

**BC/22134**

**IB/80442**

T/UNICAMP

C138<sub>i</sub>

ANA LÚCIA ROSCANI CALUSNI



**" INTERAÇÃO ENTRE O *Streptococcus pyogenes* e  
A HEMOGLOBINA S "**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) <i>Ana Lúcia Roscani Calusni</i> em <i>20/04/94</i> e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>Antonio Sérgio Ramalho</i>
--

Campinas - SP.

4710

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	
T. UNICAMP	
C. 138 C	
V.	Ex.
T. MOO BC/	22.134
PROC.	286/94
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/07/94
N.º CPD	

CM-00059924-5

Orientador: Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho.

Professor Nível Titular do Departamento de Genética Médica da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

**Ao Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho, agradeço o valioso apoio e o estímulo que me concedeu.**

À meus pais Wilson e Judite, pelo carinho e dedicação que recebi desde a infância.

À meu esposo José Eduardo, pelo incentivo, força e compreensão na realização deste trabalho.

À minha irmã Glaucia, pela sua ajuda.

## **Agradecimentos:**

A todos pacientes.

Aos colegas, que gentilmente doaram sangue para controle.

Aos docentes do serviço de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica da FCM da Unicamp e amigos Dr. Ulysses Moraes de Oliveira e Profa. Maria Cecília B. Villares de Oliveira, pelo valioso apoio recebido.

Ao Prof. Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena, pela orientação estatística deste trabalho.

A todos os colegas do serviço de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela colaboração.

À Dra. Angela Von Novakovsky, Patologista Clínica do Serviço de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, por seu apoio e sua amizade.

À Dra. Célia Regina Garlipp, Professora Assistente Doutora do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelo incentivo à pós-graduação.

À Heliane Guerra Serra, por sua amizade.

Aos funcionários do serviço de Hematologia do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela realização de exames necessários.

Aos funcionários do Serviço de Imunologia do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela realização de exames necessários.

À Dra. Cármen Sílvia Bertuzzo Martins, Profa. Assistente Doutora do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelo apoio e sugestões.

À Dra. Maria de Fátima Sonati, Profa. Assistente Doutora do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela ajuda recebida.

À Dra. Brasilina de Campos Salles Cerqueira, Profa. Doutora do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, pelo fornecimento da cepa padrão do *Streptococcus pyogenes*.

À Rute Siqueira Alves, pela orientação na digitação do texto.



Às funcionárias da coleta de sangue do Hemocentro, que muito colaboraram.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Unicamp, pela atenção e colaboração.

Aos docentes, funcionários e amigos do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela cooperação.

A todos os que colaboraram com este trabalho, minha gratidão.

# ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	
I.1 - A hemoglobina S .....	01
I.2 - A manutenção do polimorfismo da hemoglobina S	08
I.3 - O <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	11
II - OBJETIVOS .....	14
III - CASUÍSTICA E MÉTODOS .....	16
IV - RESULTADOS .....	19
V - DISCUSSÃO .....	25
VI - RESUMO E CONCLUSÕES .....	30
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33

## I - INTRODUÇÃO

## I.1 - A HEMOGLOBINA S

As hemoglobinopatias hereditárias são alterações monogênicas freqüentes em populações humanas, atingindo importância a nível de Saúde Pública em vários países, inclusive no Brasil (Ramalho, 1986). Ainda recentemente, o Comitê de Prevenção e Controle das Hemoglobinopatias da Organização Mundial da Saúde, reunido em Chipre, ressaltou a importância dessas alterações genéticas na América Latina, com especial ênfase ao Brasil (Penchaszadeh, 1993).

Embora a classificação das hemoglobinopatias seja um assunto complexo e controverso, existe a tendência em dividi-las em duas grandes classes gerais: as hemoglobinopatias estruturais e as hemoglobinopatias por deficiência de síntese ou talassemias. Nas hemoglobinopatias estruturais, cujo protótipo é a hemoglobina S, ocorre uma alteração na estrutura da fração globínica da hemoglobina, tendo sido descritas até o momento mais de 600 hemoglobinas humanas anômalas (Wajemar et al, 1991). Já nas hemoglobinopatias por deficiência de síntese, ocorre uma depressão geneticamente condicionada da síntese das cadeias alfa (talassemia alfa) ou beta (talassemia beta) da hemoglobina normal A ( $Hb A = \alpha_2 \beta_2$ ). Tanto a talassemia alfa quanto a talassemia beta são freqüentes no Brasil, embora esta última tenha maior importância clínica em nosso meio (Ramalho, 1986).

A hemoglobina S foi a primeira hemoglobina anômala descoberta (Pauling et al, 1949) e a primeira a ter a sua alteração estrutural esclarecida (Ingram, 1957): ela possui na posição número seis das cadeias beta a valina em lugar do ácido glutâmico. Essa única troca

de resíduo aminoácido é a base de toda fisiopatogenia da hemoglobina S, uma vez que ela é diretamente responsável pelo fenômeno da falcização das hemácias. Ela é responsável também pelo comportamento eletroforético anômalo dessa hemoglobina, tornando a sua migração mais lenta que a da hemoglobina A em pH alcalino.

Uma vez que as cadeias beta da hemoglobina S diferem das cadeias beta da hemoglobina normal A apenas pelo resíduo aminoácido da posição seis, é evidente que os genes que comandam a síntese dessas cadeias também devem diferir entre si apenas por um *códon*. De fato, sabe-se hoje que a seqüência GAG que codifica o ácido glutâmico da posição  $\beta^6$  está substituído no gene da hemoglobina S pela seqüência GTG, que codifica a valina, o que pode ser facilmente evidenciado pela quebra do DNA por algumas enzimas de restrição, como a DdeI e a Mst II (Chang e Kan, 1982) ou pelo uso de oligonucleotídeos sintéticos alelo-específicos no dot-blot (Conner *et al*, 1983).

O nome da hemoglobina S provém da primeira letra da palavra inglesa *sickle*, que significa foice. Isso porque as moléculas da hemoglobina S, quando desoxigenadas, possuem a propriedade de se agregarem, formando longos polímeros (fibras de hemoglobina S), que deformam as hemácias, que assumem a típica forma de uma foice à microscopia óptica. O fenômeno da falcização das hemácias é reversível, mas, após sucessivas deformações, essas células tornam-se irreversivelmente falcizadas. Os principais fatores predisponentes da produção de hemácias falciformes *in vivo* são a hipóxia, a estase sanguínea, a acidose, a desidratação e as infecções (Ramalho, 1986).

Os heterozigotos do gene da hemoglobina S, que manifestam o chamado traço falciforme, normalmente são assintomáticos, embora possam manifestar complicações agudas, até mesmo fatais, em situações que favoreçam a produção de hemácias falciformes, como, por

exemplo, nas grandes hipoxemias. Tais indivíduos são freqüentes em nossas populações, perfazendo cerca de 6% a 10% dos negróides brasileiros (Ramalho, 1986).

