

ANTONIO SÉRGIO RAMALHO

INVESTIGAÇÃO DOS TRAÇOS TALASSEMICOS BETA E DELTA-BETA
EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO ESTUDANTIL DE CAMPINAS, SP.

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universida-
de Estadual de Campinas, para a
obtenção do grau de Doutor.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Bernardo Beiguelman

Campinas, SP

1975

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais

Ao Prof. Dr. Bernardo Beiguelman

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Zeferino Vaz
Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Bernardo Beiguelman
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Antonio Augusto de Almeida
Universidade Estadual de Campinas

Dr. Walter Pinto Junior
Universidade Estadual de Campinas

Dr. Antonio Lauro Coscina
Universidade Estadual de Campinas

Dr. João Antonio Voza
Casa de Saúde Campinas

Dr. Fernando de Lira Ventura
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. José Cintra Ferreira
Instituto Adolfo Lutz de Campinas

Dr. Luiz Gastão Rosenfeld
Instituto de Hematologia Clínica de São Paulo

Srta. Neusa Arrivabene
Universidade Estadual de Campinas

Srta. Ivone Aparecida Onisto
Universidade Estadual de Campinas

Srta. Maria Isabel Agnello
Universidade Estadual de Campinas

Sra. Hilda de Toledo Anconi
Instituto Adolfo Lutz de Campinas

Sr. Aldo Donizete da Silva
Universidade Estadual de Campinas.

ÍNDICE

	pag.
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DA LITERATURA	4
II.1 - A evolução do conceito de talassemia	4
II.2 - As variedades de talassemia	11
II.3 - As bases moleculares das talassemias	21
II.4 - Principais aspectos clínicos e laboratoriais das talassemias	23
II.5 - A frequência das talassemias nas diversas populações humanas e a manutenção do seu polimorfismo	32
III. MATERIAL E MÉTODOS	41
III.1 - A triagem dos indivíduos	41
III.2 - Classificação dos indivíduos triados	45
III.3 - Investigação dos indivíduos triados	45
III.4 - Técnicas complementares	52
IV. RESULTADOS	54
V. DISCUSSÃO	60
V.1 - Discussão do material e dos métodos	60
V.2 - Discussão dos resultados	68
VI. SUMÁRIO E CONCLUSÕES	78
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

I. INTRODUÇÃO

As talassemias sempre despertaram grande interesse como objeto de investigação científica pelo fato de constituírem entidades genético-clínicas com características extremamente peculiares.

A contínua ampliação do conceito de talassemia, a constatação de sua distribuição geográfica, praticamente universal, bem como as descobertas recentes a respeito da sua fisiopatogenia, estão conferindo às síndromes talassêmicas novo interesse como terreno de pesquisa, o qual promete continuar muito fértil. Ao lado desses fatos, é inegável a grande importância clínica de tais hemoglobinopatias.

Realmente, como comenta WEATHERALL (1967), as síndromes talassêmicas se converteram em um tema extremamente interessante para os investigadores de várias disciplinas e em um campo bastante amplo de comunicação entre o clínico, que tem a responsabilidade de diagnosticar e tratar os referidos transtornos, e o pesquisador, cujos estudos a respeito do controle molecular da síntese proteica têm tanta aplicação nesses problemas clínicos.

Do ponto de vista do geneticista, por seu lado, além dos estudos das alterações talassêmicas prometerem respostas a algumas questões fundamentais sobre os mecanismos genéticos implicados na síntese defeituosa de proteínas, chama a atenção o fato das talassemias constituírem entidades passíveis de detecção no seu estado heterozigótico.

Entre nós, contudo, não se tem observado, de modo geral, interesse acentuado a respeito das síndromes talassêmicas. De fato, a maioria dos nossos clínicos ainda identifica a talassemia apenas com a clássica anemia de Cooley e a considera com incidência rara no Brasil, a despeito da pobreza da investigação nacional nesse sentido. As dificuldades inerentes ao diagnóstico das talassemias heterozigóticas, associadas, na maioria dos casos, a um quadro clínico pobre em alterações, contribuem para reforçar essa imagem.

Aliás, chama a atenção o fato de serem os indivíduos portadores das talassemias heterozigóticas, com raras exceções, pessoas clinicamente normais ou com sinais e sintomas produzidos por uma anemia leve. Esses últimos casos, bem como aqueles com anemia mais acentuada, podem ser, portanto, diagnosticados pelo clínico desavisado como manifestando uma anemia carencial, o qual irá verificar ser a mesma, surpreendentemente, rebelde à terapêutica. De fato, a microcitose produzida pela talassemia heterozigótica pode ser confundida com aquela consequente de uma anemia ferropriva e, nesse caso, é óbvio que a terapêutica comumente empregada em tais casos será ineficaz, podendo mesmo ser prejudicial ao paciente, já que envolve o risco potencial de causar hemossiderose (CROSBY, 1972). Realmente, é fato conhecido que a recorrência familiar de uma anemia não responsiva à terapêutica habitual tem constituído a chave inicial para o diagnóstico de uma das variedades de talassemia (NECHELES et al., 1969).

Outro aspecto importante do reconhecimento de portadores do traço talassêmico (heterozigotos das talassemias) diz respeito ao risco potencial que tais indivíduos apresentam de gerarem, através de casamento com pessoa de igual genótipo, filhos com talassemia homozigótica, que é sempre grave.

Embora as síndromes talassêmicas se distribuam universalmente, elas atingem proporções bastante elevadas em populações dos países da área do Mediterrâneo, o que é particularmente verdade para a talassemia β .

As populações caucasóides que deram origem às do Estado de São Paulo procederam, basicamente, de Portugal, Itália e Espanha, e, além disso, cumpre ressaltar que, a partir da segunda metade do século passado, houve maciço contingente migratório italiano para o nosso Estado (CARNEIRO, 1950), procedente, principalmente, da região do vale do Pô e do Sul da Itália, onde a frequência da talassemia β é especialmente alta.

Em vista da situação exposta, é surpreendente que, até o presente, não se tenha iniciado um estudo sistemático dessa condição no Estado de São Paulo, através de uma ampla investigação genético-epidemiológica.

O presente trabalho tem como objetivo contribuir para a avaliação, em nosso meio, do problema das síndromes talassêmicas, investigando a frequência das variantes talassêmicas β e $\delta\beta$.

II. REVISÃO DA LITERATURA

II.1 - A evolução do conceito de talassemia

O termo talassemia foi empregado pela primeira vez por WHIPPLE e BRADFORD (1936) que pretenderam, com esse nome, chamar a atenção para a incidência em populações de origem mediterrânea (talassa, em grego, mar) de um tipo de anemia infantil, que havia sido descrito anteriormente por COOLEY e LEE (1925) em crianças de ascendência italiana, grega e síria.

Paralelamente a essa designação, entretanto, tal tipo de anemia continuou recebendo a denominação de anemia de Cooley, já que coube a esse autor (COOLEY, 1927) demonstrar ser a mesma uma entidade clínica com características próprias, que lhe conferiam individualização dentro do quadro geral das anemias infantis, na época designadas, genericamente, por anemia de Von Jaksch.

Segundo COOLEY (1927), tais características compunham um quadro de anemia hemolítica grave, acompanhada de hepatomegalia, esplenomegalia, alterações dos ossos longos e dos ossos do crânio, aumento da resistência osmótica das hemácias e leucocitose.

No mesmo ano da publicação do trabalho de seus colegas norte-americanos, RIETTI (1925) descreveu, na Itália, a ocorrência de uma anemia hemolítica associada a aumento da resistência osmótica das hemácias, que foi por ele designada como ittero emolitico primitivo.

Aos casos estudados por RIETTI se juntaram outros, com características similares (GREPPI, 1928; MICHELI, PENATI e MOMIGLIANO, 1935), que levaram ao reconhecimento da existência de uma condição mórbida lembrando a anemia de Cooley. Tais casos, porém, não apresentavam as graves manifestações dessa última, permitindo aos indivíduos afetados sobreviver até a idade adulta. Essa anemia passou a ser conhecida por síndrome de Rietti, Greppi e Micheli.

Duas décadas, entretanto, tiveram que decorrer para que se avançasse um pouco mais na compreensão das relações existentes entre a anemia de Cooley e a síndrome de Rietti, Greppi e Micheli. Isto porque, apesar das evidências de parentesco entre as duas entidades clínicas, só depois do trabalho de VALENTINE e NEEL (1944) é que se passou a aceitar a hipótese de que a primeira representava o estado homozigótico de um gene autossômico parcialmente dominante, enquanto a segunda era a expressão clínica do estado heterozigótico da mesma entidade genética.

Em consequência disso, passou-se também a considerar a talassemia como uma doença hereditária que no estado homozigótico (talassemia major) determinava um quadro de anemia grave, geralmente fatal na infância, enquanto em heterozigose (talassemia minor e talassemia minima) podia ocasionar transtornos mais leves, compatíveis com a sobrevivência até a idade adulta.

O impacto causado pelo trabalho de PAULING e colaboradores (1949), demonstrando o comportamento eletroforético anormal da hemoglobina siclêmica teve, como seria de se esperar, repercussão profunda no estudo das hemoglobinas. Isso provocou, consequentemente, a investigação das alterações hemoglobínicas que poderiam estar, eventualmente, vinculadas à talassemia e que permitiriam enquadrá-la dentro das hemoglobinopatias hereditárias.

Os estudos realizados nesse sentido, entretanto, foram, aos poucos, definindo a talassemia como um tipo especial de hemoglobinopatia, diferente, por exemplo, da anemia de células falciformes e de outras alterações congêneres.

ITANO, em 1957, publicou um importante trabalho a respeito das hemoglobinas, no qual sumariou os conhecimentos da época com relação ao assunto e dividiu as hemoglobinopatias hereditárias em duas grandes classes gerais. Em uma das classes incluiu as hemoglobinopatias decorrentes da inibição da síntese da molécula de hemoglobina, sem alteração de suas propriedades físicas. Na outra, reuniu as hemoglobinopatias conseqüentes da síntese de moléculas de hemoglobina diferentes das normais no concernente às suas propriedades físicas. Essas propriedades físicas diferentes,

reveladas sobretudo pelo comportamento eletroforético anormal, estariam relacionadas a alterações estruturais da fração globínica da hemoglobina.

Desse modo, as hemoglobinopatias estruturais caracterizar-se-iam por alterações detectáveis na estrutura da hemoglobina, como as observadas, por exemplo, na anemia de células falciformes. Já nas hemoglobinopatias por deficiência de síntese, cujo exemplo típico seria a talassemia, ocorreria uma diminuição da síntese da fração globínica da hemoglobina, na ausência de alteração estrutural evidenciável.

Aqui é conveniente citar, embora de passagem, que, na época do trabalho de ITANO (1957), eram conhecidas três hemoglobinas normais, ou seja, hemoglobinas A, A₂ e fetal ou F, suspeitando-se já da existência de uma hemoglobina embrionária, além de uma dezena de variantes anômalas. Atualmente, além do reconhecimento das hemoglobinas embrionárias, isto é, GOWER (I e II) e PORTLAND, e da variante normal A₃, produto do envelhecimento da hemoglobina A, conhecem-se mais de cento e vinte hemoglobinas anormais.

Na época que ITANO publicou o trabalho citado, considerava-se a existência de um único locus genético para controle da síntese da fração globínica da hemoglobina, sugerindo esse autor que tal controle poderia dizer respeito simultaneamente à estrutura e ao ritmo de síntese dessa fração. Por isso, baseando-se nessa hipótese, era possível supor que um mutante que afetasse a estrutura da globina poderia afetar, ao mesmo tempo, seu ritmo de síntese. E, de fato, haviam evidências de que a síntese da hemoglobina S da anemia de células falciformes ocorria em menor ritmo do que a da hemoglobina A.

Apoiado nesse raciocínio e numa tentativa de harmonizar as teorias explicativas da produção dessas duas grandes classes de hemoglobinopatias hereditárias, ITANO (1957), lançou a hipótese da substituição aminoácida "silenciosa" da fração globínica da hemoglobina talassêmica. Tal substituição seria incapaz de alterar a carga elétrica total da molécula dessa hemoglobina, que apresentaria, então, comportamento eletroforético normal. Esse defeito estrutural inapa

rente poderia ser o responsável pela inibição seletiva da síntese da hemoglobina A.

INGRAM e STRETTON (1959) também defenderam a hipótese da substituição aminoácida "silenciosa" mas, devido aos progressos ocorridos naqueles dois últimos anos com relação ao conhecimento da composição das hemoglobinas, já puderam suspeitar da localização do eventual defeito estrutural ao nível das cadeias polipeptídicas da fração globínica da hemoglobina.

Uma vez que dois tipos de cadeias peptídicas entram na composição da fração globínica da hemoglobina A ($Hb A = \alpha_2\beta_2$), o defeito estrutural inaparente e a consequente depressão da síntese poderiam dizer respeito a um tipo ou a outro de cadeia, o que falaria a favor da existência de duas variedades de talassemia. Assim, a talassemia que, inicialmente, era considerada como uma única doença, passaria a designar duas, ou seja, as talassemias α e β , identificando-se o quadro clássico com o dessa última variedade. Aqueles casos de talassemia acompanhados pela produção de hemoglobina H (β_4) poderiam ser, segundo aqueles autores, representantes da variedade α .

Embora, na realidade, nunca tivessem sido demonstradas alterações estruturais na talassemia no que diz respeito a simples substituição aminoácida, o trabalho de INGRAM e STRETTON (1959) teve a grande qualidade de chamar a atenção para a depressão seletiva da síntese de determinado tipo de cadeia polipeptídica da fração globínica da hemoglobina, que ocorre nesse tipo de anemia.

Dessa maneira, o novo conceito de talassemia já estava delineado, sendo o mesmo expresso na posterior definição de FESSAS (1966): "talassemia é o conjunto de condições nas quais a síntese de um tipo particular de cadeia polipeptídica da molécula de hemoglobina está diminuída, na ausência de um defeito estrutural demonstrável na mesma". O mecanismo íntimo de tal depressão seletiva, contudo, é desconhecido até hoje, sendo ainda motivo de especulação.

Considerando que na composição das hemoglobinas normais entram cinco diferentes tipos de cadeias polipeptí

dicas, ou seja, $Hb A = \alpha_2\beta_2$, $Hb A_2 = \alpha_2\delta_2$, $Hb F = \alpha_2\gamma_2$ e Hb embrionárias = ϵ_4 , $\alpha_2\epsilon_2$ e $\epsilon_2\gamma_2$, dever-se-iam esperar, como salientou MOTULSKY (1964a), cinco tipos diferentes de talassemia, isto é, talassemias α , β , γ , δ e ϵ . Evidentemente, com exceção da última, todas as outras deveriam ser passíveis de averiguação clínica.

De fato, além das talassemias α e β , mais frequentemente observadas, foram descritos casos de talassemia δ , sobretudo na Grécia (FESSAS e STAMATOYANNOPOULOS, 1962; CHOREMIS et al., 1964) e sugerida a ocorrência de talassemia γ (HAMILTON et al., 1961), a qual veio a ser, posteriormente, confirmada (KAN et al., 1972).

Outra dedução lógica dizia respeito à possibilidade da existência de variedades de talassemia nas quais mais de um tipo de cadeia polipeptídica estaria com sua síntese deprimida.

Realmente, existem vários casos descritos de talassemia $\delta\beta$ ou talassemia F (ZUELZER et al., 1961; FESSAS, 1961; GABUZDA et al., 1964 e WEATHERALL, 1964), bem como de condições relacionadas a esse tipo de talassemia, como é o caso, por exemplo, das síndromes da hemoglobina Lepore. Essas últimas representam estados similares à talassemia, já que associadas a defeitos estruturais da hemoglobina, ou seja, a um grupo de transtornos nos quais há a produção de pequenas quantidades de uma hemoglobina anômala, onde a cadeia peptídica alterada nada mais é do que uma fusão das cadeias β e δ (BAGLIONI, 1962).

Considerando-se esse fato, parece preferível a definição de COMINGS (1970), segundo a qual "talassemia é a depressão hereditária da síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina, excluindo-se a diminuição do ritmo de síntese de cadeias peptídicas anormais, que é observada em algumas hemoglobinopatias caracterizadas por uma simples substituição aminoácida".

Essa definição, embora mais ampla que a de FESSAS (1966), não conceitua, contudo, com precisão, o que é talassemia. De fato, existe uma condição conhecida por persistência hereditária da hemoglobina fetal que se caracteriza por níveis elevados de hemoglobina fetal na idade adulta,

sem apresentar as alterações eritrocitárias características da talassemia. Por outro lado, apesar da síntese de cadeias β e δ estar deprimida em diferentes graus nas diversas variantes dessa condição, ela não é considerada talassemia, justamente pelo fato de não apresentar as características hematológicas peculiares à mesma, características estas que serão discutidas, oportunamente, ainda neste capítulo.

Um outro exemplo no mesmo sentido pode ser dado valendo-se das síndromes da hemoglobina Lepore, as quais são classificadas por uns, como tipos especiais de talassemia e por outros como estados similares à talassemia. Tais síndromes apresentam as características hematológicas da talassemia, embora estejam associadas à produção de cadeias polipeptídicas estruturalmente alteradas.

Do exposto, parece plausível considerar a existência de dois efeitos distintos na talassemia:

- a) Efeito primário - depressão parcial ou total da síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina, sem alteração estrutural evidenciável.
- b) Efeito secundário-produção de alterações talassêmicas nos eritrócitos.

Assim, nas síndromes da hemoglobina Lepore não se observa, a rigor, o efeito primário, enquanto que na persistência hereditária da hemoglobina fetal o que não se observa é o efeito secundário.

Por outro lado, exigir a presença simultânea dos dois efeitos para considerar uma condição hereditária como talassemia, complica bastante o problema, uma vez que as alterações hematológicas são pouco nítidas na talassemia δ heterozigótica, enquanto que a talassemia α condiciona o aparecimento de hemoglobinas francamente anômalas (hemoglobina H e hemoglobina de Bart).

NATHAN e GUNN (1966), apontando um aspecto interessante do problema das talassemias, propuseram uma modificação muito sutil do conceito de talassemia a qual, segundo eles, seria apenas o resultado de um desequilíbrio da síntese de hemoglobinas. Assim, havendo diminuição da síntese de um tipo de cadeia peptídica da hemoglobina, é lógico que as

cadeias não afetadas, que deveriam se combinar com o referido tipo para formar a fração globínica normal, iriam se acumular, o que levaria à formação de maiores quantidades de hemoglobinas diferentes da hemoglobina A, bem como à formação de corpos de inclusão. Estes, que nada mais seriam do que o resultado da precipitação dessas hemoglobinas diferentes, poderiam ser os responsáveis pela maior destruição dos eritrócitos, ou seja, pela hemólise observada. Segundo NATHAN e GUNN (1966), portanto, as manifestações talassêmicas seriam devidas não apenas à sub-produção da hemoglobina A, mas sobretudo à super-produção de determinados tipos de hemoglobina. Assim, por exemplo, no caso da inibição da síntese de cadeias α , haveria na vida fetal um excesso de cadeias γ em relação a cadeias α , com formação de tetrâmeros γ_4 , ou seja, de hemoglobina de Bart. Já no adulto, o excesso de cadeias β levaria à formação de hemoglobina H (β_4), que é instável e se precipita, formando corpos de inclusão. Aqui cumpre assinalar que já se provou que tais corpos de inclusão formados por precipitados de cadeias β aumentam a permeabilidade da membrana dos eritrócitos aos cátions (NATHAN et al., 1969) e tornam também estas células mais sujeitas à captação pelo sistema retículo-endotelial do baço e outros órgãos (NATHAN e GUNN, 1966; RIFKIND, 1966; WENNBORG e WEISS, 1968). No mesmo sentido, as inclusões formadas por outros tipos de precipitados hemoglobínicos apresentam efeitos similares (JACOB et al., 1968).

Apesar disso é conveniente lembrar que a inibição da síntese de cadeias β não provoca grande excesso de cadeias α e conseqüente formação de tetrâmeros α_4 na mesma proporção em que são formados, na situação anterior, os tetrâmeros γ_4 e β_4 .

Para explicar esse último fato, BAGLIONI e COLOMBO (1964) sugeriram, com base em algumas evidências experimentais, que as cadeias β deveriam ser importantes na remoção das cadeias α dos ribossomos e, por isso, nunca ocorreria grande acúmulo dessas últimas, na vigência de depressão da síntese das primeiras. FESSAS (1963), no entanto, sugeriu que os corpos de inclusão por ele demonstrados nos eritroblastos e eritrócitos de talassêmicos β poderiam ser

precipitados insolúveis de cadeias α , o que foi, de fato, confirmado posteriormente (FESSAS et al., 1966).

Em resumo, as definições clássicas expressam, apenas, o que talvez seja o defeito fundamental das talassemias, isto é, diminuição da síntese de um ou mais tipos de cadeias peptídicas da hemoglobina, na ausência de alteração estrutural demonstrável nas mesmas. Por outro lado, fica patente que o conceito de talassemia sofreu uma evolução, passando de simples nome de uma entidade mórbida para a denominação de um conjunto de entidades genético-clínicas distintas, que mereceram de WEATHERALL (1967) a designação mais genérica de síndromes talassêmicas.

De qualquer modo, esse processo evolutivo continua, visto que ainda não se dispõe, no momento, de uma conceituação precisa de tão complexas entidades, que continuam revelando novas e inesperadas facetas com o prosseguir das investigações.

II.2 - As variedades de talassemia

A classificação das síndromes talassêmicas ainda é um assunto difícil e controvertido. De fato, além de elas incluírem diferentes entidades genéticas, ainda se deve considerar o amplo espectro de variações da manifestação homoe heterozigótica de diferentes sistemas alélicos, a associação desses sistemas com os produtores de outras hemoglobinopatias, bem como a ocorrência de estados similares à talassemia, como, por exemplo, a persistência hereditária da hemoglobina fetal. Ao analisar essas dificuldades, COMINGS (1970) comentou com uma ponta de ironia que, "infelizmente, quando a Natureza produziu as talassemias, ela não tinha em mente o irreprimível desejo do homem de fazer classificações".

Em consequência dos obstáculos opostos à classificação das talassemias e tendo em vista os objetivos do presente trabalho, parece, pois, pertinente que se procure dar, no momento, uma visão panorâmica das síndromes talassêmicas, apenas para possibilitar àqueles pouco familiarizados com tais entidades genético-clínicas, melhor situação no proble

ma.

A compreensão das talassemias exige conhecimentos profundos de detalhes íntimos dos mecanismos genéticos de controle da síntese de hemoglobinas, assunto extremamente complexo, terreno de inúmeras investigações e múltiplas hipóteses. Enveredar pelo mesmo seria fugir da finalidade a que se destina este trabalho, mas, por outro lado, seria impossível comentar as talassemias sem mencionar alguns aspectos genéticos da síntese de hemoglobinas.

Torna-se imprescindível, no entanto, uma menção de alerta contra os perigos do raciocínio simplificado e da aceitação de hipóteses como verdades, acentuando, novamente, que a presente abordagem do assunto destina-se, unicamente, ao fornecimento de uma visão geral dos aspectos mais importantes das condições patológicas estudadas, para aqueles não familiarizados com o problema das talassemias.

Com base nessa linha de raciocínio pode-se, inicialmente, reunir as talassemias em dois grandes grupos, conforme estejam associadas à depressão da síntese de um, ou de mais de um tipo de cadeia peptídica da fração globínica da hemoglobina.

O primeiro grupo compreende as talassemias α , β , γ e δ , e, dentro do segundo, merecem atenção especial as talassemias $\alpha\beta$, $\delta\beta$, $\gamma\beta$ e β - $\delta\beta$. Chama a atenção o fato da talassemia $\delta\beta$ constituir uma entidade genética isolada, conhecida por talassemia F, enquanto que as talassemias $\alpha\beta$, $\gamma\beta$ e β - $\delta\beta$ representam estados duplamente heterozigóticos.

II.2.1 - Talassemias do primeiro grupo

TALASSEMIAS α

As talassemias α têm sido objeto de intensas investigações que estão reformulando sua sub-classificação. Inicialmente, considerava-se a existência de apenas um locus genético para a cadeia α , com um alelo para a talassemia α , o qual poderia se manifestar em heterozigose ou em homozigose, sendo esta última condição incompatível com a vida fetal. A doença da hemoglobina H era considerada como pertencente ao quadro geral das talassemias α , pelo fato de

incluir na sua fisiopatogenia, entre outros fatores, a presença do gene da talassemia α .

WASI e colaboradores (1964) propuseram a existência de dois alelos para a talassemia α , que poderiam ser representados por α^T_1 e α^T_2 , causando o primeiro inibição completa da síntese de cadeias α e o segundo inibição apenas parcial da mesma. O gene α^T_1 em homozigose seria causa de hidropsia fetal, com morte intra-uterina e a presença dos genes α^T_1 e α^T_2 , simultaneamente, causaria a doença da hemoglobina H.

LEHMANN e CARREL (1968), por outro lado, propuseram a hipótese de que a variação de gravidade observada nas talassemias α poderia ser devida à existência de dois loci genéticos ligados, os quais determinariam a produção de cadeias α . Com base nessa hipótese, LEHMANN (1970) previu a possibilidade teórica de nove genótipos condicionadores de talassemia α . Na fig.II.1 foram representadas as combinações entre os loci gênicos propostos por LEHMANN e CARREL (1968) para a determinação desses genótipos.

