911 – 914, 1991.

Martins, C. S. B.; Gonçalves, M. S.; Sonati, M. F.; Ramalho, A. S. and Costa, F. F. – Molecular characterization of beta-thalassemia heterozygotes in Brazil. **J. Méd. Genet.**, **30**: 797 – 798, 1993.

Martins, C. S. B.; Ramalho, A. S. and Pinto Jr., W. – Hemoglobina S heterozigótica e tuberculose pulmonar. **Rev. Brasil. Genet.**, **10**: 769 – 776, 1987.

Moore, R. A.; Brass, W. and Foy, H. – Sickling and malaria. **Brit. Med. J.**, **2**: 630 – 631, 1954.

Motulsky, A. G. – Current concepts of the genetics of the thalassemias. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, **29**: 399 – 412, 1964.

Motulsky, A. G. – Metabolic polymorphisms and the role of infections disease in human evolution. **Hum. Biol.**, **32**: 28 – 62, 1960.

Motulsky, A. G. – Population genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency of the red cells. **Proceedings of the Conference in Polymorphism and Geographical Variations in Disease**, **23**: 258 – 292, 1960.

Nagel, R. L. and Roth, E. F. – Malaria and red cell genetic defects. **Blood**, **74**: 1213 – 1221, 1989.

Nomura, M. L.; Andreollo, N. A.; Souza, P. R.; Mesquita, M. A.; Martins, C. S. B. e Ramalho, A. S. – Síndromes falcêmicas e úlcera duodenal. **Rev. Gastroentrol. Endosc. Diag. (GED)**, **11**: 145 – 148, 1992.

Pasvol, G. and Wilson, R. J. M. – The interaction of malaria parasites with red blood cells. **Br. Med. Bull.**, **38**: 133 – 138, 1982.

Pasvol, G.; Weatherall, D. J. and Wilson, R. J. M. – Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria. **Nature**, **274**: 701 – 703, 1978.

Pauling, L.; Itano, H. A.; Singer, S. J. and Wells, I. C. – Sickle cell anemia: a molecular disease. **Science**, **110**: 543, 1949.

Pinto Jr., W. – **Hemoglobina S e tuberculose pulmonar**. Tese de livre docência, Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, 1978.

Plato, C. C.; Rucknagel, D. L. and Gershowitz, H. – Studies on the distribution of G-6-PD deficiency thalassemia and other genetic trait in the coastal and mountains villages of Cyprus. **Am. J. Hum. Genet.**, **16**: 267 – 283, 1964.

Powars, D. R. –  $\beta^S$ -gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, **5**: 475 – 492, 1991.

Powars, D. R.; Chan, L. S. and Schroeder, W. A. – The variable expression of sickle cell disease is genetically determined. **Seminars in Hematology**, **27**: 360 – 376, 1990.

Power, H. W. – A model of how the sickle cell gene produces malaria resistance. **Journal of Theoretical Biology**, **50**: 121 – 127, 1975.

Ramalho, A. S. – **As hemoglobinopatias na prática clínica no Brasil**. Publicação didática do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, 34 pag., Campinas, 2000.

Ramalho, A. S. – Investigação genético-epidemiológica das talassemias beta e delta-beta no Estado de São Paulo. **Rev. Paul. Méd.**, **88**: 68 – 71, 1976.

Ramalho, A. S. – **Estudo médico de polimorfismo genéticos de importância clínica no Brasil**. Tese de Livre Docência, Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, 1979.

Ramalho, A. S. – **As hemoglobinopatias hereditárias. Um problema de saúde pública no Brasil**. Ribeirão Preto, Editora da Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 160p., 1986.

Ramalho, A. S. and Beiguelman, B. – Sickle cell trait and tuberculosis. **Ciência e Cultura**, **29**: 1149 – 1153, 1977.

Ramalho, A. S.; Magna, L. A.; Costa, F. F. e Grotto, H. Z. W. – Talassemia menor: um problema de saúde pública no Brasil? **Rev. Bras. Genet.**, **8**: 747 – 754, 1985.

Ramalho, A. S.; Pinto Jr., W.; Magna, L. A. e Beiguelman, B. – Talassemia e hanseníase. **Hansenol. Internat.**, **8**: 61 – 65, 1983.