Apesar de a hemoglobina S ser mais freqüente em negróides, ela não é exclusiva desse grupo racial, sendo encontrada também em altas freqüências em populações da região do Mediterrâneo, da Índia e da Ásia Menor. É interessante lembrar, portanto, que algumas populações brasileiras, como por exemplo, as do Estado de São Paulo, também receberam o gene da hemoglobina S trazido pelos imigrantes italianos, sírios e árabes. Além disso, como comenta Ramalho (1986), não seria surpreendente o encontro de freqüências apreciáveis dessa hemoglobinopatia em algumas populações caucasóides brasileiras que receberam, através da miscigenação, fluxo gênico negróide importante. Em um amplo estudo realizado recentemente na cidade paulista de Araras, por exemplo, dentre os 3.212 indivíduos examinados por Teixeira (1993), foram diagnosticados 241 (7,5%) portadores do traço falciforme.

O reconhecimento dos heterozigotos do gene da hemoglobina S nas populações é muito importante para fins de aconselhamento genético, uma vez que do casamento de dois portadores do traço falciforme podem nascer, com a probabilidade de 25%, homozigotos com a anemia falciforme. Esta é, segundo Ramalho (1986), a doença hereditária de maior prevalência em populações brasileiras, afetando 0,1% a 0,3% dos negróides.

A anemia falciforme é uma doença hemolítica crônica, acompanhada de importantes fenômenos vaso-oclusivos, que ocasionam dor, infarto e necrose em diversos órgãos. Como já foi mencionado anteriormente, todas as suas manifestações clínicas são decorrentes do fenômeno de falcização das hemácias.

As primeiras manifestações da anemia falciforme costumam ocorrer por volta dos seis meses de idade, uma vez que até então os seus portadores estão protegidos pelos altos percentuais de hemoglobina fetal, potente inibidora da falcização das hemácias. Como toda anemia hemolítica crônica importante, ela tem repercussão acentuada sobre o crescimento e o desenvolvimento dos indivíduos e pode ser complicada por episódios de esgotamento da medula óssea, traduzidos pelas crises aplásticas. Tais crises decorrem de um esgotamento temporário da medula óssea, conseqüente à sua hiperatividade compensatória ao processo hemolítico crônico. Muitas vezes elas são acompanhadas de infecção direta da medula óssea por parvovírus (Serjeant, 1985).

O quadro clínico caracteriza-se por uma anemia hemolítica crônica, por períodos de remissão relativa (períodos estáveis), pelas crises e pelas manifestações decorrentes de danos orgânicos específicos. Os períodos estáveis da doença são as fases de relativa melhoria clínica que entremeiam as crises. Dentre estas, a crise dolorosa é considerada um dos eventos mais característicos da anemia falciforme. Ela consiste em dores intensas, que se localizam nas extremidades, região lombar, abdômem e tórax, associadas, não raro, a quadro febril. Esse tipo de crise denomina-se "isquêmica", "trombótica" ou "vaso-oclusiva" e, além da dor, a região afetada pode apresentar infarto e necrose. Nesse sentido, as lesões ósseas são particularmente importantes pela freqüência e pela possibilidade de causar deformidades, como as decorrentes da necrose da cabeça do fêmur ou do úmero. Baço, pulmões, rins e coração também são órgãos quase que invariavelmente afetados na anemia falciforme, embora a lesão vaso-oclusiva possa ocorrer em qualquer região do organismo (Serjeant, 1974; 1985; Ramalho, 1986).

Existem outros tipos de crises, sendo uma delas, a hemolítica, decorrente de uma exacerbação da hemólise, enquanto que as crises de seqüestramento decorrem da retenção de hemácias falcizadas no baço. Consideram-se responsáveis pelo desencadeamento das crises as infecções, os quadros piréticos, a exposição ao frio, a acidose, a gravidez, a desidratação e a baixa tensão de oxigênio. Tais crises, no entanto, também podem ocorrer na ausência de um fator desencadeante evidenciável.

Embora a anemia falciforme seja de difícil tratamento, algumas de suas complicações, potencialmente letais, não o são. Sendo assim a taxa de sobrevivência dos indivíduos com essa hemoglobinopatia está diretamente ligada ao nível de atendimento médico recebido pelas populações a que pertencem. Alguns autores associam claramente o nível sócio-econômico à gravidade da doença. Os pacientes de nível mais elevado têm melhor nutrição, higiene, assistência médica, etc., que facilitam o controle da doença. No Brasil, embora muitos pacientes ainda faleçam na infância, o número dos que atingem a idade adulta é cada vez maior ( Ramalho, 1986; Paiva e Silva et al, 1993).

Hutz (1981), em seu estudo realizado no Rio de Janeiro, observou que a idade média de óbito na amostra examinada foi de  $16,4 \pm 12$  anos, variando de 6 meses a 53 anos. As mortes foram mais freqüentes entre 1 e 10 anos e entre 36 e 40 anos e as principais causas de óbito foram a crise de falcização (17%), a insuficiência respiratória (10,6%) e as infecções (10,6%). Está perfeitamente demonstrado, no entanto, que o diagnóstico e o tratamento precoce aumentam a sobrevida dos doentes com a anemia falciforme ( Vichinsky et al, 1988; Bowman, 1991).



Um estudo realizado por Wong et al (1992) nos E.U.A. mostrou que houve um aumento de dez vezes da população adulta com anemia falciforme, devido à vacinação anti-pneumocócica e à penicilinoterapia profilática em crianças com menos de 2 anos de idade.

Concluindo este item, é interessante ressaltar que são reconhecidos atualmente vários fatores genéticos, geográficos, alimentares, sócio-econômicos e até psicológicos relacionados à grande variabilidade clínica da anemia falciforme (Serjeant, 1974; 1985; Ramalho, 1986; Powars et al, 1990). Dentre eles, merecem destaque os haplótipos de DNA e a concomitância com a talassemia alfa, que são considerados os principais moduladores de gravidade da anemia falciforme. Os pacientes que manifestam simultaneamente a anemia falciforme e a talassemia alfa tendem a apresentar menos lesões em tecidos moles, embora tenham as suas lesões ósseas agravadas. Já os haplótipos de DNA do tipo Bantu, Benin e Senegal estão associados, respectivamente, às formas grave, intermediária e leve da anemia falciforme (Powars et al, 1990).