Segundo LEHMANN (1970), a depressão de um gene tende a deprimir também aqueles genes que o sucedem imediatamente ao longo do cromossomo e, pelo contrário, a estimular a atividade dos que o precedem imediatamente e, por isso, as talassemias α -I causariam maiores deficiências de cadeias α do que as α -II. Saliente-se, no entanto, a existência de evidências tanto a favor como contra essa hipótese, não sendo possível, como comentou WASI (1970), comprová-la nem desmentí-la.

WASI e colaboradores (1972) demonstraram que a hemoglobina Thai pode ter participação importante em algumas formas de pseudo-talassemia α . Essa hemoglobina, frequente em tailandeses, possui suas cadeias α estruturalmente alteradas, sendo encontrada em pequenas quantidades, constituindo, apenas, 1% a 2% da hemoglobina total. Segundo os autores, o gene da hemoglobina Thai produz depressão intensa da síntese das cadeias α , possuindo, portanto, um efeito talassêmico α -símile.

Dentro do quadro das talassemias α devem ser consideradas também suas formas de interação com as altera-

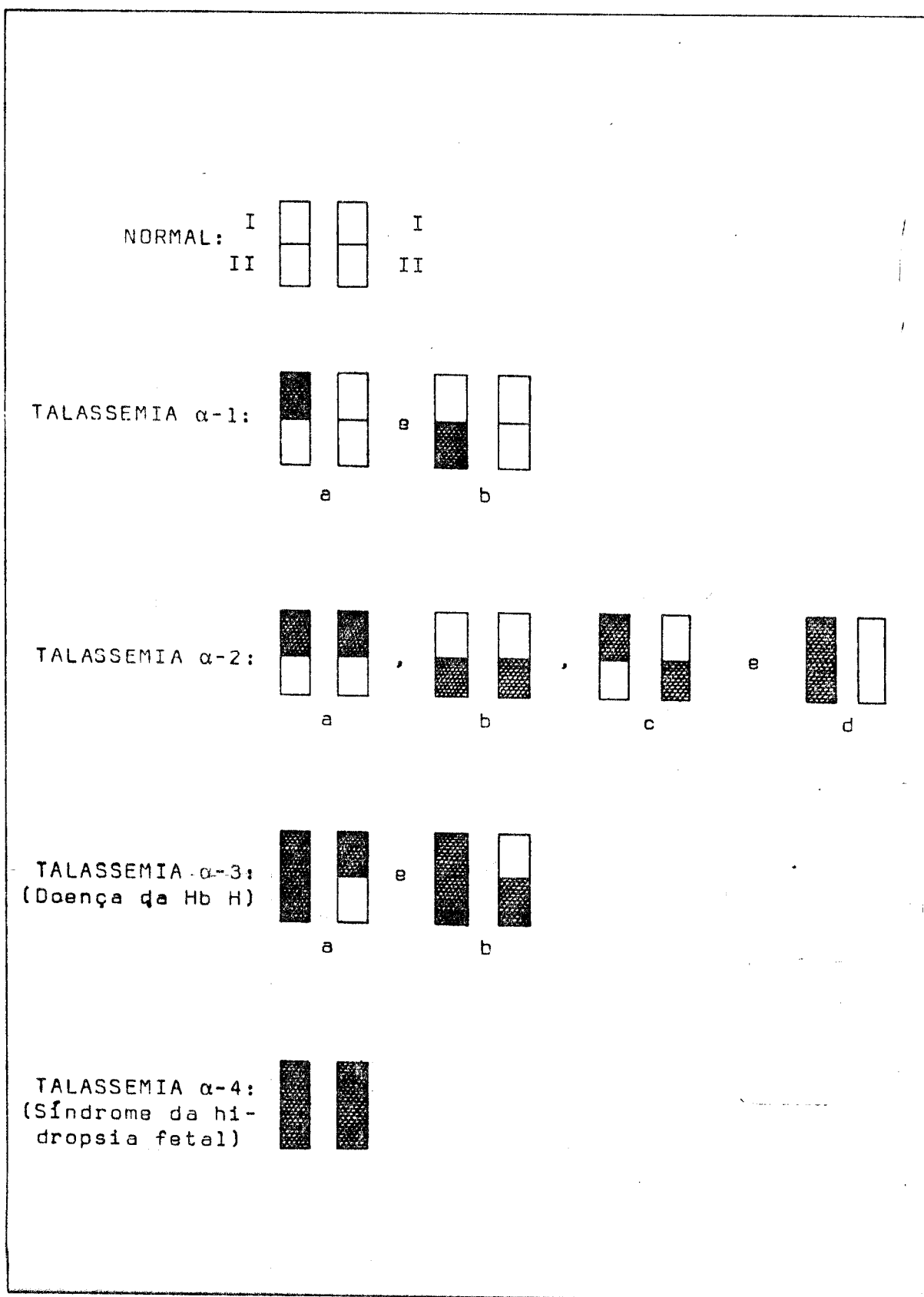


Fig.II.1 - Representação esquemática das combinações entre os loci gênicos da talassemia α segundo a hipótese de LEHMANN e CARREL (1968). Os símbolos escuros indicam os alelos mutantes.

ções estruturais de cadeia α , como é o caso, por exemplo, da talassemia α de hemoglobina Q (VELLA et al., 1958; DORMONDY et al., 1961; LIE-INJO e de HART, 1963), descrita sobretudo em chineses, e a talassemia α de hemoglobina I (ATWATER et al., 1960).

A talassemia α , associada a variantes estruturais de cadeia β , é designada por talassemia α não interativa, havendo várias descrições de casos de talassemia α de células falciformes (ZUELZER et al., 1956; COHEN et al., 1959), talassemia α de hemoglobina C (ZUELZER e KAPLAN, 1954) e talassemia α de hemoglobina E (WASI et al., 1969).

Enquanto na talassemia α interativa a hemoglobina anômala (Hb Q ou Hb I, por exemplo) aparece em porcentagens superiores às esperadas se o indivíduo fosse heterozigoto apenas da hemoglobinopatia estrutural, na talassemia α não interativa as porcentagens de hemoglobina anômala (Hb S ou Hb C, por exemplo) são inferiores às esperadas.

TALASSEMIAS β

O sub-tipo mais frequentemente descrito é a talassemia A2 (talassemia β associada a níveis elevados de hemoglobina A2), encontrado nas formas hetero- e homozigótica.

Usando a nomenclatura proposta por FESSAS (1965), essa seria a talassemia β tipo 1.

O aumento do nível de hemoglobina A2, caracteristicamente observado na forma heterozigótica, traduz, como se sabe, um aumento da síntese de cadeias δ . De acordo com GERALD (1964), trata-se, apenas, de um aumento relativo, pois, segundo ele, na talassemia β heterozigótica existem, praticamente, dois genes de cadeia δ ativos para cada gene de cadeia β funcional. Realmente, a proporção de hemoglobina A2 na maioria dos portadores de talassemia A2 heterozigótica varia de 4% a 6%, enquanto que no indivíduo normal são encontrados valores de 2% a 3% (GERALD e DIAMOND, 1958).

ZUCKERKANDL (1964) demonstrou que a explicação para tal fato não é tão simples assim, existindo, na verdade, efeitos compensatórios complexos atuando na síntese das cadeias peptídicas da hemoglobina. Tais efeitos seriam observados entre sistemas sintetizantes controlados por genes ale

los e não alelos. Assim, o gene da talassemia β causaria, através de mecanismos compensatórios complexos, maior atividade do seu alelo normal, bem como dos genes responsáveis pela produção de cadeias δ e γ . E, de fato, verificou-se um aumento absoluto na quantidade de cadeias δ na talassemia A2 heterozigótica, variando esse aumento de vinte por cento até várias vezes o nível normal de cadeias δ (ZUCKERKANDL, 1964).

Com relação às cadeias γ , no entanto, observou-se um efeito diferente. Assim sendo, o nível de hemoglobina F nos talassêmicos A2 heterozigotos é muito variável, não tendo sua determinação, inclusive, grande valor diagnóstico dessa condição (BEAVEN et al., 1961; WEATHERALL, 1964, 1967). Por outro lado, aumentos constantes e significativos dessa hemoglobina são observados na forma homozigótica da talassemia A2 (VECCHIO, 1948; SINGER et al., 1951; RICH, 1952; ROCHE et al., 1953; WHITE e BEAVEN, 1959; WEATHERALL e VELLA, 1960). É possível, portanto, que a ativação dos loci responsáveis pela produção de cadeias γ exija, entre outros fatores, a diminuição do nível de cadeias β abaixo de determinado valor crítico. Provavelmente, o aumento da produção de cadeias γ é observado como resposta a uma condição particular, criada secundariamente pelos níveis baixos de cadeias β (ZUCKERKANDL, 1964).

Cumpre assinalar, por outro lado, a existência de provas evidentes da estreita união entre os loci das cadeias β e δ (SMITH e TORBERT, 1958; CEPPELLINI, 1959; HORTON et al., 1961; BOYER et al., 1963; HORTON e HUISMAN, 1963; RANNEY et al., 1963), explicando LEHMANN (1970) o aumento da síntese das cadeias δ , observado na talassemia A2, pelo fato do gene de tal cadeia preceder, imediatamente, àquele da cadeia β no mesmo cromossomo, e ser estimulado quando este último estiver deprimido.

Sabe-se que a talassemia A2 inclui variantes severas e brandas. Na talassemia β de caucasóides, a razão β/α nos heterozigotos, obtida por métodos de separação cromatográfica das cadeias globínicas, pode ser um indicador da possível gravidade clínica do homozigoto eventualmente gerado por tais indivíduos (KAN e NATHAN, 1971). Assim, se

um dos genitores possuisse uma razão β/α maior que 0,5, o risco de gravidade da doença na forma homozigótica diminuiria bastante.

Essa razão β/α é consideravelmente maior que 0,5 na maioria dos talassêmicos β heterozigotos negróides (HAMILTON e SCHWARTZ, 1970; BRAVERMAN et al., 1971) e é comum encontrar-se quantidade apreciável de hemoglobina A em pacientes negróides com talassemia β homozigótica. Já nos talassêmicos β homozigotos de origem mediterrânea, geralmente, encontra-se pequena quantidade de hemoglobina A (NATHAN, 1972).

SCHWARTZ (1969) demonstrou existir, sobretudo entre negros, uma condição extremamente branda de talassemia β , definindo um estado de portador assintomático da mesma.

O outro sub-tipo de talassemia β , menos frequentemente descrito, é a talassemia A2F, representada por casos de talassemia β que revelam, no estado heterozigótico, níveis elevados de hemoglobinas A2 e F (SCHOKKER et al., 1966).

Existam ainda várias descrições de casos cujo quadro hematológico é idêntico ao da talassemia A2 heterozigótica, mas que revelam, ao estudo hemoglóbínico, níveis normais de hemoglobinas A2 e F (BERNINI et al., 1962; BEAVEN et al., 1964; WEATHERALL, 1964).

Entre as talassemias β interativas chamam a atenção, sobretudo, a talassemia β de células falciformes (SILVESTRONI e BIANCO, 1955; CHOREMIS e ZANNOS, 1957; AKSOY, 1959; CHATTERJEA, 1959; WATSON-WILLIAMS, 1963; PEARSON, 1969; GIERTLER et al., 1971; CONDON e SERJEANT, 1972; DUNSTON et al., 1972), a talassemia β de hemoglobina C (SINGER et al., 1954; ZUELZER e KAPLAN, 1954; SMITH e KREVANS, 1959; PORTIER et al., 1960; PEROSA et al., 1961; GÖKSEL e TARTAROGLU, 1961; BLATRIX et al., 1970) e a talassemia β de hemoglobina E (MINNICH et al., 1954; NA-NAKORN, 1959; de SILVA et al., 1959; AUNG-THAN-BATU et al., 1971).

TALASSEMIA γ

A existência da talassemia γ foi sugerida por HAMILTON e colaboradores (1961), tendo sido demonstrada, posteriormente, através de estudos radiocromatográficos do sangue de recém-nascidos (KAN et al., 1972).

A diminuição da síntese de cadeias γ deve produzir manifestações já na vida intra-uterina, uma vez que a principal hemoglobina dessa fase da vida, ou seja, a hemoglobina F, não é produzida adequadamente (STAMATOYANNOPOULOS, 1971).

Partindo da hipótese da existência de vários genes estruturais responsáveis pela produção de cadeias γ , ocupando diferentes loci gênicos (SCHROEDER et al., 1968), pode-se supor que a gravidade do quadro dependerá do número de mutantes presentes no indivíduo, sendo a condição letal quando não houver formação de cadeias γ .

Obviamente, o diagnóstico deve ser estabelecido no período neonatal, pois, posteriormente, ocorrerá a substituição da síntese de cadeias γ por cadeias β .

TALASSEMIA δ

Existem descrições de casos desse tipo de talassemia, sobretudo na Grécia (FESSAS e STAMATOYANNOPOULOS, 1962; CHOREMIS et al., 1964), estando, nesses casos, afetada a produção do componente hemoglobínico normal menor, ou seja, da hemoglobina A₂.

II.2.2 - Talassemias do segundo grupo

TALASSEMIA $\alpha\beta$

A combinação das talassemias α e β foi descrita pela primeira vez por FESSAS (1961) em três indivíduos que apresentavam, simultaneamente, talassemias α e A₂. Outros casos com a mesma alteração hematológica foram descritos posteriormente por BERNINI et al. (1962), WEATHERALL (1963) e WASI et al. (1969).

KAN e NATHAN (1970), ao ampliar o número de casos descritos, propuseram que a interação dos genes para as talassemias α e β produziria uma diminuição do desequilíbrio entre as cadeias peptídicas da globina, atenuando as manifestações clínicas desse tipo de talassemia.

Aqui cumpre notar que WASI e colaboradores (1969) descobriram um interessante caso de talassemia $\alpha\beta$ do hemoglobina E.

TALASSEMIA $\delta\beta$

A talassemia $\delta\beta$ também é conhecida por talassemia F, sendo considerada por muitos autores como um sub-tipo da talassemia β .

Juntamente com a talassemia F devem ser citados os estados similares à talassemia, ou seja, as síndromes da hemoglobina Lepore e a persistência hereditária da hemoglobina fetal, devido às evidentes relações de parentesco entre as mesmas.

Os primeiros casos de talassemia F foram descritos em italianos residentes nos EE.UU (ZUELZER et al., 1961), em gregos (FESSAS, 1961; GABUZDA et al., 1964) e em negróides (WEATHERALL, 1964).

É mais frequentemente encontrada na forma heterozigótica, quando associada a níveis normais ou baixos de hemoglobina A2 e a níveis elevados de hemoglobina F, mas já foi descrita também na forma homozigótica (BRANCATI e BAGLIONI, 1966; RAMOT et al., 1970) na qual é observada completa supressão da síntese de cadeias β e δ .

As bases genéticas da talassemia F são de particular interesse, já que representariam a supressão da atividade de dois genes estruturais ligados. Essa talassemia poderia ser o resultado da deficiência completa dos genes β e δ , o que não explica, contudo, as alterações eritrocitárias típicas da talassemia (COMINGS e MOTULSKY, 1966). Realmente, a ausência de anemia na persistência hereditária da hemoglobina fetal homozigótica indica que a ausência de síntese de cadeias β e δ não é suficiente para causar, por si só, o quadro hematológico da talassemia.

As várias possibilidades genéticas aplicáveis a essa condição são apresentadas detalhadamente no trabalho de COMINGS e MOTULSKY (1966).

As síndromes da hemoglobina Lepore compreendem um grupo de transtornos associados à produção de pequenas quantidades de hemoglobina anômala, onde a cadeia peptídica alterada nada mais é do que a fusão das cadeias β e δ (BAGLIONI, 1962). A origem desse polipeptídeo de fusão $\delta\beta$ pode ser explicada através do mecanismo genético de permutação desigual produzindo um gene de fusão $\delta\beta$ (BAGLIONI, 1962; NANCE,

1963; GERALD, 1964). O esquema da fig.II.2 dá uma idéia visual dessa hipótese.

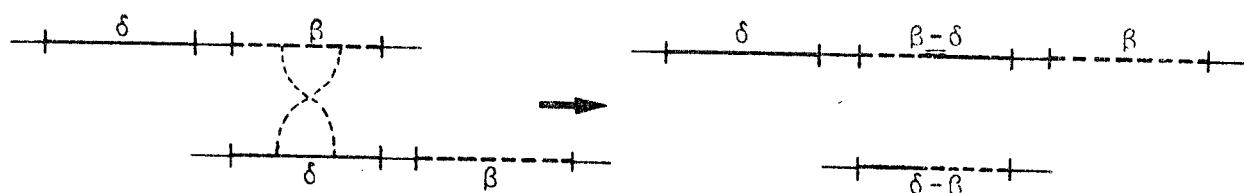


Fig.II.2 - Esquema ilustrativo da hipótese de BAGLIONI (1962) para explicar a origem de um gene determinante do polipeptídeo $\delta\beta$.

O produto recíproco dessa permutação desigual, ou seja, o polipeptídeo de fusão $\beta\delta$ também já foi descrito na hemoglobina Miyada, mais conhecida pela denominação de hemoglobina anti-Lepore (OHTA et al., 1971).

Merece referência especial o fato dessas cadeias $\delta\beta$ e $\beta\delta$, do mesmo modo que as cadeias δ , serem sintetizadas apenas nos estágios iniciais de maturação das células eritróides, antes de ser atingida a fase reticulocitária (ROBERTS et al., 1973).

TALASSEMIA $\gamma\beta$

KAN e colaboradores (1972) descreveram, pela primeira vez, o caso de uma criança com anemia hemolítica hipocrômica e microcítica com eritroblastose ao nascimento, que veio a ser diagnosticada como portadora de talassemia $\gamma\beta$.

Para explicar esse acontecimento, pode-se utilizar a hipótese de SCHROEDER e colaboradores (1968), que defendem a existência de vários loci responsáveis pela produção de cadeias γ , podendo existir um locus para a referida cadeia de cada lado dos loci para as cadeias β e δ (HUISMAN et al., 1970). Assim sendo, a deficiência de um segmento cromossômico contendo esses loci foi proposta como mecanismo possível na gênese desse tipo de talassemia (KAN et al., 1972).

TALASSEMIA $\beta-\delta\beta$

A talassemia $\beta-\delta\beta$, cujo quadro clínico é semelhante ao da talassemia A2 homozigótica, nada mais é que o resultado da interação das talassemias A2 e F (ZUELZER et al., 1961; FESSAS, 1961; WOLF e IGNATOV, 1963).

II.3 - As bases moleculares das talassemias

De acordo com HARRIS (1973), dois tipos de hipóteses podem ser feitas a respeito da natureza das mutações que levam à síntese defeituosa das cadeias globínicas nas talassemias. Uma, é que as mutações ocorrem no próprio locus estrutural que determina a sequência aminoácida da cadeia afetada no seu ritmo de síntese. Nesse caso, os genes da talassemia seriam alelos dos que determinam as variantes estruturalmente alteradas da mesma cadeia. A outra hipótese é que a mutação afeta um locus diferente, o qual está, no entanto, diretamente envolvido na regulação do ritmo de síntese da referida cadeia.

Importantes informações a respeito dessa questão podem ser obtidas por intermédio do estudo de filhos de indivíduos duplamente heterozigotos da talassemia e de uma hemoglobinopatia estrutural afetando a mesma cadeia, ou seja, de portadores de uma talassemia interativa. Considerável número de famílias nessa situação foi estudado e está claro que os filhos desses indivíduos duplamente heterozigotos ou recebem o gene da talassemia, ou o gene da variante estrutural, mas nunca os dois, ou nenhum. Isso sugere que os genes da talassemia e da hemoglobinopatia estrutural ocupam o mesmo locus, isto é, são alelos, ou, se ocuparem loci separados, estes devem estar completamente ligados.

Se o gene da talassemia β , por exemplo, ocupa, de fato, um locus diferente do estrutural da cadeia β , mas completamente ligado a ele, as manifestações do indivíduo duplamente heterozigoto, como, por exemplo, do portador da talassemia de células falciformes, indicam, claramente, que o gene da talassemia pode, apenas, reprimir a atividade do locus estrutural localizado no mesmo cromossomo, já que o ritmo de síntese da cadeia β estruturalmente alterada (β^s) não está afetado no mesmo grau.

Segundo essa hipótese, o locus da talassemia deve corresponder, de acordo com o modelo de Jacob e Monod, a um operador, que estaria especificamente relacionado ao controle da atividade do gene estrutural adjacente. Deve ser notado que, se a síntese de cadeias δ não está reprimida na

talassemia A2, mas, pelo contrário, estimulada, seria necessário supor que os loci estruturais β e δ , completamente ligados, não estão sob o controle do mesmo operador, não constituindo, assim, um operon.

Se, por outro lado, os genes das talassemias representam mutações que ocupam o mesmo locus que determina a estrutura da cadeia afetada em sua síntese, resta saber, exatamente, como tais mutantes condicionam tal depressão de síntese.

O desenvolvimento de um método de separação cromatográfica das cadeias peptídicas da fração globínica da hemoglobina por CLEGG, NAUGHTON e WEATHERALL (1965) permitiu o estudo da incorporação de aminoácidos marcados em cadeias isoladas, mediante incubação celular in vitro (WEATHERALL, CLEGG e NAUGHTON, 1965). Os métodos radiocromatográficos passaram, desde então, a ser usados para o diagnóstico das talassemias α (CLEGG e WEATHERALL, 1967; KAN et al., 1968), β (WEATHERALL, CLEGG e NAUGHTON, 1965; BANK e MARKS, 1966; KAN e NATHAN, 1968) e γ (KAN et al., 1972). Diga-se, de passagem, que tais métodos tornaram possível o diagnóstico da talassemia β heterozigótica ao nascimento, mediante estudo do sangue do cordão umbilical (KAN e NATHAN, 1968).

De qualquer modo, essas técnicas de incubação, embora realizadas in vitro e relacionadas apenas a vestígios da síntese protéica dos reticulócitos, permitiram uma evidência mais direta da redução da síntese de cadeias α e β nas talassemias α e β . Tal fato, como seria de se esperar, incentivou, ainda mais, as investigações a respeito das bases moleculares de tal depressão de síntese. Com relação a esse assunto, pensou-se, inicialmente, numa deficiência numérica de ribossomos nos reticulócitos talassêmicos. Entretanto, como tal deficiência só poderia explicar a diminuição da síntese da hemoglobina total e não da de determinados tipos de cadeias peptídicas em particular, as pesquisas de BURKA e MARKS (1963) nesse sentido tiveram o resultado que seria de se esperar, ou seja, a constatação de um número normal de ribossomos nos reticulócitos talassêmicos.

Além disso, BANK e MARKS (1966) demonstraram que os ribossomos dos eritroblastos talassêmicos também funcio-

navam normalmente, pelo menos no que diz respeito à sua resposta a um ARN mensageiro artificial, do tipo do ácido poliridílico. Trabalhos posteriores vieram a confirmar a inexistência de alterações da função ribossômica na talassemia (GILBERT et al., 1970; NIENHUIS et al., 1971).

INGRAM (1964) havia proposto a hipótese de que o defeito fundamental nessa hemoglobinopatia poderia ser a produção de ARNs mensageiros defeituosos comandando a síntese de cadeias α ou β . De fato, as pesquisas dirigidas ao esclarecimento dessa hipótese reconheceram a existência de alterações no ARN mensageiro dos reticulócitos talassêmicos (BENZ e FORGET, 1971; NIENHUIS e ANDERSON, 1971; NATTA et al., 1973), embora não pudessem distinguir entre a produção de pequena quantidade de ARN mensageiro normal e a produção quantitativamente normal ou aumentada de um ARN mensageiro instável. Segundo NATHAN (1972), embora não se possa, no momento, optar por nenhuma dessas duas alternativas, existem mais indicações de que o defeito primário na talassemia seja, realmente, a produção diminuída de ARN mensageiro normal. Trabalhos recentes estão trazendo maiores evidências a favor de tal deficiência quantitativa do ARN mensageiro na síntese das cadeias peptídicas da hemoglobina do talassêmico, o que está promovendo, aos poucos, a transferência das pesquisas bioquímicas a respeito das talassemias, do citoplasma para o núcleo da célula (NATHAN, 1973).

II.4 - Principais aspectos clínicos e laboratoriais das talassemias

Nos tópicos da presente seção serão abordados, apenas, os principais aspectos clínicos e laboratoriais das formas mais frequentemente descritas de talassemia, ou seja, das talassemias α , β e $\delta\beta$, com ênfase especial às duas últimas, mais diretamente relacionadas a esta pesquisa, visto que os outros tipos de talassemia, bem como os estados talassêmicos-símbles fogem ao escopo desta investigação.

II.4.1 - Talamias α

Segundo WEATHERALL (1967), os portadores do traço

talassêmico α são reconhecidos, na infância, por apresentarem níveis elevados de hemoglobina de Bart (5% a 15% da hemoglobina total), mostrando, na idade adulta, um quadro hematológico normal ou ligeiramente alterado. Nesse último caso, os portadores adultos podem revelar anisopoiquilocitose e hipocromia moderadas, aumento da resistência osmótica das hemácias, níveis normais de hemoglobinas A2 e F e, ocasionalmente, presença de corpos de inclusão nas hemácias ou vestígios de hemoglobina de Bart ou de hemoglobina H, demonstráveis, apenas, mediante uso de técnicas eletroforéticas muito sensíveis.

