

Zélia Arpini Sampaio

**Polimorfismo de Hemoglobinas Humanas
no Estado do Piauí: Distribuição, Prevalência,
Relações Históricas e Antropológicas**



1910000382



Zélia Arpini Sampaio

**POLIMORFISMO DE HEMOGLOBINAS HUMANAS NO ESTADO DO PIAUÍ: DISTRIBUIÇÃO,
PREVALÊNCIA, RELAÇÕES HISTÓRICAS E ANTROPOLÓGICAS**

*Dissertação apresentada para obtenção do grau
de Mestre em Genética, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".*

São José do Rio Preto

1987



T-382/88



Este trabalho foi orientado pelo Prof. Dr. Paulo César Naoum e realizado no Centro de Referência de Hemoglobina - Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" e no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Piauí, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

ao indígena, ao Imigrante Português e ao Escravo Africano, formadores da população piaulense.



Bedico

Aos meus pais

Leonor e Zeferino

Minha homenagem:

Ao Fernando

As minhas filhas

Májury e Márina

*Ao Indígena, ao Imigrante Português e ao Escravo
Africano, formadores da população piauiense.*

*Quero-lhes por igual, agradecer a
grandeza da vida.*

Dedico

*Aos meus pais
Leonor e Zeferino*

Ao Fernando

*Às minhas filhas
Májury e Hãrine*

*Quero-lhes por igual, deram-me a
grandeza da vida.*

A Deus, força que estimula e orienta a vontade de sempre fazer algo;

Ao Professor Doutor Paulo Cesar Magalhães, exemplo de dinamismo e empenho, pela orientação e pela amizade constantemente demonstradas durante a minha estada em seu laboratório;

Aos Professores Doutores Marileila Varalla Garcia e Celso Abreu de Moura, pela paciência e disponibilidade com que sempre se adôlheram e, principalmente, pelas valiosas discussões relacionadas aos dados deste trabalho;

Aos Professores Doutores Manoel Antônio Martins e Aluísio José Gallo, membros da banca examinadora desta dissertação, pelas sugestões apresentadas após leitura da pré forma;

Ao Professor Doutor José Wilson Campos Batista, Vice-Reitor da FUFPI, exemplo de conduta profissional, pelo constante apoio e principalmente por acreditar em meu trabalho;

A Cleonair Buschi Gomes, professora de Hemoglobina, pelo apoio durante as laborações e pela ajuda na parte técnica;

A Janete Batista Freire, do Departamento de Biologia, pela revisão do texto, pela paciência e pela ajuda na parte técnica;

Ao Professor Doutor Vitor Hugo, pela leitura da pré forma e pela ajuda na parte técnica;

Ao Professor Doutor Jaime, pela colaboração durante a redação do SUMÁRIO;

"A principal lição que se pode tirar da Genética é que os grupos aos quais pertencemos diferem uns dos outros: não sou superior nem inferior a ninguém; sou diferente de todos; quanto maior for a diferença entre mim e meu próximo, mais coisas teremos a oferecer um ao outro.

Esta não é uma afirmação ditada pela moral; é a lição fundamental da Genética..."

Albert Jacquard

Aos professores e colegas do Curso de Pós-Graduação, pela convivência amigável e enriquecedora;

A Fundação Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade de concretizar meu sonho profissional;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa concedida para realização do Curso de Pós-Graduação.

AGRADECIMENTOS

- . A Deus, força que estimula e orienta a vontade de sempre fazer algo;
- . Ao Professor Doutor Paulo Cesar Naoum, exemplo de dinamismo e dedicação, pela orientação e pela amizade constantemente demonstradas durante a minha estada em seu laboratório;
- . Aos Professores Doutores Marileila Varella Garcia e Celso Abba de Mourão, pelo carinho e disponibilidade com que sempre me acolheram e, principalmente, pelas valiosas discussões relacionadas aos dados deste trabalho;
- . Aos Professores Doutores Moacyr Antônio Mestriner e Aluísio José Gallo, membros da banca examinadora desta dissertação, pelas sugestões apresentadas após leitura da pro forma;
- . Ao Professor Doutor José Wilson Campos Batista, Vice-Reitor da FUFPI, exemplo de conduta profissional, pelo constante apoio e principalmente por acreditar em meu trabalho;
- . À Cleuzenir Toschi Gomes, bióloga estagiária do Centro de Referência de Hemoglobina, pela disponibilidade em me acompanhar durante as laboriosas coletas de sangue e assídua colaboração na parte técnica;
- . À Janice Batista Freire e Maria das Dores Alves, funcionárias do Departamento de Biologia da FUFPI, e também ao Doutor Meirelles, pela remessa das amostras de sangue;
- . Ao Professor Doutor Victor Manoel Salceda, pela colaboração na leitura da pro forma e constante troca de idéias;
- . Ao Professor Doutor James Robert Coleman, pela colaboração durante a redação do SUMMARY;
- . Aos professores e colegas do Curso de Pós-Graduação, pela convivência amigável e enriquecedora;
- . À Fundação Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade em concretizar meu sonho profissional;
- . À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida para realização do Curso de Pós-Graduação.