A análise de DNA de paulistas com a anemia falciforme revelou a predominância do haplótipo Bantu ou CAR, associado a uma forma clínica mais severa da doença (Costa et al, 1992; Zago et al, 1992). Ao contrário do que ocorre nos EUA e na Jamaica, onde predomina o haplótipo Benin, associado a uma forma mais branda da anemia falciforme, o haplótipo Bantu foi observado em mais de 60% dos cromossomos dos pacientes paulistas. Já em pacientes de Salvador, BA, Costa et al, (1992) constataram uma predominância do haplótipo Benin. Tanto no estudo realizado em Ribeirão Preto, SP ( Zago et al, 1992), quanto no realizado em Campinas, SP e Salvador, BA ( Costa et al, 1992), o haplótipo Senegal, associado a uma forma ainda mais benigna da doença, foi irrelevante. Essas diferenças de distribuição dos

haplótipos, decorrentes de diferentes padrões do tráfico de escravos, explicam as diferenças regionais na evolução clínica da anemia falciforme.

## I. 2 - A MANUTENÇÃO DO POLIMORFISMO DA HEMOGLOBINA S

Um aspecto que sempre despertou o interesse dos geneticistas foi o de a hemoglobina S atingir frequências extremamente elevadas em certas populações, a despeito do alto coeficiente seletivo do gene que a determina. De fato, salta à vista que a taxa de mutação ou de casamentos preferenciais seria incapaz de contrabalançar a eliminação do gene da hemoglobina S, feita pela seleção praticamente total dos homozigotos antes da idade reprodutiva, que ocorria na maioria das populações, pelo menos até há bem pouco tempo (Beiguelman, 1981; Ramalho, 1986). Em outras palavras, a malignidade da anemia falciforme torna difícil explicar a manutenção do polimorfismo da hemoglobina S por mutações recorrentes, em determinadas populações. Assim sendo, é forçoso pensar em outros mecanismos homeostáticos mantendo o polimorfismo dessa hemoglobina.

Em 1949, Haldane, verificando a semelhança das distribuições geográficas da talassemia e da malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, sugeriu a hipótese de que os heterozigotos do gene da talassemia beta teriam vantagens seletivas em relação aos normais no que diz respeito a esse tipo de malária. Esse mesmo raciocínio foi empregado por Allison em 1954 para explicar o polimorfismo da hemoglobina S na África. Tal hipótese teve como argumentos favoráveis as observações feitas em áreas hiperendêmicas do *Plasmodium falciparum*, nos quais se verificou maior grau de parasitemia nas crianças hemoglobicamente normais quando comparadas às portadoras do traço falciforme (Allison, 1954). Além disso, Raper (1959) demonstrou que o grau de parasitemia era

inversamente proporcional ao conteúdo de hemoglobina S nas hemácias.

Esses fatos contribuíram para que a hipótese de Allison ganhasse grande popularidade, passando a ser empregada como exemplo clássico de manutenção de polimorfismo por seleção a favor dos heterozigotos. Apesar disso, tal hipótese também deu início a uma considerável controvérsia, pois outros estudos não comprovaram diferenças de parasitemia entre falcêmicos e não falcêmicos. O próprio Raper levantou dúvidas sobre os resultados do trabalho de Allison, supondo a existência de um viés. Isso porque aquele autor não encontrou menor incidência de malária em indivíduos com o traço falciforme, ao analisar uma amostra populacional cerca de oito vezes maior que a estudada por Allison. Da mesma forma, Pinto Jr. (1978), revendo os dados de Allison, encontrou algumas evidências desfavoráveis à hipótese acima mencionada.

Após vários estudos com resultados conflitantes é que se percebeu que o efeito protetor do traço falciforme podia confundir-se com a imunidade adquirida e apenas os estudos que se limitavam a crianças bem novas, antes do desenvolvimento da imunidade adquirida, tornavam evidente o efeito protetor da hemoglobina S. Assim, como comenta Serjeant (1985), tornou-se bem claro que o traço falciforme confere alguma proteção contra a malária causada pelo *Plasmodium falciparum* apenas durante o período crítico da infância situado entre a perda da imunidade obtida passivamente através da mãe e o desenvolvimento da imunidade ativa (entre os 6 meses e os 3 anos, aproximadamente).

A constatação de que o efeito protetor da hemoglobina S frente à malária causada pelo *Plasmodium falciparum* estava limitado a crianças de tenra idade encorajou a investigação de eventuais vantagens

seletivas do portador do traço falciforme frente a outras doenças infecciosas e parasitárias endêmicas em nosso meio, como a hanseníase (Cézar et al, 1974), a tuberculose (Ramalho e Beiguelman, 1977 ; Pinto Jr., 1978; Martins et al, 1987) e a doença de Chagas (Domingos et al, 1991), com resultados negativos. Assim sendo, parece claro que o problema da manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e de outras hemoglobinopatias longe está do perfeito esclarecimento.

Restrepo e Moore, citados por Wiernik (1968), sugeriram que a hemoglobina S poderia ter um efeito protetor contra a febre reumática. Isso porque esses autores encontraram uma freqüência do traço falciforme de apenas 4,4% entre negróides com febre reumática, contra a freqüência de 11,7% observada no grupo controle. Esses fato, juntamente com alguns achados laboratoriais que serão comentados adiante, tornaram interessante investigar as relações entre a hemoglobina S e o *Streptococcus pyogenes*, mas Restrepo e Moore não levaram adiante as suas investigações.

### I.3 - O *Streptococcus pyogenes*

Os estreptococos são germes gram-positivos, com tendência à formação de cadeias. Eles se incluem dentre as bactérias patogênicas mais importantes para o homem e podem invadir qualquer tecido ou órgão e produzir diferentes síndromes clínicas, dependendo da localização e da relação parasita-hospedeiro. A denominação *Streptococcus pyogenes* foi criada por Rosenbach em 1884 e continua sendo usada para diferenciar o estreptococo patogênico comum de outros microrganismos, como o *Streptococcus viridans* e os estreptococos anaeróbios. Muitos desses outros estreptococos são habitantes normais das vias respiratórias, genitourinárias e gastrintestinais, causando infecções apenas nos indivíduos com diminuição da resistência natural. O *Streptococcus viridans*, por exemplo, tem grande importância como causa de endocardite bacteriana subaguda.

As infecções estreptocócicas podem ser divididas em dois grandes grupos. No primeiro grupo incluem-se as doenças agudas e muitas vezes dramáticas, tais como a amigdalite, escarlatina, erisipela, febre puerperal e linfangite. Essas infecções são freqüentes e caracterizam-se por certas manifestações tóxicas, sépticas e de supuração. O segundo compreende as complicações tardias, não supuradas, das estreptococcias. Estas, que compreendem a febre reumática e a glomerulonefrite aguda, manifestam-se geralmente duas a três semanas após uma estreptococcia aguda. Adquirem maior importância porque podem ser acompanhadas de cardiopatia valvular crônica ou, possivelmente, de nefrite crônica.

Quando os estreptococos crescem em placas de ágar sangue, é possível dividi-los em três grupos. As colônias alfa apresentam uma zona de hemólise incompleta ou esverdeada, os estreptococos beta mostram uma zona de hemólise completa e, finalmente, os estreptococos gama não produzem alterações visíveis no ágar sangue.