Embora algumas crianças normais apresentem ao nascimento pequenas quantidades de hemoglobina de Bart (FESSAS e MASTROKALOS, 1959; VELLA, 1959; DANCE e HUHENS, 1962; WEATHERALL, 1963), a presença da mesma nos níveis de 5% a 15% constitui a melhor indicação para o diagnóstico de tal estado talassêmico. É por isso que o período neonatal é o mais propício para o diagnóstico da talassemia α (MALAMOS, FESSAS e STAMATOYANNOPOULOS, 1962), a qual é dificilmente diagnosticável em indivíduos adultos. De fato, o diagnóstico do traço talassêmico α no adulto pode ser extremamente difícil, pelo fato de o equilíbrio na síntese das várias frações se manter constante, não existindo, praticamente, excesso de cadeias γ ou β . A única indicação da deficiência de síntese de cadeias α pode ser a presença de corpos de inclusão de hemoglobina H em algumas raras células mas, mesmo estes, estão ausentes frequentemente (FESSAS, 1965).

SCHMAIER e colaboradores (1973) demonstraram a eficiência da determinação eletrônica do volume corpuscular médio (V.C.M.) e da hemoglobina corpuscular média (Hb.C.M.) das hemácias como testes de triagem do traço talassêmico α no período neonatal. Segundo os autores, um V.C.M. menor ou igual a $94 \mu^3$ e uma Hb.C.M. menor ou igual a 29 pg, no recém-nascido, devem ser considerados anormais, merecendo a criança um estudo eletroforético de suas hemoglobinas. A presença da hemoglobina de Bart em quantidades apreciáveis (5% a 19%) estabelece o diagnóstico do traço talassêmico α .

Já um defeito grave na síntese de cadeias α , por seu lado, é incompatível com a sobrevivência, levando à mor

te fetal ou neonatal, apresentando a criança hidropsia generalizada, hepatomegalia e níveis de hemoglobina de Bart de 80% a 100% da hemoglobina total (LIE-INJO et al., 1962; BANWELL e STRICKLAND, 1964; DIAMOND et al., 1965; PEARSON, 1965; KAN et al., 1967; POOTRAKUL et al., 1967; TODD et al., 1967; BOON, 1973). Nesse caso, a morte parece ser decorrente de hipóxia, visto que a hemoglobina de Bart é um pigmento respiratório ineficiente para fornecer oxigênio aos tecidos em condições fisiológicas (HORTON et al., 1962).

É possível identificar, na maioria dos casos, outro componente hemoglobínico de migração eletroforética mais lenta do que a da hemoglobina de Bart, constituindo cerca de 10% a 15% da hemoglobina total. Discute-se a natureza desse componente, que não foi, ainda, claramente identificado. Apesar disso existem indicações de que tal componente é uma hemoglobina embrionária normal, a hemoglobina de Portland, cuja fração globínica está constituída por cadeias ϵ e γ (WEATHERALL et al., 1970).

Segundo WASI e colaboradores (1969), a hepatomegalia dos portadores de hidropsia fetal por deficiência grave da síntese de cadeias hemoglobínicas α é muito mais acentuada do que a esplenomegalia, ao contrário do que ocorre nos portadores de hidropsia fetal por isoimunização por incompatibilidade sanguínea. Os mesmos autores assinalam que cerca de metade das mães de tais indivíduos desenvolvem toxemia gravídica durante a gestação desses casos.

A placenta do talassêmico α , por sua vez, apresenta características francamente patológicas, sendo maior e mais grossa do que a normal, além de ser bastante friável (BANWELL e STRICKLAND, 1964; DIAMOND et al., 1965; WASI et al., 1969).

A chamada doença da hemoglobina H, estudada dentro do panorama geral das talassemias α , se apresenta em quadros clínicos bastante variáveis. As manifestações mais frequentes são aquelas decorrentes de uma anemia prolongada, sobretudo astenia intensa, podendo ocorrer esplenomegalia (RIGAS et al., 1955; MINNICH et al., 1958; VELLA et al., 1958; FESSAS, 1959; WOODROW et al., 1964). Os dados laboratoriais mais característicos dessa hemoglobinopatia são a pre-

sença da hemoglobina H em níveis de 5% a 30% da hemoglobina total e os corpos de inclusão nas hemácias (GOUTTAS et al., 1955), identificáveis após incubação dessas células com azul-cresil brilhante.

II.4.2 - Talassemias β

A principal variante das talassemias β , ou seja, a talassemia A2 ou tipo 1, apresenta, na sua forma homozigótica, manifestações clínicas decorrentes de anemia hemolítica grave, com repercussão acentuada sobre o crescimento e o desenvolvimento do indivíduo, hepatomegalia, esplenomegalia e alterações ósseas típicas. Esse quadro clínico define a talassemia major, também conhecida pelas denominações de anemia de Cooley, síndrome de Cooley e Lee, síndrome de Damesheck, eritremia familiar crônica, anemia eritroblástica primária, leptocitose hereditária, anemia do Mediterrâneo e anemia das células em alvo (JABLONSKI, 1969).

Pelo fato de a síntese da hemoglobina A nessa condição mórbida estar deprimida, a talassemia A2 homozigótica pode ser classificada como uma anemia hipocrômica. Realmente, é possível observar uma hipocromia notável nos esfregaços sanguíneos, com numerosas hemácias apresentando quantidade muito pequena de hemoglobina.

É provável que vários tipos de genes mutantes (alelos talassêmicos) possam causar a talassemia A2 e, embora todos eles provoquem depressão da síntese de cadeias β da fração globínica da hemoglobina, o grau em que isso ocorre parece variar consideravelmente de um gene mutante para outro (HARRIS, 1973). Já foi citado o fato de que as variantes brandas da talassemia A2 são mais frequentes em negróides (SCHWARTZ, 1969; HAMILTON e SCHWARTZ, 1970; BRAVERMAN et al., 1971) e, mesmo entre os caucasoídes, também é possível observar nítida variação da sua gravidade, embora ela seja, geralmente, maior do que a observada entre os negróides. Estudos bioquímicos realizados em pacientes talassêmicos italianos de Ferrara e da Sicília, por exemplo, demonstraram que a sua anormalidade básica consistia, respectivamente, na ausência (depressão completa) e na simples diminuição (de-

pressão parcial) da síntese das cadeias β da fração globínica da hemoglobina (CONCONI et al., 1970).

Embora a talassemia A2 homozigótica seja considerada uma anemia hipocrômica, ela também tem que ser classificada dentre as anemias hemolíticas, pelas suas manifestações e, principalmente, pelo fato de os casos que a apresentam mostrarem, a despeito da hiperplasia eritróide da medula óssea, baixa taxa de hemácias nos hemogramas (1 a 2 milhões por mm^3 de sangue). Realmente, na talassemia A2 homozigótica, a anemia hipocrômica é acompanhada por um aumento ineficiente da eritropoiese (STURGEON e FINCH, 1957) e rápida destruição dos eritrócitos recém-formados (GABUZDA et al., 1963), o que limita acentuadamente a capacidade compensatória da medula óssea, mesmo estando seus depósitos de ferro aumentados.

A fisiopatogenia dessa anemia hemolítica só pôde ser vislumbrada depois que se descobriu que os corpos de inclusão, visíveis com microscópio de fase e coráveis com violeta de metila, presentes nos eritroblastos e eritrócitos de pacientes com talassemia β homozigótica são precipitados insolúveis de cadeias α (FESSAS, 1963; FESSAS et al., 1966).

CONCONI e colaboradores (1970), usando técnica radiocromatográfica, também comprovaram a ocorrência de um excesso de cadeias α em lisados de reticulócitos de talassêmicos β homozigotos. Observaram, entretanto, que o excesso de cadeias α só dizia respeito àquelas cadeias marcadas radioativamente, ou seja, às recém-sintetizadas. Concluíram, portanto, que o excesso de cadeias α não se acumula totalmente no citoplasma da célula talassêmica, sendo removido de alguma maneira. De fato, se tais cadeias não fossem removidas, deveria ser encontrado, também, um grande excesso de cadeias α não radioativas e, portanto, previamente sintetizadas. Pesquisando o destino das cadeias α excedentes, esses autores encontraram duas vias distintas de trocas:

- a) através de um processo rápido, ocorre troca entre as cadeias α recém-sintetizadas e as previamente existentes e constituintes das hemoglobinas;
- b) através de um processo mais lento, ocorre troca entre as cadeias α recém-sintetizadas e aquelas previamente existentes e constituintes de um "pool" localizado, provavel-

mente, no retículo endoplasmático dos reticulócitos talassemicos. Tal retículo se veria sobrecarregado pelo excesso de cadeias α retiradas do citoplasma, o que causaria alteração progressiva de suas propriedades físico-químicas. Com o tempo, o retículo endoplasmático desapareceria da célula e, juntamente com ele, as cadeias α a ele ligadas.

BANK e colaboradores (1969), entretanto, encontraram evidências de haver digestão proteolítica do excesso de cadeias α na talassemia β .

Aqui é interessante, ainda, mencionar o fato de se ter encontrado uma correlação linear negativa entre o excesso de cadeias α e a sobrevivência das hemácias talassêmicas (VIGI et al., 1969). Assim sendo, quanto maior o excesso de cadeias α , menor a sobrevivência das hemácias, indicando que o excesso de cadeias α é, realmente, um fator importante na patogenia das manifestações hemolíticas presentes na talassemia β .

Nos pacientes não esplenectomizados é possível observar grande quantidade de eritrócitos gutiformes, com corpos de inclusão acumulados na sua parte mais delgada (NATHAN e GUNN, 1966).

Após esplenectomia, não são observadas mais as células gutiformes e os eritrócitos apresentam numerosos vacúolos que contêm inclusões de cadeias α parcialmente digeridas (KENT et al., 1966). Esses achados indicam que o baço tem atuação sobre as hemácias que possuem corpos de inclusão, deformando-as e tornando-as gutiformes, tendo-se sugerido que a deformação das hemácias seria decorrente de uma forte atração exercida pelo baço sobre as inclusões nelas contidas (SLATER et al., 1968; WENNBERG e WEISS, 1968).

Além de estarem associados com a deformação dos eritrócitos, os corpos de inclusão causam alteração na permeabilidade da membrana dessas células, permeabilidade essa acen tuadamente aumentada a favor do sódio (CIVIDALLI e RUSSELL, 1970) e do potássio (NATHAN e GUNN, 1966). NATHAN et al. (1969) observaram que a alteração da membrana celular está associada ao número de inclusões.

De acordo com o esperado, os esfregaços sanguíneos dos casos com essa anemia revelam notável anisopoiquilocitose, com muitos micrócitos e, ocasionalmente, macrócitos, além

de alvócitos em número variável, reticulócitos, em torno de 5%, e grande quantidade de eritroblastos.

O quadro hemoglobínico, por seu lado, caracteriza-se por aumento da hemoglobina fetal, cujo nível oscila entre 30% e 60% da hemoglobina total, embora já tenham sido descritos casos com níveis inferiores a 10% e superiores a 90% (VECCHIO, 1948; SINGER et al., 1951; RICH, 1952; ROCHE et al., 1953; WHITE e BEAVEN, 1959; WEATHERALL e VELLA, 1960), bem como por porcentagem variável de hemoglobina A2, que pode se apresentar normal ou aumentada (CARCASSI et al., 1957; KUNKEL et al., 1957; MARINONE e BERNASCONI, 1957; WEATHERALL e VELLA, 1960; WENT e Mac IVER, 1961).

Uma alteração hematológica importante nessa anemia é o notável aumento da resistência osmótica das hemácias, podendo-se observar em alguns casos, segundo WEATHERALL (1967), hemólise incompleta em solução salina a 0,1%.

As alterações ósseas observadas na talassemia A2 homozigótica são devidas, fundamentalmente, à hiperatividade e hipercrecimento da medula óssea. O aumento da pressão intra-medular causa uma atrofia das camadas esponjosa e cortical dos ossos. MOSELEY (1962) salienta que na talassemia β homozigótica as alterações ósseas são, geralmente, mais acentuadas do que as usualmente observadas em outras anemias hemolíticas crônicas, tais como a anemia de células falciformes e a anemia esferocítica.

Embora as alterações ósseas não sejam muito acentuadas no primeiro ano de vida, elas podem ser evidenciadas em idades tão precoces como, por exemplo, 18 semanas, aparecendo os primeiros sinais radiológicos em ossos pequenos, particularmente metacarpianos e metatarsianos. No crânio, a hiperplasia medular provoca um alargamento do espaço diploe, sendo a tábua externa atrofiada e deslocada externamente. Ocasionalmente, as trabéculas do diploe assumem posição perpendicular à tábua interna, adquirindo um aspecto radiado, referido como "em pelo ericado". Outros sinais de grande valor diagnóstico na talassemia A2 homozigótica são o retardo da pneumatização dos seios aéreos e o crescimento exagerado do maxilar superior. Nos pacientes que sobrevivem mais tempo, aparece pronunciada regressão das alterações do esqueleto pe

riférico, mas as alterações cranianas persistem e podem até se acentuar (MOSELEY, 1962, ROY et al., 1971).

O prognóstico dessa forma de talassemia é mau, vindo o paciente a falecer, geralmente, ainda na infância. Com o emprego de transfusões sanguíneas repetidas e tratamento com antibióticos, muitos pacientes chegam à puberdade, mas irão apresentar complicações sideróticas viscerais graves, tais como lesões cardíacas, endócrinas e hepáticas.

Já a forma heterozigótica da talassemia A2 não é acompanhada, na maioria dos casos, por manifestações clínicas dignas de nota. Cumpre salientar, no entanto, que a expressão clínica de tal estado heterozigótico é, na verdade, muito variável, podendo uma porcentagem pequena de seus casos revelar anemia relativamente grave, hepatomegalia, esplenomegalia e alterações ósseas (talassemia intermedia), enquanto que outros casos, pelo contrário, se apresentam oligossintomáticos (talassemia minor) ou totalmente assintomáticos (talassemia minima). Tal variação de quadros clínicos parece obedecer a diferenças familiares e raciais.

De qualquer modo, quando se analisa apenas a forma mais comum dessa talassemia, verifica-se que o quadro clínico é pobre em alterações. Algumas pessoas afetadas apresentam manifestações clínicas decorrentes de anemia leve, sendo um achado relativamente frequente as crises dolorosas no abdome superior, que podem estar associadas a uma peri-esplente ou a uma litíase biliar. A esplenomegalia moderada constitui, também, um achado relativamente frequente.

Segundo WEATHERALL (1967), a maioria dos portadores do traço talassêmico β não apresenta anemia ao exame hematológico, sendo o achado mais característico uma elevação moderada da taxa de hemácias, com diminuição da hemoglobina corpuscular média (Hb.C.M.) e redução em nível variável do volume corpuscular médio (V.C.M.). O esfregaço sanguíneo, por seu lado, revela, na maioria dos casos, microcitose moderada e poiquilocitose, com leve hipocromia. Os alvéolos estão, geralmente, presentes, mas a sua ausência não tem valor diagnóstico. A resistência osmótica das hemácias está sempre aumentada, mesmo quando as demais alterações hematológicas são mínimas.

Quanto ao quadro hemoglobínico, o sinal mais importante ainda é aquele verificado por KUNKEL et al. (1957), isto é, de que nessa forma de talassemia há um aumento constante da hemoglobina A2. Assim, de acordo com eles, 34 portadores de talassemia β heterozigótica apresentaram um valor médio de hemoglobina A2 igual a 5,11%, valor esse mais alto do que a taxa média de 2,54% observada em 300 indivíduos normais. No concernente à hemoglobina F, observa-se que seu nível é variável nessa forma de talassemia, verificando-se, geralmente, percentuais ligeiramente aumentados ou normais (BEAVEN et al., 1961; WEATHERALL, 1964, 1967). Os casos de talassemia β heterozigótica que, ao lado da hemoglobina A2 aumentada, revelam aumentos constantes e significativos da hemoglobina F, da ordem de 5% a 15% da hemoglobina total, definem a chamada talassemia A2F (SCHOKKER et al., 1966).

Ainda merecem citação os vários casos que, ao lado de um quadro hematológico praticamente igual ao da talassemia A2 heterozigótica, apresentam níveis normais de hemoglobinas A2 e F (BERNINI et al., 1962; BEAVEN et al., 1964; WEATHERALL, 1964) e que definem, possivelmente, mais uma variedade de talassemia β . Essa talassemia, designada, segundo a nomenclatura de FESSAS (1965), por tipo 2 (ii) é dificilmente diferenciada do traço talassêmico α , sendo a principal manifestação diferencial a presença de corpos de inclusão de hemoglobina H, que indicam a talassemia α (DIAMOND et al., 1965; GRAY e MARION, 1971).

A maioria dos casos de talassemia A2 heterozigótica evoluem sem complicações, embora em alguns exista a tendência à litíase biliar e à formação de úlceras crônicas nas pernas, podendo ocorrer, ainda, anemia intensa durante a gravidez.

Com relação a esse último aspecto, RATTEN e BEISCHER (1972), trabalhando na Austrália, encontraram 28% de talassêmicas β entre 568 mulheres grávidas cuja hemoglobina total era inferior a 9,2g/100 ml.

Cumprе ressaltar, mais uma vez, que muitos portadores da talassemia mínima, também conhecida por anemia microcítica constitucional, talassemia latente, microcitemia ou síndrome de Silvestroni e Bianco (JABLONSKI, 1969) são com-

pletamente assintomáticos do ponto de vista clínico, possuindo uma alteração exclusivamente laboratorial e fazendo parte da fração sadia da população.

II.4.3 - Talassemia $\delta\beta$

A talassemia $\delta\beta$ ou talassemia F caracteriza-se, no estado heterozigótico, por manifestações clínicas e laboratoriais similares às da talassemia A2 heterozigótica. Dela difere apenas no seu quadro hemoglobínico, já que está associada a níveis normais ou baixos de hemoglobina A2 e elevados de hemoglobina F, da ordem de 5% a 30% da hemoglobina total (FESSAS, 1961; ZUELZER et al., 1961; GABUZDA et al., 1964; WEATHERALL, 1964). Já foi descrita na forma homozigótica revelando, nesse caso, ao lado de alterações talassêmicas típicas dos eritrócitos, a ocorrência de 100% de hemoglobina fetal (BRANCATI e BAGLIONI, 1966; RAMOT et al., 1970).

A talassemia F pode interagir com a talassemia A2, determinando um quadro clínico similar ao da talassemia A2 homozigótica. Nesse caso, os níveis de hemoglobina F são muito altos e em torno de 90% da hemoglobina total (FESSAS, 1961; ZUELZER et al., 1961; GABUZDA et al., 1964).

II.5 - A frequência das talassemias nas diversas populações humanas e a manutenção do seu polimorfismo

II.5.1 - Distribuição geográfica das talassemias

A talassemia clássica identifica-se, na maioria dos seus casos, com a hoje denominada talassemia A2 ou talassemia β tipo 1 e, por isso, a quase totalidade dos primeiros estudos realizados a respeito da distribuição geográfica da talassemia dizem respeito apenas a essa variante.

Três hipóteses podem ser aventadas para explicar a origem dessa hemoglobinopatia e a sua disseminação nas populações humanas:

- 1) sendo originária das populações da região mediterrânea, espalhou-se nas do Oriente através do fluxo gênico das primeiras nações, chegando até a China (CHERNOFF, 1959);

- 2) tendo origem no Oriente, provavelmente na Indochina, disseminou-se no Ocidente (BRUMPT, 1955);
- 3) surgindo na Armênia, fluiu igualmente para o Oriente e para o Ocidente (SHEBA, 1959, apud CHERNOFF, 1959);

CHERNOFF (1959), analisando quase duas centenas de publicações, reviu os estudos da distribuição geográfica da talassemia. Segundo esse autor, numa primeira fase, compreendendo o período entre 1925 e 1950, a talassemia foi diagnosticada em três principais áreas do mundo:

- 1) nos Estados Unidos da América do Norte, em descendentes de italianos, gregos, sírios e armênios e, em menor proporção, em descendentes de chineses, sobretudo daqueles originários de Cantão e de Hong-Kong;
- 2) na região mediterrânea, principalmente Itália, Grécia, Chipre, Síria e Turquia, com publicações de casos isolados em Portugal, Espanha, Egito e outros países do Oriente Médio;
- 3) em três focos asiáticos principais, ou seja, Índia, China e Filipinas.

Dessa primeira fase, existem apenas comunicações esparsas de casos na Argentina, Brasil, México, Inglaterra, França, Alemanha e Bulgária.

A partir de 1950, porém, a talassemia passou a ser descrita, com intensidade variável em, praticamente, todo o mundo, mas cumpre assinalar que as dificuldades inerentes ao diagnóstico da talassemia na sua forma heterozigótica tornam difícil estabelecer a sua prevalência real em qualquer população. Assim, por exemplo, SILVESTRONI e BIANCO (1959), organizaram um mapa da distribuição da talassemia β na Itália, usando como único critério de seleção o aumento da resistência osmótica das hemácias, o que se sabe, atualmente, não ser um método seguro. Verificaram, nesse seu estudo que, enquanto a frequência de heterozigotos era de 1% a 2% nas cidades do norte e do centro da Itália, no Vale do Pô e na Sicília eram encontrados níveis de 7% a 15%, sendo que aproximadamente 25% desses indivíduos apresentavam sintomatologia, constituindo, pois, um problema de Saúde Pública.

Os dados apresentados na tabela II.1 permitem uma visão geral das frequências das talassemias α e β assinala-

Tab.II.1 - Frequências dos traços talassêmicos α e β assinaladas por diversos autores em populações humanas.

LOCAL	α %	β %	REFERÊNCIA
Itália			
Continente	0,2	até 20	RUCKNAGEL, 1966
Sicília	-	3-13	RUCKNAGEL, 1966
Sardenha	-	9,4	TERRENATO, 1973
Grécia			
Continente	0,4- 0,7	6-14	RUCKNAGEL, 1966
Rodes	-	16	KATTAMIS <u>et al.</u> , 1969
Chipre	10	15-17	KATTAMIS <u>et al.</u> , 1972; ASHIOTIS <u>et al.</u> , 1973
Portugal	-	0,6	RUCKNAGEL, 1966
Espanha	-	1- 3	PELLICER e CASADO, 1970
Malta	-	3,5	CAUCHI, 1970
Turquia	-	1,7	CAVDAR e ARCASOY, 1971
Inglaterra	-	14	MODELL <u>et al.</u> , 1972
(Origem cipriota)			
Alemanha	-	0,1	NOWICKI <u>et al.</u> , 1972
Argélia	-	1-15	RUCKNAGEL, 1966
Egito	-	0,3	RUCKNAGEL, 1966
Sudão	-	2,5	WEATHERALL <u>et al.</u> , 1971
Nigéria	-	0,2- 0,8	FOLAYAN ESAN, 1970
Gana	-	1,3- 1,7	WEATHERALL <u>et al.</u> , 1971
Líbia	-	0	WEATHERALL <u>et al.</u> , 1971
África Ocidental	2-10	2	RUCKNAGEL, 1966
Israel	-	14	RUCKNAGEL, 1966
(Samaritanos)			
Líbano e Síria	-	5	RUCKNAGEL, 1966
Índia (Madras)	-	15	RUCKNAGEL, 1966
Tailândia	3- 5	1-10	RUCKNAGEL, 1966
Vietnã do Sul	-	2	RUCKNAGEL, 1966
Malásia			
Chineses	7	-	LOPEZ e LIE-INJO, 1971
Malaios	4,9	-	LOPEZ e LIE-INJO, 1971
Indus	1,8	-	LOPEZ e LIE-INJO, 1971
Birmânia	10	-	AUNG-THAN-BATU <u>et al.</u> , 1971
China	3	3- 5	RUCKNAGEL, 1966; McFADZEAN e TODD, 1971
Filipinas	-	1	RUCKNAGEL, 1966
Indonésia	0,5	-	RUCKNAGEL, 1966
Nova Guiné	-	0,8	RUCKNAGEL, 1966
Austrália			
Geral	-	2,8	SMITH <u>et al.</u> , 1971
Origem Medi- terrânea	-	4-20	RAVEN, 1972; FLEMING, 1972
Canadá			
(Origem chinesa)	6,7	3,8	GRAY e MARION, 1971
EE.UU			
Origem grega	2,4	5	PEARSON <u>et al.</u> , 1973
Negróides	2- 7	0,5- 2	PEARSON, 1969; MOTULSKY, 1973; SCHMAIER <u>et al.</u> , 1973; SCHMIDT, 1973.

das em diferentes populações.

A literatura nacional, por seu lado, restringe-se, praticamente, ao registro de casos isolados de talassemia, mostrando-se carente de investigações a respeito da sua frequência ao nível das populações. ARAÚJO (1965), estudando as hemoglobinopatias em São Paulo, encontrou aumento da hemoglobina A2 em 0,75% de 928 indivíduos de cor branca, em 1,81% de 110 de cor parda e em 3,33% de 330 de cor preta. Refere esse autor, ainda, que a frequência de talassemia β homozigótica em 685 pacientes do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foi de 0,6%.

Levando em conta todas as variantes conhecidas da talassemia, verifica-se que a frequência relativa da maioria delas é, geralmente, desconhecida na população dos diversos países, havendo poucos autores dedicados a esse tipo de investigação. Na tabela II.2 são apresentadas as frequências relativas de variantes das talassemias α e β encontradas por NECHELES e colaboradores (1969) em seu laboratório, em Boston, num período compreendendo vários anos, enquanto que na tabela II.3 são apresentadas as frequências relativas das talassemias α e β observadas por QUATTRIN e colaboradores (1970) no sul da Itália.

