

BC/35777

IB/80230

Iara Duchovni Silva

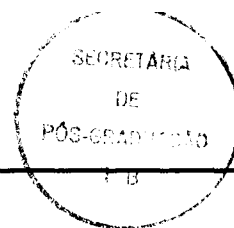
Evidência de um efeito materno na
transmissão hereditária dos traços
falciforme e talassêmico beta



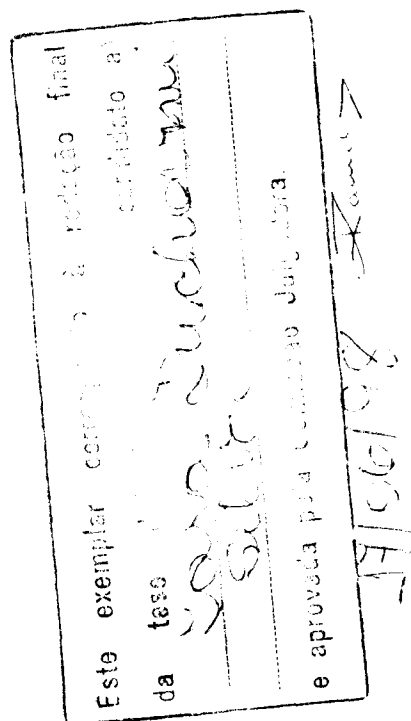
1998

T/UNICAMP

S138_e,



Evidência de um efeito materno na transmissão hereditária dos traços falciforme e talassêmico beta



Orientador: Antônio Sérgio Ramalho

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Doutor em Biologia

PS - Errata referente à pag. 38 (anexa)



UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	
V.	EX.
TCMBO	80/35777
PROC	395/98
C	D ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/11/98
N.º GPD	400118211.3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP**

Silva, Iara Duchovni

Si38e

Evidência de um efeito materno na transmissão hereditária dos traços falciforme e talassêmico beta / Iara Duchovni Silva -- Campinas, SP: [s.n.], 1998.

Orientador: Antônio Sérgio Ramalho.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Hemoglobinopatia. 2. Anemia falciforme.

3. Talassemia. 4. Polimorfismo (Genética). I. Ramalho, Antônio Sérgio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 17 de junho de 1998

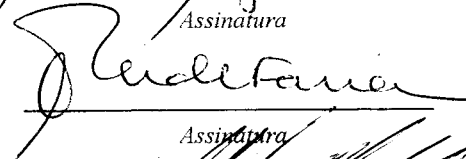
BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

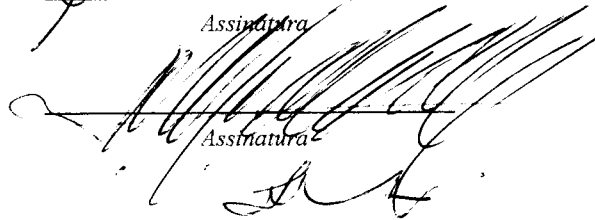
Prof. Dr. Antonio Sérgio Ramalho


Assinatura

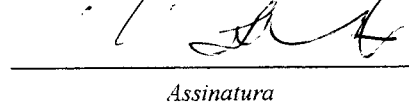
Profa. Dra. Antonia Paula Marques de Faria


Assinatura

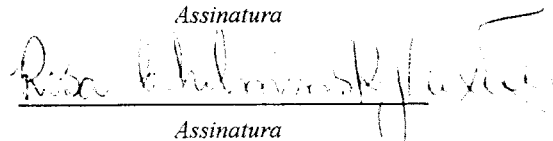
Prof. Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena


Assinatura

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi


Assinatura

Profa. Dra. Rosa Chelmishy Teixeira


Assinatura

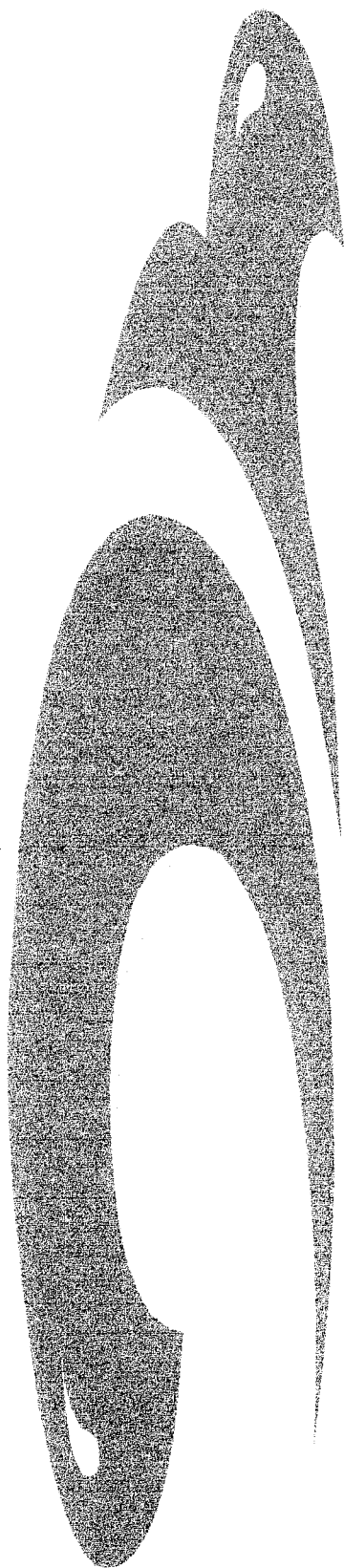
SUPLENTES:

Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra

Assinatura

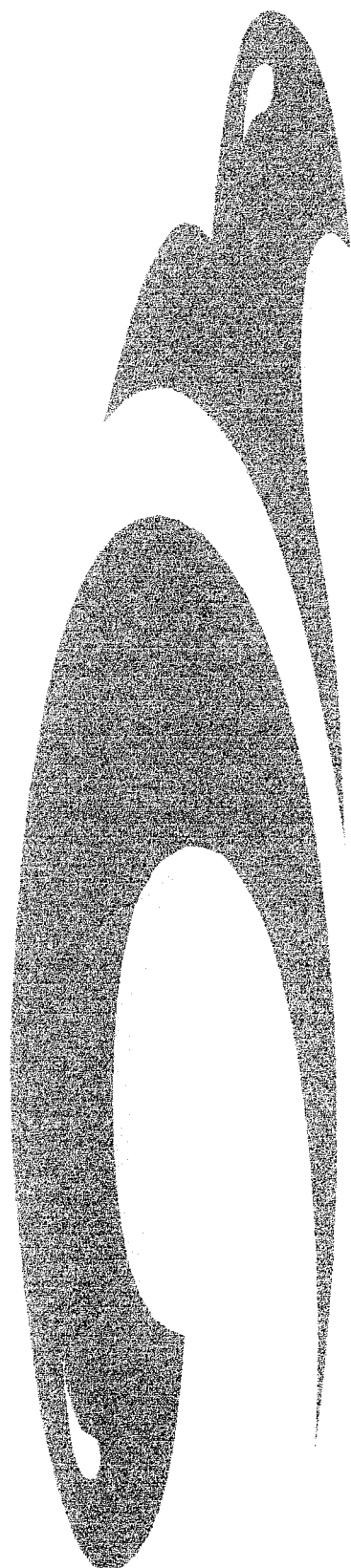
Pra. Dra. Cristine Hackel

Assinatura



À minha mãe, Léa, (in memoriam) pelo seu exemplo de vida, de amor, de luta e dedicação a todos os seus ideais. Tentarei segui-los sempre.

Ao meu pai, Saulo, pelo seu caráter irrepreensível, sua luta para vencer com ética e pela sua educação que nos proporcionou exemplo de trabalho e honestidade.



Ao meu marido Elvino, pelo seu exemplo de vida, de luta, de ética moral, de amor, apoio carinho, compreensão e paciência os quais sempre se fizeram presentes.

Aos meus filhos Marcelo, Davi e Leandro pelo apoio emocional, compreensão e paciência durante toda a realização deste trabalho.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antônio Sérgio Ramalho, pela orientação segura, amizade e estímulo que sempre me ofereceu.

A Profa. Dr. Sara T. O. Saad, pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena, pela avaliação da análise estatística e pelo constante estímulo e amizade.

À Profa. Dra. Carmem Sílvia Bertuzzo, pela amizade, colaboração e sempre uma palavra de incentivo.

À Profa. Dra. Antonia Paula Marques de Faria, pelas sugestões oferecidas ao trabalho.

À Profa. Dra. Rosa Chelminsky Teixeira, pela colaboração e sugestões oferecidas ao trabalho.

À Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra, pelo apoio e amizade.

À Profa. Dra. Carmem Silvia Passos Lima, pelo apoio e colaboração.

À assistente social Maria Luiza, pelo apoio e colaboração.

As amigas Alessandra, Elvira e Rosana pelo apoio, amizade e colaboração.

Aos funcionários Luis Antônio, Elizeu e Lindomar, pela colaboração e amizade.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela contribuição financeira através da concessão de bolsa de doutorado.

A todos os professores do curso de pós-graduação, pela minha formação acadêmica.

À secretária da pós graduação de genética Tereza V. A. de Pádua Chiodetto pela sua colaboração.

A todos os colegas e funcionários do Depto. de Genética Médica, que acompanharam o desenvolvimento do trabalho.

A todos os funcionários do Banco de Sangue e Ambulatório de Hemocentro, pela colaboração durante a realização deste trabalho.

Enfim, a todos os pacientes e seus familiares, sem a colaboração dos quais, isto não seria possível.

RESUMO	i
I. INTRODUÇÃO	01
I.1. A hemoglobina S e a talassemia beta	02
I.2. A manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta: A hipótese da malária	11
I.3. Outros mecanismos homeostáticos sugeridos para explicar a manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta	23
II. OBJETIVO	32
I.1. Justificativa	33
I.2. Objetivo	35
III. CASUÍSTICA E MÉTODOS	36
III.1. Casuística.....	37
III.2. Métodos.....	43
III.2.1. Investigação laboratorial do traço falciforme.....	44
III.2.1.1. Eletroforese de hemoglobinas em fitas de acetato de celulose, pH alcalino	44
III.2.1.2. Teste de solubilidade para confirmação da hemoglobina S	48
III.2.2. Investigação laboratorial do traço talassêmico beta	49

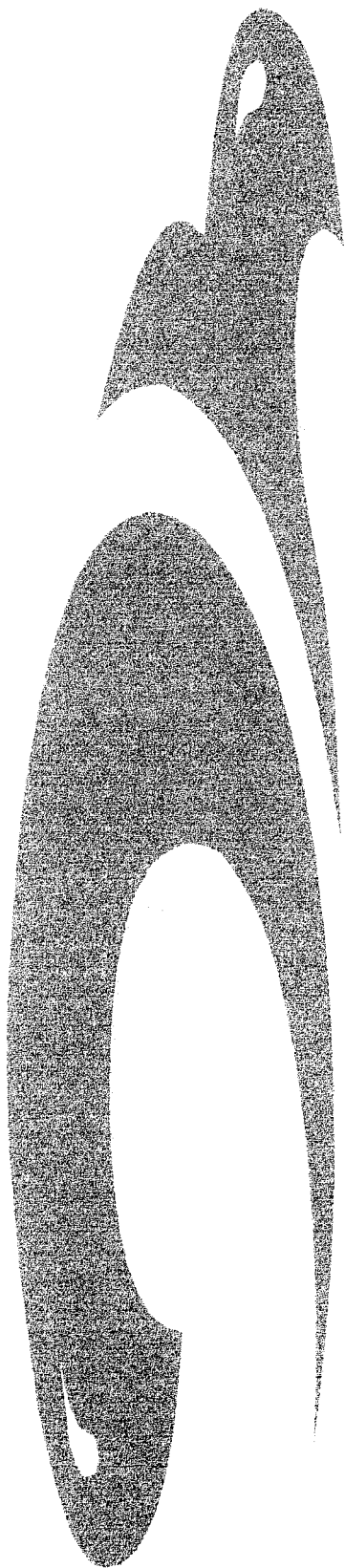
III.2.2.1. Hematimetria	49
III.2.2.2. Análise da morfologia das hemácias em esfregaço sanguíneo	50
III.2.2.3. Quantificação de hemoglobina A ₂ pelo método da eluição após eletroforese de hemoglobinas.	50
III.2.2.4. Dosagem da hemoglobina fetal pelo método da desnaturação alcalina.....	50
III.2.3. Análise estatística.....	51
 IV. RESULTADOS.....	52
 V. DISCUSSÃO.....	60
 VI. CONCLUSÕES.....	74
 VII. SUMMARY	76
 VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

Lista de Tabelas

Tabela I: Procedência dos casos-índice dos núcleos familiares examinados (frequência e porcentagem).....	38
Tabela II: Idade dos casos-índice AS e AT	39
Tabela III: Casais AS X AA (núcleos familiares, n = 201; genealogia, n = 437) e Casais AT X AA (núcleos familiares, n = 138; genealogia, n = 282)	53
Tabela IV: Idade dos filhos	54
Tabela V: Índices de abortamento e mortalidade por sexo e tipo de traço do genitor	56
Tabela VI: Distribuição de filhos por faixa etária - AS.....	57
Tabela VII: Distribuição de filhos por faixa etária -AT	57
Tabela VIII: Distribuição dos filhos por sexo - AS.....	58
Tabela IX: Distribuição dos filhos por sexo - AT	58
Tabela X: Distribuição dos filhos por tamanho da prole - AS.....	59
Tabela XI: Distribuição dos filhos por tamanho da prole - AT.....	59

Lista de Gráficos e Figuras

Gráfico I: Distribuição dos núcleos familiares por procedência	38
GráficoII: Média e intervalo de confiança da média das idades dos casos-índice AS e AT.....	39
GráficoIII a VI: Distribuição das idades dos genitores AS e AT por sexo/traço	40/41
Gráfico VII: Distribuição dos núcleos familiares por número de filhos.....	42
Gráfico VIII: Média e intervalo de confiança da média das idades dos filhos de genitores AS e AT	54
Gráfico IX a XII: Distribuição dos filhos por sexo/traço por tipo de traço do genitor.....	55
Gráfico XIII a XVI: Porcentagem de abortamentos e mortalidade pós-natal entre filhos de pais AS a AT e mães AS e AT	56
Figura 1: Eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose em tampão Tris-EDTA - borato pH 8,9.....	46
Figura 2: Eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose em tampão Tris-EDTA - borato pH 8,9.....	47



Resumo

A teoria de Haldane a respeito da vantagem seletiva dos heterozigotos com os traços falciforme e talassêmico beta na presença da malária causada pelo *Plasmodium falciparum* tem sido largamente aceita, principalmente em relação ao gene da hemoglobina S, nas áreas onde a malária ainda é endêmica. A semelhança das distribuições geográficas da talassemia beta e de antigas zonas hiperendêmicas de malária na região mediterrânea também tem sido demonstrada em vários estudos, mas os mecanismos de proteção apresentados pelos talassêmicos heterozigotos ainda não estão completamente esclarecidos.

Além de apresentar alguns aspectos controversos, a hipótese da malária pressupõe que os portadores do traço falciforme e do traço talassêmico beta nascem na proporção mendeliana esperada e são favorecidos posteriormente por algum fator do meio ambiente. A fertilidade diferencial também tem sido proposta como um mecanismo alternativo de manutenção do polimorfismo balanceado da talassemia beta em algumas populações. Entretanto, uma eventual distorção favorecendo a transmissão do alelo mutante da hemoglobina S e da talassemia beta também é uma hipótese plausível, que merece ser verificada.

A proporção mendeliana foi testada no presente trabalho pelo teste do χ^2 na prole de 201 portadores do traço falciforme (AS) e de 138 portadores do traço talassêmico beta (AT), casados com pessoas com a hemoglobina normal (AA). A amostra de filhos era composta predominantemente por crianças e os indivíduos AS e AT eram oligossintomáticos ou assintomáticos. As taxas de mortalidade (4,17% para filhos de

genitores AS e 2,28% para filhos de genitores AT) foram baixas para terem exercido alguma influência na proporção de filhos AS e AT sobreviventes.

Já a porcentagem de abortamentos reconhecidos foi significativamente maior entre as mães AS e AT.

A tabela mostra o número de filhos portadores e não portadores gerados por pais e mães AS e AT.