Tomando por base as características antigênicas de um polissacarídeo de composição variável localizado na parede bacteriana - o carboidrato C - que pode ser detectado por diferentes técnicas imunológicas, os estreptococos foram divididos em vinte grupos sorológicos (grupos de Lancefield) designados por letras maiúsculas do alfabeto. Os estreptococos beta hemolíticos do grupo A (*Streptococcus pyogenes*) são os responsáveis pela grande maioria das estreptococcias humanas. Outros estreptococos, como os dos grupos C, D e G já foram demonstrados, ocasionalmente, como causadores de infecção humana (Trabulsi, 1986; Balows et al, 1992).

Os tipos sorológicos do grupo A, que interessa particularmente ao clínico, são dados graças à presença de duas proteínas (M e T) na célula. Tomando-se por base essas proteínas M e T pode-se distinguir em torno de 60 e 26 sorotipos de *Streptococcus pyogenes*, respectivamente. Essa sorotipagem tem interesse epidemiológico e é importante para a compreensão da sua patogenicidade. Assim, por exemplo, alguns sorotipos M estão associados mais freqüentemente à glomerulonefrite do que outros (Trabulsi, 1986).

Os focos primários de infecção pelo *Streptococcus pyogenes* localizam-se geralmente na faringe e amígdalas (faringo-amigdalites) e na pele (piodermite e erisipela), daí disseminando-se para diferentes órgãos e tecidos do organismo. As faringo amigdalites podem ser acompanhadas de febre reumática e de glomerulonefrite, mas as

piodermites podem ocasionar apenas glomerulonefrites (Trabulsi, 1986).

Não se conhece a incidência de febre reumática e de glomerulonefrite aguda no Brasil. No entanto, a febre reumática é reconhecida com um grave problema de Saúde Pública no Brasil, sendo considerada pelas nossas autoridades sanitárias como uma das doenças mais caras em nosso país, em função dos custos dos procedimentos de cirurgia cardíaca para correção das lesões valvulares.



## II - OBJETIVOS

Como já foi mencionado na parte introdutória desta tese, Restrepo e Moore, em dados não publicados citados por Wiernik (1968), encontraram uma freqüência do traço falciforme significativamente menor entre negróides com a febre reumática. Além disso, esses autores observaram que quando certos tipos de estreptococos beta hemolíticos do grupo A eram cultivados em placas de ágar sangue contendo apenas a hemoglobina S, obtinha-se um menor número de colônias do que quando um inóculo equivalente era cultivado em placas de ágar sangue contendo apenas a hemoglobina normal A. Com base nesses achados, eles aventaram a hipótese de que os portadores da hemoglobina S poderiam ter alguma vantagem seletiva frente à infecção pelo *Streptococcus pyogenes*.

Evidentemente, a confirmação dessa hipótese colocaria em discussão um novo mecanismo homeostático de manutenção do polimorfismo da hemoglobina S. Para tanto, seria necessário afastar algum possível viés nos achados laboratoriais de Restrepo e Moore, já que o menor crescimento de colônias de *Streptococcus pyogenes* nas placas de ágar sangue contendo a hemoglobina S poderia estar relacionado a outros fatores dos pacientes, tais como a anemia, a presença de antibiótico, sobretudo penicilina, no plasma, o título de anticorpos anti-estreptolisina O e a presença da hemoglobina fetal.

Assim sendo, o presente trabalho teve por objetivo geral comparar o crescimento do *Streptococcus pyogenes* em placas de ágar sangue contendo hemoglobina S e hemoglobina A, eliminando algum possível viés não previsto na investigação de Restrepo e Moore. Julgou-se conveniente testar duas cepas de estreptococos beta hemolíticos - uma do grupo A de Lancefield e outra do grupo não-A e acrescentar medidas da hemólise causada pelo estreptococo. Nesse sentido, a tese teve os seguintes objetivos específicos:

1. comparar o número de colônias de estreptococos entre as placas de ágar sangue contendo hemoglobina S e hemoglobina A;
2. comparar a porcentagem de hemólise em culturas de estreptococos em tubos de ensaio contendo hemoglobina S e hemoglobina A;
3. comparar o tamanho do halo de hemólise nas placas de ágar sangue contendo hemoglobina S e hemoglobina A;
4. investigar se o número de colônias de estreptococos e o tamanho do halo de hemólise nas placas de ágar sangue dependem da concentração de hemoglobina S presente no meio;
5. investigar se o número de colônias e o tamanho do halo de hemólise nas placas de ágar sangue dependem de fatores do plasma (endógenos e exógenos) dos pacientes;
6. verificar se o número de colônias de estreptococos nas placas de ágar sangue e a porcentagem da hemólise nas culturas de estreptococos em tubos de ensaio estão correlacionadas com a porcentagem de hemoglobina fetal dos pacientes;
7. verificar se o número de colônias de estreptococos nas placas de ágar sangue está correlacionado com o título de anticorpos anti-estreptolisina O dos pacientes;
8. testar, em todos os exames, se o estreptococo  $\beta$  hemolítico do grupo A apresenta os mesmos resultados que o estreptococo  $\beta$  hemolítico do grupo não-A.

### III - CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram examinadas amostras de sangue de 12 pacientes voluntários adultos (3 homens e 9 mulheres) com diagnóstico clínico e laboratorial de anemia falciforme, seguidos no Ambulatório de Hemoglobinopatias Hereditárias do Hemocentro da UNICAMP. Esses pacientes foram pareados, de acordo com o sexo, grupo étnico e idade, com 12 voluntários normais, com títulos normais de anticorpos anti-estreptolisina O (ASO). Para tanto, foram colhidos 10 ml de sangue venoso de cada indivíduo examinado, usando-se o EDTA como anticoagulante, determinando-se a concentração de hemoglobina, o padrão eletroforético de hemoglobinas, a porcentagem de hemoglobina fetal e o título de anticorpos anti-estreptolisina O ASO (exames realizados pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP).

Mediante entrevista prévia, foi verificado se os pacientes estavam sendo medicados com antibióticos ou outros fármacos, se receberam injeção de Penicilina G Benzatina ou transfusão sanguínea recente. Os pacientes que haviam recebido transfusão há menos de 2 meses e/ou uma dose de Penicilina G Benzatina há menos de 21 dias não foram incluídos na casuística, lembrando-se que essa penicilina tem ação bactericida durante 14 dias e bacteriostática durante 21 dias .

As culturas do *Streptococcus pyogenes* foram realizadas pela autora no Serviço de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, testando-se sempre duas cepas de estreptococos beta hemolíticos: uma do grupo não-A e outra cepa padrão do grupo A cedida pelo Laboratório de Referência do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

As culturas de estreptococos foram realizadas em placas de ágar sangue e em tubos de ensaio, com hemácias lavadas ressuspensas em Todd Hewitt.