ÍNDICE

	página
I. INTRODUÇÃO.....	1
Hemoglobinas humanas	1
Hemoglobinopatias	6
Variabilidade genética e polimorfismo	24
A formação populacional do estado do Piauí.....	28
Objetivos	46
II. MATERIAL E MÉTODOS	47
III. RESULTADOS	70
IV. DISCUSSÃO	93
V. RESUMO E CONCLUSÕES	110
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS	113
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
VIII. APÊNDICES	136

INTRODUÇÃO

Hemoglobinas Humanas

As hemoglobinas humanas representam mais de 95% do conteúdo protéico solúvel dos eritrócitos e constituem um grupo de moléculas com propriedades estruturais e funcionais semelhantes. Em sua configuração quaternária, apresentam forma elipsóide com dimensões moleculares de aproximadamente 64 X 55 X 50 Å e peso de aproximadamente 64.000 dáltons (PERUTZ, 1976). Cada molécula de hemoglobina humana normal é composta de quatro subunidades, cada uma delas contendo uma cadeia protéica e um grupo heme denominado metaloporfirina. A metaloporfirina ocupa 3,55% da molécula e é o pigmento responsável pela cor vermelha da hemoglobina e função de transporte de oxigênio dos capilares alveolares aos tecidos do corpo. Esta porção é idêntica em todos os tipos de hemoglobinas, estando a variação presente apenas na porção protéica (HONING & ADAMS III, 1986). As cadeias protéicas que compõem as quatro subunidades da molécula de hemoglobina são idênticas, duas a duas, e designadas por cadeias do tipo alfa (α) e cadeias do tipo beta (β). As cadeias do tipo α possuem 141 aminoácidos cada e abrangem as cadeias zeta (ζ) e alfa (α); as cadeias do tipo β possuem 146 aminoácidos cada e abrangem as cadeias epsilon (ϵ), gama (γ), delta (δ) e beta (β). Em cada subunidade a ligação entre a globina e o heme se faz por meio do aminoácido histidina nas posições 87 nas cadeias do tipo α e na posição 92 nas cadeias do tipo β , sendo que o oxigênio fixa-se ao heme nas proximidades do aminoácido

histidina das posições 58 na cadeia α e 63 na cadeia β (PERUTZ, 1976).

As características da hemoglobina com relação à solubilidade, à afinidade ao oxigênio, à cooperatividade e ao efeito Bohr tornam esta proteína um excelente transportador de oxigênio. A afinidade da hemoglobina ao oxigênio é diretamente proporcional à pressão parcial desse gás, permitindo que uma molécula de hemoglobina parcialmente oxigenada tenha maior chance de tornar-se totalmente oxigenada do que uma que não esteja. O 2,3-difosfoglicerato e o efeito Bohr atuam como importantes reguladores fisiológicos da hemoglobina; a presença de fosfatos orgânicos diminui a afinidade ao oxigênio e o pH ácido aumenta tal afinidade (KILMARTIN, 1976). A conformação globular e oligomérica da molécula de hemoglobina deve-se à disposição dos helicóides em 75% do conteúdo molecular. Incluem-se, aí, as superfícies internas, cujos aminoácidos não polares promovem contatos interatômicos e ligações heme-globina que mantêm a estabilidade molecular. Os 25% restantes referem-se à superfície externa da molécula, onde os aminoácidos polares estabelecem contatos com o meio aquoso circundante (PERUTZ, 1976).

Os estudos sobre relações entre estrutura e função da molécula de hemoglobina tornaram possível identificar resíduos de aminoácidos responsáveis por funções específicas dessa molécula. Assim, a análise tridimensional da molécula de hemoglobina permite verificar cinco categorias de resíduos: 1) os que estão em contato com o grupo heme, protegendo-o contra a oxidação; 2) os que fazem contatos $\alpha_1\beta_1$, em número de 34, responsáveis pela estabilidade da molécula; 3) os que fazem contatos $\alpha_1\beta_2$, em número de 19, que permitem movimentos de deslizamento das cadeias α e β ; 4) os que se ligam ao 2,3-DPG na cadeia β e 5) os que estão envolvidos no efeito Bohr (EATON, 1980).

As cadeias dos tipos α e β combinam-se para formar as diferentes hemoglobinas, predominantes conforme a fase evolutiva que ocorre na espécie humana. Na fase embrionária aparecem a Hb Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$) e Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$), na fase fetal aparece a Hb Fetal ($\alpha_2\gamma_2$) e na fase pós-nascimento, notadamente depois do 6º mês de vida aparecem a Hb A₁ ($\alpha_2\beta_2$) e Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$).