II.5.2 • Mecanismos homeostáticos que mantêm o polimorfismo da talassemia β

A alta prevalência de portadores do gene da talassemia β em determinadas populações, a despeito do seu alto coeficiente seletivo, evidencia a existência de mecanismos homeostáticos mantendo o polimorfismo dessa hemoglobinopatia. Realmente, se os homozigotos do gene da talassemia β são selecionados antes da idade reprodutiva, é claro que a frequência desse gene deveria corresponder apenas à taxa de mutação, ou seja, a eliminação do gene detrimental deveria ser feita ^{de início} muito rapidamente, pois não é possível aos homozigotos transmitir o gene causador da anomalia eritrocitária em questão.

Frequências apreciáveis de talassemia β têm sido

Tab.II.2 - Frequências das variantes de talassemia observadas por NECHELES et al. (1969) em uma amostra selecionada (casos detectados em laboratório).

VARIANTE	Nº	%
<u>I - Talassemia α</u>		
A- Portador assintomático	2	2,3
B- Doença da Hb H	2	2,3
C- Portador do traço talassêmico α	11	12,8
<u>II - Talassemia β</u>		
A- Talassemia A2	67	78,0
B- Talassemia $\delta\beta^*$	4	4,6
C- Talassemia A2F	0	0,0
TOTAL	86	100,0

* Os autores consideram a talassemia $\delta\beta$ como sendo um tipo de talassemia β .

Tab.II.3 - Frequências das variantes de talassemia observadas por QUATTRIN et al., 1970 no Sul da Itália.

VARIANTE	%
Talassemia A2	88
Talassemia A2F	6
Talassemia $\delta\beta$	1
Talassemia α	3
Aumento isolado da Hb A2	2

encontradas em quase todas populações de países tropicais e sub-tropicais (Tab.II.1), com descrição apenas ocasional de casos isolados em países de clima frio ou temperado. Tais casos possuem, geralmente, ascendência de origem mediterrânea, representando os raros casos comprovadamente autóctones, possíveis mutações. HALDANE (1949), verificando a semelhança das distribuições geográficas da talassemia β e da malária causada pelo Plasmodium falciparum, sugeriu a hipótese de que os heterozigotos da talassemia β teriam vantagem seletiva em relação aos normais no que diz respeito a esse tipo de malária. Assim sendo, os indivíduos com talassemia β homozigótica morreriam em virtude da própria doença enquanto que os normais homozigotos seriam mais selecionados pela malária do que os heterozigotos.

O mesmo raciocínio de HALDANE em relação à malária e à talassemia β foi empregado para explicar o polimorfismo da hemoglobina S na África (ALLISON, 1954a,b), sendo a existência de associação entre malária e deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6PD) sugerida por MOTULSKY (1960a,b). 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 β , da sickle cell anemia e da deficiência de G-6PD.

Na Grécia, no entanto, observou-se correlação negativa entre os traços sickle cell e talassêmico (BARNICOT et al., 1963), ou seja, nos locais em que a talassemia β era mais frequente, a prevalência da sickle cell anemia era menor. Merece menção o fato de ter sido observada correlação negativa similar na Tailândia entre a talassemia β e o estado de portador da hemoglobina E (FLATZ et al., 1965, apud LIE-INJO, 1969).

Já em relação à talassemia β e à deficiência de G-6PD, foi observada uma correlação positiva entre as duas entidades na Sardenha (SINISCALCO et al., 1961) e, do mesmo modo, observou-se correlação positiva entre a deficiência de G-6PD e a sickle cell anemia, em várias populações (MOTULSKY, 1964b).

A correlação negativa entre a talassemia β e as hemoglobinopatias estruturais de cadeia β , tais como as he-

moglobinopatias S e E, é interpretada como decorrente de um efeito deletério condicionado pela interação dos dois genes detrimenais 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.

CARCASSI, CEPPELLINI e PITZUS (1957), investigando a hipótese de HALDANE na Sardenha, constataram maior prevalência de talassemia β nas zonas pantanosas baixas do que nas regiões montanhosas, onde, obviamente, havia menor incidência de malária. A mesma distribuição foi observada nas ilhas da Oceania por CURTAIN e colaboradores (1962).

Já na Grécia (CHOREMIS et al., 1963; FRASER et al., 1964; STAMATOYANNOPOULOS e FESSAS, 1964), em Chipre (PLATO et al., 1964) e na Tailândia (FLATZ et al., 1965, apud LIE-INJO, 1969), as relações observadas entre a malária e a talassemia β não se mostraram muito evidentes. Na ilha de Chipre, por exemplo, PLATO e colaboradores (1964), embora tenham encontrado uma frequência bem maior de deficiência de G-6PD nas zonas com malária endêmica do litoral do que nas zonas montanhosas do interior, não observaram, em relação à talassemia β , 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 β , presente há mais tempo na ilha, deveria ser, inicialmente, muito frequente 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 do centro da ilha, levando consigo o gene da talassemia β . Os genes talassêmicos β que permaneceram nas populações do litoral, bem como os genes da deficiência de G-6PD, sofreram seleção positiva pela malária nessa região de Chipre.

Por outro lado, a presença da siclemia na maioria das áreas com malária endêmica da Grécia, do mesmo modo que a presença da hemoglobinoapatia E na Tailândia, poderiam ser responsáveis, pelo menos em parte, pela correlação menos evidente entre a malária e a talassemia β nesses países. Realmente, na ilha grega de Rodas, onde a prevalência da sicle-

nia é baixa, são observadas altas frequências tanto de deficiência de G-6PD quanto de talassemia β (22% e 16% respectivamente), havendo evidências de que essa ilha constituiu no passado uma zona hiperendêmica de malária (KATTAMIS et al., 1969).

Sendo a distribuição geográfica da talassemia β 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 β confira, realmente, certa proteção contra a malária. Reforça essa idéia o fato de não poder ser afastada a possibilidade de interferência de outros fatores (siclemia, hemoglobinopatia E, diferenças raciais) nas áreas onde as relações entre a malária e a talassemia não se mostram muito evidentes.

A opinião de MOTULSKY (1964a) é de que tanto a siclemia quanto a deficiência de G-6PD e a talassemia β devem exercer ação protetora contra a malária causada pelo Plasmodium falciparum. Segundo esse autor, o traço siclêmico possui maior ação protetora contra a malária do que da deficiência de G-6PD e bem maior, ainda, do que a talassemia β . Em relação à talassemia β heterozigótica, supõe-se que o mecanismo protetor decorra da presença de microcitose, hipocromia, anisocitose e do fato de ser encontrado, com relativa frequência, decréscimo do tempo de vida das hemácias (BEIGUELMAN, 1968). Se o Plasmodium falciparum requer hemácias perfeitamente normais para o seu crescimento, pelo menos uma boa proporção de indivíduos com o traço talassêmico estaria protegida.

Como a seleção contra a talassemia β é muito grande, é bastante provável que existam outros mecanismos homeostáticos muito potentes, além da malária, mantendo o seu polimorfismo em muitas populações.

HALDANE (1949) sugeriu que os portadores do traço talassêmico poderiam estar protegidos contra os períodos de diminuição intensa dos depósitos de ferro corporal, hipótese essa afastada atualmente (BANNERMAN, 1961). Sugeriu-se, também, que a fertilidade das talassêmicas heterozigotas poderia estar aumentada por razões desconhecidas (FRASER et al.,

1964). No mesmo sentido, os níveis relativamente baixos de colesterol sérico e da lipoproteína β dos talassêmicos heterozigotos (FESSAS, STAMATOYANNOPOULOS e KEYS, 1963, apud WEATHERALL, 1967) poderiam constituir uma vantagem seletiva importante, ainda que após a idade reprodutiva. De qualquer forma, fica patente que as vantagens conferidas aos heterozigotos da talassemia β devem ser, sem dúvida, muito complexas.

III. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada em duas etapas, constituindo a primeira, uma fase de triagem. Os indivíduos selecionados nessa fase inicial foram novamente investigados, com o intuito de se diagnosticar os eventuais portadores dos traços talassêmicos β e $\delta\beta$.

III.1 - A triagem dos indivíduos

A fase de triagem foi programada de modo a obedecer os aspectos éticos e sociais estabelecidos para a seleção de portadores de doenças hereditárias (LAPPÉ et al., 1972) e baseada nos critérios de MALAMOS, FESSAS e STAMATOYANNOPOULOS (1962) e de PEARSON e colaboradores (1973) para a triagem de portadores dos traços talassêmicos β e $\delta\beta$.

Para tanto, foram examinados 800 estudantes da Universidade Estadual de Campinas, inclusive do Colégio Técnico (250), convocados por ordem de matrícula e não submetidos a qualquer processo de seleção prévia. As características da amostra examinada são apresentadas na tabela III.1.

Solicitou-se, a cada indivíduo, o preenchimento de uma ficha, por intermédio da qual, além da identificação, eram obtidas informações sobre o país de nascimento dos pais, avós e bisavós das pessoas examinadas. No caso de bisavós brasileiros, procurou-se conhecer, através da família, a origem dos seus ancestrais.

Foram adotados quatro critérios independentes de triagem, ou seja:

- 1) alteração da morfologia da série vermelha no esfregaço sanguíneo;
- 2) diminuição da hemoglobina corpuscular média (Hb.C.M.);
- 3) diminuição do volume corpuscular médio das hemácias (V.C.M.);
- 4) aumento da resistência osmótica dos eritrócitos.

Foram retirados 5 ml de sangue venoso de cada indivíduo examinado, usando-se como anticoagulante o sal dipo

Tab.III.1 - Características da amostra submetida ao processo inicial de triagem.

CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO		Nº	%
SEXO	MASCULINO	533	66,62
	FEMININO	267	33,38
GRUPO RACIAL	CAUCASÓIDE	678	84,75
	MONGOLÓIDE	107	13,37
	NEGRÓIDE	15	1,88
GRUPO ETÁRIO (anos)	Até-14	39	4,88
	15-18	351	43,88
	19-22	337	42,12
	23-26	46	5,75
	27-30	23	2,87
	Acima de 30	4	0,50
PROCE-DÊNCIA	BRASIL	770	96,25
	São Paulo	679	84,88
	Minas Gerais	33	4,12
	Paraná	16	2,00
	Guanabara	10	1,25
	Mato Grosso	7	0,88
	Rio de Janeiro	6	0,75
	Pernambuco	4	0,50
	Rio Grande do Sul	4	0,50
	Bahia	2	0,25
	Paraíba	2	0,25
	Rio Grande do Norte	2	0,25
	Ceará	1	0,12
	Goiás	1	0,12
	Maranhão	1	0,12
	Pará	1	0,12
	Piauí	1	0,12
	DO ESTRANGEIRO	30	3,75
	Japão	8	1,00
	Bolívia	5	0,62
	Paraguai	3	0,38
	Portugal	3	0,38
	EE.UU	2	0,25
	Itália	2	0,25
	S.Salvador	2	0,25
	Alemanha	1	0,12
	China	1	0,12
	Panamá	1	0,12
	Peru	1	0,12
	Suriname	1	0,12

tássico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), na concentração recomendada por DACIE e LEWIS (1970), ou seja, 1 mg por ml de sangue. Os esfregaços sanguíneos foram realizados dentro do prazo máximo de 90 minutos após a retirada do sangue, procedendo-se as demais determinações dentro do prazo máximo de 3 horas.

III.1.1 - Alteração da morfologia da série vermelha no esfregaço sanguíneo

Com o sangue de cada indivíduo examinado prepararam-se quatro esfregaços, que foram corados pela técnica de Leishman. A morfologia da série vermelha foi examinada nos quatro esfregaços quanto à presença ou ausência de microcitose, macrocitose, anisocitose, poiquilocitose, eliptocitose, hipocromia, alvocitose, ponteados basófilos e policromasia. Qualquer alteração, em qualquer grau, foi considerada como tendo valor para triagem, selecionando-se da amostra, também os casos considerados duvidosos.

III.1.2 - Diminuição da hemoglobina corpuscular média (Hb. C.M.)

A concentração da hemoglobina em g% e o número de hemácias por mm^3 de sangue foram determinados eletronicamente, usando-se o sistema SMA 4A da "Technicon Auto Analyser" (EE.UU), que é um sistema que processa a análise automatizada e sequencial de amostras de sangue total, determinando o valor da concentração de hemoglobina, o valor do hematócrito, bem como o número de hemácias e de leucócitos por mm^3 de sangue. Nesse sistema, as análises são realizadas ao ritmo de sessenta por hora, sendo os resultados dos quatro exames registrados sequencialmente em gráfico. O sistema é calibrado por meio de soluções padronizadas.

A determinação da concentração de hemoglobina pelo sistema utilizado é feita por método padronizado internacionalmente, ou seja, pelo método da cianometemoglobina.

O sistema foi calibrado diariamente com padrões conhecidos e cada amostra de sangue foi analisada duas ve

zes, usando-se no cálculo da hemoglobina corpuscular média, os valores médios tanto da concentração de hemoglobina, quanto do número de hemácias por mm^3 de sangue.

Considerou-se o valor de 27 pg como sendo o limite inferior da normalidade da hemoglobina corpuscular média (WINTROBE, 1967), triando-se da amostra, portanto, os indivíduos com valores de Hb.C.M. inferiores a esse.

III.1.3 - Diminuição do volume corpuscular médio das hemácias (V.C.M.)

O valor do hematócrito foi determinado pelo método do micro-hematócrito e a contagem do número de hemácias por mm^3 de sangue foi feita eletronicamente, como já se mencionou acima.

Foram usados tubos capilares padronizados (Propper Manufacturing Co., NY), submetidos à centrifugação durante 5 minutos a 11.500 r.p.m., lendo-se o valor do hematócrito em tabela apropriada. Quando esse valor se mostrava superior a 50%, os capilares eram centrifugados por mais 5 minutos.

Cada amostra de sangue mereceu duas determinações do hematócrito, usando-se o valor médio destas no cálculo do volume corpuscular médio das hemácias. Considerou-se o valor de $82 \mu^3$ como sendo o limite inferior da normalidade do volume corpuscular médio das hemácias (WINTROBE, 1967), triando-se da amostra, portanto, os indivíduos com valores de V.C.M. inferiores a esse.

III.1.4 - Aumento da resistência osmótica dos eritrócitos

A resistência osmótica foi testada pelo método de triagem padronizado por MALAMOS, FESSAS e STAMATOYANNOPOULOS (1962), ou seja, adicionou-se 0,02 ml de sangue a 5 ml de solução de cloreto de sódio a 0,4%, procedendo-se a homogeneização da mistura por inversão do tubo. O tubo era examinado após mantê-lo durante 45 minutos à temperatura ambiente, quanto à sua transparência, sendo considerados normais (negativos) os tubos transparentes, e anormais (positi

vos) os tubos apenas translúcidos, opacos ou com sedimento de células.

Por se tratar de um teste qualitativo, cada amostra de sangue mereceu três determinações, sendo os casos duvidosos, que apresentaram apenas uma ligeira turvação, considerados como sendo positivos e, portanto, também triados da amostra.

III.2 - Classificação dos indivíduos triados

Os indivíduos triados foram classificados em 16 classes, de acordo com os critérios apresentados na tabela III.2. Reservou-se uma classe especial (classe P) para aqueles casos que foram selecionados pelo fato de não terem sido submetidos, por uma razão accidental qualquer, a todos os testes de triagem adotados.

III.3 - Investigação dos indivíduos triados

Os estudantes triados da amostra na fase inicial da pesquisa foram reinvestigados com a finalidade de se diagnosticar os eventuais portadores dos traços talassêmicos β e $\delta\beta$. Para tanto, foram realizadas determinações hematológicas e bioquímicas, tendo sido adotados os critérios diagnósticos estabelecidos por MALAMOS, FESSAS e STAMATOYANNOPOULOS (1962) e por WEATHERALL (1967) para tais estados talassêmicos.

1. Critérios hematológicos:

- 1.1 - Alteração da morfologia dos eritrócitos: microcitose, anisocitose, poiquilocitose, eliptocitose, hipocromia, ponteados basófilos e presença de alvéolos;
- 1.2 - Aumento da resistência osmótica das hemácias;
- 1.3 - Diminuição da hemoglobina corpuscular média (Hb. C.M.);
- 1.4 - Diminuição do volume corpuscular médio das hemácias (V.C.M.).

2. Critérios bioquímicos:

- 2.1 - Aumento do percentual da hemoglobina A2;

Tab.III.2 - Critérios usados na classificação dos indivíduos seleccionados na fase de triagem.

(+ = Presente, - = Ausente, 0 = Não testado).

CLASSE	DIMINUIÇÃO DO V.C.M.	DIMINUIÇÃO DA Hb.C.M.	ALTERAÇÃO DAS HEMÁCIAS	AUMENTO DA R.OSMÓTICA
A	+	+	+	+
B	-	+	+	+
C	+	+	+	-
D	+	+	-	+
E	+	-	+	+
F	+	+	-	-
G	-	-	+	+
H	+	-	+	-
I	-	+	-	+
J	+	-	-	+
K	-	+	+	-
L	+	-	-	-
M	-	+	-	-
N	-	-	+	-
O	-	-	-	+
P	+, - ou 0	+, - ou 0	+, - ou 0	+, - ou 0

2.2 - Aumento do percentual da hemoglobina fetal.

Exigiu-se, para o diagnóstico do estado de portador dos traços talassêmicos β ou $\delta\beta$ a presença de pelo menos três dos quatro critérios hematológicos e de pelo menos um dos dois critérios bioquímicos. O tipo de talassemia foi determinado com base nos níveis das hemoglobinas A2 e fetal, ou seja:

- A) Talassemia β tipo A2 ou tipo 1 - apresenta níveis aumentados de hemoglobina A2 associados a níveis de hemoglobina F inferiores a 5% da hemoglobina total;
- B) Talassemia β tipo A2F - apresenta níveis aumentados de hemoglobina A2 associados a níveis de hemoglobina F superiores a 5% da hemoglobina total;
- C) Talassemia $\delta\beta$ ou talassemia F - apresenta níveis normais ou baixos de hemoglobina A2 associados a níveis de hemoglobina F superiores a 5% da hemoglobina total.

Para os eventuais casos que obedecessem apenas aos critérios hematológicos, programou-se uma investigação especial, incluindo a dosagem do ferro sérico e a pesquisa de corpos de inclusão nas hemácias, visando o diagnóstico diferencial entre quatro condições, ou seja:

- 1. Talassemia β do terceiro tipo (talassemia β com níveis normais de hemoglobinas A2 e F) - apresenta níveis normais de hemoglobinas A2 e F associados a níveis normais ou aumentados de ferro sérico;
- 2. Concomitância de talassemia β tipo A2 e anemia ferropriva intensa - apresenta níveis normais ou apenas ligeiramente aumentados de hemoglobina A2 associados a níveis de hemoglobina F inferiores a 5% da hemoglobina total, e a níveis diminuídos de ferro sérico;
- 3. Anemia ferropriva intensa - apresenta níveis diminuídos de hemoglobina A2 associados a níveis normais de hemoglobina F e a níveis diminuídos de ferro sérico;
- 4. Traço talassêmico α - apresenta níveis normais de hemoglobinas A2 e F associados a níveis normais ou elevados de ferro sérico, bem como, presença de corpos de inclusão de hemoglobina H nas hemácias, identificáveis após a incubação dessas células com azul-cresil brilhante.

Foram colhidos mais 5 ml de sangue venoso dos in-

divíduos investigados, usando-se EDTA como anticoagulante na mesma concentração especificada no tópicó III.1. Os esfregaços sangüíneos foram realizados no momento da colheita, usando-se, portanto, sangue sem anticoagulante.

III.3.1 - Exames hematológicos

III.3.1.1 - Estudo da morfologia da série vermelha

Com o sangue de cada indivíduo examinado prepararam-se quatro esfregaços que foram corados pela técnica de Leishman. A morfologia da série vermelha de cada caso foi estudada por quatro examinadores diferentes, dois dos quais hematologistas clínicos. Assim sendo, cada caso foi classificado de acordo com a presença ou ausência de microcitose, macrocitose, anisocitose, poiquilocitose, eliptocitose, hipocromia, alvocitose, ponteadó basófilo e policromasia.

III.3.1.2 - Estudo da resistência globular osmótica

O estudo da resistência globular osmótica foi feito, inicialmente, pelo método de MALAMOS, FESSAS e STAMATOY-ANNOPOULOS (1962), construindo-se, nos casos positivos ou duvidosos, uma curva de resistência osmótica (DACIE e LEWIS, 1970).

III.3.1.3 - Determinação do valor da hemoglobina corpuscular média (Hb.C.M.)

A determinação do valor da hemoglobina corpuscular média foi feita do mesmo modo que na fase de triagem, apenas mudando a técnica de determinação da hemoglobina, que foi feita pelo método da cianometemoglobina, usando-se o reagente de Kampen e Zijlstra (DACIE e LEWIS, 1970). Foi usado um fotocolorímetro modelo PL-4 da "Carl Zeiss" (Alemanha), procedendo-se à realização de uma curva-padrão, para leitura da concentração de hemoglobina, a intervalos regulares de 30 de terminações. Para a realização da curva-padrão foram utilizadas soluções de cianometemoglobina "Merck" (Merck, Darmstadt,

Alemanha).

Cada amostra de sangue mereceu duas determinações de sua concentração de hemoglobina, usando-se o seu valor médio para calcular a hemoglobina corpuscular média.

III.3.1.4 - Determinação do volume corpuscular médio das hemácias (V.C.M.)

A determinação do volume corpuscular médio das hemácias foi feita do mesmo modo que na fase de triagem.

III.3.2 - Exames bioquímicos

Para a realização dos exames bioquímicos, ou seja, para a dosagem das hemoglobinas A2 e F, preparou-se, previamente, uma solução de hemoglobina a 10g%. Para tanto, 3 ml de sangue foram centrifugados a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos, sendo o sobrenadante e o creme leucocitário removidos por aspiração com uma pipeta Pasteur. As hemácias foram lavadas quatro vezes com solução de NaCl a 0,85% ou até que o líquido da última lavagem ficasse claro. As células do sedimento foram hemolisadas com volume igual de água bidestilada, adicionando-se meio volume de tolueno. O tubo foi agitado vigorosamente durante 5 minutos antes de deixá-lo em repouso em refrigerador entre 4°C e 10°C durante 3 horas. A seguir, centrifugou-se a 3.000 r.p.m. durante 30 minutos e, com uma pipeta Pasteur, perfurou-se a camada de estroma e aspirou-se a solução de hemoglobina do centro do tubo. Após a filtração através de papel Whatmann nº 1, a solução foi diluída com água bidestilada até atingir a concentração de 10g%.

III.3.2.1 - Dosagem da hemoglobina A2

A determinação da hemoglobina A2 foi feita por eletroforese em fitas de acetato de celulose ("Sartorius Membranfilter GMBH", Alemanha), utilizando-se um sistema "Boskamp" (Boskamp Gerätebau KG, Alemanha) de eletroforese. Adotou-se a técnica usada no Instituto de Hematologia "Arthur Siqueira Cavalcanti", Rio de Janeiro, GB.

Reagentes:

1) Tampão tris-glicina, pH 9,1

Tris (hidroximetil) aminometano	14,1	g
Glicina	22,6	g
Água bidestilada	1500	ml

2) Solução corante:

Amido negro 10 B	0,5	g
Metanol	45	ml
Ácido acético glacial	10	ml
Água bidestilada q.s.p.	100	ml

3) Solução descorante:

Metanol	45	ml
Ácido acético glacial	10	ml
Água bidestilada q.s.p.	100	ml

Técnica:

As fitas de acetato de celulose são colocadas na solução tampão por 10 minutos. Retira-se o excesso de tampão entre duas folhas de papel de filtro e coloca-se as fitas em uma cuba de eletroforese previamente cheia com o mesmo tampão. Deposita-se, a seguir, a solução de hemoglobina sobre a fita mediante o uso de aplicador apropriado, realizando-se a corrida eletroforética sob a diferença de potencial de 200 volts durante 1 hora. Retiram-se as fitas da cuba, colocando-as na solução corante por 20 minutos. Descore-se o fundo, posteriormente, através de lavagens sucessivas com a solução descorante.

O aumento da fração A2 foi apreciado qualitativamente, mediante comparação com padrões normais. Verificou-se, também, se a hemoglobina F estava presente.

Para a quantificação da hemoglobina A2, procedeu-se, previamente, à diafanização da membrana de acetato de celulose, com a solução diafanizadora usada no Centro de Pesquisas Imunoquímicas, São Paulo (sete partes de dioxana e três partes de isobutanol).

A quantificação da fração hemoglobínica A2 foi feita através de densitometria, utilizando-se um densitômetro modelo Quick -da "Atago" (EE.UU). Cada amostra mereceu duas

corridas eletroforéticas simultâneas, sendo, cada uma, quantificada três vezes, adotando o valor médio para expressar a porcentagem de hemoglobina A2 da amostra examinada.

Visando estabelecer o intervalo de variação das porcentagens de hemoglobina A2 consideradas normais, com o uso da técnica empregada na pesquisa, dosou-se a hemoglobina A2 de 88 indivíduos normais.

III.3.2.2 - Dosagem da hemoglobina fetal

A dosagem da hemoglobina F foi feita pela técnica de BETKE e colaboradores (1959), a qual nada mais é do que uma modificação mais sensível da técnica clássica de SINGER e colaboradores (1951).