As placas de ágar sangue foram preparadas de acordo com a técnica usual, a uma concentração de 5% de sangue. Com o sangue dos pacientes com anemia falciforme foram preparadas três placas de ágar sangue para as duas cepas bacterianas utilizadas, uma com sangue não modificado (anêmico), outra com sangue submetido ao aumento da concentração de hemácias (e de hemoglobina) pela retirada de quantidade adequada do plasma (concentração igualada à do controle) e outra com hemácias lavadas ressuspensas em plasma compatível de controle normal. Foi preparada também uma placa controle para cada paciente, com o sangue de um voluntário normal. As placas foram inoculadas com uma suspensão bacteriana pelo método do "pour-plate" e incubadas a 37°C por 24 horas em atmosfera de CO<sub>2</sub> (8-10%). Após esse tempo, procedeu-se à contagem do número de colônias e à medida do tamanho do halo de hemólise (média de 10 leituras).

A cultura em tubo foi feita com uma suspensão de hemácias lavadas a 5%, em caldo Todd Hewitt (meio de cultura próprio para os estreptococos) e incubada por 24 horas a 37°C com as duas cepas bacterianas, separadamente. A leitura da hemólise foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Após a hemólise total por saponina, foi feita uma segunda leitura, podendo-se assim calcular a porcentagem de hemólise pela fórmula:

$$\% \text{ hemólise} = 1^{\text{a}} \text{ leit.} / 2^{\text{a}} \text{ leit.}$$

Foi realizada, para cada paciente, uma cultura em tubo com o sangue do seu controle normal, medindo-se a sua porcentagem de hemólise.

Utilizou-se inóculo equivalente para todos os cultivos (0,5 do tubo nº 1 da escala de Mac Farland diluído 1/100), tanto em placas de ágar sangue como em tubos de ensaio, sendo as amostras de bactérias provenientes de uma cepa-mãe congelada a -20°C.

As análises estatísticas dos resultados foram feitas pela análise de variância, teste t e testes de correlação, conforme será especificado no item seguinte.

## IV - RESULTADOS



Nas tabelas I e II são apresentados os resultados dos testes realizados com os estreptococos beta hemolíticos dos grupos A e não-A, respectivamente.

Tais resultados serão analisados estatisticamente a seguir, de acordo com os objetivos específicos da tese.

**A - Quanto ao número de colônias nas placas de ágar sangue.**

O teste de Bartlett demonstrou que as amostras são homogêneas quanto ao número de colônias. Foi realizada então a análise de variância, com os seguintes resultados:

**Grupo A :** não há diferença significativa entre as amostras ( $F = 0,1351$ ).

**Grupo não-A :** não há diferença significativa entre as amostras ( $F = 0,1412$ ).

**Grupo A x Grupo não-A :** não há diferença significativa entre as amostras ( $F = 0,1846$ ).

**TABELA I**

Testes realizados com *Streptococcus*  $\beta$  hemolítico do grupo A de Lancefield (cepa padrão)

Pacientes	HbF	ASO	Sangue falc. não modificado		Sangue falc. concentrado		Hem. lavada + plasma (a)		Hem. lavada(b)	Sangue Cont.		Hemácia lavada (c)
	%	(UT)*	Halo Hemol. (mm)	número colônias	Halo Hemol. (mm)	número colônias	Halo Hemol. (mm)	número colônias	% de Hemol.	Halo Hemol. (mm)	número colônias	% de Hemol.
1 - A.J.A.	5,1	33	2,70	81	2,80	78	2,00	57	85,96	2,40	98	59,50
2 - C.B.S.	0,7	376	2,00	233	2,00	217	1,60	245	94,17	2,70	147	99,83
3 - D.P.C.	2,8	74	2,50	192	2,00	169	2,00	197	87,00	2,80	170	82,00
4 - I.M.S.	7,7	50	2,00	197	3,00	198	2,00	220	69,02	3,00	187	95,66
5 - J.D.J.	2,0	33	2,50	208	2,50	154	2,00	164	92,92	3,00	180	48,92
6 - L.H.V.	7,3	167	2,00	198	2,00	183	1,75	126	78,18	3,00	206	80,68
7 - M.A.G.	7,2	167	3,00	22	2,00	85	1,75	23	21,14	3,00	74	45,02
8 - M.V.S.	14,0	33	2,60	210	2,00	244	2,00	254	28,99	2,50	370	71,00
9 - M.F.S.	5,2	111	2,50	75	3,00	73	2,00	78	92,39	2,40	98	59,60
10 - M.A.	2,7	251	3,00	164	2,00	185	3,00	169	68,25	3,00	170	98,11
11 - W.M.	3,8	74	3,00	83	2,50	68	2,00	75	81,48	2,00	75	98,78
12 - Z.S.	6,2	33	2,00	146	2,00	160	2,00	150	81,61	3,00	170	92,92

a) Hemácias lavadas de sangue falcêmico ressuspensas em plasma normal compatível.

b) Hemácias lavadas de sangue falcêmico ressuspensas em caldo de Todd Hewitt (solução a 5%).

c) Hemácias lavadas de sangue normal ressuspensas em caldo de Todd Hewitt (solução a 5%).

\* U.T. - Unidade Todd por mililitro de soro (Valor normal < 200 UT/ml).

**TABELA II**

Testes realizados com Streptococcus  $\beta$  hemolíticos do grupo não A

Pacientes	HbF	ASO	Sangue falc. não modificado		Sangue falc. concentrado		Hem. lavada + plasma (a)		Hem. lavada(b)	Sangue Cont.		Hemácia lavada (c)
	%	* (UT)	Halo Hemol. (mm)	número colônias	Halo Hemol. (mm)	número colônias	Halo Hemol. (mm)	número colônias	% de Hemol.	Halo Hemol. (mm)	número colônias	% de Hemol.
1 - A.J.A.	5,1	33	4,00	274	5,00	264	3,00	236	91,86	4,00	273	55,84
2 - C.B.S.	0,7	376	3,00	153	3,20	125	2,30	142	98,81	3,80	123	99,83
3 - D.P.C.	2,8	74	3,00	157	3,00	200	2,00	143	44,84	2,00	182	80,37
4 - I.M.S.	7,7	50	2,00	180	2,60	195	2,30	164	99,30	3,00	193	93,46
5 - J.D.J.	2,0	33	3,90	20	4,00	30	2,25	27	51,66	5,00	24	47,68
6 - L.H.V.	7,3	167	4,00	178	3,00	190	2,25	252	70,04	3,00	240	74,14
7 - M.A.G.	7,2	167	4,00	95	4,00	66	2,50	65	29,14	5,00	74	83,55
8 - M.V.S.	14,0	33	3,95	286	3,50	224	3,00	274	32,10	4,00	350	59,31
9 - M.F.S.	5,2	111	3,65	267	5,00	230	3,00	163	53,80	4,00	273	62,47
10 - M.A	2,7	251	5,00	146	5,00	185	4,20	158	60,78	6,00	134	97,56
11 - W.M.	3,8	74	3,00	139	3,00	145	3,00	269	87,94	5,00	272	94,22
12 - Z.S.	6,2	33	4,70	100	5,00	152	4,00	136	86,53	6,00	148	91,80

a) Hemácias lavadas de sangue falcêmico ressuspensas em plasma normal compatível.

b) Hemácias lavadas de sangue falcêmico ressuspensas em caldo de Todd Hewitt (solução a 5%).

c) Hemácias lavadas de sangue normal ressuspensas em caldo de Todd Hewitt (solução a 5%).