Casais AS X AA (núcleos familiares, n = 201; prole, n = 437)

Propósito	Filhos			χ^2	p
	AS	AA	Total		
Mãe (107)	144	89	233	12.98283	p = 0.000315
Pai (94)	103	101	204	0.0196078	p = 0.888639
Total (201)	247	190	437	7.434783	p = 0.006401

Casais AT X AA (núcleos familiares, n = 138; prole, n = 282)

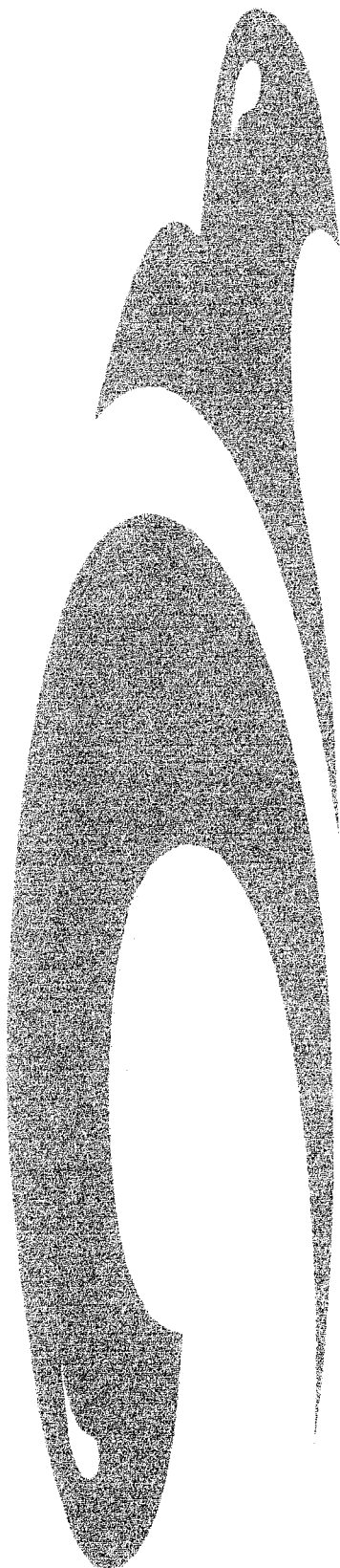
Propósito	Filhos			χ^2	p
	AT	AA	Total		
Mãe (95)	117	66	183	14.21311	p = 0.000164
Pai (43)	57	42	99	2.272727	p = 0.131678
Total (138)	174	108	282	15.44681	p = 0.000085

Esses dados demonstram um efeito materno estatisticamente significativo favorecendo a transmissão dos alelos da hemoglobina S e da talassemia beta.

Como seria de se esperar, a proporção mendeliana foi confirmada entre os filhos dos casos-índice do sexo masculino, embora a existência de um efeito paterno só possa ser descartada com segurança nos casos com a hemoglobina S.

Evidentemente, os mecanismos pré e pós-zigóticos de distorção não podem ser ignorados e merecem ser investigados. Os resultados obtidos devem refletir um efeito biológico, podendo ser atribuídos a um distúrbio de segregação de gametas, ou, mais provavelmente, à sobrevivência seletiva de embriões heterozigotos de mães portadoras.

Sob essa interpretação, um excesso de abortamentos, reconhecidos ou não, de homozigotos AA explicaria o relativo excesso de heterozigotos, que sobreviveriam até o nascimento. Além disso, o fenótipo heterozigoto da mãe deve contribuir de forma importante nesse efeito, uma vez que o excesso de filhos heterozigotos não foi observado a nível significativo quando o genitor heterozigoto foi o pai e não a mãe.



I - Introdução

1.1. A hemoglobina S e a talassemia beta

A hemoglobina S e a talassemia beta estão incluídas entre os polimorfismos genéticos humanos mais profundamente estudados dos pontos de vista clínico, bioquímico, molecular e populacional. Ambas afetam a cadeia de globina beta da hemoglobina adulta normal A ($HbA=\alpha_2\beta_2$), cujo gene está localizado no terço distal do braço curto do cromossomo 11 (especificamente em 11p 15.5) (Deisseroth *et al.*, 1976; 1978). Embora causadas por mutações do mesmo gene, elas pertencem a classes distintas de hemoglobinopatias hereditárias, uma vez que a hemoglobina S apresenta uma alteração de estrutura da cadeia de globina beta, enquanto a talassemia beta decorre de uma deficiência de síntese parcial ou total dessa cadeia.

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

a de uma foice, daí ter recebido o nome da primeira letra da palavra inglesa *sickle*, que quer dizer foice.

O gene da hemoglobina S apresenta, evidentemente, uma alteração molecular muito simples, ou seja, a mutação do códon β^6 de GAG, que codifica o ácido glutâmico, para GTG, que codifica a valina. Conseqüentemente, a identificação de tal gene pela análise direta de DNA também é muito simples, seja pelo uso de enzimas de restrição, como a Mst II, seja pelo emprego de oligonucleotídeos sintéticos alelo-específicos. Apesar disso, como veremos adiante, a expressão do gene da hemoglobina S é influenciada significativamente pelos haplótipos do grupamento gênico β^S e pela ação de proteínas repressoras, como a BP₁.

Os homozigotos do gene da hemoglobina S (homozigotos SS) manifestam uma anemia hemolítica crônica e incurável, embora tratável, denominada anemia falciforme. Além do processo hemolítico, causado pela destruição de hemácias falcizadas, tais homozigotos manifestam complicações vaso-oclusivas, com isquemia, dor, infartamento, necrose e fibrose em vários órgãos. Ossos e articulações, baço, rins, pulmões e coração apresentam-se quase que invariavelmente comprometidos na anemia falciforme. Trata-se, portanto, de uma doença crônica que evolui por crises, que podem ser hemolíticas, dolorosas, aplásticas e de seqüestramento de hemácias falcizadas em órgãos como o baço e o fígado (Sergeant, 1974; 1985; Ramalho, 1986; Embury *et al.*, 1995). O diagnóstico e o tratamento precoce (sobretudo a administração profilática de penicilina entre os seis meses e os cinco anos de idade) aumentam a sobrevida dos pacientes, diminuindo a

mortalidade na infância por doenças infecciosas, sobretudo as septicemias fulminantes por pneumococos e outras bactérias encapsuladas. Apesar disso, cerca de 20% das crianças brasileiras com a anemia falciforme ainda falecem antes dos cinco anos de idade (Araújo *et al.*, 1993). Já nos E.U.A. e na Europa, a esperança média de vida desses pacientes é de cerca de quarenta anos, existindo casos bem documentados de grande longevidade (Ramalho, 1986).

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

Os polimorfismos do DNA do grupamento ("cluster") do gene β^S , próximos dos genes de cadeias γ (Hb F= $\alpha_2 \gamma_2$), regulam a síntese de hemoglobina fetal, a razão de hemoglobina S para a hemoglobina fetal nas hemácias falcizadas e a taxa de decréscimo da hemoglobina fetal durante o início da infância. Uma vez que a hemoglobina fetal interfere na polimerização da hemoglobina S, sendo um dos mais potentes inibidores da falcização das hemácias, a modulação de gravidade da anemia falciforme exercida pelos haplótipos de DNA baseia-se, em grande parte, nos níveis de hemoglobina fetal. De fato, enquanto nos pacientes falciformes adultos com o haplótipo Bantu são encontrados níveis de hemoglobina fetal abaixo de 5%, naqueles com haplótipo Benin tais níveis oscilam entre 5% e 15% e nos com o haplótipo Senegal eles superam a taxa de 15% (Powars *et al.*, 1990; Powars, 1991). Verificou-se, também, que a ligação da proteína repressora BP₁, capaz de reprimir a expressão do gene β^S , é variável nos vários haplótipos de DNA, sendo decrescente entre os haplótipos Senegal, Benin e Bantu (Elion *et al.*, 1992). Assim, por exemplo, os pacientes falciformes com a composição haplotípica Bantu/Bantu, que são os mais comuns em nosso meio, além de apresentarem baixos níveis de hemoglobina fetal, ainda apresentam pequena ligação com a proteína repressora BP₁ e, portanto, alta concentração intracelular de hemoglobina S, do que resulta uma expressão clínica de máxima gravidade.

Os heterozigotos do gene da hemoglobina S, portadores do traço falciforme ou siclêmico (heterozigotos AS) possuem um percentual de hemoglobina anômala que varia de 22% a 45% da hemoglobina total. As suas hemácias apresentam a capacidade de se

tornarem falciformes, embora, para tanto, devam ser submetidas a menores tensões de oxigênio do que as hemácias dos pacientes homozigotos, que possuem maior potencial de falcização (Ramalho, 1986).

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

A opinião mais comum, no entanto, é a de que essas complicações ocorram muito raramente, pois o baixo potencial de falcização das hemácias dos heterozigotos AS exige fatores desencadeantes (hipóxia, acidose, desidratação) muito intensos. Assim, por

exemplo, estudos de avaliação da morbidade do traço falciforme realizados na UNICAMP não constatarem uma associação estatisticamente significativa entre essa condição clínica e as dores ósteo-articulares (Gonçales e Ramalho, 1985), as úlceras de membros inferiores (Ramalho *et al.*, 1985), a hematúria (Gonçalves *et al.*, 1989) e a úlcera duodenal (Nomura *et al.*, 1992).

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

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

A frequência do traço falciforme pode ser estimada em 6,6% nas populações negróides do Sul e Sudeste brasileiros (Ramalho e Beiguelman, 1977; Salzano, 1979), o

que permite estimar a frequência de nascimento de homozigotos SS em, aproximadamente, 0,1% nessas populações. Pode-se dizer, portanto, que a anemia falciforme é um problema de Saúde Pública entre nós, sendo a doença hereditária monogênica mais freqüente no Brasil (Ramalho, 1986).

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

Ao contrário do que ocorre com a hemoglobina S, a talassemia beta possui bases moleculares extremamente heterogêneas, podendo ser causada por mais de 600 tipos de mutações (Weatherall *et al.*, 1995). Tais mutações determinam uma depressão parcial (mutações β^+) ou total (mutações β^0) da síntese da cadeia beta da hemoglobina A. Essa deficiência de síntese, por sua vez, pode ser determinada por vários tipos de alterações moleculares, as quais, em resumo, afetam a transcrição, a maturação, a liberação, a estabilidade ou a tradução do RNA mensageiro. Assim, entre as mutações talassêmicas, podem ser encontradas as dos tipos “nonsense”, “frameshift”, as de afetam o “splicing”, a região promotora, a cauda de poli-A, etc. (Gelehrter e Collins, 1990; Weatherall *et al.*, 1995). No Brasil, entretanto, quatro tipos de mutações perfazem 97% dos casos de talassemia beta heterozigótica, ou seja, a β^{039} (64%), a $\beta^{-IVS1-110}$ (20%), a $\beta^{-IVS1-6}$ (7%) e

a $\beta^{0\text{ IVS1-1}}$ (6%) (Martins *et al.*, 1993). Infelizmente, dentre elas, apenas a $\beta^{+ \text{ IVS1-6}}$ pode ser considerada uma mutação “benigna”, causando uma forma mais leve de talassemia.

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

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

Embora a talassemia beta tenha uma distribuição geográfica praticamente universal, ela atinge as suas maiores frequências nos países que circulam o Mar Mediterrâneo (“talassa”, em grego, significa mar). Assim, taxas de heterozigotos superiores a 20%

foram descritas em algumas regiões da Itália, da Grécia e de Chipre (Silvestroni e Bianco, 1975; Ramalho, 1976, 1979, 1986; Weatherall *et al.*, 1995).

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

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

1.2. A manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta: a hipótese da malária.

Um aspecto que sempre despertou o interesse dos geneticistas foi o de algumas hemoglobinopatias, como é o caso da hemoglobina S e da talassemia beta, atingirem frequências extremamente elevadas em certas populações, a despeito do alto coeficiente seletivo dos genes que as determinam. De fato, “salta à vista que a taxa de mutações ou de casamentos preferenciais seria incapaz de contrabalançar a eliminação dos genes dessas hemoglobinopatias, feita pela seleção praticamente total dos homozigotos antes da idade reprodutiva, que ocorria na maioria das populações, pelo menos até há bem pouco tempo” (Pinto Jr., 1978; Beiguelman, 1981; Ramalho, 1986). Em outras palavras, a gravidade da anemia falciforme e da talassemia maior torna difícil explicar a manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta por mutações recorrentes, em determinadas populações. Assim sendo, é forçoso pensar em outros mecanismos homeostáticos mantendo o polimorfismo dessas hemoglobinopatias.

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

O aparecimento da malária endêmica causada pelo *Plasmodium falciparum* foi um desastre ecológico que provavelmente matou mais pessoas do que qualquer outra doença. Tal endemia é atribuída à mudança de hábitos das populações de áreas tropicais e sub-

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

Haldane (1949), verificando a semelhança das distribuições geográficas da talassemia beta e da malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, sugeriu a hipótese de que os heterozigotos da talassemia beta teriam vantagem seletiva em relação aos normais, no que diz respeito a esse tipo de malária. Assim sendo, os indivíduos com a talassemia beta homozigótica morreriam antes da idade reprodutiva em virtude da própria doença, enquanto os homozigotos normais seriam mais eliminados pela malária do que os heterozigotos, cuja frequência então aumentaria nas populações.

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

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

A correlação negativa entre a talassemia beta e as hemoglobinopatias estruturais de cadeia β , tais como a hemoglobina S e a hemoglobina E, pode ser 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.

A hipótese de Haldane a respeito da talassemia beta foi testada em várias populações, recebendo evidências favoráveis em algumas e desfavoráveis em outras.

Assim, por exemplo, Carcassi e colaboradores (1957) constataram maior prevalência de talassemia beta nas zonas pantanosas baixas da Sardenha do que nas regiões montanhosas, onde, obviamente, havia menor incidência da malária. A mesma distribuição foi observada por Curtain e colaboradores (1962) nas ilhas da Oceania. Já na Grécia (Choremis *et al.*, 1963; Fraser *et al.*, 1964; Fessas *et al.*, 1966), em Chipre (Plato *et al.*, 1964) e na Tailândia (Lie-Injo, 1969), as relações observadas entre malária e a talassemia beta não se mostraram muito evidentes.

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

responsáveis, pelo menos em parte, pela correlação menos evidente entre a malária e a talassemia nesses países.

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

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

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

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

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

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

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

- 1 - Uma vez que os homozigotos do gene da hemoglobina S praticamente não se reproduziam, a manutenção das altas frequências do gene da hemoglobina S

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

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

Esses fatos contribuíram para que a hipótese de Allison ganhasse grande popularidade, passando a ser empregada como exemplo clássico de manutenção de polimorfismo por seleção a favor dos heterozigotos. Apesar disso, tal hipótese também deu início a uma considerável controvérsia. Dois outros estudos não comprovaram diferenças de parasitemia entre falcêmicos e não falcêmicos (Moore *et al.*, 1954; Archibald e Bruce-Chwatt, 1955). Da mesma forma, Beutler e colaboradores (1955) não

conseguiram comprovar os resultados dos experimentos de inoculação realizados por Allison (1954). O próprio Raper (1956) levantou dúvidas sobre os resultados do trabalho de Allison (1954), supondo a existência de um viés. Isso porque, como comenta Pinto Jr. (1978), aquele autor não encontrou incidência menor de malária entre indivíduos com o traço falciforme, ao analisar uma amostra populacional cerca de oito vezes maior que a estudada por Allison. Da mesma forma, Ringelmann e colaboradores (1976), estudando uma grande casuística de crianças de uma área endêmica de malária de Gana, encontraram uma taxa de infestação maior entre portadores do traço falciforme.

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

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

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

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

Verificou-se, por outro lado, que a hemoglobina S pode interferir na formação de algumas excrescências externas ou “knobs” nas células parasitadas, as quais permitem que as formas maduras fiquem aderidas ao endotélio vascular, protegidas do reconhecimento e da destruição pelo sistema retículo-endotelial. Assim sendo, a falcização poderia

favorecer o deslocamento das hemácias parasitadas do endotélio vascular, predispondo-as à destruição pelo sistema retículo-endotelial do baço e outros órgãos (Udeinya *et al.*, 1981).

O mecanismo de destruição dos parasitas no interior das células falcêmicas, na verdade, ainda não está completamente elucidado (Nagel e Roth, 1989; Eaton, 1994). A baixa concentração de ions K^+ proposta por Friedman (1978) tem algumas evidências experimentais, já que os seus efeitos deletérios sobre o crescimento do parasita são parcialmente revertidos quando se adiciona potássio ao meio de cultura (Friedman *et al.*, 1979). Outras investigações demonstraram também que a perda de água pela hemácia falcizada, a formação do polímero de hemoglobina S, que interfere diretamente sobre algumas funções críticas do parasita e que representa um substrato pobre para as proteases produzidas pelo *Plasmodium falciparum*, além da presença de hemoglobina fetal (Hb. F), adversa ao parasita, são mecanismos importantes na resistência conferida aos falcêmicos contra a malária (Nagel e Roth, 1989). Quanto à presença da hemoglobina F, convém lembrar, no entanto, que ela se limita, nos adultos, às hemácias dos homozigotos, já que os seus níveis não estão aumentados nos adultos heterozigotos, portadores do traço falciforme. Assim sendo, os efeitos adversos dessa hemoglobina sobre o *Plasmodium falciparum* estariam condicionados à persistência de níveis significativos de hemoglobina fetal por mais tempo nas crianças heterozigotas com o traço falciforme do que nas crianças normais, nas quais ela costuma desaparecer antes dos seis meses de idade (Nagel e Roth, 1989).

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

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

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

autores, a hipótese da malária deve ser sempre considerada em combinação com outros fatores.

1.3. Outros mecanismos homeostáticos sugeridos para explicar a manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta.

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

Tendo em vista que a distribuição geográfica do gene da hemoglobina S na África e na Índia não coincide apenas com a de áreas malarígenas, mas, também, com a de antigas zonas hiperendêmicas de lepra, Cézar e colaboradores (1974) julgaram interessante investigar no Brasil se os portadores do traço falciforme não teriam alguma vantagem seletiva frente ao *Mycobacterium leprae*. Esse estudo obteve os mesmos resultados negativos observados anteriormente por Lewis e Chaudhury (1969) em Gana, ou seja, a constatação de que a frequência de portadores heterozigotos da hemoglobina S não diferia

significamente entre hansenianos e indivíduos-controle. Do mesmo modo, resultados negativos similares foram obtidos por Ramalho e colaboradores (1983), ao analisar as relações entre a talassemia beta e a hanseníase no Estado de São Paulo.