Reagentes:

Solução de hidróxido de sódio 1,2 N

Solução aquosa saturada de sulfato de amônia

Solução de Drabkins

Técnica:

Adiciona-se 0,3 ml da solução de hemoglobina a 10% a 5,7 ml da solução de Drabkins. A solução de cianometemoglobina assim obtida é usada para o teste e para o padrão. Para um tubo-teste, pipetam-se 2,8 ml da solução de cianometemoglobina e adiciona-se 0,2 ml de solução de hidróxido de sódio 1,2 N. A solução é agitada delicadamente durante 2 minutos cronometrados. Exatamente após esse tempo, faz-se a dissolução completa de 2,0 ml de solução aquosa saturada de sulfato de amônia. Deixa-se em repouso durante, pelo menos, 5 minutos e depois filtra-se através de papel Whatmann 42.

Prepara-se o padrão diluindo 1,4 ml da solução de cianometemoglobina em 8,6 ml de água bidestilada.

As absorbâncias do padrão e do teste são lidas em um fotocolorímetro, a um comprimento de onda de 540 nm, usando-se como branco o reagente de Drabkins.

Cálculo:

$$\text{Porcentagem de Hb.F} = \frac{\text{Absorbância do teste} \times 100}{\text{Absorbância do padrão} \times 4}$$

III.4 - Técnicas complementares

III.4.1 - Dosagem do ferro sérico

Nos casos em que foi necessária a dosagem do ferro sérico, colheu-se 10 ml de sangue venoso sem anticoagulante. Após coagulação, separou-se o soro que foi posto a centrifugar a 3.000 r.p.m. durante 30 minutos. O sobrenadante límpido foi aspirado em pipeta Pasteur e transferido para outro frasco.

Toda vidraria usada foi antes cuidadosamente limpa, permanecendo imersa em solução sulfocrômica durante 24 horas, sendo, posteriormente, lavada várias vezes com água corrente e água bidestilada.

A dosagem do ferro sérico foi feita através do uso de um conjunto completo de reagentes Merckotest (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Reagentes:

Tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 5,5

Reagente de coloração - sal dissódico do ácido batofenantro
linassulfônico 0,68 mM, fosfato de sódio 400 mM, pH 5,5

Ascorbato de sódio.

Técnica:

Pipeta-se em tubos de ensaio:

SUBSTÂNCIAS	AMOSTRA A ANALISAR	AMOSTRA EM BRAN CO DO SORO	AMOSTRA EM BRANCO DOS REAGENTES
Ascorbato de sódio (dis- solvido por agitação)	aprox. 5mg	aprox. 5 mg	aprox. 5 mg
Tampão	-	1 ml	-
Reagente de coloração	1 ml	-	1 ml
Água bides- tilada	-	-	1 ml
Soro	1 ml	1 ml	-

Os tubos de ensaio são bem agitados e mantidos durante 10 minutos em banho-maria a 37°C. Depois do arrefecimento à temperatura ambiente, medem-se as extinções das amostras a analisar comparando-as com as amostras em branco

dos reagentes. As extinções das amostras em branco do soro são comparadas com água bidestilada.

Cálculo:

Para o cálculo da concentração de ferro a partir das extinções medidas a um comprimento de onda de 546 nm, usa-se a equação:

Concentração de ferro = $(E_A - E_B) \cdot 568 \mu\text{g Fe}/100 \text{ ml}$

na qual E_A é a extinção da amostra a analisar e E_B é a extinção da amostra em branco do soro.

Cada amostra mereceu duas determinações, calculando-se o valor médio.

III.4.2 - Pesquisa dos corpos de inclusão nas hemácias

Para a pesquisa de corpos de inclusão de hemoglobina H nas hemácias adotou-se a técnica de GOUTTAS e colaboradores (1955).

Reagentes:

Solução de azul-cresil brilhante a 1%

Azul-cresil brilhante 1 g

Solução de NaCl a 0,85% 100ml

Técnica:

Misturar duas partes de sangue e uma de solução de azul-cresil brilhante a 1% em um tubo de ensaio.

* Deixar em banho-maria a 37°C durante 30 minutos.

Fazer esfregaços sanguíneos e examinar ao microscópio, sob objetiva de imersão.

IV. RESULTADOS

Dentre os 800 indivíduos examinados na fase inicial de triagem, foram selecionados 98, cuja classificação, de acordo com os critérios apontados na tabela III.2, é apresentada na tabela IV.1.

Tabela IV.1 - Classificação dos indivíduos selecionados na fase de triagem.

CLASSE	Nº
A	10
B	1
C	1
D	0
E	0
F	0
G	1
H	0
I	0
J	0
K	15
L	2
M	13
N	36
O	13
P	6
TOTAL	98

Foram diagnosticados 9 casos de talassemia β heterozigótica, todos assintomáticos e pertencentes à classe A.

Como já foi mencionado, dosou-se a hemoglobina A_2 de 88 indivíduos normais, visando ao estabelecimento do intervalo de variação das porcentagens dessa hemoglobina, que pode ser considerado como normal, com o uso da técnica adotada na pesquisa. Obteve-se, nos indivíduos normais, a

porcentagem média de 2,04%, com um intervalo de variação de 0,96% a 3,13%. A porcentagem de hemoglobina A_2 dos talassêmicos variou de 3,46% a 4,59%, com a média de 3,88%. A fig. IV.1 apresenta a distribuição dos indivíduos normais e dos talassêmicos segundo os percentuais de hemoglobina A_2 .

O limite superior da variação normal de hemoglobina A_2 foi considerado como igual a 3,2%, porque somando-se dois desvios padrão à média amostral dos valores tomados em arco-seno dos percentuais, obtém-se $8,17 + 2 \times 1,09 = 10,35$, pois $\bar{x} = 8,17$ e $s(x) = 1,09$, e 10,35 corresponde ao arco-seno de 3,2%, que discrimina os indivíduos normais dos talassêmicos quanto ao percentual de hemoglobina A_2 .

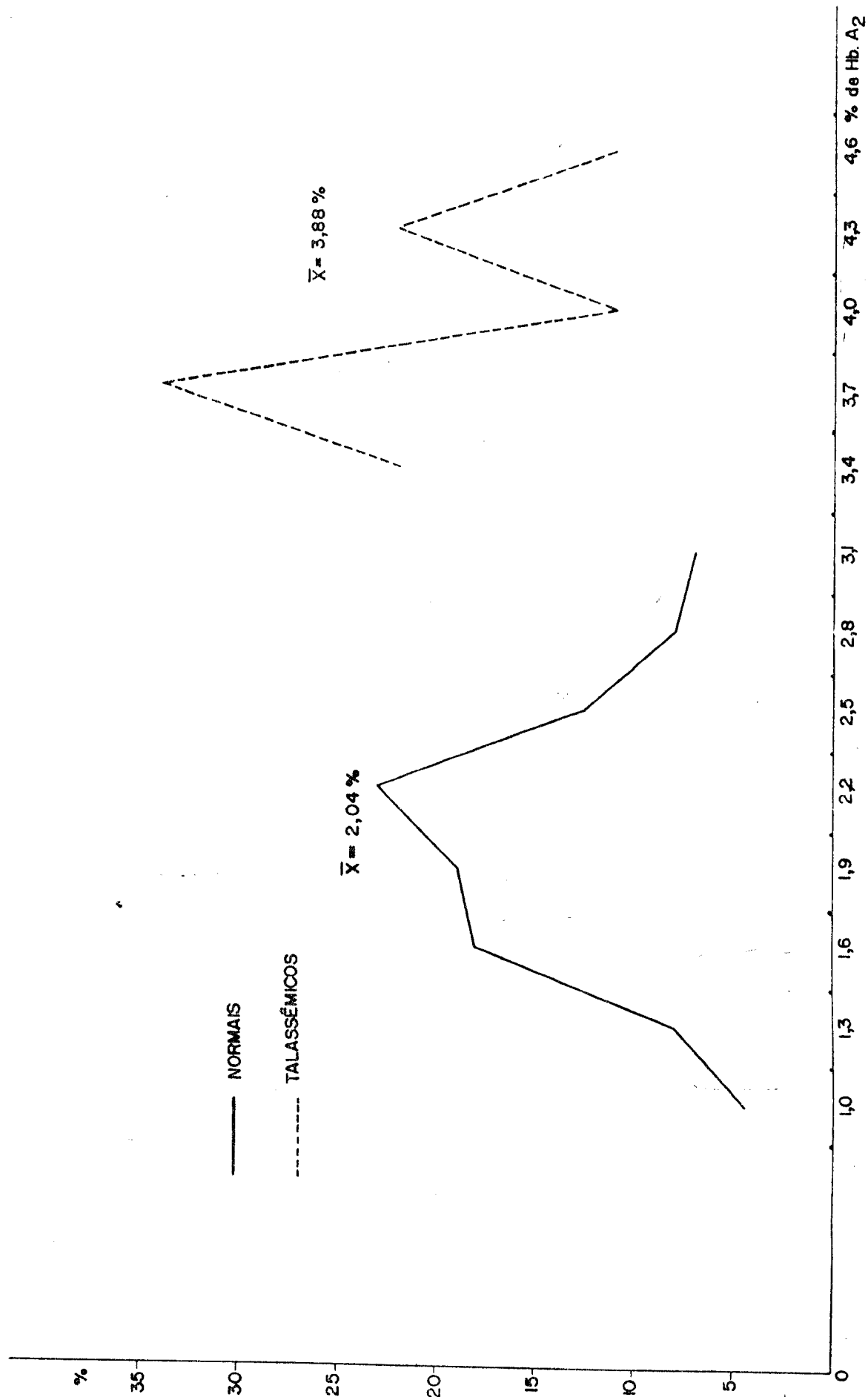
Apenas três portadores do traço talassêmico β apresentaram níveis de hemoglobina fetal superiores a 5% da hemoglobina total, ou seja, 6,14%, 6,59% e 9,66%, respectivamente, sendo classificados como portadores de talassemia β heterozigótica tipo A_2F . Os outros seis talassêmicos foram classificados como portadores de talassemia β heterozigótica tipo A_2 ou tipo 1.

As principais manifestações encontradas nos talassêmicos são apresentadas na tabela IV.2 e, na figura IV.2 é possível apreciar o aumento da fração hemoglobínica A_2 dos talassêmicos em relação à de indivíduos normais, sendo possível observar, ainda, a presença da hemoglobina fetal nos portadores da talassemia A_2F .

A investigação especial programada para os casos que obedecessem apenas aos critérios hematológicos de diagnóstico da talassemia β heterozigótica, sem aumento dos percentuais das hemoglobinas A_2 e fetal, se fez necessária em apenas duas estudantes, pertencentes às classes A e C, respectivamente, sendo firmada, em ambas, o diagnóstico de anemia ferropriva. Tal investigação foi dispensada no indivíduo pertencente à classe B, pois o esfregaço realizado com o seu sangue revelou a presença do Plasmodium falciparum, merecendo menção o fato desse estudante proceder de uma região rural de Mato Grosso.

Portanto, não foram encontrados na amostra indivíduos com os traços talassêmicos $\delta\beta$, α e β do terceiro tipo (com níveis normais de hemoglobinas A_2 e fetal).

Fig. IV.1 - Distribuição de 88 indivíduos normais e de 9 talassêmicos segundo os percentuais da hemoglobina A₂.



Tab.IV.2 - Manifestações encontradas nos portadores assintomáticos do traço talassêmico β .
(+ = presente, - = ausente e $\uparrow$ = aumentada).

TALASSEMICO	SEXO	IDADE (anos)	HEMOGLOBINA (g%)	HEMATOCRITO (%)	HEMACIAS $\times 10^6$ (mm^3)	V.C.M. (μ^3)	Hb.C.M. (pg)	RESISTENCIA OSMOTICA	MORFOLOGIA DA SÉRIE VERMELHA								Hb. A2 (%)	Hb. Fetal (%)
									microcitose	hipocromia	anisocitose	poiquilocitose	alvocitose	eliptocitose	pont. basófilo	poli cromasia		
C.M.G.	F	18	10,6	38	5,7	66	18	$\uparrow$	+	+	+	+	+	+	+	-	4,05	1,68
V.A.M.	F	19	11,6	41	5,2	78	22	$\uparrow$	+	+	+	+	+	-	+	-	4,15	6,14
S.A.R.	F	19	10,0	36	5,2	69	19	$\uparrow$	+	+	+	+	+	+	+	-	4,22	0,0
C.M.I.*	M	21	13,3	41	5,5	74	24	$\uparrow$	+	+	+	+	+	+	-	+	3,46	9,66
J.C.C.	M	19	13,3	44	5,5	80	24	$\uparrow$	+	+	+	+	-	-	+	-	3,47	1,69
A.B.M.C.	M	20	12,2	44	6,0	73	20	$\uparrow$	+	+	+	+	+	+	+	+	3,69	1,48
U.B.J.	M	14	11,2	40	6,3	63	17	$\uparrow$	+	+	+	+	+	-	+	+	4,59	2,08
G.C.	M	18	12,0	39	6,2	62	19	$\uparrow$	+	+	+	+	-	-	+	+	3,69	1,65
J.C.L.	M	14	13,8	43	7,0	61	19	$\uparrow$	+	+	+	+	+	-	+	-	3,65	6,59

* Paciente de origem chinesa. Todos os outros são caucasóides.

Como achados complementares, foram detectados dois casos de hemoglobinopatia D heterozigótica e um de eliptocitose hereditária. Como na técnica de eletroforese empregada na pesquisa a hemoglobina D apresenta o mesmo comportamento eletroforético que o da hemoglobina S, a diferenciação entre ambas foi feita através de testes de falcização, testes de solubilidade e de eletroforese em gel de ágar (ARAÚJO, 1965). Na fig. IV.3 é possível apreciar a presença da hemoglobina D nos dois heterozigotos encontrados na amostra.

A variação da prevalência do traço talassêmico β de acordo com os grandes grupos raciais e as origens dos ascendentes dos indivíduos examinados será discutida no tópico seguinte.

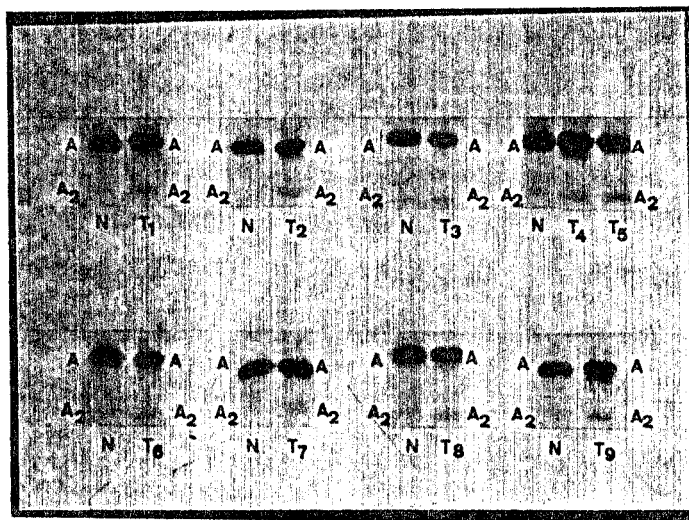


Fig.IV.2 - Eletroforese de hemoglobinas de indivíduos normais (N) e de portadores do traço talassêmico β (T). Nota-se o aumento da fração hemoglobínica A_2 nos talassêmicos, podendo-se, ainda, observar a presença da hemoglobina fetal, logo abaixo da fração hemoglobínica A, nos talassêmicos T_2 , T_4 e T_9 .

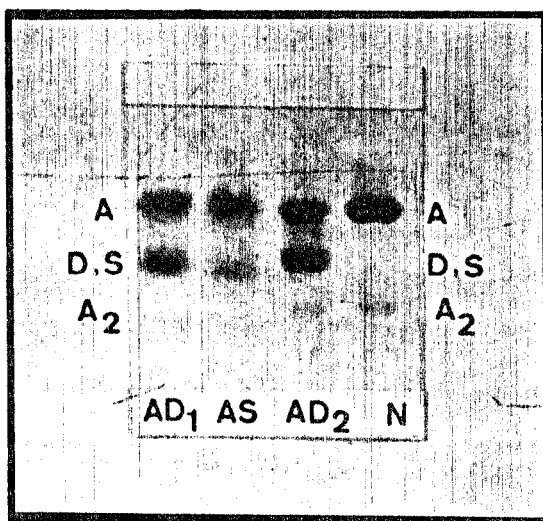


Fig.IV.3 - Eletroforese de hemoglobinas de um indivíduo normal (N), de um portador do traço siclêmico (AS) e dos portadores heterozigotos da hemoglobinopatia D (AD_1 e AD_2) detectados na amostra. U-sou-se o portador do traço siclêmico como controle apenas para mostrar o comportamento eletroforético semelhante das hemoglobinas D e S, na técnica empregada.

V. DISCUSSÃO

V.1 - Discussão do material e dos métodos

Uma vez que o termo talassemia designa um conjunto de entidades genético-clínicas distintas, torna-se necessário definir quais de suas variantes serão primordialmente visadas em qualquer investigação a respeito da prevalência desse tipo especial de hemoglobinopatia. Isso porque, cada uma das variedades de talassemia exige, obviamente, uma abordagem especial.

Assim, por exemplo, o estado de portador da talassemia α , como já foi mencionado anteriormente, é muito dificilmente diagnosticado no adulto, sendo o período neonatal a época ideal para o seu diagnóstico (MALAMOS et al., 1962; WEATHERALL, 1963). Portanto, uma investigação que tenha como objetivo o censo de tal estado talassêmico deve ser realizada, de preferência, entre recém-nascidos, empregando, sobretudo, métodos de determinação das hemoglobinas de Bart e H. Já as depressões graves da síntese de cadeias α , por serem incompatíveis com a sobrevivência, devem ser estudadas em natimortos e em crianças hidrópicas falecidas logo após o nascimento.

As talassemias γ , da mesma forma, devem ser investigadas entre recém-nascidos, natimortos e produtos de abortamento, enquanto que as talassemias β e $\delta\beta$, dificilmente são diagnosticadas nos primeiros meses de vida extra-uterina, a não ser quando são empregados métodos radiocromatográficos para a identificação das mesmas (KAN e NATHAN, 1968). Tal diagnóstico, usualmente, baseia-se, sobretudo, em critérios clínicos e hematológicos, já que o estudo dos percentuais de hemoglobina fetal nunca leva a conclusões definitivas nos primeiros três meses de vida extra-uterina, além do que, a hemoglobina A2 não alcança o seu nível adulto final antes dos seis meses de idade (WEATHERALL, 1967). Essas talassemias, na sua forma homozigótica, constituem entidades patológicas graves, com êxito letal geralmente na infância.

Na forma heterozigótica, entretanto, não causam comprometimento grave da saúde dos afetados. De fato, o quadro clínico brando, ou mesmo a normalidade observada na grande maioria dos casos de talassemia β e $\delta\beta$ heterozigóticas, permite que as investigações censitárias a respeito das mesmas sejam realizadas em populações adultas e produtivas.

Frante à necessidade de se definir, na presente investigação, quais as variantes talassêmicas que seriam primordialmente visadas, escolheu-se aquelas mais frequentemente descritas na região mediterrânea, sobretudo na Itália, uma vez que considerável parte da população do Estado de São Paulo é de ascendência italiana. Assim sendo, investigou-se a prevalência do traço talassêmico β , juntamente com o $\delta\beta$, em uma população constituída por estudantes universitários e de um colégio técnico.

O diagnóstico de casos isolados de talassemia heterozigótica fundamenta-se, predominantemente, na combinação das informações fornecidas pelos exames hematológicos, pelos estudos hemoglobínicos, pelo estudo familiar e, assessoramente, pela história clínica, exame físico e outros exames subsidiários.

Visto que os estudos bioquímicos, que são de fundamental importância, requerem técnicas trabalhosas e dispendiosas, impõe-se, no estudo de populações, o uso de um teste de triagem adequado, através do qual se possa selecionar os casos que, realmente, mereçam a investigação diagnóstica completa.

Tendo-se em vista o grande número de variantes de talassemia, torna-se patente a dificuldade de escolha de um teste de triagem adequado a todas elas simultaneamente, problema esse que persiste, mesmo quando a pesquisa se dirige primordialmente para a detecção de apenas os heterozigotos das talassemias β e $\delta\beta$.

Nas primeiras investigações a respeito da prevalência das talassemias usou-se sempre, como teste de triagem, a determinação da resistência osmótica das hemácias, já que essa se encontra aumentada em praticamente todos os tipos de talassemia, até mesmo nos casos em que todas as outras alterações hematológicas são mínimas. Aliás, o aumen-

to da resistência osmótica das hemácias sempre foi considerado como uma das características mais marcantes das talassemias. Assim, nos primeiros casos descritos de anemia de Cooley (COOLEY e LEE, 1925) já se fazia referência a tal alteração hematológica, atribuindo-se a CAMINOPETROS (1937) a descoberta de que a resistência osmótica das hemácias se encontra também aumentada nos genitores de crianças com anemia de Cooley. Passou-se, então, a usar tal característica para a detecção de indivíduos portadores de talassemia β heterozigótica, critério esse exaustivamente usado na Itália, sobretudo por SILVESTRONI e BIANCO (1949, 1959).

Realmente, a resistência osmótica das hemácias encontra-se aumentada em todas as variantes de talassemia β e $\delta\beta$ homo- e heterozigóticas, e também, embora de forma menos acentuada, nas talassemias α (WEATHERALL, 1967). WINTROBE (1967) refere que a resistência osmótica dos eritrócitos pode estar tão aumentada na talassemia β homozigótica que, às vezes, se pode observar hemólise incompleta em soluções salinas a 0,03% ou, até mesmo, em água destilada. Lembre-se, de passagem, que, normalmente, ocorre hemólise completa em soluções salinas no intervalo entre 0,30% a 0,33%.

Esse seria, realmente, um ótimo teste de triagem se não apresentasse o inconveniente de incluir, entre os selecionados, casos falsamente positivos, principalmente indivíduos com anemia ferropriva e, o que é mais grave, excluir da amostra muitos casos falsamente negativos (WEATHERALL, 1967; PEARSON et al., 1973).

Embora a determinação da resistência osmótica das hemácias constitua um teste de triagem pouco seguro, quando usado isoladamente, ele é muito importante na investigação de qualquer caso em que se suspeite dessa hemoglobinopatia. Por essa razão, adotou-se o estudo da resistência osmótica das hemácias como um dos testes de triagem dessa pesquisa, não tendo sido observado nenhum caso falsamente negativo.

Aliás, a resistência globular osmótica aumentada tem sido observada, também, na vigência de icterícia e em casos de outros tipos de anemia hipocrômica, sobretudo na ferropriva, bem como na siclemia e na policitemia vera (WINTROBE, 1967)..

GOUTTAS (1961), estudando 395 indivíduos certamente heterozigotos da talassemia β , e considerando a talassemia $\delta\beta$ como uma variante de talassemia β , encontrou as alterações apresentadas na tabela V.1.

Tab.V.1 - Alterações encontradas em 395 indivíduos heterozigotos das talassemias β e $\delta\beta$ (GOUTTAS, 1961).

ALTERAÇÃO	Nº	%
Esfregaço sanguíneo alterado	389	98,4
Aumento da hemoglobina A2	370	93,6
Aumento da hemoglobina F	191	48,7

Segundo os dados expressos na tabela V.1, o estudo das características da série vermelha do esfregaço sanguíneo constitui um excelente teste de triagem das talassemias β e $\delta\beta$, tendo sido, por isso, também adotado na pesquisa. Existe, no entanto, um detalhe que deve ser levado em consideração, ou seja, o de não serem excepcionais os casos de portadores do traço talassêmico β e $\delta\beta$ que apresentam apenas alterações mínimas do esfregaço e que podem ser considerados como negativos por um examinador inexperiente. Com a preocupação de evitar tal fato, considerou-se como sendo positivos, para fins de triagem, mesmo aqueles casos apenas levemente alterados ou duvidosos, embora se tenha constatado, posteriormente, que os talassêmicos possuíam esfregaços francamente alterados.

Mc PHEDRAN e colaboradores (1972), procedendo à determinação eletrônica do volume corpuscular médio das hemácias (V.C.M.) em pacientes hospitalizados, encontraram em 100 pacientes com microcitose acentuada (V.C.M. $< 70 \mu^3$) 50 casos de anemia ferropriva e 25 casos de talassemia. Baseando-se nesse resultado, PEARSON e colaboradores (1973) resolveram testar a validade da determinação eletrônica do volume corpuscular médio das hemácias como teste de triagem das talassemias, obtendo resposta bastante satisfatória. O valor do volume corpuscular médio das hemácias igual a $79 \mu^3$ mostrou-se, no estudo dos autores acima referidos, como sendo um bom índice discriminante entre talassêmicos e não-talassêmicos. Para maior segurança, usou-se na pesquisa o valor de $82 \mu^3$ como limite inferior da normalidade do V.C.M.,

constatando-se, realmente, que um dos talassêmicos possuía V.C.M. igual a $80 \mu^3$.

Sabe-se, outrossim, que uma alteração hematológica bastante característica do portador dos traços talassêmicos β e $\delta\beta$ é a diminuição da sua hemoglobina corpuscular média (Hb.C.M.), o que seria o resultado da combinação de efeitos de duas alterações opostas: aumento da produção de hemácias, por um lado, e discreta diminuição da síntese de hemoglobina, por outro (WEATHERALL, 1967).

MALAMOS e colaboradores (1962) recomendam a determinação da hemoglobina corpuscular média como teste de triagem das talassemias heterozigóticas, tendo-a encontrada diminuída (Hb.C.M. $< 27 \text{ pg}$) em cerca de 97% dos 109 talassêmicos heterozigotos por eles estudados. No presente trabalho encontrou-se diminuição da Hb.C.M. em todos talassêmicos.