\* U.T. - Unidade Todd por mililitro de soro (Valor normal < 200 UT/ml).

Tanto no grupo A quanto no grupo não-A não foi observada correlação nas amostras falcêmicas entre o número de colônias e o título de anticorpos anti-streptolisina O ASO ( $t = -0,159$  e  $t = 0,0569$ , respectivamente, não significativos) e entre o número de colônias e a porcentagem de hemoglobina fetal ( $t = 0,1799$  e  $t = 1,999$ , respectivamente, não significativos).

**B - Quanto a porcentagem de hemólise na cultura em tubo de ensaio.**

O teste t de Student mostrou que:

**Grupo A:** Controle x Falcêmicos = Não há diferença significativa entre as amostras. ( $t = 0,7093$ )

**Grupo não-A:** Controle x Falcêmicos = Não há diferença significativa entre as amostras. ( $t = 1,079$ )

**Grupo A x Grupo não-A:** Há diferença significativa entre as amostras

O teste de correlação de Pearson demonstrou que tanto no grupo A quanto no grupo não A não existe correlação entre a porcentagem de hemólise e o título de anticorpos anti-streptolisina O ASO ( $t = 0,145$  e  $t = 0,079$ , não significativos). O mesmo teste demonstrou, por outro lado, que no grupo A existe uma correlação inversa entre a porcentagem de hemólise e a porcentagem de hemoglobina fetal ( $r = -0,7084$ ). Tal correlação não foi observada no grupo não A ( $r = -0,0013$ ).

## **C - Quanto ao tamanho do halo de hemólise nas placas de ágar sangue**

### **1 - Grupo A:**

O teste de Bartlett demonstrou que as amostras são homogêneas quanto ao tamanho do halo de hemólise. Foi feita, portanto, a análise de variância, que demonstrou haver diferença entre as amostras ( $F = 7,5562$ ).

Tendo em vista esse resultado, comparou-se as placas preparadas com sangues falcêmicos com as preparadas com sangues normais, pelo teste de Dunnett, observando-se o seguinte:

- a) Sangue não modificado x Controle = Não há diferença significativa  
( $\Delta = 0,241$ )
- b) Sangue concentrado x Controle = Há diferença significativa  
( $\Delta = 0,408$ )
- c) Hemácias lavadas x Controle = Há diferença significativa  
( $\Delta = 0,717$ )

### **2 - Grupo não-A:**

O teste de Cochran demonstrou que as amostras são homogêneas quanto ao halo de hemólise. Foi feita, portanto, a análise de variância que demonstrou haver diferenças entre as amostras ( $F = 4,8944$ ).

Tendo em vista esse resultado, comparou-se as placas preparadas com sangues falcêmicos com as preparadas com sangue normais, pelo teste de Dunnett, observando-se o seguinte:

- a) Sangue não modificado x Controle = Não há diferença significativa  
(  $\Delta = 0,550$ )
- b) Sangue concentrado x Controle = Não há diferença significativa  
(  $\Delta = 0,375$ )
- c) Hemácias lavadas x Controle = Há diferença significativa  
(  $\Delta = 1,417$ )

## V - DISCUSSÃO

Os dados laboratoriais de Restrepo e Moore que motivaram o presente trabalho referiam-se especificamente ao número de colônias de estreptococos nas placas de ágar sangue.

Quanto a esse aspecto, os resultados do presente trabalho não confirmaram os dados de Restrepo e Moore, uma vez que não se observou diferença significativa quanto ao número de colônias de *Streptococcus pyogenes* nas placas de ágar sangue preparadas com sangues falcêmicos e normais. A concentração do sangue para afastar a possível interferência da anemia e a lavagem das hemácias e sua ressuspensão em plasma compatível (para afastar possível interferência de fatores do plasma dos doentes) não produziram modificações significativas no número de colônias, indicando não serem estes os eventuais vieses da pesquisa de Restrepo e Moore.

Outra possibilidade seria a desses autores terem feito uma classificação "presuntiva" do estreptococo do grupo A testado em sua pesquisa. Trabalhando-se, no entanto, com uma cepa não A e outra cepa certamente do grupo A (cepa padrão, cedida por Centro de Referência), também não se observou diferenças significativas quanto ao número de colônias nas placas preparadas com hemoglobina S e hemoglobina A. Além disso, comparando-se os números de colônias observados com a cepa A aos verificados com a cepa não-A também não se constatou diferença significativa entre as amostras. Da mesma forma, não se observou correlação entre o número de colônias nas placas de ágar sangue e o título de anticorpos anti-streptolisina O (ASO) e a porcentagem de hemoglobina fetal dos pacientes examinados.

Esse conjunto de resultados nos permite afirmar com toda segurança que o número de colônias de estreptococos nas placas de ágar sangue não difere significativamente caso o sangue usado em seu preparo contenha a hemoglobina S ou a hemoglobina normal A.



A comparação da porcentagem de hemólise em culturas de estreptococos realizados em tubos de ensaio e a comparação da medida do halo de hemólise em torno das colônias de estreptococos cultivados em placas de ágar sangue são contribuições originais deste trabalho, não constando da comunicação de Restrepo e Moore.

A medida da porcentagem de hemólise em tubos de ensaio não mostrou diferenças significativas entre os sangues falcêmicos e normais. Tal porcentagem no entanto, mostrou-se curiosamente correlacionada de forma inversa no grupo A à hemoglobina fetal presente nos sangues falcêmicos, relação essa que merece ser melhor investigada. É importante ressaltar, todavia, que a correlação inversa com a hemoglobina fetal foi insuficiente para determinar diferença significativa na porcentagem de hemólise observada entre sangues falcêmicos e normais. Além disso, a forma clínica de anemia falciforme mais comum em nosso meio, ou seja, a relacionada ao haplótipo Bantu, não é acompanhada de níveis elevados de hemoglobina fetal. De fato, o haplótipo Senegal, acompanhado de altas porcentagens de hemoglobina fetal, é excepcional em nosso país (Costa *et al.*, 1992; Zago *et al.*, 1992). Por outro lado, a diferença significativa na porcentagem de hemólise observada entre os estreptococos dos grupos A e não A não pode ser considerada surpreendente, uma vez que se tratam de cepas diferentes de bactéria.