Já as relações entre a hemoglobina S e a tuberculose pulmonar vêm sendo investigadas desde a década de 50, com resultados sempre controversos. Assim, a existência de uma associação entre a forma heterozigótica da hemoglobina S e a tuberculose pulmonar foi observada por alguns autores (Weiss e Stecher, 1952; Ramalho e Beiguelman, 1977) e não por outros (Rosenblum *et al.*, 1955; Ryan *et al.*, 1960).

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

Os resultados obtidos por Pinto Jr. (1978) permitiram-lhe aventar a hipótese de que a diversidade de resultados poderia eventualmente depender das características das amostras de negróides examinadas nos diversos trabalhos. Isso porque, na sua opinião, os pacientes com o traço falciforme e com tuberculose pulmonar poderiam responder melhor ao

tratamento, pelo fato de geralmente manifestarem uma forma exsudativa da infecção, forma essa mais incômoda e que obrigaria o paciente a procurar atendimento médico mais precocemente. Assim sendo, os trabalhos que só examinassem negróides em início de tratamento poderiam encontrar uma frequência muito alta de portadores do traço falciforme, enquanto que os trabalhos que examinassem negróides em tratamento há mais tempo, encontrariam frequências baixas desse traço hemoglobínico. Dessa forma, caso os falcêmicos realmente apresentassem cura mais rápida e menor mortalidade pela tuberculose pulmonar, a introdução de uma terapêutica efetiva para essa doença teria então criado um novo mecanismo homeostático de manutenção do polimorfismo da hemoglobina S.

Martins, Ramalho e Pinto Jr. (1987), investigando a eventual associação entre a forma heterozigótica da hemoglobinopatia S e o tempo de tratamento da tuberculose pulmonar, não encontraram, no entanto, resultados confirmatórios dessa hipótese. De fato, esses autores não observaram um excesso de heterozigotos AS entre os pacientes com menos de seis meses de tratamento e nem mesmo entre os recém-admitidos nos sanatórios. Além disso, também não se observou menor prevalência de heterozigotos AS na amostra de pacientes com mais de um ano de tratamento, o que poderia indicar uma cura mais rápida por parte desses portadores do traço falciforme. Esses resultados não favorecem a hipótese, portanto, que o traço falciforme confira algum valor prognóstico à tuberculose pulmonar, antecipando o início do tratamento ou modificando a duração da doença.

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

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

entre o número de colônias de *Streptococcus pyogenes*, nem da taxa de hemólise, entre as placas de ágar-sangue preparadas com a hemoglobina S e com a hemoglobina A.

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

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

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

Fleming e colaboradores (1979), no entanto, não observaram, na Nigéria, uma fertilidade maior das mulheres e dos homens heterozigotos AS em relação aos homozigotos normais AA.

Fraser e colaboradores (1964) também sugeriram que a fertilidade das talassêmicas heterozigotas poderia estar aumentada por razões desconhecidas. Na verdade, a primeira

demonstração de que os heterozigotos poderiam ter aumento de fertilidade foi dada em um trabalho realizado entre talassêmicos italianos, já na época em que a hipótese de Haldane estava sendo formulada. Nesse trabalho, Silvestroni e colaboradores (1950) encontraram algumas evidências, não comprovadas estatisticamente, da maior fertilidade de famílias de Ferrara (Itália) quando ambos os genitores eram heterozigotos. Posteriormente, um estudo realizado na mesma área confirmou essa tendência, embora o respaldo da significância estatística também não tenha sido obtido (Aguzzi *et al.*, 1978).

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

Ao analisar, no entanto, o aumento de fertilidade média em locais com alta frequência de heterozigotos e alta incidência de malária, dois aspectos devem ser considerados. Em primeiro lugar, a maior fertilidade pode ser realmente atribuído a maior quantidade de heterozigotas na população, as quais teriam, por razões desconhecidas, maior fertilidade. Em segundo lugar, esse fato também pode ser atribuído à maior

quantidade de mulheres com imunidade à malária, adquirida já na infância e, conseqüentemente, com menor perda fetal por malária. De fato, o efeito de diferentes graus de malária sobre o comportamento reprodutivo já havia sido demonstrado anteriormente por Zei e colaboradores (1990).

Para avaliar, portanto, o efeito da composição genética e dos dados epidemiológicos da malária sobre comportamento reprodutivo nas diversas áreas, Lisa e colaboradores (1994) classificaram os dados de fertilidade e esterilidade de acordo com a frequência de heterozigotos e o nível de morbidade da malária. Assim procedendo, eles constataram um efeito direto e combinado do fator genético e da imunidade adquirida sobre as taxas de fertilidade e esterilidade na Sardenha.

Esses resultados indicam, portanto, a conveniência da realização de estudos diretos de comportamento reprodutivo nas famílias dos heterozigotos. Quanto a este aspecto, é interessante mencionar que, em um estudo realizado na Malásia, Joishy e colaboradores (1988) não constataram, entre famílias com a hemoglobina S, um número de filhos maior do que em famílias sem hemoglobina anômala.

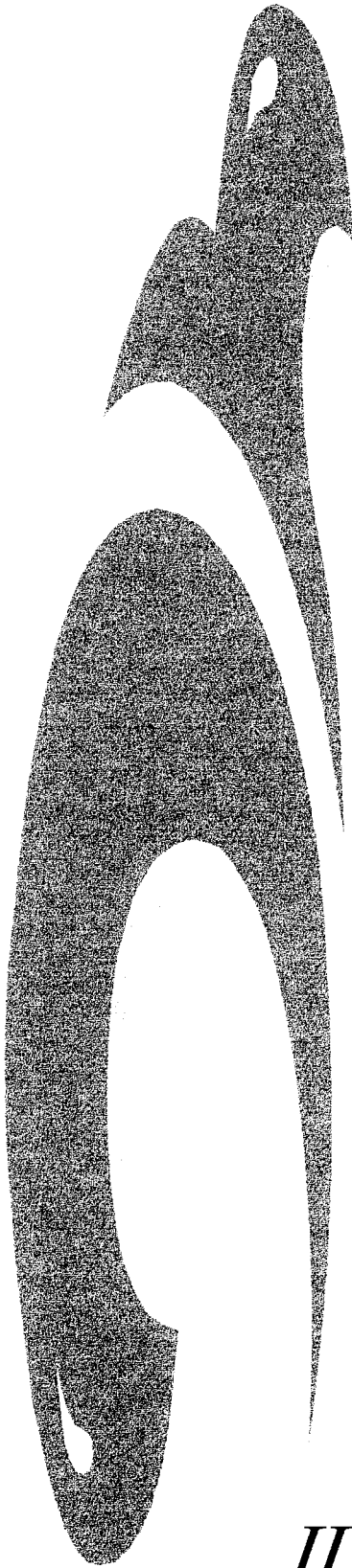
Recentemente Schiliró e colaboradores (1997) voltaram a chamar a atenção para a importância do estudo das hemoglobinopatias sob uma perspectiva histórica, levando-se em consideração outros fatores além da malária. Nesse contexto, é interessante lembrar, por exemplo, que barreiras geográficas, políticas, religiosas ou culturais fizeram com que algumas tribos africanas e populações mediterrâneas se comportassem como pequenos isolados, estando sujeitas a alguns efeitos, como a deriva genética e, em alguns casos, até

mesmo ao “efeito do fundador”. Por outro lado, como enfatiza Beiguelman (1994), nas populações primitivas também era freqüente a diminuição abrupta de seu tamanho em consequência de guerras, epidemias, fome e outras catástrofes. As freqüências gênicas dos sobreviventes nem sempre correspondiam à da população original, de sorte que a população derivada deles podia mostrar uma composição genética diferente da que existia anteriormente. Esse efeito, decorrente do estreitamento da passagem de genes de uma população original para outra, por intermédio de uma geração reduzida, costuma ser denominado efeito do gargalo. Outro fator evolutivo a ser considerado sob a perspectiva histórica é o do fluxo gênico de populações imigrantes, decorrente das múltiplas invasões e conquistas. Só a ilha da Sicília, por exemplo, foi dominada sucessivamente por gregos, fenícios, etruscos, romanos, bizantinos, árabes, normandos e ibéricos (Schiliró *et al.*, 1993).

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

beta na população siciliana. Já em outro estudo italiano realizado na região de Ferrara, embora os resultados sugerissem certo grau de casamentos preferenciais entre os pais de 2.227 talassêmicos, eles não diferiam significativamente dos observados na população geral (Barrai *et al.*, 1987).

Concluindo este item, parece desnecessário enfatizar, frente ao exposto até aqui, que atribuir a manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta nas diversas populações exclusivamente à vantagem seletiva dos heterozigotos frente à malária, seria uma visão inadequadamente simplista de um problema muito mais complexo. Nesse contexto, a pesquisa de outros fatores eventualmente envolvidos nessa questão parece ser um tema bastante atraente em termos de Genética Humana e Evolutiva.



II - Justificativa e Objetivo

II.1. Justificativa

Conforme foi apresentado na parte introdutória do presente trabalho, vários argumentos sugerem a existência de outros mecanismos homeostáticos, além da malária, mantendo o polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta em várias populações. Fazendo uma síntese, podemos destacar os seguintes aspectos:

1. É pouco provável que um único mecanismo homeostático consiga manter frequências tão elevadas de genes cuja eliminação, através dos homozigotos, era praticamente total até há bem pouco tempo;
2. A mortalidade pela malária é insuficiente para, por si só, explicar as altas frequências de hemoglobina S observadas em áreas endêmicas do *Plasmodium falciparum*;
3. O efeito mais evidente da interação *in vitro* entre a hemoglobina S e o *Plasmodium falciparum*, ou seja, a falcização facilitada das hemácias, não é um fenômeno que ocorra frequentemente nos heterozigotos AS em condições fisiológicas;
4. O traço falciforme confere alguma proteção contra a malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, principalmente durante o período imunológico crítico da infância, situado entre a perda da imunidade obtida passivamente através da mãe (anticorpos maternos) e o desenvolvimento da imunidade ativa (entre os 6 meses e os 3 anos, aproximadamente). Antes e após este período, o efeito

protetor conferido pelo traço falciforme é minimizado e confundido pelo efeito protetor conferido pelas imunidades passiva e ativa, respectivamente;

5. Os mecanismos que conferem uma eventual proteção dos heterozigotos do gene da talassemia beta contra o *Plasmodium falciparum* ainda são desconhecidos;
6. Nem todas áreas de alta prevalência de hemoglobina S e de talassemia beta correspondem a antigas zonas endêmicas de malária;
7. A hemoglobinopatia ou a combinação de hemoglobinopatias presentes variam muito de uma área malarígena para outra;
8. Todos os estudos que investigaram a maior resistência dos heterozigotos AS e AT frente a outras doenças infecciosas e parasitárias de alta mortalidade levaram a resultados negativos;
9. O aumento da fertilidade das heterozigotas, ainda que possível, só foi demonstrado de forma indireta, em antigas áreas hiperendêmicas de malária;
10. Não foi constatada uma correlação positiva direta entre a frequência de heterozigotos AS e AT e os níveis de morbidade e mortalidade pela malária;
11. O casamento preferencial entre pais de pacientes com hemoglobinopatias foi verificado em uma região da Itália, mas não em outra;
12. Sob uma perspectiva histórica, vários outros fatores devem ser levados em consideração no estudo do polimorfismo das hemoglobinopatias, além da seleção favorável dos heterozigotos pela malária. Dentre eles, merecem

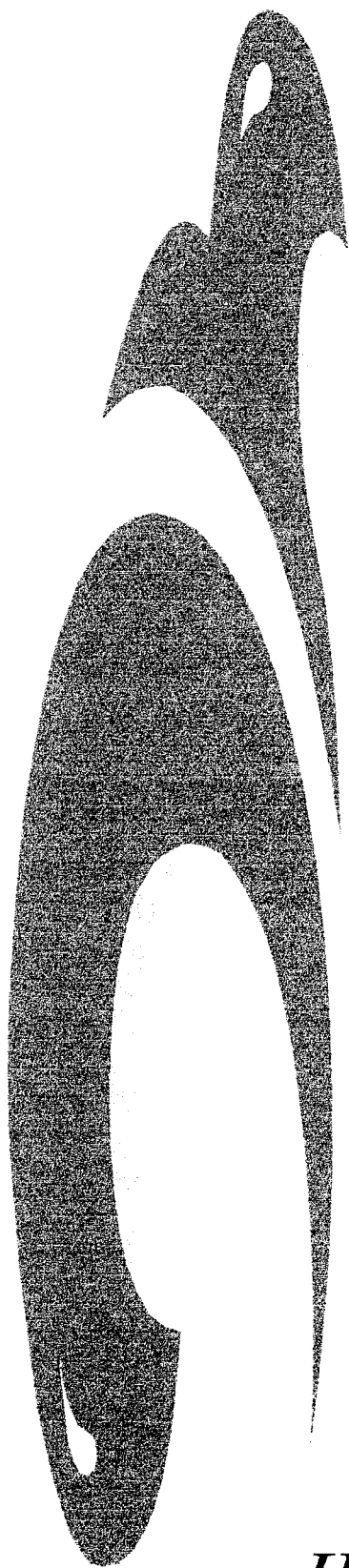
atenção a deriva genética, o efeito do fundador, o efeito do gargalo e o fluxo gênico de populações migrantes.

Curiosamente, todos os mecanismos homeostáticos sugeridos para explicar a manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta partem da premissa de que os heterozigotos AS e AT realmente nascem na proporção mendeliana esperada e que, posteriormente, sofrem seleção favorável, por algum fator do meio ambiente. E se esses heterozigotos já nascessem, por um processo qualquer, em proporção superior à esperada pela teoria mendeliana?

II.2. Objetivo

O presente trabalho tem justamente por objetivo verificar, por meio da análise direta de famílias, se os heterozigotos AS e AT nascem na proporção mendeliana esperada. A hipótese alternativa, ou seja, a do nascimento desses heterozigotos em proporção superior à esperada, coloca em discussão, evidentemente, mais um eventual mecanismo homeostático de manutenção de polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta.

Por outro lado, julgou-se interessante, também, investigar, a existência de um eventual efeito materno ou paterno favorecendo a transmissão hereditária dos traços falciforme e talassêmico beta.



III - Casuística e Métodos

III.1. Casuística

Para a realização do presente trabalho foram examinados 339 núcleos familiares, dos quais 201 (59%) foram identificados por um genitor (caso-índice) AS e 138 (41%) por um genitor AT.

A proporção de heterozigotos foi investigada entre os filhos dos casos-índice AS e AT, evitando-se assim distorções de averiguação, uma vez que o estudo das famílias foi feito a partir da geração paterna e não da geração filial (Beiguelman, 1994).

Todos os núcleos familiares foram completamente estudados pela autora, para a obtenção de informações necessárias para o preenchimento de uma ficha para cada um deles. Essa ficha continha além de dados pessoais, os heredogramas com todas as informações importantes, tais como procedência, idades, sexo, abortamentos e crianças falecidas. Os núcleos familiares nos quais não foi possível examinar ambos os cônjuges e todos os filhos não foram incluídos na casuística acima mencionada.

A distribuição da origem das famílias que foram obtidas no serviço de aconselhamento genético e nos programas de triagem populacional e orientação genética desenvolvidos no Hemocentro da UNICAMP (Ramalho *et al*, 1996) e no Núcleo de Genética da Prefeitura Municipal de Araras (Teixeira e Ramalho, 1994) pode ser observada na tabela I:

ERRATA:

O Gráfico I da Casuística e Métodos, situado na página 38, encontra-se com as cores das barras do ítem "Gestantes" trocadas. O gráfico com as cores corretas encontra-se abaixo.