Poder-se-ia, portanto, com grande comodidade, usar apenas a determinação eletrônica do volume corpuscular médio e da hemoglobina corpuscular média das hemácias como testes de triagem da forma heterozigótica das talassemias β e $\delta\beta$, separando da amostra inicial, para estudo posterior, aqueles indivíduos que apresentassem um desses parâmetros diminuídos, ou os dois conjuntamente. Esse critério, aliás, é o adotado por KNOX-MACAULAY e colaboradores (1973), nas suas pesquisas a respeito das síndromes talassêmicas na Inglaterra.

Para maior segurança optou-se, no entanto, pela adoção de uma associação de testes de triagem, os quais, entretanto, se mostraram igualmente eficientes, uma vez que todos talassêmicos diagnosticados na amostra pertenciam à classe A, isto é, foram selecionados simultaneamente pelos quatro critérios de triagem.

Todos indivíduos selecionados pelo teste inicial deveriam ser, obviamente, submetidos, em seguida, a exames bioquímicos, ou seja, dosagem das hemoglobinas A2 e fetal, com o objetivo de se diagnosticar os eventuais portadores das talassemias β e $\delta\beta$ presentes na amostra triada.

Como já se mencionou anteriormente, desde a observação inicial de KUNKEL e colaboradores (1957), considere

ra-se o aumento constante dos níveis de hemoglobina A2 na forma heterozigótica da talassemia A2 como o principal dado diagnóstico dessa variedade talassêmica. Levando em consideração o fato de ser essa variante, entre todas, a mais frequentemente descrita, e lembrando que a hemoglobina A2 se apresenta igualmente elevada na variante A2F de talassemia β heterozigótica (SCHOKKER et al., 1966), torna-se óbvia a obrigatoriedade da determinação dos níveis dessa hemoglobina em qualquer investigação a respeito da frequência das talassemias β em populações.

Duas ressalvas, no entanto, devem ser feitas. Uma quanto ao estudo de crianças com menos de seis meses de idade, já que a hemoglobina A2 não alcança seu nível adulto antes dessa idade (WEATHERALL, 1967), e outra quanto ao estudo de pacientes grávidas, pois existem comunicações assinalando que o nível de hemoglobina A2 pode se elevar nos últimos meses da gravidez (OKCUOGLU et al., 1963 apud WEATHERALL, 1967).

Níveis elevados de hemoglobina A2 podem também estar associados à anemia perniciosa (JOSEPHSON et al., 1958), à hemoglobina Zurich (RIEDER et al., 1965) e à hemoglobina Tacoma (BAUR e MOTULSKY, 1965). ARENDS (1967) encontrou níveis aumentados de hemoglobina A2 em pacientes portadores de malária aguda crônica, infestados pelo Plasmodium vivax. WEATHERALL e colaboradores (1971), por outro lado, não constatarem percentuais aumentados dessa hemoglobina em pacientes infestados pelo Plasmodium falciparum. Níveis diminuídos de hemoglobina A2 são observados, sobretudo, nos casos de anemia ferropriva (WASI et al., 1968; STEINER et al., 1971).

Várias técnicas podem ser usadas para determinação dos níveis de hemoglobina A2, dentre as quais podem-se mencionar a eletroforese em gel de amido (GOLDBERG, 1958; GRATZNER e BEAVEN, 1960; ESAN, 1972), a eletroforese em bloco de amido (GERALD, 1958; GERALD e DIAMOND, 1958), a eletroforese em gel de ágar (YAKULIS et al., 1960), a eletroforese em membrana de acetato de celulose (PETRAKIS et al., 1962) e a cromatografia, empregando celulose DEAE (BERNINI, 1969). Optou-se pela eletroforese em membranas de acetato

de celulose, com bons resultados, tanto na apreciação qualitativa do aumento da fração hemoglobínica A2, quanto na sua quantificação.

A necessidade da determinação do percentual da hemoglobina fetal também se impõe numa pesquisa dessa natureza pelo fato de níveis elevados dessa hemoglobina constituírem o principal dado diagnóstico de uma das variedades importantes de talassemia, ou seja, da talassemia $\delta\beta$ (ZUELZER et al., 1961; GABUZDA et al., 1964; WEATHERALL, 1964), encontrando-se, também, percentuais aumentados dessa hemoglobina na talassemia A2F (SCHOKKER et al., 1966), e, ocasionalmente, na talassemia A2 (BEAVEN et al., 1961; WEATHERALL, 1964, 1967).

Aqui convém mencionar que aumentos percentuais dessa hemoglobina são igualmente encontrados na persistência hereditária da hemoglobina fetal (BAGLIONI, 1963, CONLEY et al., 1963; FESSAS e STAMATOYANNOPOULOS, 1964), e também, embora de forma moderada, durante a gravidez e em alguns casos de leucemia aguda, de anemia aplástica e de outras anemias hemolíticas diferentes das talassemias (JOSEPHSON et al., 1958).

A determinação da porcentagem de hemoglobina fetal é feita através da sua dosagem bioquímica, sendo a técnica mais simples a de SINGER e colaboradores (1951). Esse método, no entanto, não é seguro para valores de hemoglobina fetal inferiores a 5% da hemoglobina total (WEATHERALL, 1967). Visto que em muitos indivíduos heterozigotos das talassemias se encontra apenas um ligeiro aumento da hemoglobina fetal, torna-se necessário o emprego de outros métodos mais sensíveis, dentre os quais, tem-se uma modificação muito útil da técnica de SINGER et al., 1951 (BETKE et al., 1959), que foi, justamente, a empregada na pesquisa. Os valores normais, para o adulto, segundo essa técnica, variam de 0,5% a 1% da hemoglobina total, podendo as cifras superiores a 1,5% serem consideradas altas.

A diferenciação entre casos de talassemia β heterozigótica do terceiro tipo (com níveis normais de hemoglobinas A2 e fetal) e a anemia ferropriva nem sempre é fácil e, por isso, numa investigação a respeito da frequência das

talassemias, torna-se indispensável o uso de um teste que permita, quando necessário, distinguir as duas entidades clínicas. Parece estar plenamente estabelecido que a dosagem do ferro sérico representa um índice bastante útil na diferenciação entre as duas condições, uma vez que o mesmo se apresenta normal ou elevado na talassemia β heterozigótica e acentuadamente diminuído na anemia ferropriva (HARRIS, 1963; LEHMANN e HUNTSMAN, 1966; WINTROBE, 1967; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1967).

Deve ser lembrada, ainda, a possibilidade de coexistência da talassemia β ou $\delta\beta$ e anemia ferropriva no mesmo indivíduo, o que, certamente, é particularmente verdadeiro em populações com alta frequência de anemia ferropriva. KATTAMIS e colaboradores (1972), procedendo à dosagem do ferro sérico em 106 heterozigotos das talassemias β e $\delta\beta$, encontraram revelações interessantes no estudo dos portadores de talassemia e anemia ferropriva simultaneamente. Entre elas, deve-se mencionar a de que a deficiência de ferro inibe a síntese de hemoglobina A2, mesmo nos indivíduos portadores do traço talassêmico A2. De fato, nos não-talassêmicos apresentando ferro sérico normal, os autores encontraram o percentual médio de hemoglobina A2 igual a 2,6%, enquanto que naqueles que apresentavam ferro sérico diminuído, o valor médio encontrado foi de 1,7%. Entre talassêmicos A2 heterozigotos, foi encontrado o percentual médio de 5,6% de hemoglobina A2 naqueles com níveis normais de ferro sérico, contra o valor de 4,6% observado nos indivíduos com ferro sérico diminuído. Quanto à hemoglobina fetal, por outro lado, não se observou alteração em seu percentual nos indivíduos com deficiência de ferro.

Sendo a população estudada na presente pesquisa socialmente diferenciada e aparentemente sadia, não seria de se esperar o encontro de alta frequência de portadores de anemia ferropriva intensa. Realmente, foram detectados apenas dois casos de moderada intensidade, que mereceram a diferenciação diagnóstica com o estado de portador da talassemia β .

A incubação das hemácias com azul-cresil brilhante deve ser um procedimento de rotina em todos casos em que

se suspeito do traço talassêmico α , com a finalidade de demonstrar corpos de inclusão formados por precipitados de hemoglobina H (GOUTTAS et al., 1955). Tal procedimento, no entanto, não se fez necessário na presente pesquisa.

Finalizando essa discussão, cumpre assinalar que a metodologia usada no presente trabalho obedeceu àquela que deve ser adotada em estudos visando a investigação ao nível de populações. Por esse motivo, foram realizados apenas os exames considerados indispensáveis para o diagnóstico de certeza dos traços talassêmicos β e $\delta\beta$.

V.2 - Discussão dos resultados

A prevalência do traço talassêmico β na amostra analisada como um todo foi igual a 1,12%, não causando surpresa a ausência de portadores do traço talassêmico $\delta\beta$, uma vez que esse tipo de talassemia é, realmente, descrito com bem menor frequência, mesmo nos países da área mediterrânea. No entanto, quando os indivíduos da amostra examinada foram classificados de acordo com os grupos étnicos a que pertencem, através da investigação de sua ascendência até os bisavós, a prevalência da talassemia β heterozigótica foi notavelmente alterada. De fato, examinando a tabela V.2, na qual a prevalência da talassemia β heterozigótica é apresentada na amostra distribuída de acordo com os grandes grupos raciais, e subclassificada segundo a origem dos ancestrais dos indivíduos examinados, fica patente a importância da contribuição italiana, no que diz respeito à frequência da talassemia β entre nós.

Dentre os nove talassêmicos detectados na amostra, sete são brasileiros, nascidos no Estado de São Paulo e dois são estrangeiros radicados no Brasil, sendo um deles italiano, proveniente de Matera, e o outro chinês, proveniente de Formosa.

A importância da imigração italiana no Estado de São Paulo é indiscutível, como se pode depreender dos dados da tabela V.3, tirados da investigação de SALDANHA (1968) em uma região vizinha à Campinas (Capivari, SP). Na mesma tabela estão incluídos os dados desse autor a respei

Tab.V.2 - Prevalência da talassemia β heterozigótica de acordo com os grupos raciais e a origem dos ascendentes dos indivíduos examinados.

GRUPO RACIAL	ORIGEM DOS ASCENDENTES	Nº	TALASSEMICOS	
			Nº	%
Caucasóides (678)	1) Ancestrais só de origem italiana	78	5	6,41
	2) Pelo menos um ancestral de origem italiana	302	3	0,99
	3) Ancestrais de outra origem mediterrânea	281	0	0
	4) Ancestrais de origem não mediterrânea	17	0	0
Mongolóides (107)	1) Ancestrais de origem japonesa	106	0	0
	2) Ancestrais de origem chinesa	1	1	-
Negróides (15)		15	0	0
TOTAL		800	9	1,12

Tab.V.3 - Frequência relativa de diversos grupos estrangeiros registrados em Capivari, SP, no Estado de São Paulo e no Brasil durante o censo de 1950 (SALGANHA, 1968).

Local	Italianos	Espanhóis	Portugueses	Sírios	Franceses	Austríacos	Alemães	Outros
Capivari *	66,8	14,4	4,0	10,6	-	1,7	0,9	1,7
Est. S. Paulo	23,2	14,4	22,2	3,3	0,5	1,2	3,6	31,6
Brasil	18,2	10,6	28,6	3,7	0,7	1,3	5,4	31,5

* Excluindo os naturalizados

to da proporção de estrangeiros no Estado de São Paulo e no Brasil.

Associando-se tal fato aos resultados da presente pesquisa, pode-se afirmar que a talassemia β heterozigótica é uma condição importante entre nós, devendo os hematologistas estar atentos a ela, incluindo-a no diagnóstico diferencial das anemias microcíticas. Lembre-se, por outro lado, que a detecção do portador assintomático da talassemia β reveste-se, também, de grande importância, não apenas no que diz respeito aos cuidados individuais mas, sobretudo, em termos de aconselhamento genético.

Os portadores do traço talassêmico β não necessitam, usualmente, cuidados especiais, a não ser em situações de sobrecarga para o organismo como a representada, por exemplo, pela gravidez, quando então é indispensável o recebimento de uma suplementação adequada de ácido fólico (WEATHERALL, 1972). No entanto, o aspecto clínico mais importante do problema do talassêmico β heterozigoto diz respeito à possibilidade de confusão diagnóstica entre o seu estado e a anemia ferropriva.

A situação dos nove talassêmicos detectados na amostra é bastante ilustrativa quanto a esse particular, uma vez que todos desconheciam o fato de serem portadores de uma hemoglobinopatia hereditária, tendo vários deles já sido medicados anteriormente com sulfato ferroso. Tal conduta terapêutica deve ter sido tomada, provavelmente, com base nos níveis hemoglobínicos ligeiramente diminuídos e na microcitose observada em seus esfregaços sanguíneos. Torna-se dispensável comentar a impropriedade dessa medicação que, além de ineficaz, é iatrogênica, uma vez que oferece o risco potencial de prejudicar o paciente, causando-lhe uma hemossiderose (CROSBY, 1972).

Ainda com relação a esse aspecto do problema, é digno de nota o fato de ter sido proposta, nos EE.UU, uma lei tornando obrigatório o enriquecimento da farinha de trigo com compostos ferrosos, visando, com isso, prevenir a anemia ferropriva. Obviamente, essa proposta foi severamente criticada pelos hematologistas americanos, uma vez que poderia prejudicar muitos indivíduos, dentre os quais, toda a

população de talassêmicos daquele país (CROSBY, 1972).

Quanto ao aconselhamento genético, a pesquisa da talassemia β heterozigótica deveria ser incluída rotineiramente, por exemplo, no exame pré-nupcial dos indivíduos de ascendência italiana, podendo-se submetê-los, inicialmente, a testes simplificados de triagem e, dependendo do resultado, proceder-se-iam ou não as dosagens bioquímicas. Dessa forma, usando testes simples, econômicos e já padronizados em praticamente todos os laboratórios de análises clínicas, estaria sendo prevenido o nascimento de homozigotos da talassemia β . Cumpre ressaltar que tais homozigotos, portadores de anemia hemolítica grave, embora não constituam um problema de Saúde Pública entre nós, representam um problema gravíssimo ao nível familiar e individual.

A pesquisa do traço talassêmico β é, pois, obrigatória no futuro cônjuge de um heterozigoto da talassemia β , bem como na prole de casais constituídos por um heterozigoto dessa talassemia e um homozigoto normal, uma vez que seus filhos correm o risco de 50% de serem portadores do traço talassêmico β .

Os resultados da presente pesquisa permitem concluir, ainda, que a talassemia β deve ser, igualmente, um problema importante em outras regiões do Brasil que também receberam grandes contingentes de imigrantes italianos, como é o caso, por exemplo, dos Estados do Rio Grande do Sul e do Paraná. Por outro lado, é fácil aceitar que, dentro do Estado de São Paulo, a prevalência dessa hemoglobinopatia deve variar de uma região para outra, sendo maior nos núcleos onde o contingente da população de origem italiana é mais alto.

Visto que a prevalência da talassemia β é muito variável nas próprias populações da Itália, parece claro, também, que outro ponto importante que deve ser levado em conta na investigação da frequência dessa hemoglobinopatia, entre nós, é o local de origem dos ancestrais italianos dos indivíduos de nossas populações. Assim, por exemplo, as populações da região de Campinas e áreas vizinhas, que receberam imigrantes italianos predominantemente de Veneto (Veneza, Pádua, Treviso, Rovigo, Verona), Lombardia (Mântua,

Milão) e Emília Romana (Ferrara, Bolonha, Parma, Módena) (SALDANHA, 1968), regiões que são consideradas como de alta prevalência de talassemia β (SILVESTRONI e BIANCO, 1959), devem merecer maiores atenções na investigação dessa hemoglobinopatia. Isso não exclui, evidentemente, a eventual importância da contribuição, em termos de talassemia β , dada por outros imigrantes.

Frente aos resultados obtidos no presente trabalho, é plausível supor que a prevalência da talassemia β , entre nós, devia ser praticamente nula até a segunda metade do século XIX, ou seja, até a sua introdução, em nosso meio, pelos maciços contingentes imigratórios italianos.

Aceita essa premissa, duas situações devem ser consideradas ao se discutir a dinâmica do gene da talassemia β em nossas populações: a) a quebra dos isolados italianos, originando populações miscigenadas; b) a não miscigenação, por razões diversas, de populações de origem italiana.

Visto que os estudantes examinados foram escolhidos aleatoriamente e que, dentre aqueles com ascendência italiana (380), 78 eram descendentes não miscigenados, isto é, tinham os oito bisavós italianos, pode-se dizer que a fração não miscigenada da amostra analisada corresponde a aproximadamente 20% dos indivíduos com pelo menos um ancestral italiano.

A importância da miscigenação como fator capaz de alterar as frequências gênicas é nitidamente traduzida pela diferença entre as prevalências do traço talassêmico β observadas nas subamostras miscigenada e não miscigenada, uma vez que nessa última a prevalência do traço talassêmico foi de 6,41%, enquanto que na primeira ela foi de 0,99%.

Chama a atenção, por outro lado, o fato de a prevalência do traço talassêmico β , encontrada na subamostra não miscigenada (6,41%) ser semelhante àquela encontrada em algumas regiões da Itália, embora menor, obviamente, que a comumente descrita nas áreas italianas de altíssima prevalência de talassemia β , como, por exemplo, o vale do Pô, a Sardenha e a Sicília (SILVESTRONI e BIANCO, 1959; RUCKNAGEL, 1966; TERRENATO, 1973). Além disso, examinando-se a tabela II.1 é possível notar que a prevalência aqui encontrada não

difere muito daquelas assinaladas em várias populações humanas, as quais são consideradas, classicamente, como tendo alta prevalência de talassemia β .

De qualquer modo, cumpre lembrar, mais uma vez, que as frequências dessa hemoglobinopatia nos diversos países onde foi estudada estão sendo constantemente revistas, à medida que são usados métodos mais seguros de investigação. Isso porque nos primeiros estudos a respeito da prevalência da talassemia β havia muita confusão diagnóstica entre essa hemoglobinopatia e a anemia ferropriva, disso resultando, evidentemente, superestimativas daquela condição.

O casamento entre indivíduos de origem italiana representa, obviamente, uma barreira à diluição do gene da talassemia β na nossa população. Tal evento deve ter ocorrido em proporção apreciável nos primeiros tempos da imigração italiana no Brasil. Apesar da tendência para a quebra dos isolados, e consequente miscigenação com a população receptora, aumentar progressivamente, sobretudo devido à ausência de grandes diferenças raciais e religiosas, bem como em decorrência das facilidades de mobilidade social, o isolamento genético pode ter persistido em algumas regiões do nosso Estado. Pode-se supor, portanto, que a prevalência da talassemia β deve ser maior nas nossas comunidades de origem italiana que, por razões diversas, permaneceram mais refratárias à miscigenação. Assim, por exemplo, em algumas das pequenas cidades do interior do Estado de São Paulo, onde a maior parte da população tem origem italiana, o casamento entre indivíduos com tal origem, embora não preferencial, é mais frequente que nos grandes centros urbanos, onde há coexistência de indivíduos de ascendências diversas.

Se na população receptora a frequência de um gene é p_1 , enquanto na população imigrante esta frequência é $p_2 \neq p_1$, é claro que, se a população receptora contribuir com um percentual x para a população híbrida (o que equivale a dizer que a imigrante contribui com um percentual $1-x$), tem-se que a frequência gênica p_m da população miscigenada será:

$$p_m = x p_1 + (1-x) p_2$$

Essa fórmula pode ser transformada de modo a permitir a estimativa da proporção x da população que interveio na constituição da população miscigenada (BERNSTEIN, 1931; OTTENSPOOSER, 1944), isto é, ser escrita como:

$$x = \frac{p_m - p_2}{p_1 - p_2}$$

Usando os dados obtidos no presente trabalho, tem-se pois:

$$x = \frac{0,0099 - 0,0641}{0 - 0,0641} = 0,845 \text{ ou } 84,5\%$$

visto que $p_m = 0,0099$, $p_2 = 0,0641$ e a frequência p_1 pode ser considerada como nula.

Dessa forma, a contribuição da população receptora deveria ser de, aproximadamente, 85%, enquanto que a proporção de italianos deveria ser de, aproximadamente, 15%. No entanto, verificando a origem dos 2.416 bisavós dos 302 indivíduos da subamostra miscigenada encontrou-se uma proporção de 42,2% de indivíduos de origem italiana, valor esse que se afasta significativamente do valor teoricamente esperado (15,5%). Várias hipóteses podem ser levantadas para explicar esse desvio entre os valores observado e esperado, tais como:

1. A prevalência do gene da talassemia β na população italiana que se miscigenou com a receptora poderia ser, na realidade, menor que a usada no cálculo mencionado, ou seja, menor que a encontrada na subamostra não miscigenada estudada.

Tal afirmativa não carece de fundamento, uma vez que os italianos provenientes das regiões rurais do vale do Pô, onde a prevalência da talassemia β é especialmente alta, estabeleceram-se, aqui no Brasil, também em regiões rurais, dedicando-se principalmente à lavoura. Evidentemente, as barreiras contrárias à quebra dos isolados e consequente miscigenação desses italianos com as nossas populações receptoras foram maiores que as oferecidas àqueles provenientes dos grandes centros urbanos da Itália, onde a prevalência da talassemia β é menor, e que se estabeleceram nas nossas cidades, dedicando-se ao comércio, ao artesanato ou à pequena indústria.

2. Vários autores referem a ocorrência de portadores "silenciosos" do traço talassêmico, não detectáveis por nenhum teste de triagem (KAN et al., 1968; SCHWARTZ, 1969; SMITH et al., 1971; WEATHERALL, 1972). A possibilidade de maior ocorrência desses talassêmicos "silenciosos" entre indivíduos de ascendência mista não pode ser totalmente afastada, uma vez que a expressão do gene da talassemia β poderia estar, eventualmente, condicionada à sua interação com outros fatores genéticos do indivíduo.
3. Visto que a origem dos bisavós dos estudantes só podia ser obtida mediante informações fornecidas pelos mesmos, ou por seus familiares, é possível supor a ocorrência de superestimativa da proporção de italianos por erro de informação. Em outras palavras, é plausível supor que, nos casos com ascendência mista, a informação a respeito dos ancestrais possa permitir maior distorção do que naqueles sem miscigenação. Assim, por exemplo, havendo dúvida quanto a origem de um dos constituintes de um dos casais de bisavós, mas sendo o seu cônjuge certamente de origem italiana, poderia haver, por parte dos informantes, uma tendência para a generalização, informando, assim, que o casal de bisavós possuía origem italiana.

Por outro lado, é mais fácil aceitar que os informantes deveriam tender a supervalorização da ascendência brasileira, e não da italiana, o que seria particularmente verdadeiro para os estudantes sem sobrenome italiano. Esse fato, evidentemente, fala contra essa terceira hipótese.

Das três hipóteses apresentadas, a segunda seria a de mais fácil averiguação em nosso meio, bastando, para tanto, estudar os filhos de dois tipos de casais:

1. casais constituídos por um heterozigoto da talassemia β de origem italiana e um homozigoto normal de origem não italiana;
2. casais constituídos por um heterozigoto da talassemia β de origem italiana e um homozigoto normal também de origem italiana.

Caso a hipótese aventada possua, realmente, fundamento, a proporção de casos de talassemia β diagnosticados

entre os filhos de genitores de diferentes origens (casais do primeiro tipo) deveria ser significativamente menor do que a observada entre os filhos de genitores de origem italiana (casais do segundo tipo). Em outras palavras, essa proporção deveria ser significativamente menor do que a teoricamente esperada de 50%.

Finalizando esta discussão, algumas considerações merecem ser feitas com relação ao encontro de dois portadores da hemoglobinopatia D heterozigótica dentre os 98 indivíduos submetidos à eletroforese de hemoglobinas. Trata-se de dois estudantes caucasóides, um do sexo masculino e outro do sexo feminino, completamente assintomáticos e que foram triados da amostra inicial pelo fato de um deles apresentar ligeiras alterações da morfologia da série vermelha no esfregaço sanguíneo, e o outro, turvação duvidosa em um dos tubos do teste de resistência osmótica.

Investigando a ascendência desses indivíduos, constatou-se que ambos são descendentes de portugueses, o que está de acordo com a hipótese de terem sido os ibéricos os principais introdutores da hemoglobina D no Brasil (ARAÚJO, 1965).

VI. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

As populações caucasóides que deram origem às do Estado de São Paulo procedem, basicamente, dos países europeus da área do Mediterrâneo, cumprindo ressaltar que, a partir da segunda metade do século passado, houve maciço contingente imigratório italiano para este Estado, procedente, principalmente, da região do vale do Pô e do Sul da Itália, onde a prevalência da talassemia β é especialmente alta.

Tendo em vista a ausência de estudos epidemiológicos sistemáticos das síndromes talassêmicas no Estado de São Paulo, o autor se propôs, após fazer uma revisão crítica da literatura a respeito do problema das talassemias em geral, a avaliar a importância das talassemias β e $\delta\beta$ em nosso meio.

Foram estudados 800 estudantes da Universidade Estadual de Campinas, inclusive do Colégio Técnico, convocados por ordem de matrícula e não submetidos a qualquer processo de seleção prévia, realizando-se a pesquisa em duas etapas.

A primeira etapa consistiu da triagem dos casos suspeitos de talassemia β e $\delta\beta$, na qual foram adotados quatro critérios independentes de seleção dos indivíduos, a saber, alteração da morfologia dos eritrócitos, diminuição da hemoglobina corpuscular média, diminuição do volume corpuscular médio das hemácias e aumento da resistência osmótica das hemácias.