A medida do tamanho do halo de hemólise nas placas de ágar sangue, embora não tenha revelado diferenças significativas entre os sangues falcêmicos não modificados e os sangues normais, mostrou diferenças significativas em relação aos controles no grupo A, quando os sangues falcêmicos foram concentrados e quando as hemácias falcêmicas foram lavadas e ressuspensas em plasma normal compatível, e, em relação ao grupo não-A, quando as hemácias falcêmicas foram

lavadas e ressuspensas em plasma normal compatível. Esses resultados indicam apenas que a medida do tamanho do halo de hemólise é mais suscetível a variações, sendo pouco adequada a estudos dessa natureza. De fato, é indiscutível que a determinação da porcentagem de hemólise em tubos de ensaio fornece uma avaliação mais sensível da ação hemolítica do estreptococo do que a medida do tamanho do halo de hemólise em torno as colônias cultivadas em placas de ágar sangue.

A nível de exames microbiológicos, é pouco provável, portanto, que o *Streptococcus pyogenes* mostre alguma interação peculiar com o sangue que contenha a hemoglobina S, diferente da observada com o sangue com a hemoglobina A. Nesse sentido, os resultados obtidos no presente trabalho não favorecem a hipótese de que os portadores da hemoglobina S tenham alguma vantagem seletiva frente as infecções causadas pelos estreptococos  $\beta$  hemolíticos do grupo A e suas complicações.

Embora os objetivos desta tese tenham se limitado a alguns aspectos laboratoriais da questão, também é interessante especular sobre alguns aspectos epidemiológicos da relação entre a anemia e o traço falciformes e a febre reumática e a glomerunefrite aguda.

Nesse sentido, o primeiro aspecto a ser ressaltado é o da comunicação de Restrepo e Moore a respeito da baixa freqüência do traço falciforme entre negróides com febre reumática permanecer isolada na literatura, não tendo sido confirmada nem rejeitada por outros estudos. Assim sendo, não pode ser afastada a possibilidade de se tratar de um achado espúrio.

Em segundo lugar, há de se ponderar que não se conhece nada a respeito da incidência das doenças estreptocócicas nos séculos passados em regiões tropicais e sub-tropicais de alta prevalência da hemoglobina S. Embora saiba-se hoje que as doenças estreptocócicas,

incluindo a febre reumática, não são exclusivas das regiões temperadas, como se pensava no passado (Markowitz, 1991), é evidente que a sua incidência em regiões tropicais e sub-tropicais sempre foi menor que a de outras doenças, como a malária. Assim sendo, é pouco provável que elas pudessem participar de algum mecanismo homeostático importante de manutenção do polimorfismo da hemoglobina S.

A informação de que a febre reumática é rara em pacientes com a anemia falciforme também não está imune a contestações. Tal informação apareceu pela primeira vez em um trabalho de Klinefelter publicado em 1942 e continuou sendo mantida em alguns livros-textos mais antigos, como o de Wintrobe (1961).

Como comenta Wiernik (1968), entretanto, a raridade da ocorrência simultânea da anemia falciforme e da febre reumática no mesmo paciente pode ser explicada com base apenas nas incidências individuais dessas doenças. De fato, segundo esse autor, entre crianças negróides norte-americanas, a incidência da anemia falciforme é de cerca de 0,2% e da febre reumática é de cerca de 0,6%. Assim, a probabilidade de que uma criança com a anemia falciforme venha manifestar a febre reumática é 0,6%. Já a probabilidade de se encontrar ao acaso uma criança negróide norte-americana com as duas doenças simultaneamente é de apenas 0,0012%!

Outro aspecto a ser considerado é o de que a penicilinoterapia profilática (Penicilina G Benzatina ou penicilina oral) faz parte da conduta terapêutica de adultos e, sobretudo, de crianças com a anemia falciforme. Assim, por exemplo, a administração diária de penicilina oral entre os seis meses e os cinco anos de idade reduz drasticamente a ocorrência de septicemias fulminantes por pneumococos nessas crianças ( Vichinsky *et al*, 1988; Wong *et al*, 1992). Como a penicilina é o antibiótico de escolha para tratamento de infecções por

*Streptococcus pyogenes*, é possível que essa bactéria não chegue a causar infecção em crianças com a anemia falciforme devidamente tratadas, tornando rara a ocorrência de febre reumática e de glomerulonefrite nesses pacientes.

Alguns autores mais cautelosos, como Serjeant (1974), afirmam que a incidência de febre reumática e de glomerulonefrite aguda é desconhecida entre pacientes com a anemia falciforme. Com relação à glomerulonefrite, o que se tem ressaltado é a possibilidade de ocorrência dessa complicação, geralmente pediátrica, em pacientes adultos com a anemia falciforme, em decorrência de uma alteração do estado imunológico ou da presença de úlceras crônicas infectadas nas pernas (Serjeant, 1985).

Concluindo esta discussão, é interessante comentar que conjunto de dados apontados nesta tese sugere que os estudos a respeito da interação entre o *Streptococcus pyogenes* e a hemoglobina S provavelmente levarão aos mesmos resultados negativos que já foram observados em relação a essa hemoglobina anômala e a hanseníase (César et al, 1974), a tuberculose (Ramalho e Beiguelman, 1977; Pinto Jr., 1978; Martins et al, 1987) e a doença de Chagas (Domingos et al, 1991).

## VI - RESUMO E CONCLUSÕES

Dados não publicados de Restrepo e Moore, citados por Wiernik (1968), indicam que quando alguns tipos de estreptococos  $\beta$  hemolíticos do grupo A são semeados em placas de ágar sangue contendo apenas hemoglobina S, obtém-se um menor número de colônias do que em placas de ágar sangue contendo apenas a hemoglobina normal A.

Tendo em vista a importância desse achado na discussão dos mecanismos homeostáticos de manutenção do polimorfismo da hemoglobina S, julgou-se atraente confirmar e ampliar essa investigação, eliminando-se algum eventual viés que pudesse interferir no crescimento dos estreptococos. Para tanto, foram estudadas amostras de sangue de doze pacientes adultos com a anemia falciforme, pareados com controles normais de mesmo sexo, idade e grupo étnico. Comparou-se o número de colônias de estreptococos e o tamanho do halo de hemólise em placas de ágar sangue preparadas com sangues falcêmicos e normais, bem como a porcentagem de hemólise em culturas de estreptococos preparadas em tubos de ensaio com sangues falcêmicos e normais. Para cada sangue falcêmico foram preparadas seis placas de ágar sangue: duas com sangue não modificado (anêmico), duas com sangue submetido ao aumento da concentração de hemácias pela retirada de quantidade adequada de plasma e duas com hemácias lavadas ressuspensas em plasma normal compatível. Todas variáveis foram correlacionadas com a porcentagem de hemoglobina fetal e com o título de anticorpos anti-streptolisina O dos pacientes. Foram testadas duas cepas de estreptococos  $\beta$  hemolíticos: uma do grupo não-A e outra do grupo A de Lancefield (cepa padrão cedida por Centro de Referência).