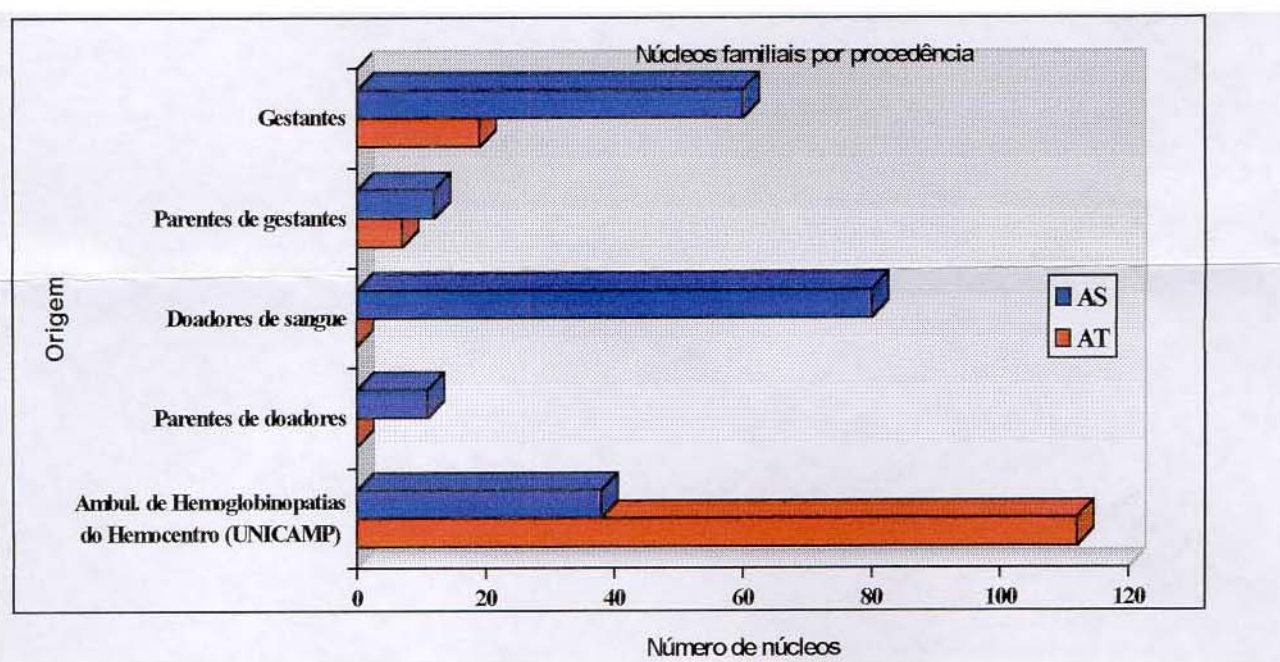
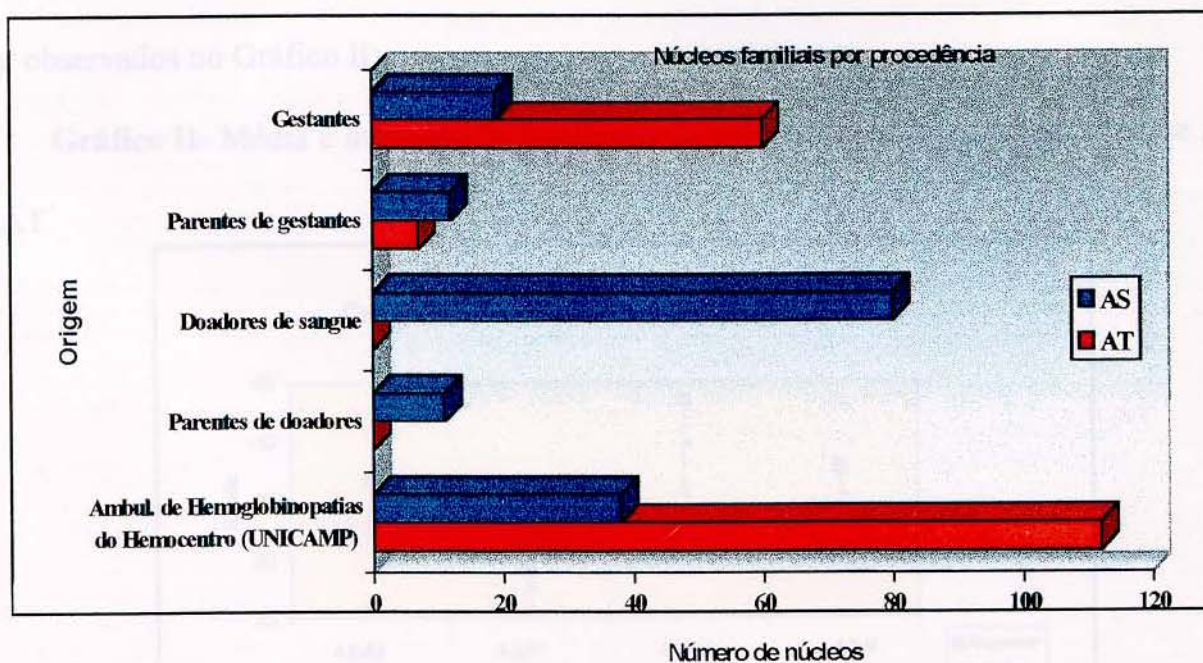


Tabela I: Procedência dos casos-índice dos núcleos familiares examinados (frequência e porcentagem).

Procedência	Traco		
	AS	AT	Total
Gestantes	60 (29,86%)	19 (13,77%)	79 (23,30%)
Parentes de Gestantes	12 (5,97%)	7 (5,07%)	19 (5,60%)
Doadores de Sangue	80 (39,80%)	-	80 (23,60%)
Parentes de Doadores	11 (5,47%)	-	11 (3,25%)
Ambulatório de Hemoglobinopatias	38 (18,90%)	112 (81,16%)	150 (44,25%)
Total	201 (100%)	138 (100%)	339 (100%)

Para melhor visualização, os dados foram condensados no Gráfico I:

Gráfico I- Distribuição dos núcleos familiares por procedência.



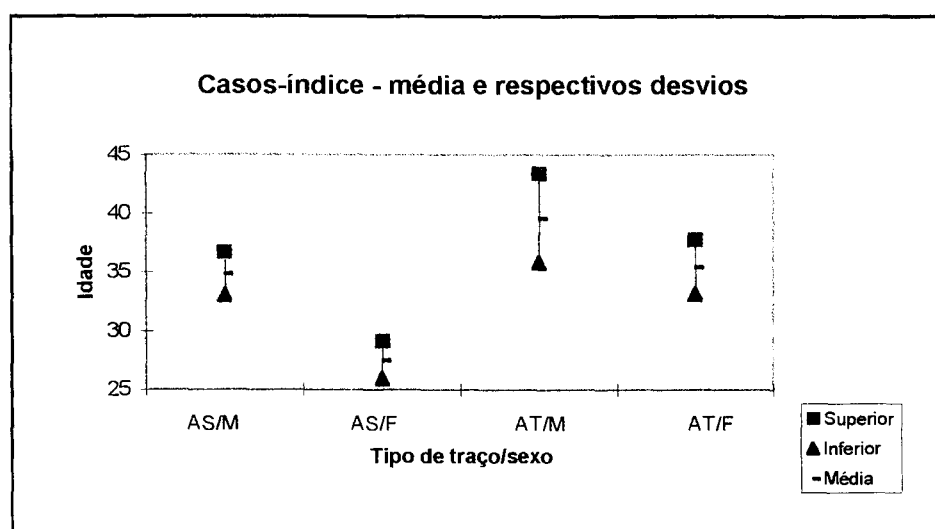
A idade média, o desvio-padrão e o intervalo de confiança da média das idades dos casos-índice AS e AT estão apresentados na Tabela II.

Tabela II: Idade dos casos-índice AS e AT.

Idade dos pais	Sexo	Média	Desvio-Padrão	Intervalo de confiança da média
AS	Masc	34.78	8.77	$33.01 \leq \mu \leq 36.55$
	Fem	27.48	8.37	$25.89 \leq \mu \leq 29.07$
	Total	30.89	9.28	$29.61 \leq \mu \leq 32.17$
AT	Masc	39.53	12.72	$35.73 \leq \mu \leq 43.33$
	Fem	35.40	11.35	$33.10 \leq \mu \leq 37.70$
	Total	36.70	11.91	$34.71 \leq \mu \leq 38.69$

A média das idades dos casos-índice, bem como seu intervalo de confiança podem ser observados no Gráfico II:

Gráfico II- Média e intervalo de confiança da média das idades dos casos-índice AS e AT.



Os Gráficos III a VI mostram a distribuição das idades dos casos-índices AS e AT por sexo/traço:

Gráficos III a VI- Distribuição das idades dos genitores AS e AT por sexo/traço.

Gráfico III

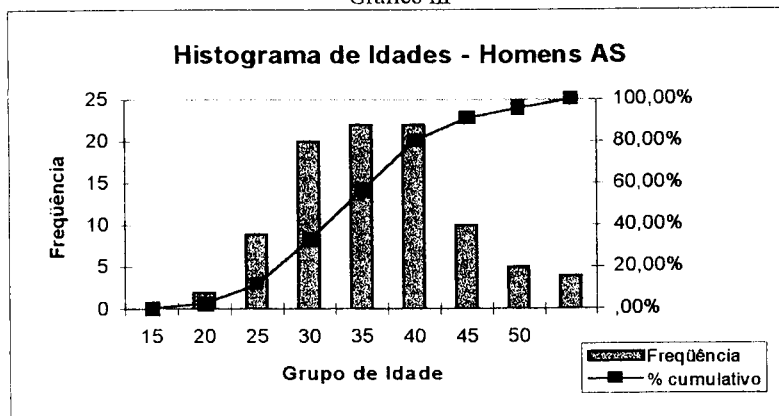


Gráfico IV

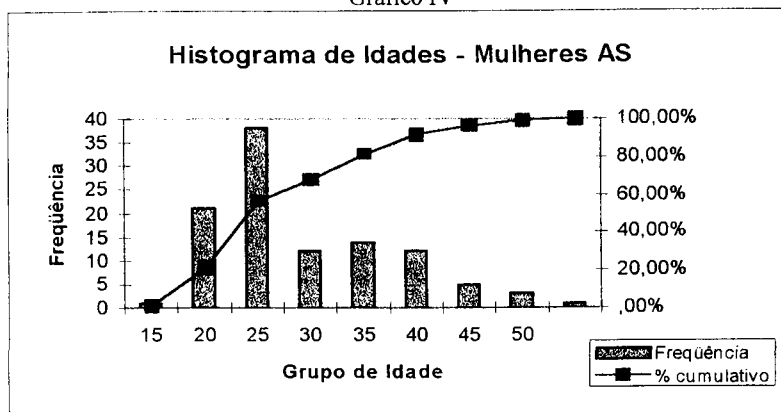


Gráfico V

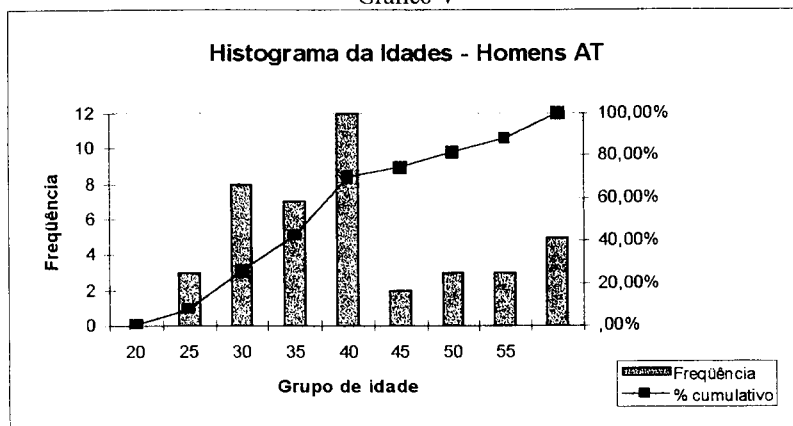
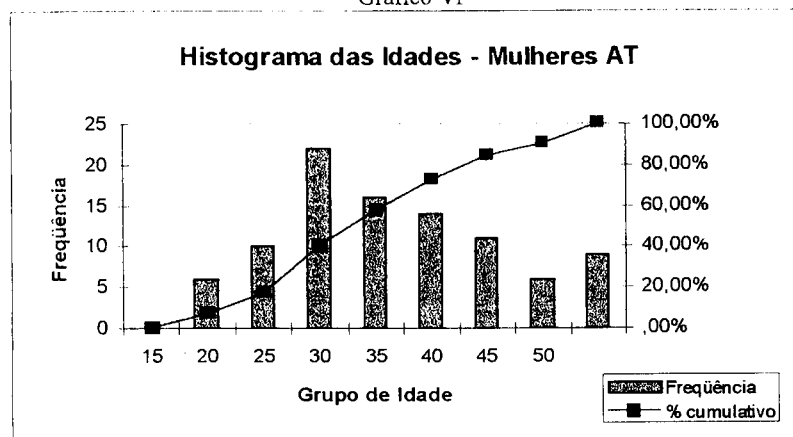


Gráfico VI



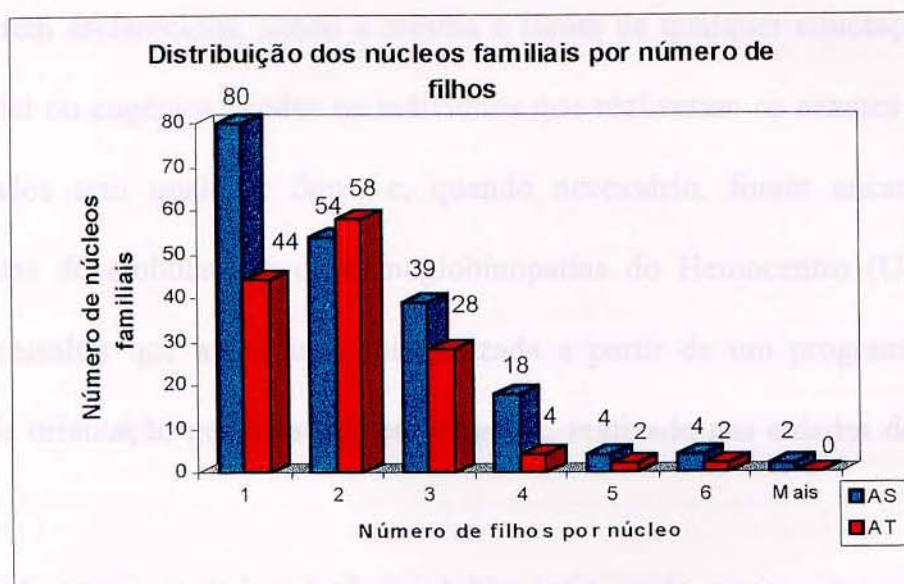
A análise destes histogramas mostra que 90% dos homens AS tinham menos de 45 anos, enquanto 95% das mulheres AS pertenciam a esta mesma faixa etária. Com relação aos homens e mulheres AT, as porcentagens de idades abaixo de 45 anos foram, respectivamente, 75% e 85%.

É possível observar, portanto que a grande concentração das idades dos homens AS foi verificada no grupo etário entre 25 e 40 anos e que, nas mulheres com esse mesmo traço predominou a faixa etária entre 15 e 25 anos.

Com relação aos casos-índice AT, é possível observar que a faixa etária entre 25 e 40 anos predominou entre os homens, observando-se uma distribuição etária mais homogênea entre as mulheres.

No Gráfico VII é possível observar a distribuição dos núcleos familiares por número de filhos, constatando-se uma grande concentração de famílias com um ou dois filhos.

Gráfico VII - Distribuição dos núcleos familiares por número de filhos.



Os núcleos familiares examinados eram constituídos na sua grande maioria, portanto, por casais jovens, em idade reprodutiva, com número pequeno de filhos. Quanto a essas características, a casuística examinada foi bastante homogênea, tanto nos casos de traço falciforme, quanto nos de traço talassêmico beta.

III.2. Métodos

Os casos-índice foram convidados a comparecer às entrevistas através de cartas-convite, por contatos telefônicos ou por visitas domiciliares. Alguns indivíduos apresentaram-se espontaneamente, ou foram encaminhados por médicos.

De acordo com o estabelecido pelos artigos 122 a 130 do Código de Ética Médica (CREMESP, 1988), a participação dos indivíduos na pesquisa foi voluntária, após seus objetivos serem esclarecidos, sendo a mesma e isenta de qualquer conotação financeira, política, racial ou eugênica. Todos os indivíduos que realizaram os exames receberam os seus resultados sem qualquer ônus, e, quando necessário, foram encaminhados aos hematologistas do ambulatório de hemoglobinopatias do Hemocentro (UNICAMP). É importante ressaltar que a pesquisa foi realizada a partir de um programa assistencial voluntário de orientação genética de heterozigotos, realizado nas cidades de Campinas e Araras.

Detectado como portador de hemoglobinopatia, cada genitor que compareceu à entrevista foi convidado a trazer para exame o seu cônjuge e os seus filhos, e, caso desejasse, também outros parentes. A detecção dos portadores de hemoglobinopatias foi feita através da triagem de doadores de sangue, de gestantes e de pessoas que procuraram espontaneamente o ambulatório, ou foram a ele encaminhadas por médicos da cidade e região. Em todas as pessoas foram realizados os mesmos exames, gratuitamente.

Após a entrevista e dado o consentimento, a investigação laboratorial do traço falciforme e do traço talassêmico beta foi realizada nos laboratórios do Departamento de Genética Médica e da Seção de Hematologia do Departamento de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP, bem como no Núcleo de Genética da Prefeitura Municipal de Araras, conforme a metodologia recomendada por Ramalho (1986).

De cada indivíduo foi colhida uma amostra de 5 ml de sangue venoso, utilizando-se seringa e agulhas descartáveis em tubos de vidro contendo EDTA 10% (na concentração de 1mg por ml de sangue) como anticoagulante.

III.2.1. Investigação laboratorial do traço falciforme.

Para a pesquisa da hemoglobina S, efetuou-se:

III.2.1.1. Eletroforese de hemoglobinas em fitas de acetato de celulose, pH alcalino.

Para realizar a eletroforese de hemoglobinas, foi necessária a preparação dos hemolisados da seguinte forma: em um tubo de ensaio colocou-se dois ml de sangue total, completando-se com solução salina (NaCl 0,9%) e centrifugou-se por dez minutos a 2000 rpm. Após, o plasma sobrenadante e a camada de glóbulos brancos foram removidos por aspiração com uma pipeta de Pasteur. A seguir, as hemácias concentradas foram lavadas três ou quatro vezes com solução salina, até que o sobrenadante ficasse límpido, sendo hemolisadas com 0,5 volume de água destilada e 0,5 volume de tetracloreto de carbono (CCl₄). Esses hemolisados foram agitados vigorosamente por alguns minutos e centrifugados a 3000 rpm por 20 minutos. Após a centrifugação, observaram-se três

camadas: o CCl_4 no fundo do tubo, o estroma na porção intermediária e a solução de hemoglobinas a 10% na porção superior, a qual foi retirada com uma pipeta de Pasteur, onde recebeu uma gota de cianeto de potássio (KCN 1%), ficando pronta para posterior utilização.

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

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

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

As fitas foram retiradas da cuba de eletroforese e mantidas no corante por alguns minutos, após os quais fez-se a descoloração do fundo, por meio de lavagens sucessivas com a solução descorante e, por último, em água corrente, para a retirada do excesso.