Os 98 estudantes triados nessa fase inicial da pesquisa foram investigados com a finalidade de se diagnosticar os eventuais portadores dos traços talassêmicos β e $\delta\beta$. Para tanto, foram usados critérios bioquímicos (aumento do percentual da hemoglobina A2 e aumento do percentual da hemoglobina fetal) e hematológicos (alteração da morfologia dos eritrócitos, aumento da resistência osmótica das hemácias, diminuição da hemoglobina corpuscular média e diminuição do volume corpuscular médio das he

mácias).

Exigiu-se, para o diagnóstico do estado de portador dos traços talassêmicos β ou $\delta\beta$ a presença de pelo menos três dos quatro critérios hematológicos e de pelo menos um dos dois critérios bioquímicos. O tipo de talassemia foi determinado com base nos níveis das hemoglobinas A2 e fetal.

Foram diagnosticados nove casos de talassemia β heterozigótica, todos assintomáticos e pertencentes à classe dos indivíduos triados simultaneamente pelos quatro critérios de seleção. Oito desses talassêmicos eram caucasóides, descendentes miscigenados ou não de italianos, e apenas um era mongolóide, nascido na China (Formosa) e radicado no Brasil. Não foram encontrados portadores do traço talassêmico $\delta\beta$.

A prevalência do traço talassêmico β na amostra analisada como um todo foi igual a 1,12%. No entanto, quando os indivíduos foram classificados de acordo com os grupos étnicos a que pertenciam, através da investigação de sua ascendência até os bisavós, verificou-se que a prevalência do traço talassêmico foi de 6,41% entre os descendentes não miscigenados de italianos, enquanto que na subamostra miscigenada ela foi de apenas 0,99%.

Os resultados do presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

1. A talassemia β heterozigótica é uma condição importante entre nós, devendo os hematologistas estar atentos a ela, seja para fins de diagnóstico diferencial das anemias microcíticas, seja para fins de aconselhamento genético ou de cuidados individuais, mesmo em casos de portadores assintomáticos da talassemia β .
2. A confusão diagnóstica entre a talassemia β heterozigótica e a anemia ferropriva parece ser bastante frequente em nosso meio. A situação dos nove talassêmicos detectados na amostra é bastante ilustrativa quanto a esse particular, uma vez que todos desconheciam o fato de serem portadores de uma hemoglobinopatia hereditária, tendo vários deles já sido medicados anteriormente com

sulfato ferroso, correndo o risco, portanto, de manifestarem hemossiderose. Tal conduta terapêutica deve ter sido tomada, provavelmente, com base nos níveis hemoglobínicos ligeiramente diminuídos e na microcitose observada em seus esfregaços sanguíneos.

3. A prevalência do traço talassêmico β encontrada entre os descendentes não miscigenados de italianos (6,41%) é semelhante àquela encontrada em algumas populações da Itália e em outras populações humanas que são consideradas, classicamente, como tendo alta prevalência dessa talassemia.
4. A prevalência da talassemia β , entre nós, devia ser praticamente nula até a segunda metade do século XIX, ou seja, até a sua introdução, em nosso meio, pelos maciços contingentes imigratórios italianos.
5. Dentro do Estado de São Paulo, a prevalência dessa hemoglobinopatia deve variar de uma região para outra, sendo maior nos núcleos onde o contingente da população de origem italiana é mais alto.
6. A prevalência da talassemia β deve ser maior nas regiões do Estado de São Paulo que receberam imigrantes provenientes de áreas italianas de alta prevalência dessa talassemia. Assim, por exemplo, as populações da região de Campinas e áreas vizinhas, que receberam imigrantes italianos predominantemente de Veneto (Veneza, Pádua, Treviso, Rovigo, Verona), Lombardia (Mântua, Milão) e Emília Romana (Ferrara, Bolonha, Parma, Módena), regiões que são consideradas como de alta prevalência de talassemia β , devem merecer maiores atenções na investigação dessa hemoglobinopatia.
7. A prevalência da talassemia β deve ser maior nas nossas comunidades de origem italiana que, por razões diversas, permaneceram mais refratárias à miscigenação.
8. A talassemia β deve constituir um problema igualmente im-

portante em outras regiões do Brasil que também receberam grandes contingentes de imigrantes italianos, como é o caso, por exemplo, dos Estados do Rio Grande do Sul e do Paraná.

9. A contribuição italiana em termos de talassemia β , embora seja a mais importante entre nós, não exclui a contribuição dada por outros imigrantes.
10. Verificando a origem dos 2.416 bisavões dos 302 indivíduos da subamostra miscigenada, encontrou-se uma proporção de 42,2% de indivíduos de origem italiana, valor esse que se afasta significativamente do valor teoricamente esperado de 15,5%. Três hipóteses podem ser levantadas para explicar esse desvio entre os valores observado e esperado:
 1. A prevalência do gene da talassemia β na população italiana que se miscigenou com a receptora poderia ser menor do que a encontrada na subamostra não miscigenada estudada.
 2. A ocorrência de talassêmicos "silenciosos", não detectáveis por nenhum teste de triagem, poderia ser maior entre os indivíduos de ascendência mista, uma vez que a expressão do gene da talassemia β poderia estar, eventualmente, condicionada à sua interação com outros fatores genéticos do indivíduo.
 3. Nos casos com ascendência mista, as informações a respeito dos ancestrais poderiam permitir maior distorção do que naqueles sem miscigenação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSOY, M. (1959) "Abnormal haemoglobins in Turkey". In: JONXIS, J.H.P. & DELAFRESNAYE, J.F., eds. "Abnormal Haemoglobins - A Symposium", Oxford, Blackwell, p.216
- ALLISON, A.C. (1954a) Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. Br.Med.J., 1: 290-294.
- ALLISON, A.C. (1954b) The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg., 48: 312-318.
- ARAÚJO, J.T. (1965) Hemoglobinas anormais em São Paulo. J. Bras.Med., 9: 1264-1283.
- AREND, T. (1967) High concentrations of hemoglobin A2 in malaria patients. Nature(Lond), 215: 1517-1518.
- ASHIOTIS, Th.; ZACHARIADIS, Z.; SOFRONIADOU, K., LOUKOPOULOS, D. & STAMATOYANNOPOULOS, G. (1973) Thalassaemia in Cyprus. Br.Med.J., 2: 38-42.
- ATWATER, J.; SCHWARTZ, I.R.; ERSLEY, A.J.; MONTGOMERY, T.D. & TOCANTINS, L.M. (1960) Sickling of erythrocytes in a patient with thalassemia-hemoglobin I disease. N.Engl.J. Med., 263: 1215-1223.
- AUNG-THAN-BATU; UHLA-PE & KHIN-KYI-NYUNT (1971) The incidence of alpha-thalassaemia trait. Trop.Geogr.Med., 23: 23-25.
- AUNG-THAN-BATU; UHLA-PE; KHIN-KYI-NYUNT & TIN-U (1971) Haemoglobinopathies in Burma. IV. Thalassaemia-haemoglobin E disease and thalassaemia major. Trop.Geogr.Med., 23: 25-29.

BAGLIONI, C. (1962) The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. Proc.Nat.Acad.Sci., 48: 1880-1886.

BAGLIONI, C. (1963) A child homozygous for persistence of foetal haemoglobin. Nature (Lond), 198: 1177-1179.

BAGLIONI, C. & COLOMBO, B. (1964) Control of hemoglobin synthesis. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 29: 347-356.

BANK, A.; BRAVERMAN, A.S. & MARKS, P.A. (1969) Globin chain synthesis in thalassemia. Ann.N.Y.Acad.Sci., 165: 231-237.

BANK, A. & MARKS, P. (1966) Excess α chain synthesis relative to β chain synthesis in thalassaemia major and minor. Nature(Lond), 212: 1198-1200.

BANNERMAN, R.M. (1961) "Thalassemia. A survey of some aspects", N.York, Grune & Stratton.

BANWELL, G.S. & STRICKLAND, M. (1964) Haemoglobinopathy associated with recurrent stillbirth. J.Obstet.Gynaecol.Br.Commonw., 71: 788-790.

BARNICOT, N.A.; ALLISON, A.C.; BLUMBERG, B.S.; DELIYANNIS, G.; KRIMBAS, C. & BALLAS, A. (1963) Haemoglobin types in Greek populations. Ann.Hum.Genet., 26: 229-236.

BAUR, E.W. & MOTULSKY, A.G. (1965) Hemoglobin Tacoma-a β -chain variant associated with increased Hb A2. Human-genetik, 1: 621-634.

BEAVEN, G.H.; ELLIS, M.J. & WHITE, J.C. (1961) Studies on human foetal haemoglobin. III. The hereditary haemoglobinopathies and thalassaemia. Br.J.Haemat., 7: 169-186.

BEAVEN, G.H.; STEVENS, B.L.; ELLIS, M.J.; WHITE, J.C.; BERNS

- TOCK, L., MASTER, P. & STAPLETON, T. (1964) Studies of foetal hemoglobin. IV. Thalassaemia-like conditions in British families. Br.J.Haemat., 10: 1-14.
- BEIGUELMAN, B. (1968) "Dinâmica dos genes nas populações e nas famílias", São Paulo, EDART, Coleção Genética Médica, V.3.
- BENZ, E.J. & FORGET, B.G. (1971) Defect in messenger RNA for human hemoglobin synthesis in beta thalassemia. J. Clin. Invest., 50: 2755-2760.
- BERNINI, L. (1969) Rapid estimation of hemoglobin A₂ by DEAE chromatography. Biochem.Genet., 2: 305-310.
- BERNINI, L., COLUCCI, C.F., de MICHELE, D., PIOMELLI, S. & SINISCALCO, M. (1962) A possible case of alpha-beta thalassaemia. Acta Genet.(Basel), 12: 202-208.
- BERNSTEIN, F. (1931) Zur Grundlegung der chromosomentheorie der Vererbung beim Menschen mit besonderer Berücksichtigung der Blutgruppen. Z.indukt.Abstamm.u.Vererbungs1., 57: 113-138.
- BETKE, K., MARTI, H.R. & SCHLICHT, I. (1959) Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. Nature(Lond), 184: 1877-1878.
- BLATRIX, C., DE TRAVERSE, P.M., COQUELET, M.L., ISRAEL, J., PELLETIER, P. & FERRARA, G. (1970) La double heterozygotie hemoglobinoze C-thalassémie dans la race blanche. Presse Med., 78: 1791-1792.
- BOON, W.H. (1973) Alpha-thalassaemia in Singapore. Aust. Paediat.J., 9: 5-9.
- BOYER, S.H., RUCKNAGEL, D.L., WEATHERALL, D.J. & WATSON-WILLIAMS, E.J. (1963) Further evidence for linkage between the β and δ loci governing human hemoglobin and the popu

lation dynamics of linked genes. Am.J.Human Genet., 15: 438-448.

BRANCATI, C. & BAGLIONI, C. (1966) Homozygous $\beta\delta$ thalassaemia ($\beta\delta$ -microcythaemia). Nature(Lond), 212: 262-264.

BRAVERMAN, A., Mc CURDY, P.R. & MANOS, O. (1971) Mild homozygous β -thalassaemia in Negroes. Clin.Res., 19: 407.

BRUMPT, L.C. (1955) A propos de l'anémie de Cooley: Thalassémie ou sinémie ? Bull.Acad.Natl.Med.(Paris), 139: 333-336.

BURKA, E.R. & MARKS, P.A. (1963) Ribosomes active in protein synthesis in human reticulocytes: Defect in thalassaemia major. Nature(Lond), 199: 706-707.

CAMINOPETROS, J. (1937) L'anémie erythroblastique des peuples de la Méditerranée orientale. Monogr.Acad.Athènes, 6: 3.

CARCASSI, V., CEPPELLINI, R. & PITZUS, F. (1957) Frequenza della thalassaemia in quattro popolazioni Sarde e suoi rapporti con la distribuzione dei gruppi sanguigni e della malaria. Boll.Ist.Sieroter.(Milan), 36: 206-218.

CARCASSI, V., CEPPELLINI, R. & SINISCALCO, M. (1957) Il tracciato elettroforetico dell'emoglobina per una migliore discriminazione della talassaemia. Haematol., 42: 1635-1648.

CARNEIRO, J.F. (1950) Imigração e colonização no Brasil. Publ. avulsa nº 2 - Cadeira de Geografia do Brasil, Fac. Nac.Fil.Univ. do Brasil, Rio de Janeiro.

CAUCHI, M.N. (1970) The incidence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and thalassaemia in Malta. Br.J.Haemat., 18: 101-106.

ÇAVDAR, A.O. & ARCASOY, A. (1971) The incidence of β -thalassemia and abnormal hemoglobins in Turkey. Acta Haemat.(Basel), 45: 312-318.

CEPPELLINI, R. (1959) L'emoglobina normale lenta A2. Symposium Geneticae Haematologicae. Acta Genet.Med., 2 (Suppl): 47-68.

CHATTERJEA, J.B. (1959) "Haemoglobinopathy in India" In: JONXIS, J.H.P. & DELAFRESNAYE, J.F., eds., "Abnormal Haemoglobins - A Symposium", Oxford, Blackwell, p.322.

CHERNOFF, A.I. (1959) The distribution of the thalassemia gene: A historical review. Blood, 14: 899-912.

CHOREMIS, C., DEFARANAS, B., FESSAS, P., FRASER, G.R., KATTAMIS, C., LOUKOPOUPOS, D., MOTULSKY, A.G., STAMATOYANNOPOULOS, G. & ZANNOS-MARIOLEA, L. (1964) General aspects of complete village surveys in the Arta area of Greece for thalassemia and its interaction with Hb S and G6PD deficiency. Problems in Cooley anemia. Ann.N.Y.Acad. Sci., 119: 415-435.

CHOREMIS, C., FESSAS, P., KATTAMIS, C., STAMATOYANNOPOULOS, G., ZANNOS-MARIOLEA, L., KARAKLIS, A. & BELIOS, G. (1963) Three inherited red-cell abnormalities in a district of Greece. Lancet, 1: 907-909.

CHOREMIS, C. & ZANNOS, L. (1957) Microdrepanocytic disease in Greece. Blood, 12: 454-460.

CIVIDALLI, G., LOCKER, H. & RUSSELL, A. (1971) Increased permeability of erythrocyte membrane in thalassemia. Blood, 37: 716-724.

CIVIDALLI, G. & RUSSELL, A. (1970) The erythrocyte membrane and its permeability to cations. Harefuah, 78: 372-373.

CLEGG, J.B., NAUGHTON, M.A. & WEATHERALL, D.J. (1965) An

- improved method for the characterization of human haemoglobin mutants: Identification of $\alpha_2 \beta_2$ 95 glu - haemoglobin N (Baltimore). Nature(Lond), 207: 945-947.
- CLEGG, J.B. & WEATHERALL, D.J. (1967) Haemoglobin synthesis in alpha-thalassaemia (Haemoglobin H disease). Nature(Lond), 215: 1241-1243.
- COHEN, F.; ZUELZER, W.W.; NEEL, J.V. & ROBINSON, A.R. (1959) Multiple inherited erythrocyte anomalies in an american Negro family. Hereditary spherocytosis, sickling and thalassemia. Blood, 14: 816-827.
- COMINGS, D.E. (1970) "The hemoglobinopathies and thalassemia" In: GOODMAN, R.M., ed., "Genetic disorders of man", Boston, Little & Brown, p.143.
- COMINGS, D.E. & MOTULSKY, A.G. (1966) Absence of cis delta chain synthesis in $\delta\beta$ -thalassemia (F-thalassemia). Blood, 28: 54-69.
- CONCONI, F.; BARGELLES, A.; DEL SENNO, L.; GABURRO, D.; MELLONI, E.; MENINI, C.; PONTREMOLI, S.; VIGI, V. & VOLPATO, S. (1970) Globin chain synthesis in Ferrara and Sicilian beta-thalassemic subjects. Bull.Soc.Chim.Biol. (Paris), 52: 1147-1168.
- CONDON, P.I. & SERJEANT, G.R. (1972) Ocular findings in sickle-cell thalassemia in Jamaica. Am.J.Ophthalmol., 74: 1105-1109.
- CONLEY, C.L.; WEATHERALL, D.J.; RICHARDSON, S.N.; SHEPHERD, M.K. & CHARACHE, C. (1963) Hereditary persistence of fetal hemoglobin: A study of 79 affected persons in 15 Negro families in Baltimore. Blood, 21: 261-281.
- COOLEY, T.B. (1927) Von Jaksch's anemia. Am.J.Dis.Child., 33: 786.

- COOLEY, T.B. & LEE, P. (1925) A serie of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. Trans.Am.Pediat.Soc., 37: 29.
- CROSBY, W.H. (1972) Letter to the editor. Blood, 39: 298.
- CURTAIN, C.C., KIDSON, C., GAJDUSEK, D.C., GORMAN, J.G. (1962) Distribution pattern, population genetics and anthropological significance of thalassemia and abnormal hemoglobins in Melanesia. Am.J.Phys.Anthropol., 20: 475-483.
- DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. (1970) "Hematologia pratica", 2a. ed., Barcelona, Toray.
- DANCE, N. & HUHENS, E.R. (1962) Investigation of a haemoglobin consisting of γ^F -chains prepered from normal cord blood. Biochem.J., 83: 40-41.
- DIAMOND, M.P., COTGROVE, I. & PARKER, A. (1965) Case of intrauterine death due to α -thalassaemia. Br.Med.J., 2: 278-279.
- DORMONDY, K.M., LOCK, S.P. & LEHMANN, H. (1961) Haemoglobin Q alpha-thalassaemia. Br.Med.J., 1: 1582-1585.
- DUNSTON, I., ROWLAND, R., HUNTSMAN, R.G. & YAWSON, G. (1972) Sickle-cell haemoglobin C disease and sickle-cell β thalassaemia in white south africans. S.Afr.Med.J., 46: 1423-1426.
- ESAN, G.F. (1972) A simple screening procedure for beta thalassaemia. Afr.J.Med.Sci., 3: 223-229.
- FESSAS, P. (1959) "Thalassaemia and alterations in the haemoglobin pattern" In: JONXIS, J.H.P. & DELAFRESNAYE, J.F., eds., "Abnormal Haemoglobins - A Symposium", Oxford, Blackwell, p.134.

- FESSAS, P. (1961) "The beta-chains thalassaemias" In: LEHMANN, H. & BETKE, K. "Haemoglobin Colloquium, Vienna, 1960," Stuttgart, Verlag, p.90.
- FESSAS, P. (1963) Inclusions of hemoglobin in erythroblasts and erythrocytes of thalassemia. Blood, 21: 21-32.
- FESSAS, P. (1965) "Abnormal haemoglobins" In: JONXIS, J.H. P., ed., "Abnormal haemoglobins in Africa", Oxford, Blackwell, p.71.
- FESSAS, P. (1966) The disturbance of hemoglobin synthesis in thalassemia. Int.Symp. on Comp. Hem. Strut.-Thessaloniki - , April 11-13, p.51.
- FESSAS, P., LOUKOPOULOS, D. & KALTSOYA, A. (1966) Peptide analysis of the inclusions of erithroid cells in β -thalassemia. Biochim.Biophys.Acta, 124: 430-432.
- FESSAS, P. & MASTROKALOS, N. (1959) Demonstration of small components in red cell haemolysates by starch-gel electrophoresis. Nature(Lond), 183: 30.
- FESSAS, P. & STAMATOYANNOPOULOS, G. (1962) Absence of haemoglobin A2 in an adult. Nature(Lond), 195: 1215-1216.
- FESSAS, P. & STAMATOYANNOPOULOS, G. (1964) Hereditary persistence of fetal hemoglobin in Greece. A study and a comparison. Blood, 24: 223-240.
- FLEMING, A.F. (1972) The incidence of heterozygous beta-thalassaemia. Med.J.Aust., 2: 910.
- FRASER, G.R., STAMATOYANNOPOULOS, G., KATTAMIS, C., LOUKOPOULOS, D., DEFARANAS, D., KITSOS, C., ZANNOS-MARIOLEA, L., CHOREMIS, C. & MOTULSKY, A.G. (1964) Thalassemias, abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Arta area of Greece. Ann.N.Y.Acad.Sci., 119: 415-435.

- FOLAYAN ESAN, G.J. (1970) The thalassaemia syndromes in Nigeria. Br.J.Haemat., 19: 47-56.
- GABUZDA, T.G., NATHAN, D.G. & GARDNER, F.H. (1963) The turnover of hemoglobins A and A2 in the peripheral blood of three patients with thalassemia. J.Clin.Invest., 42: 1678-1688.
- GABUZDA, T.G., NATHAN, D.G. & GARDNER, F.H. (1964) Thalassaemia trait. Genetic combinations of increased fetal and A2 hemoglobins. N.Engl.J.Med., 270: 1212-1217.
- GERALD, P.S. (1958) Starch electrophoresis of hemoglobin findings in thalassemia syndromes. Natl.Acad.Sci.Natl. Res.Counc.Publ., 557: 212-219.
- GERALD, P.S. (1964) Genetic determination of hemoglobin structure. Medicine, 43: 747-757.
- GERALD, P.S. & DIAMOND, L.K. (1958) The diagnose of thalassemia trait by starch block electrophoresis of the hemoglobin. Blood, 13: 61-68.
- GIERTLER, R., HESSE, P. & MILTENYI, M. (1971) Die Sichelzellthalassämie - ein Kasuistischer Beitrag. Folia Haematol.(Leipzig), 96: 351-356.
- GILBERT, J.M., THORNTON, A.G., NIENHUIS, A.W. & ANDERSON, W. F. (1970) Cell-free hemoglobin synthesis in beta thalassemia. Proc.Natl.Acad.Sci., 67: 1854-1861.
- GÖKSEL, V. & TARTAROGLU, N. (1961) "Haemoglobin C-thalassaemia" In: LEHMANN, H. & BETKE, K., eds., "Haemoglobin Colloquium, Vienna, 1960", Stuttgart, Verlag, p.55.
- GOLDBERG, C.A.J. (1958) A new method for starch gel electrophoresis of human hemoglobins with special reference to the determination of hemoglobin A2. Clin.Chem., 4: 484-495.

- GOUTTAS, A. (1961) "Les expressions du gene thalassaemique in Greece" In: LEHMANN, H. & BETKE, K., eds., "Haemoglobin Colloquium, Vienna, 1960", Stuttgart, Verlag, p.89.
- GOUTTAS, A., FESSAS, P., TSEVRENTS, H. & XEFIERI, E. (1955) Description d'une nouvelle varieté d'anémie hémolytique congénitale (Étude hématologique, électrophorétique et génétique). Sangue, 26: 911-919.
- GRATZNER, W.B. & BEAVEN, G.H. (1960) Transparent starch gels preparation, optical properties and application to haemoglobin characterization. Clin.Chim.Acta, 5: 577-582.
- GRAY, G.R. & MARION, R.B. (1971) Thalassaemia and G-6-PD deficiency in Chinese-Canadians. Admission screening of a hospital population. Can.Med.Assoc.J., 105: 283-286.
- GREPPI, E. (1928) Ittero emolitico familiare con aumento della resistenza dei globuli. Min.Med., 8: 1.
- HALDANE, J.B.S. (1949) Disease and evolution. Ric.Sci., 19 (suppl.): 68-76.
- HAMILTON, R. & SCHWARTZ, E. (1970) Equal synthesis of α and β -chains in a Negro family with β thalassaemia. Am.J.Hum.Genet., 22: 12-13.
- HAMILTON, H.E., SHEETS, R.F. & BROSSEAU, G. (1961) Gamma-thalassaemia. J.Lab.Clin.Med., 60: 880.881.
- HARRIS, J.W. (1963) "The red cell", Cambridge, Harvard University Press.
- HARRIS, H. (1973) "The principles of human biochemical genetics", 3a. ed., Amsterdam, North-Holland.
- HORTON, B. & HUISMAN, T.J.H. (1963) Linkage of the β -chain and δ -chain structural genes of human hemoglobins. Am.J.Hum.Genet., 15: 394-397.

HORTON, B., PAYNE, R.A., BRIDGES, M.T. & HUISMAN, T.J.H.

(1961) Studies on an abnormal minor hemoglobin component (Hb-B2). Clin.Chim.Acta, 6: 246-253.

HORTON, B.F., THOMPSON, R.B., DOZY, A.M., BENNETT, F., NECHT MAN, C.M., NICHOLS, E. & HUISMAN, T.H.J. (1962) Inhomogeneity of hemoglobin. VI. The minor hemoglobin components of cord blood. Blood, 20: 302-313.

HUISMAN, T.H.J., SCHROEDER, W.A., STAMATOYANNOPOULOS, G., BOUVER, N., SHELTON, J.R., SHELTON, J.B. & APELL, G. (1970) Nature of fetal hemoglobin in the Greek type of hereditary persistence of fetal hemoglobin with and without concurrent β -thalassemia. J.Clin.Invest., 49: 1035-1040.

INGRAM, V.M. (1964) A molecular model for thalassemia. Ann.N.Y.Acad.Sci., 119: 485-495.

INGRAM, V.M. & STRETTON, A.O.W. (1959) The genetic basis of the thalassemia diseases. Nature (Lond), 184: 1903-1909.

ITANO, H.A. (1957) The human hemoglobins. Their properties and genetic control. Adv.Prot.Chem., 12: 215-268.

JABLONSKI, S. (1969) "Illustrated dictionary of eponymic syndromes and diseases and their synonyms", Philadelphia, Saunders.