Ramalho, A. S.; Velloso, L. A. e Diniz, M. – Síndrome falcêmica e úlceras de membros inferiores. **Anais Brás. Dermatol.**, **60**: 307 – 310, 1985.

Raper, A. B. – Further observations on sickling and malaria. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **53**: 110 – 117, 1959.

Raper, A. B. – Sickling in relation to morbidity from malaria and other diseases. **Brit. Med. J.**, **1**: 965 – 966, 1956.

Restrepo, A. and Moore, C. V. – Unpublished observations *apud* Weernik, P. H. – Rheumatic heart disease occurring in sickle cell disease and trait. **Southern Med. J.**, **61**: 404 – 407, 1968.

Ringelhann, B.; Hathorn, M. K. S.; Jilly, P.; Grant, F. and Parnicksy, G. – A new look at the protection of hemoglobin AS and AC genotypes against *Plasmodium falciparum* infection: acensus trait approach. **Ann. J. Hum. Genet.**, **28**: 270 – 279, 1976.

Rosenbleum, R.; Kabakow, B.; Dichtman, H. and Lyon, H. A. – Sickle cell trait and disease in pulmonary tuberculosis. **Arch. Intern. Med.**, **95**: 540 – 542, 1955.

Roth, E. F.; Friedman, M.; Veda, Y.; Telles, I.; Trager, W. and Nagel, R. L. – Sickling rates of human AS red cells infected *in vitro* with *Plasmodium falciparum* malaria. **Science**, **202**: 650 – 652, 1978.

Roth, E. F.; Raventos-Suarez, C.; Rinaldi, A. and Nagel, R. L. – Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **80**: 298 – 305, 1983.

Ryan, T. J.; O'Connor, T. F.; McCurdy, P. R. and Katz, S. – Sickle cell trait and tuberculosis. **Am. Rev. Resp. Dis.**, **81**: 546 – 549, 1960.

Salzano, F. M. – Abnormal hemoglobin studies and counseling in Brazil. In: Scott, R. B. (Ed.) **International aspects of sickle cell disease**. Washington Howard University Center for Sickle Cell Disease, pp 67 – 69, 1979.

Schiliró, G.; Rodriguez-Larralde, A.; Mamolini, E.; Scapoli, C. And Barraí, I. – Isonymy in haemoglobinopathies in a Sicilian sample. **Hum. Hered.**, **43**: 203 – 204, 1993.

Schiliró, G.; Mirabile, E.; Testa, R.; Russo-Mancuso, G. and Dibenedetto, S. P. – Presence of hemoglobinopathies in Sicily: a historic perspective. **Am. J. Med. Genet.**, **69**: 200 – 206, 1997.

Serjeant, G. R. – **Sickle cell disease**. Oxford Medical Publications, 1985.

Serjeant, G. R. – **The clinical features of sickle cell disease**. Amsterdam, North – Holland, 1974.

Silvestroni, E. and Bianco, I. – Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **Ann. J. Hum. Genet.**, **27**: 198 – 207, 1975.

Silvestroni, E.; Bianco, I. and Montalenti, G. – Frequency of microcythemia in some Italian districts. **Nature**, **165**: 682 – 683, 1950.

Siniscalco, M.; Bernini, L.; Latté, B. and Motulsky, A. G. – Favism and thalassaemia in Sardinia and their relationship to malaria. **Nature**, **190**: 1170 – 1180, 1961.

Teixeira, R. C. and Ramalho, A. S. – Genetics and Public Health: Response of a Brazilian population to an optional hemoglobinopathy program. **Rev. Brasil. Genet.**, **17**: 435 – 438, 1994.

Udeinya, I. J.; Schimidt, J. A.; Aikawa, M.; Miller, L. H. and Green, I. – Falciparum malaria – infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells. **Science**, **213**: 555 – 557, 1981.

Vandepitte, S. M. and Delaisse, S. – Sicklémie et paludisme. A perçu du problème et contribution personnelle. **Ann. Soc. Belge. Med. Trop.**, **37**: 703 – 735, 1957.