O padrão eletroforético normal AA foi confirmado em todos os cônjuges dos casos-índice AS e AT.

As figuras 1 e 2 ilustram resultados de eletroforeses de hemoglobinas em fitas de acetato de celulose pH alcalino.

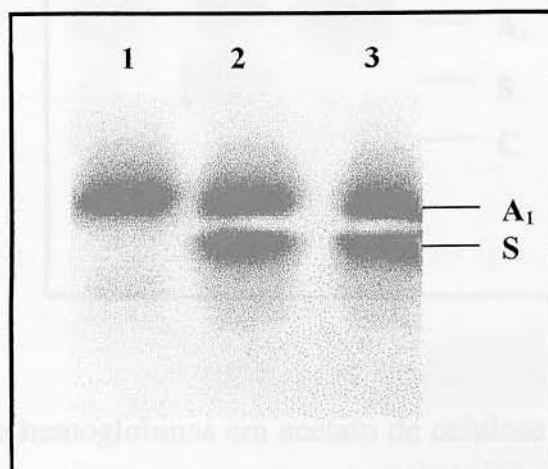


Figura 1 - Eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose em tampão Tris-EDTA - borato pH 8,9.

- 1 - homozigoto normal AA - indivíduo normal
- 2 - heterozigoto AS - portador do traço falciforme
- 3 - heterozigoto AS - portador do traço falciforme

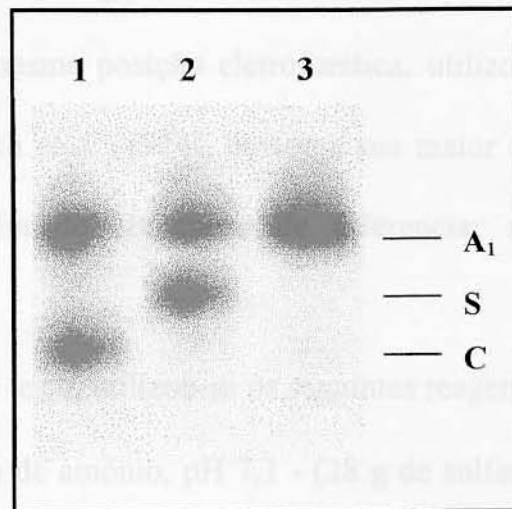


Figura 2 - Eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose em tampão Tris-EDTA - borato pH 8,9.

1 - heterozigoto AC - portador do traço da hemoglobina C

2 - heterozigoto AS - portador do traço falciforme

3 - homozigoto AA - indivíduo normal

III.2.1.2. Teste de solubilidade para confirmação da hemoglobina S

Para a confirmação da hemoglobina S, diferenciando-a de outras hemoglobinas do grupo +1, que ocupam a mesma posição eletroforética, utilizou-se o teste “Sickle-ID”, aperfeiçoado por Louderbach *et al* (1974), devido a sua maior eficiência sobre os outros testes de solubilidade, além de ser capaz de diferenciar os homozigotos SS dos heterozigotos AS, SC, SD.

Para a realização deste teste, utilizou-se os seguintes reagentes:

- Tampão de sulfato de amônio, pH 7,1 - (28 g de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ em 1000 ml de água destilada, ajustando-se o pH para 7,1 +/- 0,1 com K_2HPO_4 em solução molar).
- Solução de trabalho preparada no momento do uso:
 - * ditionito de sódio - 1g
 - * saponina - 1 g
 - * tampão de sulfato de amônio/fosfato - 100 ml

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

a) tubo com hemoglobina S

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



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



b) tubo controle

homozigoto AA = sobrenadante límpido vermelho e
um pequeno precipitado gelatinoso
(estroma das hemácias).



III.2.2. Investigação laboratorial do traço talassêmico beta.

Nesta amostra de sangue, foram realizados os seguintes exames:

III.2.2.1. Hematimetria - os valores hematimétricos foram determinados eletronicamente (Coulter Counter T8 - 90), imediatamente após as coletas das amostras.

Neste item, valorizou-se a diminuição do volume corpuscular médio das hemácias (V.C.M.) e da hemoglobina corpuscular média (H.C.M.)

III.2.2.2. Análise da morfologia das hemácias em esfregaço sanguíneo

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

III.2.2.3. Quantificação de hemoglobina A₂ pelo método da eluição após eletroforese de hemoglobinas.

A HbA₂ foi medida espectrofotometricamente após eluição das fitas em água destilada. Com a ajuda de um aplicador especial (Hamilton microliter syringes) colocou-se sobre as fitas de acetato de celulose 10 µl do hemolisado a 10%, deixando-as em uma cuba de eletroforese com tampão tris-EDTA-borato pH 8,9 por 60 minutos a 250 volts. As bandas A₁ e A₂ foram separadas, recortadas e as hemoglobinas eluídas em 3 ml de água destilada (HbA₂) e 15 ml de água destilada (HbA₁). Após a eluição, foram medidas as densidades óticas das duas bandas a 415 nm e calculadas a porcentagem correspondente à HbA₂, ou seja:

$$\% \text{ HbA}_2 = \frac{\text{D.O. HbA}_2 \times 100}{\text{D.O. HbA}_1 + \text{D.O. HbA}_2}$$

III.2.2.4. Dosagem da hemoglobina fetal pelo método da desnaturação alcalina

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

Foi colocado no tubo teste 2,8 ml dessa solução e 0,2 ml da solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1,2 N. Após dois minutos de agitação, foram acrescentados 2,0 ml de solução de sulfato de amônio saturado a 50%, deixando em repouso por 5 minutos.

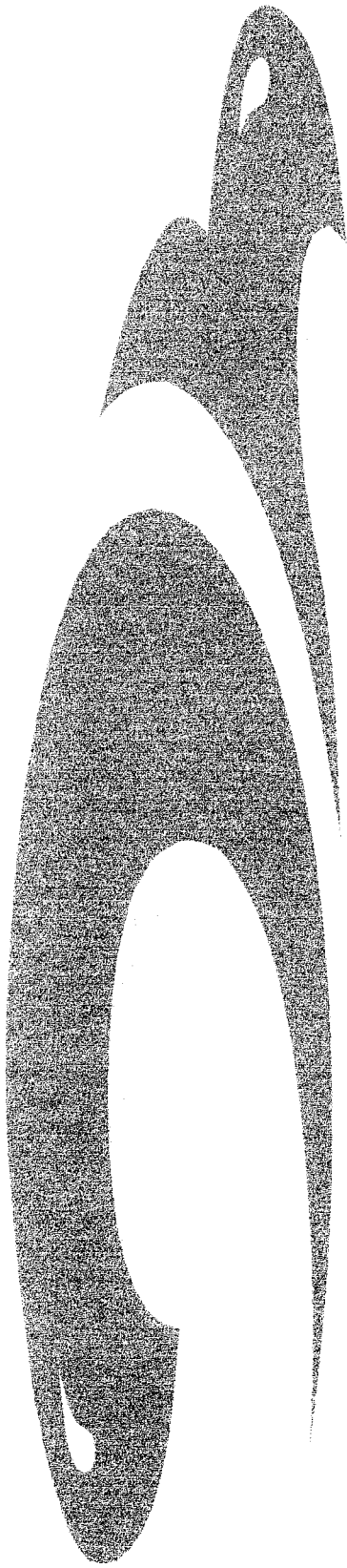
Seguida à filtração, foram determinadas as absorbâncias dos tubos teste e padrão (1,4 ml de solução de cianometemoglobina em 8,6 ml de água destilada) em um espectrofotômetro a 415 nm.

III.2.3. Análise estatística

A proporção de heterozigotos foi investigada entre os filhos dos casos-índice AS e AT, casados com cônjuges normais AA e comparada estatisticamente com a proporção mendeliana esperada de 50%, pelo teste do χ^2 (quiquadrado), considerando-se 5% como nível de significância. Nas tabelas de contingência também foi calculado o teste de χ^2 .

Quando necessário, foram usados na comparação de resultados os testes de heterogeneidade e de contrastes de Brandt-Snedecor (Piedrabuena, 1997).

Essas análises foram realizadas por computador, com auxílio dos *Softwares* Estatística e Minitab. Os gráficos foram realizadas com auxílio do *Software* Excel, da Microsoft.



IV - Resultados

Os núcleos familiares permitiram estudar uma amostra de filhos constituída por 719 indivíduos, 437 dos quais (61%) com um genitor AS e 282 (39%) com um genitor AT.

A tabela III apresenta os resultados obtidos, mostrando a distribuição dos filhos pertencentes aos núcleos familiares estudados, separando-se pai (AS, AT) e mãe (AS, AT).

Tabela III: Distribuição dos filhos nos núcleos familiares.

Casais AS X AA (núcleos familiares, n = 201; prole, n = 437)

Propósito	Filhos			χ^2	p
	AS	AA	Total		
Mãe (107)	144	89	233	12.982833	p = 0.000315
Pai (94)	103	101	204	0.019608	p = 0.888639
Total (201)	247	190	437	7.434783	p = 0.006401

Casais AT X AA (núcleos familiares, n = 138; prole, n = 282)

Propósito	Filhos			χ^2	p
	AT	AA	Total		
Mãe (95)	117	66	183	14.213115	p = 0.000164
Pai (43)	57	42	99	2.272727	p = 0.131678
Total (138)	174	108	282	15.446809	p = 0.000085

A tabela IV, a seguir mostra as principais medidas estatísticas (média, desvio padrão e intervalo de confiança da média) referentes à idade dos filhos.

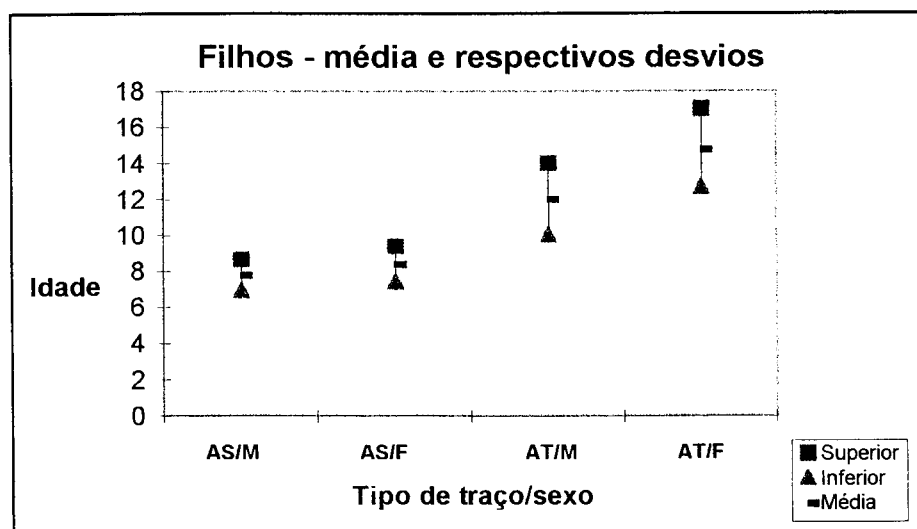
Tabela IV: Idade dos filhos (anos).

	Sexo	Média	Desvio-Padrão	Intervalo de confiança da média
Pais AS	Masc	7.76	6.89	$6.84 \leq \mu \leq 8.68$
	Fem	8.38	7.62	$7.38 \leq \mu \leq 9.38$
	Total	8.08	7.27	$7.40 \leq \mu \leq 8.76$
Pais AT	Masc	11.96	11.93	$9.98 \leq \mu \leq 13.94$
	Fem	14.80	13.23	$12.63 \leq \mu \leq 16.97$
	Total	13.40	12.66	$11.92 \leq \mu \leq 14.88$

A análise da tabela acima permitiu observar que a média das idades dos filhos de pais AT apresentou um intervalo de confiança maior do que o da média das idades dos filhos de pais AS.

O Gráfico VIII a seguir, ilustra os intervalos de confiança para as quatro médias.

Gráfico VIII - Média e intervalo de confiança da média das idades dos filhos de genitores AS e AT.



Os Gráficos IX a XII ilustram a distribuição dos filhos por sexo/traço por tipo de traço do genitor:

Gráficos IX a XII - Distribuição dos filhos por sexo/traço por tipo de traço do genitor.

Gráfico IX

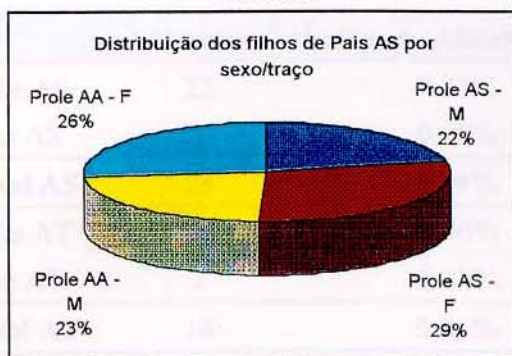


Gráfico X

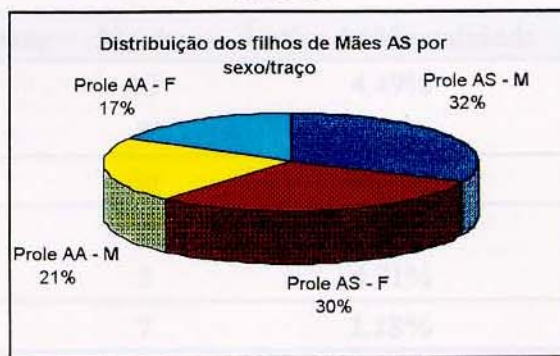


Gráfico XI

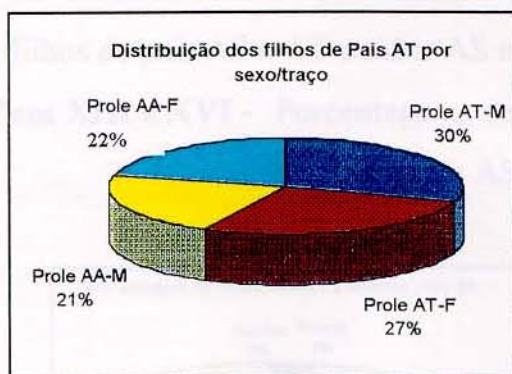
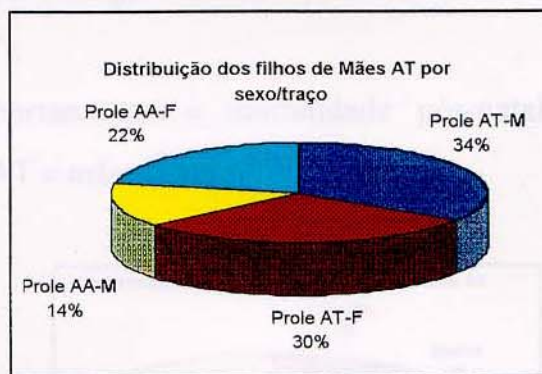


Gráfico XII



Pode ser observado nos gráficos acima que, no caso de pais AS, houve uma homogeneidade na distribuição entre filhos AS e AA. Já com relação às mães AS, percebeu-se uma porcentagem superior de filhos AS (aproximadamente 62%) em relação aos filhos normais.

Para os casos AT, observou-se comportamento semelhante ao dos casos AS. Aproximadamente 64% dos filhos de mães AT apresentaram o traço talassêmico, enquanto que nos casos-índice masculinos, observou-se uma pequena maioria para a prole AT.

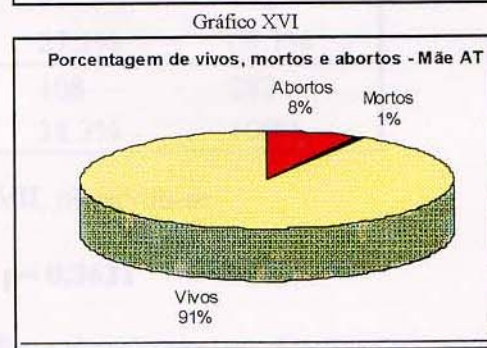
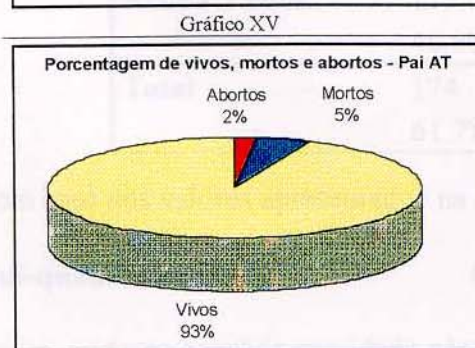
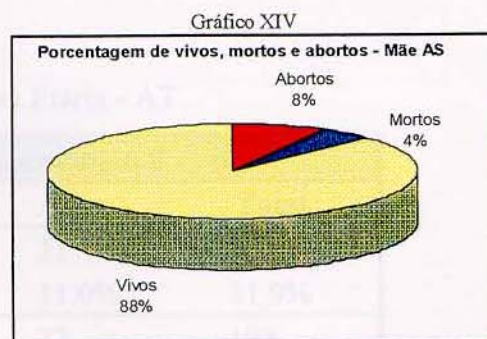
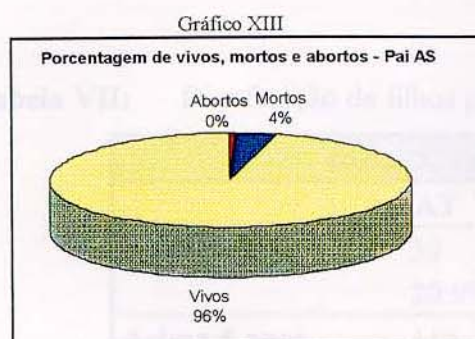
A tabela V apresenta os índices de abortamento e mortalidade pós-natal para os dois tipos de traço:

Tabela V: Índices de abortamento e mortalidade por sexo e tipo de traço do genitor.