JACOB, H.S., BRAIN, M.C. & DACIE, J.V. (1968) Altered sulphydryl reactivity of hemoglobins and red blood cell membranes in congenital heinz body hemolytic anemia. J.Clin. Invest., 47: 2664-2677.

JOSEPHSON, A.M., MASRI, M.S., SINGER, L., DWORKIN, M. & SINGER, K. (1958) Starch block electrophoretic studies of human hemoglobin solutions. II. Results in cord blood, thalassaemia and other hematological disorders. Comparison with Tiselius electrophoresis. Blood, 13: 543-551.

- KAN, Y.W.; ALLEN, A. & LOWENSTEIN, L. (1967) Hydrops fetalis with alpha-thalassemia. N.Engl.J.Med., 276: 18-23.
- KAN, Y.W.; FORGET, B.G. & NATHAN, D.G. (1972) Gamma-beta thalassemia: A cause of hemolytic disease of the newborn. N.Engl.J.Med., 286: 129-134.
- KAN, Y.W. & NATHAN, D.G. (1968) Beta thalassemia trait: Detection at birth. Science, 161: 589-590.
- KAN, Y.W. & NATHAN, D.G. (1970) Mild thalassemia: The result of interactions of alpha and beta thalassemia genes. J. Clin. Invest., 49: 635-642.
- KAN, Y.W. & NATHAN, D.G. (1971) Prediction of severity of disease in beta thalassemia. Presented at the annual meeting of the Society for Pediatric Research, Atlantic City New Jersey, April 28-May 1.
- KAN, Y.W.; SCHWARTZ, E. & NATHAN, D.G. (1968) Globin chain synthesis in the alpha thalassemia syndromes. J.Clin. Invest., 47: 2515-2522.
- KATTAMIS, C.A.; ATHANASIOS, C. & CHAIDAS, S. (1969) G6PD deficiency and favism in the Island of Rhodes (Greece). J. Med. Genet., 6: 286-291.
- KATTAMIS, C.A.; HAIDAS, S.; METAXOTOU-MAVROMATI, A. & MATSANIOTIS (1972) β -thalassaemia, G-6-PD deficiency and atypical cholinesterase in Cyprus. Br.Med.J., 3: 470-471.
- KATTAMIS, C.A.; LAGOS, P.; METAXOTOU-MAVROMATI, A. & MATSANIOTIS, N. (1972) Serum iron and unsaturated iron-binding capacity in the β -thalassaemia trait: Their relation to the levels of haemoglobins A, A₂ and F. J. Med. Genet., 9: 154-159.
- KENT, G.; MINICK, O.T.; VOLINI, F.I. & ORFEI, E. (1966) Autophagic vacuoles in human red cells. Am.J.Pathol., 48:

831-841.

KLEIHAUER, E., BRAUN, H. & BETKE, K. (1957) Demonstration von fetalem hämoglobin in den erythrocyten eines blutausstrichs. Klin.Wochenschr., 35: 637-638.

KNOX-MACAULAY, H.H.M., WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B. & PEM-BREY, M.E. (1973) Thalassaemia in the British. Br.Med.J., 3: 150-155.

KUNKEL, H.G., CEPPELLINI, R., MÜLLER-EBERHARD, U. & WOLF, J. (1957) Observations on the minor basic hemoglobin component in blood of normal individuals and patients with thalassaemia. J.Clin.Invest., 36: 1615-1625.

LAPPE, M., GUSTAFSON, J.M. & ROBLIN, R. (1972) Ethical and social issues in screening for genetic disease. N.Engl. J.Med., 286: 1129-1132.

LEHMANN, H. (1970) Different types of alpha-thalassaemia and significance of haemoglobin Bart's in neonates. Lancet, 1: 78-79.

LEHMANN, H. & CARREL, R.W. (1968) Differences between α - and β -chain mutants of human haemoglobin and between α and β thalassaemia. Possible duplication of the β -chain gene. Br.Med.J., 4: 748-750.

LEHMANN, H. & HUNTSMAN, P.C. (1966) "Man's Haemoglobins", Amsterdam, North-Holland.

LIE-INJO, L.E. (1969) Distribution of genetic red cell defects in South-East Asia. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg., 63: 664-674.

LIE-INJO, L.E. & DE HART, P.L. (1963) Splenectomy in two cases of haemoglobin Q-H-diasæse (Hb. Q-H-thalassaemia). Acta Haematol.(Basel), 29: 358-367.

- LIE-INJO, L.E.; LIE HONG GIE; AGER; JAM & LEHMANN, H. (1962) α -thalassaemia as a cause of hydrops foetalis. Br.J. Haemat., 8: 1-4.
- LIVINGSTONE, F.B. (1966) "Abnormal hemoglobins in human populations", Chicago, Aldine.
- LOPES, C.G. & LIE-INJO, L.E. (1971) Alpha-thalassaemia in newborns in West Malaysia. Hum.Hered., 21: 185-191.
- MALAMOS, B.; FESSAS, P. & STAMATOYANNOPOULOS, G. (1962) Types of thalassaemia-trait carriers as revealed by a study of their incidence in Greece. Br.J.Haemat., 8: 5-14.
- MARINONE, G. & BERNASCONI, C. (1957) Studio elettroforetico quantitativo su blocco d'amido dell'emoglobina normale e dei talassemici. Haematologica, 42(Suppl.): 1-126.
- McFADZEAN, A.J.S. & TODD, D. (1971) Cooley's anaemia among the Tanka of South China. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg., 65: 59-62.
- Mc PHEDRAN, P.; BARNES, M.G. & WEINSTEIN, J. (1972) Differential diagnosis of the abnormal mean corpuscular volume (MCV). Ann.Intern.Med., 76: 869-870.
- MICHELI, F.; PENATI, F. & MOMIGLIANO, L.G. (1935) Ulteriore ricerche sulla anemia ipocromica splenomegalica con poichilocitosi. Atti.Soc.Ital.Emat. Haematol., 16(Suppl.10).
- MINNICH, V.; NA-NAKORN, S.; CHONGCHAREONSUK, S. & KOCHAASE-NI, S. (1954) Mediterranean anemia. A study of thirty-two cases in Thailand. Blood, 9: 1-23.
- MINNICH, V.; NA-NAKORN, S.; TUCHINDA, S.; PRAVITT, W. & MOORE, C.V. (1958) Inclusion body anemia in Thailand (Hemoglobin H-thalassemia disease). Proc.VIth Cong. Int. Soc. Hematol., Boston, 1957, New York, Grune & Stratton, p.743.

- MODELL, C.B., BENSON, A. & PAYLING-WRIGHT, C.R. (1972) Incidence of β -thalassaemia trait among Cypriots in London. Br.Med.J., 3: 737-738.
- MOSELEY, J.E. (1962) The thalassemias: Variants and roentgen bone changes. J.Mt.Sinai Hosp., 29: 199-214.
- MOTULSKY, A.G. (1960a) Population genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency of the red cell. Proc.Conf. Genet.Polym.Geog.Variations Disease, U.S.Dept.Health, Educ. Welf., p.258-292.
- MOTULSKY, A.G. (1960b) Metabolic polymorphisms and the role of infectious diseases in human evolution. Hum.Biol., 32: 28-62.
- MOTULSKY, A.G. (1961) In: BLUMBERG, B.S., ed., "Genetic polymorphisms and geografic variations in disease", New York, Grune & Sttaton, p.159.
- MOTULSKY, A.G. (1964a) Current concepts of the genetics of the thalassaemias. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 29: 399-412.
- MOTULSKY, A.G. (1964b) Pharmacogenetics. Prog.Med.Genet., 3: 49-74.
- MOTULSKY, A.G. (1973) Frequency of sickling disorders in U.S. Blacks. N.Engl.J.Med., 288: 31-33.
- NA-NAKORN, S. (1959) Haemoglobinopathies in Thailand In: JONXIS, J.H.P. & DELAFRESNAYE, J.F. eds., "Abnormal haemoglobins - A Symposium", Oxford, Blackwell, p.357.
- NANCE, W.E. (1963) Genetic control of hemoglobin synthesis. Science, 141: 123-130.
- NATHAN, D.G. (1972) Thalassemia. N.Engl.J.Med., 286: 586-594.

- NATHAN, D.G. (1973) Thalassemia: A progress report on applied molecular biology. N.Engl.J.Med., 288: 1122-1123.
- NATHAN, D.G. & GUNN, R.B. (1966) Thalassemia: The consequences of unbalanced hemoglobin synthesis. Am.J.Med., 41: 815-830.
- NATHAN, D.G., STOSSEL, T.B., GUNN, R.B., SARKOWSKY, H.S. & LAFORET, M.T. (1969) Influence of hemoglobin precipitation on erythrocyte metabolism in alpha and beta thalassemia. J.Clin.Invest., 48: 33-41.
- NATTA, C., BANKS, J., NIAZI, G., MARKS, P.A. & BANK, A. (1973) Decreased β globin RNA activity in bone marrow cells in homozygous and heterozygous β thalassaemia. Nat.New Biol., 244: 280-281.
- NECHELES, T.F., ALLEN, D.M. & GERALD, P.S. (1969) The many forms of thalassemia: Definition and classification of the thalassemia syndromes. Ann.N.Y.Acad.Sci., 165: 5-12.
- NIENHUIS, A.W. & ANDERSON, W.F. (1971) Isolation and translation of hemoglobin messenger RNA from thalassemia, sickle-cell anemia and normal human reticulocytes. J. Clin.Invest., 50: 2458-2460.
- NIENHUIS, A.W., LAYCOCK, D.G. & ANDERSON, W.F. (1971) Translation of rabbit haemoglobin messenger RNA by thalassaemic and non-thalassaemic ribosomes. Nat.New Biol., 231: 205-208.
- NOWICKI, L., BECKER, H., BEHNKEN, L., MARTIN, H. & SPRENGER, A. (1972) Diagnosis of thalassemia minor with a report on another German thalassaemic family. Deuch.Med.Wochenschr., 97: 273-277.
- OHTA, Y., YAMADKA, K., SUMIDA, I. & YANASE, T. (1971) Haemoglobin Miyada, a β - δ fusion peptide (anti-Lepore) type discovered in a Japanese family. Nat.New Biol., 234:

218-220.

OTTENSOOSER, F. (1944) Cálculo do grau de mistura racial através dos grupos sanguíneos. Rev.Bras.Biol., 4: 531-537.

PAULING, L.; ITANO, H.A.; SINGER, S.J. & WELLS, I.C. (1949) Sickle-cell anemia - A molecular disease. Science, 110: 543-548.

PEARSON, H.A. (1969) Hemoglobin S-thalassemia syndrome in Negro children. Ann.N.Y.Acad.Sci., 165: 83-92.

PEARSON, H.A.; O'BRIEN, R.T. & McINTOSH, S. (1973) Screening for thalassemia trait by electronic measurement of mean corpuscular volume. N.Engl.J.Med., 288: 351-353.

PEARSON, H.A.; SHANKLIN, D.R. & BRODINE, C.R. (1965) Alpha thalassemia as cause of nonimmunological hydrops. Am.J. Dis.Child., 109: 168-172.

PELLICER, A. & CASADO, A. (1970) Frequency of thalassemia and G6PD deficiency in five provinces of Spain. Am.J. Hum.Genet., 22: 298-303.

PEROSA, L.; MANGANELLI, G. & DALFINO, G. (1961) Il primo caso di Hb C-thalassemia descritto in Italia. Haematologica, 46: 211-272.

PETRAKIS, N.L.; DOHERTY, M.A.; GRUNBAUM, B.W. & ATCHLEY, W.A. (1962) Cellulose acetate membranes for the electrophoretic demonstration of hemoglobin A2. Acta Haemat., 27: 96-103.

PLATO, C.C.; RUCKNAGEL, D.L.; GERSHOWITZ, H. (1964) Studies on the distribution of G-6PD deficiency, thalassemia and other genetic traits in the coastal and mountains villages of Cyprus. Am.J.Hum.Genet., 16: 267-283.

POOTRAKUL, S.; WASI, P. & NA-NAKORN, S. (1967) Haemoglobin

Bart's hydrops foetalis in Thailand. Ann.Hum.Genet., 30: 293-311.

PORTIER, A., TRAVERSE, P., DE DUZER, A., DESTAING, F. & POROT, J.F. (1960) L'hemoglobinoase C-thalassemie. Presse Med., 68: 1760-1763.

QUATTRIN, N., VENTRUTO, V. & DE ROSA, L. (1970) Hemoglobinopathies in Campania with particular reference to the rare and new types. Blut, 20: 292-295.

RAMOT, B., BEN-BASSAT, I., FAGNI, D. & ZAANOON, R. (1970) A family with three β - δ -thalassemia homozygotes. Blood, 35: 158-165.

RANNEY, H.M., JACOBS, A.S., BRADLEY, T.B.Jr. & CORDOVA, F.A. (1963) A "new" variant of haemoglobin A2 and its segregation in a family with haemoglobin S. Nature (Lond), 197: 164-166.

RATTEN, G.J. & BEISCHER, N.A. (1972) The significance of anaemia in an obstetric population in Australia. J.Obstet. Gynaecol.Br.Commonw., 79: 228-237.

RAVEN, J.L. (1972) Haemoglobinopathies in Australia. Med.J. Aust., 2: 726-729.

RICH, A. (1952) Studies on the hemoglobin of Cooley's anemia and Cooley's trait. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 38: 187.

RIEDER, R.F., ZINKHAM, W.H. & HOLTZMAN, N.A. (1965) Hemoglobin Zurich. Am.J.Med., 39: 4-20.

RIETTI, F. (1925) Ittero emolitico primitivo. Atti Accad. Scient.Med.Nat.Ferrara, 2: 14.

RIFKIND, R.A. (1966) Destruction of injured red cells "in vivo". Am.J.Med., 41: 711-723.

- RIGAS, D.A.; KOLER, R.D. & OSGOOD, E.E. (1955) New haemoglobin possessing a higher electrophoretic mobility than normal adult hemoglobin. Science, 121: 372.
- ROBERTS, A.V.; CLEGG, J.B.; WEATHERALL, D.J. & OHTA, Y. (1973) Synthesis in vitro of anti-Lepore haemoglobin. Nat.New Biol., 245: 23-24.
- ROCHE, J.; DERRIEN, Y.; DIACONO, G. & ROQUES, M. (1953) Sur les hémoglobines des thalassémiques (Thalassémie minime et anémies Méditerranéennes). Rev.Hémat., 8: 282-298.
- ROY, R.N.; BANERJEE, D.; CHAKRABORTY, K.N. & BASU, S.P. (1971) Observations on radiological changes of bones in thalassaemia syndrome. J.Indian Med.Assoc., 57: 90-95.
- RUCKNAGEL, D.L. (1966) On the geographical distribution and ethnic origin of thalassaemia. N.Z.Med.J., 65(Suppl.): 826-831.
- SALDANHA, P.H. (1968) Efeito da migração sobre a estrutura genética de uma comunidade paulista. Bol. n° 248 (Biol. n° 12) da Fac.Fil.Cienc.Letras USP, São Paulo, SP.
- SCHMAIER, A.H.; MAURER, H.M.; JOHNSTON, C.L. & SCOTT, R.B. (1973) Alpha thalassemia screening in neonates by mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin determination. J.Pediatrics, 83: 794-797.
- SCHMIDT, R.M. (1973) Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. JAMA, 224: 1276-1280.
- SCHOKKER, R.C.; WENT, L.N. & BOK, J. (1966) A new genetic variant of β thalassaemia. Nature(Lond), 209: 44-46.
- SCHROEDER, W.A.; HUISMAN, T.H.J.; SHELTON, J.R.; SHELTON, J. B.; KLEIHAUER, E.F.; DOZY, A.M. & ROBERSON, B. (1968) Evidence for multiple structural genes for the γ -chain of human fetal hemoglobin. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 60:

537-544.

SCHWARTZ, E. (1969) The silent carrier of beta thalassemia. N.Engl.J.Med., 281: 1327-1333.

SHEPHERD, M.K.; WEATHERALL, D.J. & CONLEY, C.L. (1962) Semi-quantitative estimation of distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull.Johns Hopkins Hosp., 110: 293-310.

DE SILVA, C.C.; JONXIS, J.H.P. & WICKRAMASINGHE, R.L. (1959) Haemoglobinopathies in Ceylon In: JONXIS, J.H.P. & DELAFRESNAYE, J.F., eds., "Abnormal Haemoglobins - A Symposium", Oxford, Blackwell, p.340.

SILVESTRONI, E. & BIANCO, I. (1949) Microcythaemia, constitutional microcytic anaemia and Cooley's anaemia (Mediterranean anaemia or thalassaemia). Am.J.Hum.Genet., 1: 83-93.

SILVESTRONI, E. & BIANCO, I. (1955) "La malattia microdrepapnoicitica", Roma, Il Pensiero Scientifico.

SILVESTRONI, E. & BIANCO, I. (1959) The distribution of the microcythaemias (or thalassaemias) in Italy In: JONXIS, J.H.P. & DELAFRESNAYE, J.F., eds., "Abnormal Haemoglobins - A Symposium", Oxford, Blackwell, p.242.

SINGER, K.; CHERNOFF, A.I. & SINGER, L. (1951) Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle-cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali desnaturation. Blood, 6: 413-428.

SINGER, K.; KRAUS, A.P.; SINGER, L.; RUBINSTEIN, H.M. & GOLDBERG, S.R. (1954) Studies on abnormal hemoglobins. X. A new syndrome: Hemoglobin C-thalassemia disease. Blood, 9: 1032-1045.

SINISCALCO, M.; BERNINI, L.; LATTE, B. & MOTULSKY, A.G.

(1961) Favism and thalassaemia in Sardinia and their relationship to malaria. Nature, 190: 1170-1180.

SLATER, L.M., MUIR, W.A. & WEED, R.I. (1968) Influence of splenectomy on insoluble hemoglobin inclusion bodies in β -thalassemic erythrocytes. Blood, 31: 766-777.

SMITH, E.W. & KREVANS, J.R. (1959) Clinical manifestations of the hemoglobin C disorders. Bull.Johns Hopkins Hosp., 104: 17-43.

SMITH, E.W. & TORBERT, J.V. (1958) Two abnormal hemoglobins with evidence for a new genetic locus for hemoglobin formation. Bull.Johns Hopkins Hosp., 102: 38-45.

SMITH, M.B., WHITESIDE, M.G., CAMPBELL, D.G. (1971) The occurrence of heterozygous beta-thalassaemia as screened by quantitative haemoglobin electrophoresis in pregnancy. Med.J.Aust., 1: 1273-1274.

STAMATOYANNOPOULOS, G. (1971) Gamma-thalassaemia. Lancet, 2: 192-193.

STAMATOYANNOPOULOS, G. & FESSAS, P. (1964) Thalassaemia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, sickling and malarial endemicity in Greece: A study of five areas. Br.Med.J., 1: 875-879.

STEINER, J., MARTI, H.R. & DEAN, D. (1971) Decreased hemoglobin A2 concentration in iron deficiency anemia. Acta Haematol., 45: 77-81.

STURGEON, P. & FINCH, C.A. (1957) Erythrokinetics in Cooley's anemia. Blood, 12: 64-73.

TERRENATO, L. (1973) β - and non- β -thalassaemia in Sardinia and their frequencies. Ann.Hum.Genet., 36: 285-295.

TODD, D., LAI, M. & BRAGA, C.A. (1967) Thalassaemia and hy-

drops foetalis-family studies. Br.Med.J., 3: 347-349.

VALENTINE, W.N. & NEEL, J.V. (1944) Hematologic and genetic study of the transmission of thalassemia. Arch.Int.Med., 74: 185-196.

VECCHIO, F. (1948) Sulla resistenza dell'emoglobina alla des naturazione alcalina negli ammalati di anemia di Colley e nei loro familiari. Progr.Med.(Napoli), 4: 201.

VELLA, F. (1959) Heterogeneity of human foetal haemoglobin. The incidence of foetal variants in Singapore. Nature (Lond), 184: 272.

VELLA, F.; WELLS, R.H.C.; AGER, J.A.M. & LEHMANN, H. (1958) A haemoglobinopathy involving haemoglobin H and a new (Q) haemoglobin. Br.Med.J., 1: 752-755.

VIGI, V.; VOLPATO, S.; GABURRO, D.; CONCONI, F.; BARGELLESI, A. & PONTREMOLI, S. (1969) The correlation between red-cell survival and excess of α -globin synthesis in β -thalassaemia. Br.J.Haemat., 16: 25-30.

WASI, P. (1970) Thalassaemia genes. Br.Med.J., 1: 431.

WASI, P.; DISTHASONGCHAN, P. & NA-NAKORN, S. (1968) The effects of iron deficiency on the levels of hemoglobin A2 and E. Lab.Clin.Med., 71: 85-91.

WASI, P.; NA-NAKORN, S.; POOTRAKUL, P. & PANICH, V. (1972) Incidence of haemoglobin Thai: A re-examination of the genetics of α -thalassaemic diseases. Ann.Hum.Genet., 35: 467-470.

WASI, P.; NA-NAKORN, S.; POOTRAKUL, S.; SOOKANCK, M.; DISTHASONGCHAN, P.; PORNPATKUL, M. & PANICH, V. (1969) Alpha- and beta-thalassemia in Thailand. Ann.N.Y.Acad.Sci., 165: 60-82.

JASI, P., NA-NAKORN, S. & SUINGDUMRONG, A. (1964) Haemoglobin H disease in Thailand: A genetical study. Nature (Lond), 204: 907-908.

WATSON-WILLIAMS, E.J. (1963) Hereditary persistence of foetal haemoglobin and β -thalassaemia in Nigerians. Symp. on Abnormal Haemoglobins, Ibadan.

WATSON-WILLIAMS, E.J. & WEATHERALL, D.J. (1963) The laboratory characterization of human haemoglobin components. Symp. on Abnormal Haemoglobin, Ibadan.

WEATHERALL, D.J. (1963) Abnormal haemoglobins in the neonatal period and their relationship to thalassaemia. Br.J. Haemat., 9: 265-277.

WEATHERALL, D.J. (1964) Biochemical phenotypes of thalassaemia in the American Negro population. Problems in Cooley anemia. Ann.N.Y.Acad.Sci., 119: 450-462.

WEATHERALL, D.J. (1967) "Los sindromes talassemicos", Barcelona, Toray.

WEATHERALL, D.J. (1972) The thalassemias In; STAMBURY, J.B.; WYNGAARDEN, J.B. & FRIEDRICKSON, D.S. eds., "The metabolic basis of inherited disease", 3a.ed., New York, McGraw Hill, p.1432.

WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B. & NAUGHTON, M.A. (1965) Globin synthesis in thalassaemia: An "in vitro" study. Nature (Lond), 208: 1061-1065.

WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B. & WONG HOCK BOON (1970) The haemoglobin constitution of infants with the haemoglobin Bart's hydrops foetalis syndrome. Br.J.Haemat., 18: 357-367.

WEATHERALL, D.J., GILLES, H.M., CLEGG, J.B., BLANKSON, J.A., MUSTAFA, D., BOI-DOKU, F.S. & CHAUDHURY, D.S. (1971) Prelimi-

nary surveys for the prevalence of the thalassaemia genes in some African populations. Ann.Trop.Med.Parasitol., 65: 253-265.

WEATHERALL, D.J. & VELLA, F. (1960) Thalassaemia in a Gurkha family. Br.Med.J., 1: 1711-1713.

WENNBERG, E. & WEISS, L. (1968) Splenic erythroclasia: An electron microscopic study of hemoglobin H disease. Blood, 31: 778-790.

WENT, L.N. & MacIVER, J.E. (1961) Thalassemia in the West Indies. Blood, 17: 166-181.

WHIPPLE, G.H. & BRADFORD, W.L. (1936) Mediterranean disease - Thalassemia (Erythroblastic anemia of Cooley). J.Pediatr., 9: 279-311.

WHITE, J.C. & BEAVEN, G.H. (1959) Foetal haemoglobin. Br. Med.Bull., 15: 33-39.

WINTROBE, M.D. (1967) "Clinical Hematology", 6a.ed., Philadelphia, Lea & Bebinger.

WOLF, J.A. & IGNATOV, V.G. (1963) Heterogeneity of thalassemia major. Am.J.Dis.Child., 105: 234-242.

WOODROW, J.C.; NOBLE, R.L. & MARTINDALE, J.H. (1964) Haemoglobin H disease in an English family. Br.Med.J., 1: 36-38.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1967) Haemoglobinopathies and allied disorders. Technical Report Series n° 338, Geneva.

YAKULIS, V.J., HELLER, P., JOSEPHSON, A.M. & SINGER, L. (1960) Rapid demonstration of hemoglobin A2 by means of agar gel electrophoresis. Am.J.Clin.Pathol., 34: 28-34.

ZUCKERKANDL, E. (1964) Compensatory effects in the hemoglobin synthesis. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 29: 357-374.

ZUELZER, W.W. & KAPLAN, E. (1954) Thalassemia hemoglobin C-disease. A new syndrome presumably due to combination of the genes for thalassemia and hemoglobin C. Blood, 9: 1047-1054.

ZUELZER, W.W., NEEL, J.V. & ROBINSON, A.R. (1956) Abnormal hemoglobins In: TOCANTINS, L.M., ed., "Progress in Hematology," New York, Grune & Sttaton, p.91.

ZUELZER, W.W., ROBINSON, A.R. & BROOKER, C.R. (1961) Reciprocal relationship of hemoglobin A2 and F in beta-thalassemia. A key to the genetic control of the hemoglobin F. Blood, 17: 393-408.