Wajcman, H.; Vasseur, C., Blouquit, Y. and Galacteros, F. – Hb Zaire and Hb Duino; two new human hemoglobin variants due rare mutational events. **Blood**, **78** (Suppl. 1): 205, 1991.

Weatherall, D. J. – **Los síndromes talassémicos**. Barcelona, Toray, 1967.

Weatherall, D. J. and Clegg, J. B. – **The Thalassemia Syndromes**. Oxford; Blackwell Scientific, 1981.

Weatherall, D. J.; Clegg, J. B.; Higgs, D. R. and Wood, W. G. – **The hemoglobinopathies**, In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S. and Valle, D. (Eds). **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. Vol. III, N. York, McGraw – Hill, pp. 3417 – 4484, 1995.

Weiss, W. and Stecher, W. – Tuberculosis and the sickle cell trait. **Arch. Intern. Med.**, **89**: 914 – 922, 1952.

Zago, M. A. – **Síntese de globinas nas talassemias e aspectos da função esplênica na anemia falciforme e na heterozigose dupla para a  $\beta$ -talassemia e a hemoglobinopatia S**. Tese de Livre Docência, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 1981.

Zago, M. A. and Costa, F. F. – Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, **79**: 385 – 388, 1985.

Zago, M. A.; Costa, F. F. and Bottura, C. Beta-thalassemia in Brazil. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, **14**: 383 – 388, 1981.

Zago, M. A.; Figuiredo, M. S. and Ogo, S. H. – Bantu Beta-S haplotype predominantes among Brazilian Blacks. **Am. J. Phys. Anthropol.**, **88**: 295 – 298, 1992.

Zeis, G.; Lisa, A. and Astolfi, P. – Fertility and malaria in Sardinia. **Ann. Hum. Biol.**, **17**: 315 – 330, 1990.



## **8. ANEXOS**

## IRMÃS AS DE PROPÓSITAS AS

Nº	NOME	IDADE	FILHOS VIVOS	FILHOS MORTOS	NATIMOR TOS	TOTAL FILHOS	GEN.
1	MMAG	31	2	0	0	2	6
2	DAS	19	0	0	0	0	7
3	NFS	45	7	0	0	7	20
4	RO	52	4	0	0	4	24
5	ABF	49	4	0	0	4	33
6	AO	47	5	1	0	6	36
7	AS	35	2	0	0	2	38
8	MAN	44	7	0	0	7	44
9	TAFV	21	2	0	0	2	44
10	VJBF	20	0	0	0	0	44
11	ICS	26	3	0	0	3	65
12	ABG	48	5	0	0	5	66
13	MAGJ	26	1	0	0	1	66
14	ABS	57	11	0	0	11	68
15	CDL	38	2	0	0	2	93
16	HCS	48	4	0	0	4	100
17	LA	34	4	0	0	4	102
18	EROSC	26	2	0	0	2	118
19	NAO	27	1	0	0	1	120
20	NMPA	34	6	2	0	8	128
21	EFPS	19	01	0	0	01	128
22	FOP	46	4	1	0	5	141
23	COL	47	7	0	0	7	144
24	SAT	38	5	0	0	5	151
25	TCM	19	1	0	0	1	163
26	ADPS	27	1	0	0	1	241
27	NVB	41	4	0	0	4	244
28	NVC	32	2	0	0	2	244
29	SVN	31	1	0	0	1	244
30	COS	52	3	1	0	4	72
31	VSO	27	3	0	0	3	72
32	MAL	31	3	0	0	3	78
33	MIM	34	2	0	0	2	205
34	ZRJ	48	3	0	0	3	316
35	MS	38	5	0	0	5	323
36	AMS	26	1	0	0	1	1f
37	APC	31	1	0	0	1	2f
38	ZARC	22	3	0	0	3	3f
39	ERM	21	3	0	0	3	6f
40	MRR	27	1	0	0	1	28f
41	MAC	34	2	0	0	2	28f
42	MVC	34	3	0	0	3	28f

43	I A B	30	4	0	0	4	46f
44	F M P	32	4	0	0	4	55f
45	L F S P	43	3	0	0	3	64f
46	B A C	34	4	0	0	4	69f
47	M A F	40	1	0	0	1	72f
48	M I J	33	1	0	0	1	76f
49	M D L S	39	5	0	0	5	98f
50	D A F	39	4	0	0	4	101f
51	M N L	46	3	0	0	3	105f
52	J S L	52	3	0	0	3	110f
53	L M M S M	21	1	0	0	1	112f