	Abortos	Índice de Abortamento	Mortes	Índice de Mortalidade
Mãe AS	22	8.23%	12	4.49%
Pai AS	1	0.46%	8	3.76%
Total AS	23	4.79%	20	4.17%
Mãe AT	16	7.96%	2	0.99%
Pai AT	2	1.88%	5	4.71%
Total AT	18	5.86%	7	2.28%

Os Gráficos XIII a XVI ilustram as porcentagens de abortamentos e mortalidade entre filhos de pais AS a AT e mães AS e AT :

Gráficos XIII a XVI - Porcentagem de abortamentos e mortalidade pós-natal entre filhos de pais AS a AT e mães AS e AT.



Como é possível observar nos gráficos XIII a XVI, os índices de abortamento foram maiores entre as mães AS e AT, comparativamente com os pais AS e AT.

As Tabelas VIII e IX apresentam a distribuição dos filhos AS e AT, de acordo com o seu sexo:

Tabela VIII: Distribuição dos filhos por sexo - AS.

Sexo X Traço Hemoglobínico S			
	AS	AA	Total
Feminino	127 29.1%	96 21.9%	223 51.0%
Masculino	120 27.5%	94 21.5%	214 49.0%
Total	247 56.6%	190 43.4%	437 100%

Com base nos valores apresentados na tabela VIII, observou-se:

Qui-quadrado (gl=1) 0.034 p= 0.8550

Assim, pode-se concluir que sexo não é um fator significativo na presença ou não de traço AS nos filhos.

Tabela IX: Distribuição dos filhos por sexo - AT.

Sexo X Traço Talassêmico β			
	AT	AA	Total
Feminino	82 29.1%	61 21.6%	143 50.7%
Masculino	92 32.6%	47 16.7%	139 49.3%
Total	174 61.7%	108 38.3%	282 100%

Com base nos valores apresentados na tabela IX, observou-se:

Qui-quadrado (gl=1) 2.333 p= 0.1266

Assim, pode-se concluir que sexo não é um fator significativo na presença ou não de traço AT nos filhos.

Finalmente as Tabelas X e XI apresentam a distribuição dos filhos AS e AT, de acordo com o tamanho da prole (filhos vivos):

Tabela X: Distribuição dos filhos por tamanho da prole - AS (filhos vivos).

Tamanho da Prole X Traço da Hemoglobina S			
	AS	AA	Total
até 2	103 23.6%	84 19.2%	187 42.8%
mais que 2	144 32.9%	106 24.3%	250 57.2%
Total	247 56.5%	190 43.5%	437 100%

Com base nos valores apresentados na tabela acima, observou-se:

Qui-quadrado (gl=1) 0.276 p= 0.5991

A tabela acima permite concluir que o tamanho da prole é fator independente da presença de traço AS nos filhos.

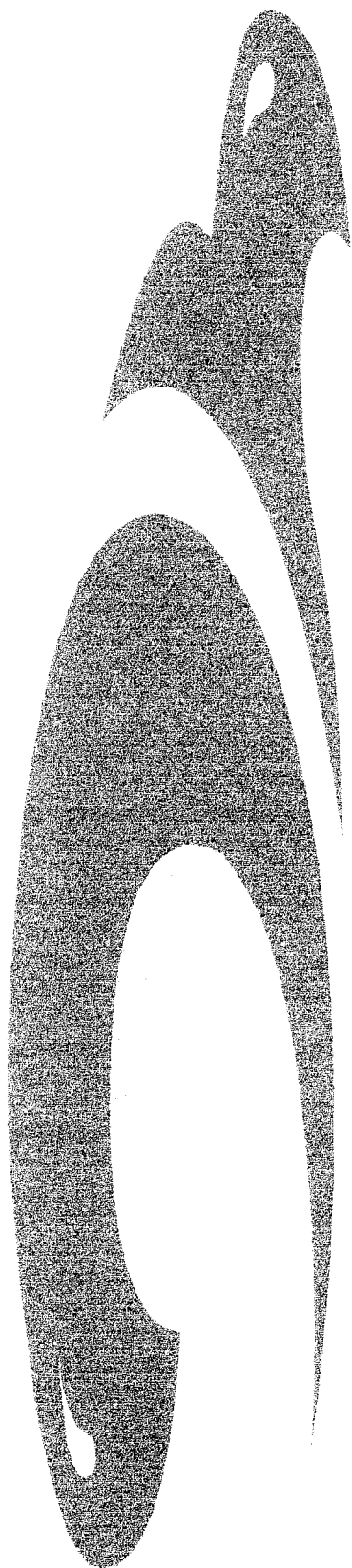
Tabela XI: Distribuição dos filhos por tamanho da prole - AT (filhos vivos).

Tamanho da Prole X Traço Talassêmico β			
	AT	AA	Total
até 2	102 36.2%	58 20.6%	160 56.8%
mais que 2	72 25.5%	50 17.7%	122 43.2%
Total	174 61.7%	108 38.3%	282 100%

Com base nos valores apresentados na tabela acima, observou-se:

Qui-quadrado (gl=1) 0.656 p= 0.4179

A tabela acima permite concluir que o tamanho da prole é fator independente da presença de traço AT nos filhos.



V - Discussão

A existência de um expressivo efeito materno favorecendo a transmissão hereditária dos traços falciforme e talassêmico beta é indicada de forma evidente na amostra analisada no presente trabalho. De fato, o excesso de heterozigotos foi constatado de forma altamente significativa na prole tanto das portadoras do traço falciforme, quanto na das portadoras do traço talassêmico beta, com uma probabilidade de ocorrência casual inferior a 0,1%. Curiosamente, o desvio da proporção mendeliana esperada ocorreu de forma bastante semelhante entre os filhos de mães AS e AT, sendo as duas amostras homogêneas quanto a essa característica, a nível de 5% ($\chi^2 = 0,20$; $p=0,6550$). Quando o caso - índice era o pai (AS ou AT), a proporção de heterozigotos entre os filhos não se desviou significativamente pelo teste do χ^2 daquela esperada pela teoria mendeliana. Verificando-se, no entanto, os contrastes pelo teste de Brandt - Snedecor entre mães e pais, a significância estatística foi observada apenas entre casais AS x AA ($\chi^2 = 5,7353$; $p=0,017$), mas não entre os casais AT x AA ($\chi^2 = 1,0705$; $p=0,301$). Assim sendo, a existência de um efeito paterno só pode ser descartada com segurança nos casos de hemoglobina S. Curiosamente, a falta de heterogeneidade na transmissão do traço entre mães AT e pais AT vem sendo observada desde o início deste trabalho (Duchovni-Silva e Ramalho, 1996a).

Antes de entrarmos na discussão propriamente dita dos resultados obtidos, parece conveniente tecermos algumas considerações a respeito da metodologia empregada, uma vez que ela é fundamental na credibilidade dos dados verificados no trabalho.

O estudo prospectivo da prole de casos-índice AS ou AT, casados com homozigotos normais AA, apesar de trabalhoso e demorado, uma vez que só pode ser realizado

paralelamente a um programa populacional voluntário de aconselhamento genético de heterozigotos adultos, apresenta a vantagem da ausência de viés, dispensando qualquer correção estatística. Evidentemente, tal método poderia ser complementado pelo estudo dos irmãos dos casos-índice AS ou AT diagnosticados no programa. Nesse caso, no entanto, seria necessária uma correção de viés, uma vez que tal tipo de averiguação está sujeito a distorções (Beiguelman, 1994). O estudo de irmãos não foi utilizado no presente trabalho, entretanto, pois na nossa experiência foi praticamente impossível examinar todos os irmãos e os genitores dos casos-índice, representados por indivíduos adultos.

A segregação de alguns polimorfismos, como, por exemplo, dos sistemas sanguíneos ABO e Rh, das haptoglobinas e mesmo das hemoglobinas tem sido estudada por diversos autores, através da análise intra-familiar de pares de parentes (mãe-filhos, pares de irmãos e outros). Assim, por exemplo, Moura e Krieger (1994) analisaram retrospectivamente os registros de 1068 núcleos familiares da Hospedaria de Imigrantes Nordestinos de São Paulo, visando estudar o comportamento intra-familiar de quinze polimorfismos, incluindo o “polimorfismo da hemoglobina”(excluindo-se a talassemia), através de pares de parentes. Assim, empregando matrizes de probabilidade condicional, foram obtidos os valores esperados para os seguintes pares de parentes analisados:

- a) todos os pares de irmãos possíveis na irmandade, quando a diferença de idade entre os irmãos era menor ou igual a 4 anos;
- b) apenas a primeira e a segunda criança da prole;
- c) um par de cada irmandade, com uma diferença de idade de 3 anos ou mais;

d) irmandade dividida pelo sexo, para testar a associação do polimorfismo com o sexo;

e) par mãe-criança (todos pares possíveis) e

f) mãe e uma criança escolhida ao acaso.

Os autores não constataram desvios significativos do esperado quando era analisado apenas um par por família, mas quando vários pares eram analisados dentro do mesmo núcleo familiar (por exemplo, pares mãe-criança), apareciam desvios significativos acima do esperado, atribuídos pelos autores ao denominado “erro estatístico tipo I”.

Embora as considerações e os dados de Moura e Krieger (1994) terem sido contestados por Valenzuela (1996), parece claro que os estudos de segregação que utilizem observações intra-familiares de pares de parentes devem ser preteridos em relação às análises tradicionais de segregação, menos sensíveis à violação do critério de independência de observações.

Hatagima e Krieger (1994) também estudaram a dinâmica populacional de vários sistemas polimórficos, incluindo o “polimorfismo da hemoglobina”, em registros de nordestinos da Hospedaria de Imigrantes de São Paulo. Na análise de segregação de múltiplos locos, não foram observadas diferenças entre os números de homozigotos observados e esperados, indicando “ausência de mecanismos biológicos atuando sobre estruturas genéticas complexas”.

Nos estudos retrospectivos acima citados não foi, portanto, investigada a existência de um efeito materno ou paterno sobre os heterozigotos. Assim sendo, a metodologia de estudo da transmissão dos traços falciforme e talassêmico beta empregada no presente

trabalho parece ser inédita na literatura, segundo o levantamento bibliográfico computadorizado realizado pela autora, abrangendo os últimos dez anos.

Na opinião de Fleming (1996), a maior sobrevivência pós-natal dos heterozigotos AS seria, por si só, responsável pelo excesso desses indivíduos nas irmandades, mecanismo esse mais provável do que um eventual distúrbio de segregação. Embora os estudos desse autor (Fleming *et al*, 1979) realizados na Nigéria realmente demonstrem a importância da malária na maior sobrevivência dos portadores do traço falciforme, tal mecanismo não se aplica aos dados observados no presente trabalho, pelas seguintes razões:

- a) a proporção de heterozigotos AS e AT na amostra de filhos não variou significativamente com a sua idade, assim como com o tamanho da prole;
- b) os índices de mortalidade nas amostras de filhos foram baixos (4,17% para a hemoglobina S e 2,28% para a talassemia beta);
- c) a malária inexistente na região onde foi realizado o nosso estudo;
- d) não foi demonstrada maior resistência dos heterozigotos AS e AT frente a outras doenças infecciosas e parasitárias prevalentes em nossa região.

Fleming (1996), ainda argumenta que, frente a um distúrbio de segregação, deveria ocorrer obrigatoriamente excesso de heterozigotos entre recém-nascidos, o que ele não tem observado em suas investigações. Quanto a isso, é preciso ponderar que quando são estudados conjuntamente, em uma única amostra, filhos de mães e pais heterozigotos, o efeito materno é diluído e o excesso de heterozigotos pode não atingir a significância estatística. Esse fato foi observado diversas vezes durante a obtenção da nossa

amostragem, quando a significância estatística variava conforme a proporção de casos-índices maternos (amostras de gestantes) ou paternos (amostra de doadores de sangue) variava na casuística total.

Hook (1996) considera extraordinariamente curioso que um efeito materno possa estar relacionado a dois alelos tão diferentes, quanto o da hemoglobina S e o da talassemia beta, embora ambos estejam relacionados ao mesmo produto gênico, ou seja, à globina beta. Na nossa opinião, no entanto, o fato de ambos alelos afetarem o DNA da mesma região do braço curto do cromossomo 11 talvez seja mais significativo do que o fato de ambos estarem relacionados ao mesmo produto gênico. De fato, a globina beta não é fundamental ao embrião e ao feto, uma vez que na vida intra-uterina o sistema respiratório vale-se das hemoglobinas embrionárias e fetal (Ramalho, 1986). Dessa forma, o produto gênico em si provavelmente tenha pouca influência na gênese do efeito materno descrito no presente trabalho.

Evidentemente, a geração de heterozigotos AS e AT em proporção não mendeliana poderia ser teoricamente explicada por vários mecanismos pré e pós-zigóticos, tais como a produção preferencial de gametas, a fertilização preferencial e, o que nos parece mais atraente, a sobrevivência seletiva de embriões. Dada a ampliação do conceito de marca genômica (*genetic imprinting*) que vem ocorrendo nos últimos tempos, tal fenômeno também merece ser considerado.

Exemplos de segregação não mendeliana (*segregation distortion*) são conhecidos desde a década de 50, como por exemplo, o excesso de fêmeas em *Drosophila pseudoobscura*, a disjunção não casual de cromossomos heteromórficos em fêmeas de

Drosophila melanogaster e o excesso de heterozigotos com o alelo *t* em ratos machos (Crow e Dove, 1988). Todos esses exemplos estão associados à produção não casual de determinados tipos de gametas e levaram Sandler e Novitski a preconizar, ainda em 1957, que “à medida que o estudo genético de organismos superiores tornarem-se mais precisos e extensos, um número cada vez maior de casos serão encontrados, nos quais os heterozigotos de certas condições não produzem as duas espécies de gametas com igual frequência”. Os autores salientaram também a força evolutiva desse processo, capaz de alterar a frequência dos alelos nas populações.

A manutenção do polimorfismo dos alelos *t* em populações naturais do rato doméstico (*Mus musculus*) é um exemplo bem conhecido desse processo em mamíferos. A homozigose de vários alelos mutantes (designados por *t^w*) é letal ou esterilizante em ratos machos. O esperma dos heterozigotos contém, no entanto, entre 85% e 99% de gametas com os alelos *t^w*, de forma que a perda dos alelos mutantes pelos homozigotos é contrabalançada pelo aumento da produção dos machos heterozigotos (Lewontin, 1968).

Na espécie humana, alguns efeitos paternos têm sido descritos na transmissão hereditária de algumas condições, como o retinoblastoma e a polidactilia. Assim, por exemplo, Munier *et al* (1992), analisando polimorfismos do DNA intragênico, demonstraram a transmissão preferencial de alelos mutantes do gene do retinoblastoma (locus RB1) pelo pai em oito famílias. Essa distorção da segregação favorecendo o pai passava despercebida sem a informação molecular, uma vez que o alelo mutante que causa predisposição ao retinoblastoma pode ser transmitido por genitores fenotipicamente

afetados ou não, ou, ainda, pode resultar de uma nova mutação, usualmente de origem paterna.

Posteriormente, Munier *et al*, (1994) reuniram na literatura 150 genealogias com diagnóstico preciso de retinoblastoma, com o fim de verificar se a segregação fenotípica relativa ao locus RB1 é influenciada pelo sexo do genitor.

A análise de segregação demonstrou que 49% dos filhos de homens transmissores eram afetados, enquanto que apenas 44% dos filhos de mulheres transmissoras eram afetados. Embora essa diferença não seja estatisticamente significativa, ela é coerente com os achados anteriores. Além disso, outros estudos realizados independentemente também constataram distorção de segregação na prole de pacientes do sexo masculino com retinoblastoma (Driscoll *et al*, 1993).

Naumova e Sapienza (1994) propuseram um mecanismo biológico para explicar a distorção de segregação no retinoblastoma, supondo que a recombinação genética cria clones de espermatogônias homozigóticas do mutante do locus RB₁, levando a uma proporção não mendeliana nos espermatozóides. Outra hipótese alternativa estaria relacionada com alguma vantagem pós-meiótica, facilitando a fertilização pelo espermatozóide portador da mutação. Tal mecanismo tem sido descrito em *Drosophila* para o traço SD e no camundongo em relação ao haplótipo t. A distorção é causada em ambos os casos pela incapacidade de quase 50% dos espermatozóides de amadurecerem completamente, levando a uma competição gamética entre espermatozóides normais e disfuncionais. Uma terceira hipótese seria a da existência de um gene modificador ligado ao sexo, que aumentaria a penetrância do gene do retinoblastoma.

Da mesma forma, Orioli (1995) observou que a frequência de polidactilia pós-axial na prole de pais negros afetados (44%) era maior que na prole de mulheres negras afetadas (31%). Tal diferença não foi observada na prole de pais brancos afetados (34%) e mães brancas afetadas (33%). Para explicar esse fato, a autora aventou a hipótese de um gene modificador recessivo ligado ao sexo atuando durante a gametogênese sobre o gene autossômico dominante da polidactilia. Tal gene modificador seria mais freqüente entre negróides e aumentaria a penetrância do gene da polidactilia, talvez modificando a organização da cromatina.