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

1. o número de colônias de estreptococos  $\beta$  hemolíticos dos grupos A e não-A nas placas de ágar sangue não difere significativamente caso o sangue usado em seu preparo contenha a hemoglobina S ou a hemoglobina normal A;
2. a concentração do sangue falcêmico usado no preparo das placas de ágar sangue (para afastar a possível interferência da anemia), bem como a lavagem das hemácias e sua ressuspensão em plasma compatível (para afastar a possível interferência de fatores do plasma), não produzem modificações significativas no número de colônias de estreptococos  $\beta$  hemolíticos dos grupos A e não-A;
3. o número de colônias de estreptococos  $\beta$  hemolíticos dos grupos A e não-A não está correlacionado nem com a porcentagem de hemoglobina fetal nem com o título de anticorpos anti-streptolisina O dos sangues falcêmicos;
4. a porcentagem de hemólise em culturas de estreptococos  $\beta$  hemolíticos dos grupos A e não-A preparadas em tubos de ensaio não difere significativamente caso as culturas sejam preparadas com sangues falcêmicos ou normais;
5. a porcentagem de hemólise em culturas de estreptococos  $\beta$  hemolíticos dos grupos A preparada em tubos de ensaio apresenta uma correlação inversa com a porcentagem de hemoglobina fetal dos pacientes falcêmicos;
6. o tamanho do halo de hemólise em torno das colônias de estreptococos  $\beta$  hemolíticos dos grupos A e não-A não difere significativamente caso as placas de ágar sangue sejam preparadas com sangues falcêmicos não modificados ou com sangues normais. A modificação do sangue falcêmico (concentração e/ou ressuspensão das hemácias lavadas em plasma normal compatível) determina, no

entanto, diferenças significativas no tamanho do halo de hemólise, em relação aos controles normais;

7. os estreptococos  $\beta$  hemolíticos dos grupos A e não-A apresentam diferenças significativas quanto à porcentagem de hemólise nas culturas realizadas em tubos de ensaio.



## VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allison, A.C. - Protection afforded by sickle cell trait against subtertian malarial infection. Brit. Med. J., 1: 290-293, 1954.

Balows, A.; Hausler, W. J. Jr.; Herrmann, K. L.; Isenberg, H. D.; Shadomy, H.J. - Manual of Clinical Microbiology. 5 ed. Washinton, D. C. ASM 1992.

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

Bowman, J. E. - Prenatal screening for hemoglobinopathies. Am. J. Hum. Genet., 48: 433-438, 1991.

Cézar, P.C.; Mizusaki, K.; Pinto Jr., W.; Opromolla, D.W.A. e Beiguelman, B. - Hemoglobina S e lepra. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol., 7: 151-167, 1974.

Chang, J.C. and Kan, Y.W. - A sensitive new prenatal test for sickle cell anemia. N. Engl. J. Med., 307: 30, 1982.

Conner, B.J.; Reyes, A.A.; Morin, C.; Hakura, K.; Teplitz, R.L. and Wallace, R.B. - Detection of sickle cell beta-S- globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 278-282, 1983.

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

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

Haldane, J.B.S. - Disease and evolution. Ric. Sic., 19: 68, 1949.

Hutz, M.H. - História natural da anemia falciforme em pacientes da região metropolitana do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1981.

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

Klinefelter, J. - The heart in sickle cell anemia. J. Med. Sci., 203: 34, 1942.

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

- Martins, C.S.B.; Ramalho, A.S. e Pinto Jr., W. - Hb S heterozigótica e tuberculose pulmonar. Rev. Bras. Genet., 10: 769-776, 1987.
- Paiva e Silva, R.B.; Ramalho, A.S. e Cassorla, R.M.S. - A anemia falciforme como problema de Saúde Pública no Brasil. Rev. Saúde Pública, 27: 54-58, 1993.
- Pauling, L.; Itano, H.A; Singer, S.J. e Wells, I.C. - Sickle cell anemia: a molecular disease. Science, 110: 543, 1949.
- Penchaszadeh, V. - Genetic Services for Hemoglobinopathies in Latin-América. Joint WHO/Tif Meeting 'on Prevention and control of Hemoglobinopathies. Nicosia, Cyprus, 3-4 April, 1993.
- Pinto Jr., W. - Hemoglobina S e tuberculose pulmonar. Tese de Livre Docência, Universidade Estadual de Campinas, 1978.
- Powars, D.; Chan, L.S. and Schroeder, W.A. - The variable expression of sickle cell disease is genetically determined. Semin in Hematol, 27: 360-376, 1990.
- Ramalho, A.S. - As Hemoglobinopatias hereditárias. Um problema de Saúde Pública no Brasil. Editora da Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 1986.
- Ramalho, A.S. e Beiguelman, B. - Sickle cell trait and tuberculosis. Ciência e Cultura, 29: 1149-1151, 1977.
- Raper, A.B. - Further observations on sickling and malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 53: 110-117, 1959.
- Serjeant, G.R. - The clinical features of sickle cell disease. Amsterdam, North-Holland, 1974.
- Serjeant, G.R. - Sickle cell disease. Oxford Medical Publication, 1985.

- Teixeira, R.C. - Viabilidade e eficiência de um programa de hemoglobinopatias hereditárias em uma comunidade brasileira (Araras, SP), abordada a partir das gestantes. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 1993.
- Trabulsi, L.R. - Microbiologia. Rio de Janeiro. Livraria Atheneu, 1986.
- Vichinsky, E.; Hurst, D.; Earles, A.; Kleman, K. and Lubin, B. - Newborn screening for sickle cell disease. Effect on mortality. Pediatrics, 81: 749-755, 1988.
- Wajeman, H.; Vassun, C.; Blouquit, Y. and Galacteros, F. - Hb Zaire and Hb Duino: Two new human hemoglobins variants due rare mutational events. Blood, 78: 205, 1991.
- Wiernik, P.H. - Rheumatic heart disease occurring in sickle cell disease and trait. Southern Med. J., 61: 404-407, 1968.
- Wintrobe, M.M. - Clinical Hematology. Philadelphia, Lea e Febiger, P. 674, 1961.
- Wong, W.; Poars, D.R.; Chan, L.; Hiti, A.; Johnson, C. and Overturf, G. - Polysaccharide encapsulated bacterial infection in sickle cell anemia: A thirty years epidemiologic experience. Am. J. Hematol., 39: 176-182, 1992.
- Zago, M.A.; Figueiredo, M.S. and Ogo, S.H. - Bantu Beta-S haplotype predominates among brazilian Blacks. Am. J. Phys. Anthropol., 88: 295-298, 1992.