**IRMÃS HOMOZIGOTAS AA – CONTROLES (AS)**

Nº	NOME	IDADE	FILHOS VIVOS	FILHOS MORTOS	NATI MORTOS	TOTAL FILHOS	GEN.
1	MGAG	24	2	0	0	2	6
2	RRSM	20	0	0	0	0	9
3	LPL	19	2	0	0	2	15
4	AGSS	26	2	0	0	2	20
5	EFKC	40	8	2	0	10	51
6	SRFS	22	1	0	0	1	54
7	RF	16	1	0	0	1	54
8	JSN	13	0	0	0	0	57
9	CSM	24	2	0	0	2	65
10	DBP	44	6	0	0	6	66
11	MASJ	34	3	0	0	3	66
12	SCGC	21	2	0	0	2	66
13	EFS	33	3	0	0	3	72
14	RMJB	43	4	0	0	4	128
15	VSM	27	0	0	0	0	135
16	MSM	24	0	0	0	0	135
17	CZS	20	1	0	0	1	167
18	ACM	36	2	0	0	2	174
19	RCL	23	1	0	0	1	186
20	AEF	27	2	0	0	2	210
21	NFF	51	3	1	0	4	210
22	CVB	39	3	0	0	3	244
23	JBS	22	2	0	0	2	245
24	MMC	48	2	0	0	2	247
25	APBC	38	3	0	0	3	270
26	ABP	31	2	0	0	2	276
27	CCS	44	12	0	0	12	135
28	EAS	38	3	0	0	3	142
29	MLS	33	4	0	0	4	148
30	EMS	32	3	0	0	3	161
31	JDR	42	4	0	0	4	282
32	AAS	46	8	0	0	8	1f
33	LMCM	36	4	0	0	4	1f
34	CCM	33	3	0	0	3	1f
35	MCCG	16	0	0	0	0	1f
36	MC	49	3	1	0	4	3f
37	PAR	23	4	1	0	5	3f
38	JBM	48	10	0	0	10	6f
39	SARM	29	2	0	0	2	21f
40	DRRF	25	0	0	0	0	21f
41	MASS	32	3	0	0	3	37f
42	ABF	47	2	0	0	2	76f
43	SM	31	2	0	0	2	99f

### IRMÃS AT DE PROPOSITAS AT

Nº	NOME	IDADE	FILHOS VIVOS	FILHOS MORTOS	NATI MORTOS	TOTAL FILHOS	GEN
1	CG	48	8	0	0	8	26
2	LDF	54	6	0	0	6	60
3	AC	48	4	0	0	4	61
4	MERS	28	2	0	0	2	77
5	MMB	22	0	0	0	0	125
6	VPC	49	6	0	0	6	220
7	NPB	31	4	0	0	4	220
8	MP	33	2	0	0	2	220
9	ACS	21	1	0	0	1	271
10	MJPV	48	3	0	0	3	367
11	MAOR	45	2	0	1	3	5f
12	YOD	40	2	0	0	2	5f
13	BVOP	33	2	0	0	2	5f
14	MAB	42	1	0	0	1	17f
15	RARS	31	2	0	0	2	18f
16	RPRC	28	2	0	0	2	18f
17	AAVS	31	3	0	0	3	20f
18	JFA	53	6	0	0	6	22f
19	MM	50	2	0	0	2	22f
20	MFFR	30	2	0	0	2	22f
21	VLFP	39	3	0	0	3	22f
22	MAFB	33	3	0	0	3	22f
23	LLFO	38	4	0	0	4	23f
24	LLS	54	5	0	0	5	24f
25	ATBC	41	2	0	0	2	33f
26	RMBO	29	1	0	0	1	33f
27	AMZG	42	2	0	0	2	36f
28	VPP	54	2	0	0	2	36f
29	CRMC	32	2	0	0	2	39f
30	MATF	38	4	0	0	4	42f
31	RTD	21	1	0	0	1	42f
32	AMVTS	40	3	0	0	3	48f
33	RNB	23	1	0	0	1	49f
34	LPK	46	5	0	0	5	50f
35	CAPVC	35	2	0	0	2	50f
36	ECF	24	1	0	0	1	50f
37	MK	24	0	0	0	0	50f
38	RC	25	2	0	0	2	53f
39	AMB	39	2	0	0	2	54f
40	MRCM	26	1	1	0	2	57f
41	IEM	67	3	1	0	4	58f
42	LR	58	6	1	0	7	58f
43	EAM	37	1	0	0	1	58f
44	MNRB	39	2	0	0	2	59f
45	MBF	74	2	0	0	2	67f