Os exemplos do retinoblastoma e da polidactilia, ambos relacionados a um efeito paterno na transmissão hereditária de genes autossômicos dominantes com penetrância incompleta, não se aplicam, evidentemente, ao efeito descrito no presente trabalho. No entanto, eles ilustram a possibilidade de atuação de genes modificadores relacionados à gametogênese, que poderiam não apenas atuar na penetrância de genes autossômicos, como também poderiam ter um efeito de “imprinting” sobre as células germinativas (Orioli, 1995).

O termo “imprinting” ou marca genômica tem sido usado para designar a expressão diferencial do material genético, seja a nível cromossômico ou gênico, dependendo da sua proveniência materna ou paterna.

Hall (1990) descreveu várias condições na espécie humana nas quais diferenças no fenótipo, idade de aparecimento e gravidade estão relacionadas ao sexo do genitor que transmite o gene. Tais condições incluem doenças monogênicas, como a coreia de

Huntington, outras de herança mais complexa, como o diabetes melito e algumas síndromes, como a de Beckwith - Wiedemann, Prader - Willi e Angelman.

No entanto, o problema parece ser mais complexo, uma vez que fortes evidências têm sido acumuladas de que algumas áreas do genoma (cromossomos, segmentos de cromossomos e genes) funcionam de forma diferente, dependendo do genitor de quem eles foram herdados. Esse processo parece ser reversível e envolve uma modificação temporária do DNA, parecendo ser uma parte integrante da função genômica normal, durante o desenvolvimento e manutenção dos organismos. De acordo com Hall (1990), uma profunda revisão da genética humana poderia revelar efeitos de “imprinting” em muitas heredopatias comuns. Segundo essa autora, as informações que dispomos ainda constituem apenas a ponta do “iceberg” e o conceito de “imprinting” poderá ser bastante ampliado no futuro próximo. Assim sendo, embora o conceito atual de “imprinting” não se relacione ao efeito descrito no presente trabalho, a ampliação do seu conceito poderá, futuramente, esclarecer alguns aspectos do mesmo.

Dentre todas as hipóteses, no entanto, a que nos parece mais plausível para explicar o efeito materno favorecendo a transmissão genética dos traços falciforme e talassêmico beta é a da sobrevivência seletiva de embriões. Da mesma forma, Hook (1996), comentando os dados preliminares da presente tese publicados no Lancet (Duchovni-Silva e Ramalho, 1996b) também opinou que a sobrevivência seletiva de embriões seria um mecanismo mais provável para explicar o efeito descrito, do que o distúrbio de segregação envolvendo os gametas. Na opinião desse autor, o fato de a mãe ter o mesmo fenótipo heterozigoto que o embrião, deve contribuir de forma importante nesse efeito.

Realmente, a análise dos índices de abortamentos verificados na casuística demonstrou um fato extremamente interessante, ou seja, um aumento significativo dessa intercorrência clínica entre as mães heterozigotas. Assim, nos núcleos familiares identificados pela mãe AS, o índice de abortamento (8,23%) foi significativamente maior que o verificado naqueles identificados pelo pai AS (0,46%). Da mesma forma, nos núcleos familiares identificados pela mãe AT, o índice de abortamento (7,96%) também foi significativamente maior que o verificado naqueles identificados pelo pai AT (1,88%).

Ao discutir esses dados, no entanto, é preciso levar em consideração o fato de que as informações anamnéticas referentes a abortamentos espontâneos, sobretudo aquelas fornecidas pelos maridos, devem sempre ser analisadas com as devidas reservas. Assim, por exemplo, embora muitas vezes os casais tenham sido entrevistados simultaneamente, é possível que as informações fornecidas pelas heterozigotas sejam mais fidedignas que as fornecidas pelos casos índice do sexo masculino.

Mais importantes que os abortamentos reconhecidos, no entanto, são os abortamentos muito precoces, nos quais a gravidez nem chega a ser diagnosticada. De acordo com Hook (1996), os nossos dados estariam mais provavelmente relacionados a esses abortamentos não reconhecidos.

Embora os dados das diversas pesquisas não sejam absolutamente concordantes no que diz respeito à incidência de abortamentos espontâneos, Jacobs (1986) avaliou que 75% do total de gestações não chegam ao termo, de tal modo que 25% são perdidas antes da implantação uterina, 33% no período pós-implantação precoce, 15% a 20% entre a 5^a e a 27^a semanas e 1% a 2% em períodos mais tardios. Estudos mais aprofundados, que se

valem da dosagem de gonadotrofina coriônica (β -hCG) no soro de mulheres no período fértil, estimam que 30% a 50% das gestações terminam em abortamento espontâneo não reconhecido (Wilcox *et al*, 1988).

Tommerup (1993) postulou que pequenas alterações cromossômicas poderiam estar presentes em um número significativo de indivíduos afetados por algumas doenças mendelianas, algumas já identificadas e outras não. Além das translocações insercionais, outros tipos raros de rearranjos familiares esporádicos têm sido identificados em investigações citogenéticas. Conquanto esses rearranjos intra-cromossômicos possam não ter implicações imediatas para os traços mendelianos conhecidos, a dissecação molecular futura dessas desordens pode alterar esse quadro (Tommerup, 1993). É possível, por exemplo, que se venha a demonstrar a eventual influência desse mecanismo na fixação do embrião ao útero e na sobrevivência seletiva de embriões.

Pela hipótese ora apresentada, quando a mãe e o embrião apresentassem o mesmo fenótipo heterozigoto (AS ou AT), mecanismos moleculares ou imunológicos garantiriam a sobrevivência preferencial do embrião, que se livraria do abortamento precoce espontâneo. Dessa forma, haveria um excesso de abortamentos, reconhecidos ou não, de embriões AA quando a mãe fosse heterozigota. Curiosamente, os dados observados no presente trabalho reforçam de uma forma indireta essa hipótese, uma vez que houve um significativo aumento do índice de abortamentos entre as mães heterozigotas AS e AT, embora esse dado, conforme foi comentado, deva ser interpretado com reservas no que diz respeito aos abortamentos reconhecidos.

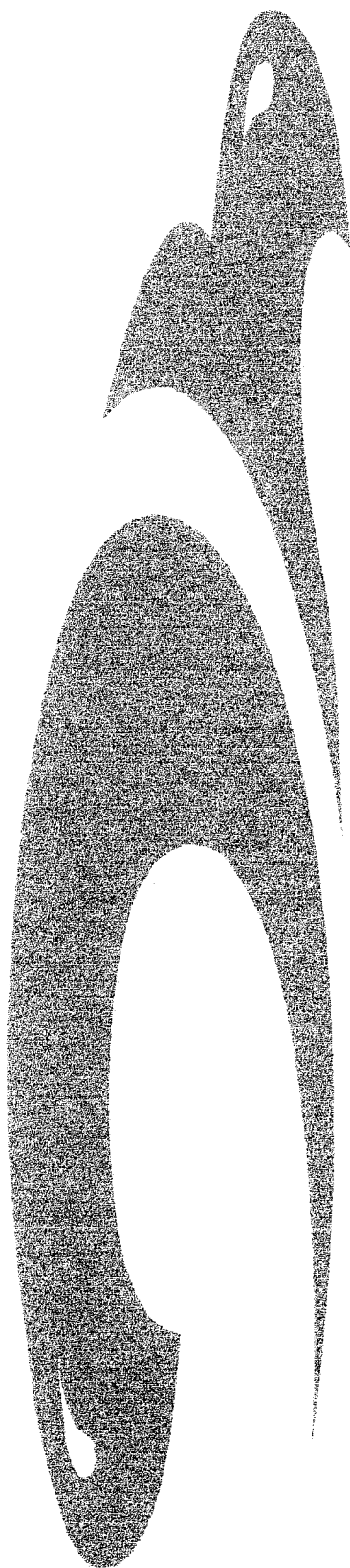
Como já foi comentado na parte inicial dessa discussão, as consequências do efeito materno na transmissão hereditária do traço falciforme e do traço talassêmico beta também só podem ser analisadas sob um prisma hipotético.

Teoricamente, tal efeito poderia contribuir para a manutenção do polimorfismo da hemoglobina S e da talassemia beta. Ainda é impossível avaliar, no entanto, a importância relativa desse mecanismo frente aos outros mecanismos propostos, sobretudo frente à seleção pela malária.

Concluindo esta discussão, é interessante comentar que o efeito materno evidenciado no presente trabalho pode, eventualmente, estar relacionado ao tipo de mutação de talassemia beta ou ao tipo de haplótipo do grupamento gênico β^S apresentado pelo(a) heterozigoto(a). Quanto a esse aspecto, é importante lembrar que a maioria dos talassêmicos beta da região de Campinas possui a mutação β^{039} ou a mutação $\beta^{-IVS1-110}$ (Martins *et al*, 1993), enquanto a maioria dos portadores da hemoglobina S dessa região apresenta os haplótipos Bantu ou Benin (Costa *et al*, 1992). Essa possibilidade deve ser considerada, ao comparar os resultados do presente trabalho aos observados em populações de outras regiões do Brasil ou de outros países.

O que nos parece mais importante, no momento, é que o efeito materno observado na presente tese seja confirmado em outros locais, através de estudos utilizando a mesma metodologia. Enquanto aguardamos tais estudos, iniciamos uma investigação a respeito da transmissão genética do traço da hemoglobina C, que também é freqüente em nosso meio, afetando 1% a 3% da população negróide (Ramalho, 1986), envolve o mesmo *locus da*

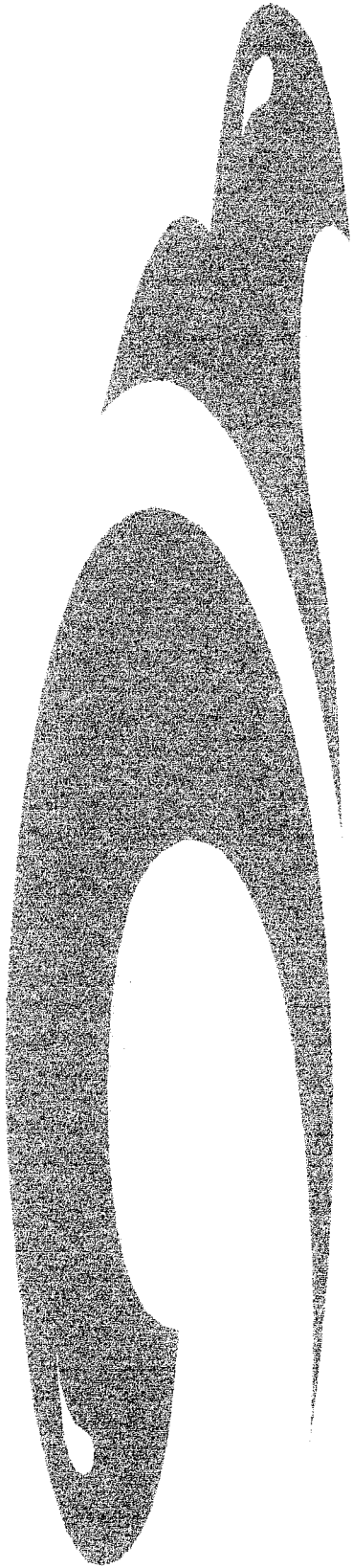
globina beta no braço curto do cromossomo 11 e cujos mecanismos de manutenção do polimorfismo são igualmente controvertidos.



VI - Conclusões

Os resultados obtidos na presente tese permitiram as seguintes conclusões:

- 1- Os heterozigotos AS e AT nascem em proporção superior à esperada pela teoria mendeliana entre filhos (as) de heterozigotas AS e AT, casadas com homozigotos normais AA. Esse fato evidencia um efeito materno favorecendo a transmissão hereditária dos traços falciforme e talassêmico beta;
- 2- Um efeito paterno similar não é observado entre filhos (as) de heterozigotos AS casados com homozigotas normais AA.
- 3- A existência de um efeito paterno não pode ser descartada com segurança entre filhos(as) de heterozigotos AT casados com homozigotas normais AA.



VII - Summary

Haldane's theory of a selective advantage of heterozygotes in the presence of *Plasmodium falciparum* malaria has been largely accepted, mainly for the sickle cell gene, in areas where malaria is still endemic. A similarity between the geographic distributions of β thalassemia and past incidence of malaria in the Mediterranean basin has also been shown in many studies, but the protection mechanism of thalassemic individuals is not completely understood.

Besides some controversial aspects, the malarial hypothesis presupposes that carriers of sickle cell trait and β thalassemia trait are born in Mendelian proportion and are later favoured by an environmental factor. Differential fertility is also proposed as mechanism maintaining the balanced polymorphism of β thalassemia in some populations. However, an eventual distortion favouring the transmission of the mutant allele is also a plausible hypothesis.

The Mendelian proportion was tested in the present paper by the χ^2 test in the progeny of 201 sickle cell trait (AS) and 138 β thalassemia trait (AT) people married to those with normal hemoglobin (AA). The progeny sample was predominantly composed of children and the AS and AT individuals had few or no symptoms. The mortality rates were very low to be correlated with AS and AT individuals.

Yet, the recognized average of abortion was more significant between mothers AS and AT.

The table shows affected and unaffected offspring:

AS X AA couples (nuclear families, n = 201; offspring, n = 437)

Proband	Offspring			χ^2	p
	AS	AA	Total		
Mother (107)	144	89	233	12.98283	p = 0.000315
Father (94)	103	101	204	0.0196078	p = 0.888639
Total (201)	247	190	437	7.434783	p = 0.006401

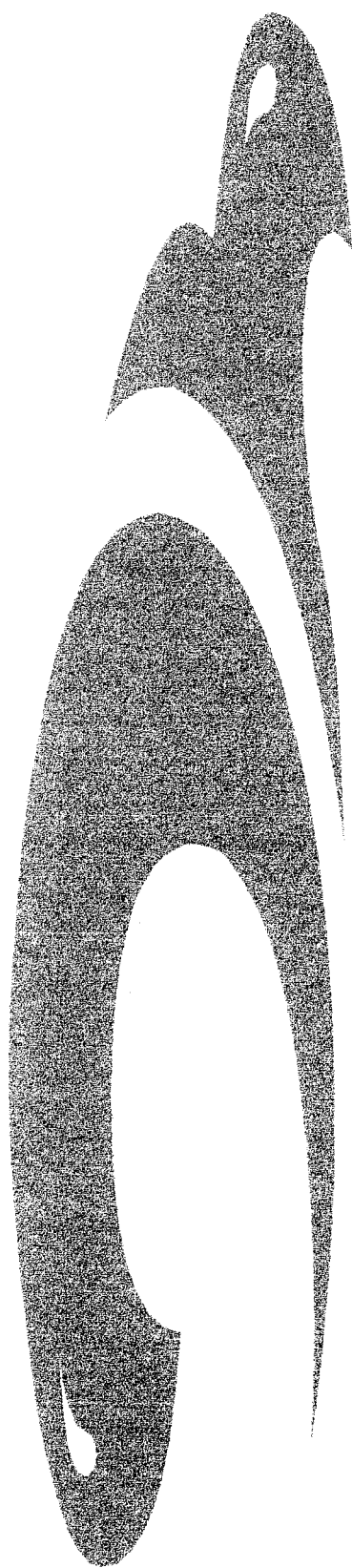
AT X AA couples (nuclear families, n = 138; offspring, n = 282)

Proband	Offspring			χ^2	p
	AT	AA	Total		
Mother (95)	117	66	183	14.21311	p = 0.000164
Father (43)	57	42	99	2.272727	p = 0.131678
Total (138)	174	108	282	15.44681	p = 0.000085

Such data show a statistically significant maternal effect favouring the transmission of S hemoglobin and β thalassemia alleles. As expected, the Mendelian proportion was confirmed in the offspring of male probands, although the paternal effect can be securely discarded only among the individuals with S hemoglobin.

Obviously, prezygotic and postzygotic mechanisms of distortion cannot be ignored and need investigation.

The data may reflect a effect true biological, and very early embryonic deaths among the conceptuses who are homozygously normal for hemoglobin A explain the relative excess of heterozygotes surviving to birth. Moreover, the heterozygous maternal phenotype must contribute importantly to this presumed effect because the differential outcome is not observed at a significant level if the carrier parent is the father, not the mother.



VIII - Referências Bibliográficas

- Aguzzi, S.; Vullo, C. and Barrai, I. - Reproductive compensation in families segregation for Cooley's anemia in Ferrara. **Ann. Hum. Genet.**, **42**:153 - 160, 1978.
- Allard, R. - A propos de la coversation genetique du sickle cell trait. **Ann Soc. Belge Med. Trop.**, **35**:649 - 660, 1955.
- Allison, A. C. - Protection afforded by sickle cell trait against subtertian malarial infection. **Br. Med. J.**, **1**: 290:294, 1954a.
- Allison, A. C. - The distribution of the sickle cell trait in East Africa and elsewhere and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **48**:312 - 318, 1954b.
- Araujo, A. S.; Givisiez, C. B.; Guerra, C. C. C.; Tricta Jr., D. V.; Barreto, J. H.; Pereira, J. M. e Naoum, P. C. - "Doença Falciforme: o que é, como diagnosticar, como tratar?". Publicação avulsa do laboratório Marjan Farmacêutica, 20 pag., 1993.
- Archibald, H. M. and Bruce - Chwatt, L. J. - Sickling and malaria. **Brit. Med. J.**, **1**:970, 1955
- Bannerman, R. M. - **Thalassemia A survey of some aspects**. N. York, Grune e Stratton, 1961.
- Barrai, I.; Barbujani, G.; Beretta, M.; Maestri, I. and Russo, A. - Surnames in Ferrara: distribution isonymy and levels of inbreeding. **Ann. Hum. Biol.**, **14**:415 - 423, 1987.

- Barnicot, N. A.; Allison, A. C.; Blumberg, B. S.; Deliyannis, G.; Krimbas, C. and Ballas, A. - Haemoglobin Types in Greek populations. **Ann. Hum. Genet.**, **26**:229 - 236, 1963
- Beiguelman, B. - **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. Coleção genética Médica, Vol. 2, São Paulo, EDART, 1981
- Beiguelman, B. - **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. Ribeirão Preto, Ed. Sociedade Brasileira de Genética, 460, 1994
- Beutler, E.; Dern, R. J. and Flanagan, C. L. - Effect of sickle cell trait on resistance to malaria. **Brit. Med. J.**, **2**:1189 - 1191, 1955.
- Brockelman, C. R.; Wongsattayanont, B.; Tan-ariya and Fucharoen, S. - Thalassemia erythrocytes inhibit in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. **J. Clin. Microbiol.**, **25**:56 - 63, 1987.
- Calusni, A. L. R. and Ramalho, A. S. - In vitro interaction between *Streptococcus pyogenes* and S hemoglobin. **J. Bras. Patol.**, **33**:121-124, 1997
- Carcassi, V.; Ceppellini, R. e Pitzus. - Frequenza della talassaemia in quatro popolazioni Sarde e suoi rapporti com la distribuzione dei gruppi sanguini e della malaria. **Boll. Ist. Suroter**. (Milan), **36**:206 - 218, 1957
- Cezar, P. C.; Mizusaki, K.; Pinto Jr, W.; Opromolla, D. V. A. e Beiguelman, B. - "Hemoglobina S e lepra". **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.**, **7**:151, 1974.

- Choremis, C.; Fessas, P.; Kattamis, C.; Stamatoyannopoulos, G.; Zannos-Mariolea, L.; Karaklis, A. e Belios, G. - Three inherited red-cell abnormalities in a district of Greece. **Lancet**, **1**:907 - 909, 1963.
- Crow, J. F. and Dove, W. F. - Perspectives, anecdotal historical and critical commentaries on genetics. **Genetics**, **118**:389 - 391, 1998
- Costa, F. F.; Gesteira, F.; Carvalho, M. H.; Miranda, S. R. P.; Queiroz, I. L.; Arruda, V. R.; Gonçalves, M. S.; Fernandes, D.; Nascimento, M. L.; Saad, S. T. O. e Sonati, M. F. - "Beta S cluster haplotypes in Brazil: the CAR type predominantes in the Southeast and the Benin type in Northeast". **Abstracts 24th Congress of the International Society of Haematology**, Londres, p. 196, 1992.
- Curtain, C. C.; Kidson, C.; Gaydusek, D. C. and Gorman, J. G. - Distribution pattern, population genetics and anthropological significance of thalassemia and abnormal hemoglobins in Melanesia. **Am. J. Phys. Anthropol.**, **20**:475 - 483, 1962.
- Deisseroth, A.; Nienhuis, A. W.; Lawrence, J.; Giles, R.; Turner, P. and Ruddle, F. H. - Chromosomal localization of human globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **75**:1456 - 1459, 1978.
- Deisseroth, A.; Velez, R. and Nienhuis, A. W. - "Hemoglobin synthesis in somatic cell hybrids: Independent segregation of the human α - and β - globin. **Science**, **191**:1262 - 1264, 1976.

- Domingos, C. R. B.; Naoum, P. C.; Moreira, H. W.; Bassi, M. G.; Monzato, A. J. e Álvares Filho, F. - Hemoglobinopatias e haptoglobinas em portadores da Doença de Chagas. **Rev. Bras. Patol. Clin.**, **27**:80 - 87, 1991.
- Driscoll, M. C.; Abramson, D. H. and Ellsworth, R. M. - Retinoblastoma: preferential transmission of mutant alleles. **Am. J. Hum. Genet. (Suppl)**, A795, 1993.
- Duchovni-Silva, I. and Ramalho, A. S. - Evidence of maternal segregation distortion in the sickle cell and β -thalassaemia traits. **J. Med. Genet.**, **33**:525, 1996a
- Duchovni-Silva, I. and Ramalho, A. S. - Maternal segregation distortion in sickle - cell and beta - thalassemia traits? **Lancet**, **347**:691 - 692, 1996b.
- Eaton, J. W. - Malaria and the selection of the sickle gene. **In**: Embury, S. H.; Hebbel, R. P.; Mohandas, N. and Steinberg, M. H. (Eds.) **Sickle cell disease. Basic principles and clinical practice**. N. York, Raven Press, pp. 13 - 18, 1994.
- Eaton, J. W. and Mucha, J. I. - Increased fertility in males with the sickle cell trait? **Nature**, **231**:456 - 457, 1971.
- Elion, J.; Berg, P. E.; Lapouméroulie, C.; Trabuchet, G.; Mittelman, M.; Schechter, A. N.; Krishnamoorthy, R. and Labie, D. - DNA sequence variation in a negative control region 5'to the β -globin gene correlates with the phenotypic expression of the β^S mutation. **Blood**, **79**:787 - 792, 1992.

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

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

Fleming, A. E. - Maternal segregation distortion in sickle cell trait. **Lancet**, **347**:1634 - 1635, 1996.

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

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

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

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

- Freitas, E. M. and Rocha, F. J. - Detection of beta-thalassemia heterozygotes among Caucasians from Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev. Bras. Genet.**, 6:185 - 188, 1983.
- Friedman, M. J. - Erythrocyte mechanism of sickle cell resistance to malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 75:1994 - 1997 - 1978.
- Friedman, M. J. - Oxidant damage mediates variant red cell resistance to malaria. **Nature**, 280:245 - 250, 1979.
- Gelehrter, T. D. and Collins, F. S. - **Principles of Medical Genetics**, Baltimore, Williams e Wilkins, pp. 113-119, 1990.
- Gonçalves, M. S.; Cavallari, S. R.; Martins, C. S. B.; Garlipp, C. R.; Bottini, P. V. e Ramalho, A. S. - Síndromes falcêmicas e hematúria. **Rev. Bras. Patol. Clin.**, 25:121 - 127, 1989.
- Gonçales, N. S. L. e Ramalho, A. S. - Alterações hemoglobínicas e dores ósteo-articulares. **Rev. Bras. Reumatol.**, 25:128 - 130, 1985.
- Haldane, J. B. S. - Disease and evolution. **Ric. Sci.**, 19 (Suppl.):68 - 76, 1949.
- Hall, J. G. - Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. **Am. J. Hum. Genet.**, 46:857 - 873, 1990.

- Hatagima, A. and Krieger, H. - Studies on polymorphism segregation in Northeastern Brazil: Analysis of multiloci. **Rev. Bras. Genet.**, **17**:431 - 434, 1994.
- Hook, E. B. - Selective embryonic survival of conceptuses with sickle cell and beta - thalassemia traits? **Lancet**, **347**:1269, 1996.
- Ingram, V. M. - Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. **Nature**, **180**:326, 1957.
- Jacobs, P. A. Chromosome abnormalities: comparative epidemiology in abortions and livebirths. Abstracts 7th. **International Congress of Human Genetics (Berlin)**, 1986.
- Joishy, S. K.; Hassan, K.; Lopes, M. and Lie - Injo, L. E. - Clinical, genetic and fertility studies of Indians with beta S-globin gene and the influence of Hbs on *Plasmodium falciparum* malaria infection. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **82**:515 - 519, 1988.
- Lehmann, H. - **The history of thalassemia. Birth Defects. Original Articles Series**, **18** (7):1 - 11, 1982.
- Lewis, R. A. and Chaudhury, D. S. - Anemia of leprosy patients in West Africa. **Internat. J. Leprosy**, **37**:288 - 295, 1969.
- Lewontin, R. C. - The effect of differential viability on the population dynamics of alleles in the house mouse. **Evolution**, **22**:262 - 273, 1968.

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

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

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

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

Lourderback, A. L.; Youhene, Y.; Fontana, A. e Natland, M. - Clinical evaluation of a rapid screening teste for sickle cell trait (S-) and sickle cell anemia (SS). **Clin. Chem.**, **20**:761 - 764, 1974.

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

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

- Martins, C. S. B.; Gonçalves, M. S.; Sonati, M. F.; Ramalho, A. S. and Costa, F. F. - Molecular characterization of beta-thalassemia heterozygotes in Brazil. **J. Med. Genet.**, **30**:797 - 798, 1993.
- Martins, C. S. B.; Ramalho, A. S. and Pinto Jr., W. - Hb S heterozigótica e tuberculose pulmonar. **Rev. Brasil. Genet.**, **10**:769 - 776, 1987.
- Moore, R. A.; Brass, W. and Foy, H. - Sickling and malaria. **Brit. Med. J.**, **2**:630 - 631, 1954.
- Motulsky, A. G. - Current concepts of the genetics of the thalassaemias. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, **29**:399 - 412, 1964.
- Motulsky, A. G. - Metabolic polymorphisms and the role of infections diseases in human evolution. **Hum. Biol.**, **32**:28 - 62, 1960.
- Moura, M. M. and Krieger, H. - Studies on polymorphism segregation in Northeastern Brazil: Pairs of relatives. **Rev. Bras. Genet.**, **17**: 109 - 112, 1994.
- Munier, F. L.; Arabien, L.; Flodman, P.; Spence, M. A.; Pescia, G.; Rutz, H. P. and Murphree, A. L. - Putative non-mendelian transmission of retinoblastoma in males: a phenotypic segregation analysis of 150 pedigrees. **Hum. Genet.**, **94**:484 - 490, 1994.

- Munier, F. L.; Spence, M. A.; Pescia, G., Balmer, A; Gailloud, C.; Thonney, F. Rutz, H. P. and Melle G. - Paternal selection favoring mutant alleles of retinoblastoma susceptibility gene. **Hum. Genet.**, **89**:508 - 512, 1992.
- Nagel, R. L. and Roth, E. F. - Malária and red cell genetic defects. **Blood**, **74**:1213 - 1221, 1989.
- Naumova, A. and Sapienza, C. - The genetics of retinoblastoma revisited. **Am. J. Hum. Genet.**, **54**:264 - 273, 1994
- Nomura, M. L.; Andreollo, N. A.; Souza, P. R.; Mesquita, M. A.; Martins, C. S. B. e Ramalho, A. S. - Síndromes falcêmicas e úlcera duodenal. **Rev. Gastroentrol. Endosc. Diag. (GED)**, **11**:145 - 148, 1992.
- Orioli, I. M. - Segregation distortion in the offspring of Afro-American fathers postaxial polydactyly. **Am. J. Hum. Genet.**, **56**:1207 - 1211, 1995.
- Pasvol, G. and Wilson, R. J. M. - The interaction of malaria parasites with red blood cells. **Br. Med. Bull.**, **38**:133 - 138, 1982.
- Pasvol, G.; Weatherall, D. J. and Wilson, R. J. M. - Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria. **Nature**, **274**:701 - 703, 1978.
- Pauling, L.; Itano, H. A.; Singer, S. J. and Wells, I. C. - Sickle cell anemia: a molecular disease. **Science**, **110**:543, 1949.

Piedrabuena, A. E. - **Elementos de Bioestatística. Publicação avulsa, 1:173, 1997.**

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

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

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

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

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

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

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

- Ramalho, A. S. - **As hemoglobinopatias hereditárias. Um problema de saúde pública no Brasil.** Ribeirão Preto, Editora da Sociedade Brasileira de Genética / CNPq, 160p, 1986.
- Ramalho, A. S. and Beiguelman, B. - Sick cell trait and tuberculosis. **Ciência e Cultura**, **29**:1149 - 1153, 1977.
- Ramalho, A. S.; Magna, L. A.; Costa, F. F. e Grotto, H. Z. W. - Talassemia menor: um problema de saúde pública no Brasil? **Rev. Bras. Genet.**, **8**:747 - 754, 1985.
- Ramalho, A. S.; Pinto Jr., W; Magna, L. A. e Beiguelman, B. - Talassemia e hanseníase. **Hansenol. Internat.**, **8**:61 - 65, 1983.
- Ramalho, A. S.; Teixeira, R. C.; Teixeira, P. A.; Compri, M. B.; Stella, M. B. e Polimeno, N. C. - Genética e Saúde Pública no Brasil: os programas comunitários de hemoglobinopatias hereditárias. **Anais Acad. Nac. med.**, **156**:13-18, 1996
- Ramalho, A. S.; Velloso, L. A. e Diniz, M. - Síndromes falcêmicas e úlceras de membros inferiores. **Anais Bras. Dermatol.**, **60**:307 - 310, 1985.
- Raper, A. B. - Further observations on sickling and malaria. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **53**:110 - 117, 1959.
- Raper, A. B. - Sickling in relation to morbidity from malaria and other diseases. **Brit. Med. J.**, **1**:965 - 966, 1956.

- Restrepo, A. and Moore, C. V. - Unpublished observations *apud* Weernik, P. H. - Rheumatic heart disease occurring in sickle cell disease and trait. **Southern Med. J.**, **61**:404 - 407, 1968.
- Ringelhann, B.; Hathorn, M. K. S.; Jilly, P.; Grant, F. and Parnicsky G. - A new look at the protection of hemoglobin AS and AC genotypes against *Plasmodium falciparum* infection: acensus trait approach. **Ann. J. Hum. Genet.**, **28**:270 - 279, 1976.
- Rosenbleum, R.; Kabakow, B.; Dichtman, H. and Lyon, H. A. - Sickle cell trait and disease in pulmonary tuberculosis. **Arch. Intern. Med.**, **95**:540 - 542, 1955.
- Roth, E. F.; Friedman, M.; Veda, Y.; Telles, I.; Trager, W. and Nagel, R. L. - Sickling rates of human AS red cells infected in vitro with *Plasmodium falciparum* malaria. **Science**, **202**:650 - 652, 1978.
- Roth, E. F.; Raventos-Suarez, C.; Rinaldi, A. and Nagel, R. L. - Glucose -6- phosphate dehydrogenase deficiency inhibits in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **80**:298 - 305, 1983.
- Ryan, T. J.; O'Connor, T. F.; McCurdy, P. R. and Katz, S. - Sickle cell trait and tuberculosis. **Am. Rev. Resp. Dis.**, **81**:546 - 549, 1960.
- Salzano, F. M. - Abnormal hemoglobin studies and counseling in Brazil. In: Scott, R. B. (Ed.) **International aspects of sickle cell disease**. Washington Howard University Center for Sickle Cell Disease, pp. 67 - 69, 1979.

- Sandler, L. and Novitski, E. - Meiotic drive as an evolutionary force. **Am. Nat.**, 41:105 - 110, 1957.
- Schiliró, G.; Rodriguez-Larralde, A.; Mamolini, E.; Scapoli, C. and Barrai, I. - Isonymy in haemoglobinopathies in a Sicilian sample. **Hum. Hered.**, 43:203 - 204, 1993.
- Schiliró, G.; Mirabile, E.; Testa, R.; Russo - Mancuso, G. and Dibenedetto, S. P. - Presence of hemoglobinopathies in Sicily: a historic perspective. **Am. J. Med. Genet.**, 69:200 - 206, 1997.
- Serjeant, G. R. - **Sickle cell disease**. Oxford Medical Publications, 1985.
- Serjeant, G. R. - **The clinical features of sickle cell disease**. Amsterdam, North - Holland, 1974.
- Silvestroni, E. and Bianco, I. - Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **Ann. J. Hum. Genet.**, 27:198 - 207, 1975.
- Silvestroni, E.; Bianco, I. and Montalenti, G. - Frequency of microcythemia in some Italian districts. **Nature**, 165:682 - 683, 1950.
- Siniscalco M.; Bernini, L.; Latte, B. and Motulsky, A. G. - Favism and thalassaemia in Sardinia and their relationship to malaria. **Nature**, 190:1170 - 1180, 1961.

- Teixeira, R. C. and Ramalho, A. S. - Genetics and Public Health: Response of a Brazilian population to an optional hemoglobinopathy program. **Rev. Brasil. Genet.**, **17**: 435 - 438, 1994.
- Tommerup, N. - Mendelian cytogenetics chromosome rearrangements associated with mendelian disorders. **J. Med. Genet.**, **30**:713 - 717, 1993.
- Udeinya, I. J.; Schimidt, J. A.; Aikawa, M.; Miller, L. H. and Green, I. - Falciparum malaria - infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells. **Science**, **213**: 555 - 557, 1981.
- Valenzuela, C. Y. Are there true ABO and Rh segregation distortions? **Rev. Bras. Genet.**, **19**: 343-349, 1996.
- Vandepitte, J. M. and Delaisse, S. - Sicklémie et paludisme. Aperçu du problème et contribution personnelle. **Ann. Soc. Belge Med. Trop.**, **37**:703 - 735, 1957.
- Wajcman, H.; Vasseur, C.; Blouquit, Y. and Galacteros, F. - Hb Zaire and Hb Duino: two new human hemoglobin variants due rare mutational events. **Blood**, **78** (Suppl.1):205, 1991.
- Weatherall, D. J. - **Los síndromes talassémicos**. Barcelona, Toray, 1967.
- Weatherall, D. J. and Clegg, J. B. - **The Thalassemia Syndromes**. Oxford; Blackwell Scientific, 1981.

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

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

Wilcox, A. J.; Weinberg, C. R.; O'Connor, J. F.; baird, D. D.; Schlatterer, J. P.; Canfield, R. E.; Armstrong, E. G. and Nisula, B. C. Incidence of early loss pregnancy. **N. Engl. Med.,** **319:**189 - 194, 1988.

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

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

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

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

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