46	DSFP	51	2	0	0	2	67f
47	CSFP	46	3	1	0	4	67f
48	TBG	63	7	0	0	7	74f
49	ETGL	34	2	0	0	2	74f
50	MBG	57	6	0	0	6	82f
51	IMG M	29	1	0	0	1	82f
52	VRBCA	48	4	0	0	4	82f
53	MCA	27	1	0	0	1	82f
54	GBO	23	0	0	0	0	82f
55	NC	28	2	0	0	2	92f
56	NBC	45	2	1	0	3	93f
57	IFC	57	5	0	0	5	95f
58	GCFP	35	2	0	0	2	95f
59	CCL	32	2	0	0	2	95f
60	EFF	67	6	0	0	6	100f
61	RMFC	50	2	0	0	2	100f
62	MFC	48	3	0	0	3	100f
63	ABC	50	3	0	0	3	100f
64	PBC	19	1	0	0	1	100f
65	MLVC	52	2	0	0	2	103f
66	JABS	25	2	0	0	2	108f
67	NGS	45	2	0	0	2	121f
68	VLGG	42	2	0	0	2	121f

### IRMÃS HOMOZIGOTAS AA – CONTROLE (AT)

Nº	NOME	IDADE	FILHOS	FILHOS	NATI	TOTAL	GEN
			VIVOS	MORTOS	MORTOS	FILHOS	
1	MAGSL	25	3	0	0	3	26
2	TAF	27	1	0	0	1	26
3	ICF	21	2	0	0	2	40
4	MFB	17	0	0	0	0	60
5	SMC	32	0	0	0	0	220
6	ECS	28	1	0	1	2	271
7	VLGL	45	5	0	0	5	207
8	LACS	55	4	0	0	4	271
9	VOM	58	3	0	0	3	05f
10	ROT	50	4	0	0	4	05f
11	ATOC	37	1	0	0	1	05f
12	VFMB	29	4	0	0	4	05f
13	MMP	53	4	0	0	4	18f
14	RCRG	29	1	0	0	1	18f
15	AARR	35	2	0	0	2	19f
16	DFG	43	3	0	0	3	22f
17	CFM	37	2	0	0	2	22f
18	MRMP	31	1	0	0	1	22f
19	MLBP	35	2	0	0	2	33f
20	CAMC	71	4	0	0	4	36f
21	CMB	53	2	0	0	2	36f
22	MPG	50	3	0	0	3	36f
23	BPC	52	2	0	0	2	36f
24	MLCP	44	3	0	0	3	36f
25	MPC	15	1	0	0	1	36f
26	IST	59	6	0	0	6	42f
27	MELV	75	6	0	1	7	48f
28	ARP	71	10	1	0	11	50f
29	MK	26	2	0	0	2	50f
30	MK	21	1	0	0	1	50f
31	JMP	20	1	0	0	1	50f
32	MHCV	43	2	0	0	2	56f
33	VLBB	43	2	0	0	2	62f
34	RL	31	0	0	0	0	62f
35	CNSM	43	1	0	0	1	73f
36	MHSB	32	1	0	0	1	73f
37	TLSP	30	1	0	0	1	73f
38	NMGR	45	2	0	0	2	74f
39	SAG	40	2	0	0	2	74f
40	AKRB	21	0	0	0	0	74f
41	MTGM	23	1	0	0	1	82f
42	ABB	45	3	0	0	3	82f
43	MF	42	2	0	0	2	100f
44	ACCP	28	1	0	0	1	100f
45	DGF	38	2	0	0	2	121f