Os genes estruturais responsáveis pela síntese das diferentes cadeias de globina têm sido extensivamente estudados. Cada gene é constituído por três seqüências codificadoras, ou *exons*, interrompidos por duas seqüências não-codificadoras, ou *introns*. Nos genes do complexo alfa, o primeiro intron possui 117 pares de bases (pb) e situa-se entre os codons 31 e 32; o segundo intron compreende 140 pb e localiza-se entre os codons 99 e 100 (LIEBHABER e col, 1980). Nos genes do complexo beta, o primeiro intron compreende aproximadamente 120 pb e situa-se entre os codons 30 e 31, enquanto o segundo intron, com aproximadamente 800 pb, interrompe a seqüência do gene nos codons 104 a 105 (LAWN e col, 1980). Os estudos de seqüenciação dos genes da globina e de seus produtos permitem sugerir a existência de relação entre determinadas seqüências codificadoras e sítios funcionais específicos na estrutura da molécula de hemoglobina. Assim, segundo EATON (1980); CRAIK e col (1981) e GÕ (1981) o exon central dos genes das cadeias α e β codificam muitos dos resíduos que fazem contato com o grupo heme.

O produto da transcrição dos genes estruturais — RNA heterogêneo ou transcrito primário — possui em sua estrutura, além dos exons, seqüências que não são traduzidas. Essas seqüências compreendem os introns e pequenos segmentos presentes nas extremidades 5' e 3' dessa molécula. Na extremidade 5'

o estudo de sequenciação demonstrou a presença de dois blocos de homologia que estão presentes na maioria dos genes eucariotos em posições análogas. Esses blocos localizam-se a 29 — 30 pb e 70 — 78 pb de cada gene e referem-se às sequências "TATA box" e "CCAAT box", respectivamente.

Da mesma forma que ocorre no processo de síntese das outras proteínas, o RNA transcrito é modificado antes de se converter em RNA_m funcional. Essas modificações constituem a fase de processamento do RNA_m e compreendem três eventos: 1) a excisão dos introns e união dos exons cujo fenômeno é denominado "splicing"; 2) a formação do capuz na extremidade 5' através da adição de um ácido guanílico metilado e 3) a formação da cauda de poli-A na extremidade 3', através da adição de uma série de resíduos de ácido adenílico.

O processo denominado "splicing" é importante para a formação de um RNA_m que atue como molde para a cadeia polipeptídica, e requer a participação de endonucleases bem como moléculas específicas de RNA nuclear das quais o RNA U₁ é o exemplo melhor caracterizado (BUSCH e col, 1982). Esses elementos reconhecem sequências específicas na junção intron-exon, tais como GU no extremo 5' e AG no extremo 3' dos introns e outras situadas próximo a esses sítios. Essas sequências têm sido altamente conservadas e são idênticas nos genes tipo α e β . Mutações nessas regiões têm sido associadas com diversos tipos de talassemia, pois acionam novos sítios de "splicing" levando à deficiência ou adição de segmentos extras no RNA_m processado.

O capuz 5' metilado é essencial na formação do complexo RNA_m - ribossomo, que controla a iniciação da síntese do polipeptídeo, e na proteção do RNA_m contra o ataque de fosfatases e exonucleases à extremidade 5', mantendo sua estabilidade.

A poliadenilação parece diminuir a susceptibilidade do RNA à desnaturação térmica e ação de ribonucleases citoplasmáticas na extremidade 3'; assim, a cauda de poli-A provavelmente protege e estabiliza a molécula de RNA_m. Mutações nas seqüências não traduzidas também estão associadas à fenótipos talassêmicos em decorrência da instabilidade do RNA_m processado (referências em COLLINS & WEISSMAN, 1984 ; SPRITZ & SANTEN, 1984 e HONING & ADAMS III, 1986).

O emprego das técnicas de hibridização celular somática, hibridização molecular, hibridização "in situ" e a utilização de enzimas de restrição têm permitido localizar genes específicos nos cromossomos. Os genes do complexo alfa de globinas humanas localizam-se no cromossomo 16, na região p12-pter (DEISSEROTH e col, 1977; KOEFLER e col, 1981; BARG e col, 1982 e BARTON e col, 1982), e os genes que codificam as cadeias do tipo beta localizam-se no cromossomo 11 na região 11p15 (DEISSEROTH e col, 1978; LEBO e col, 1979; MORTON e col, 1984).

O complexo gênico tipo α ocupa uma região de aproximadamente 30 Kb (30.000 pares de base) e contém cinco genes dispostos na ordem: 5' - ζ - $\psi\zeta_1$ - $\psi\alpha_1$ - α_2 - α_1 - 3', sendo que estes genes se expressam nessa mesma ordem no decorrer do desenvolvimento humano (LAUER e col, 1980). O complexo gênico tipo β (HBBC) ocupa uma extensão de aproximadamente 70 Kb, e é composto por 7 genes dispostos na ordem: 5' - $\psi\beta_2$ - ϵ - γ^G - γ^A - $\psi\beta_1$ - δ - β - 3' sendo que é nessa mesma ordem que os genes funcionais para globinas embrionárias, fetal e adulta se expressam no indivíduo (MORTON e col, 1984).

A sequência nucleotídica completa dos genes funcionais e pseudogenes para hemoglobinas já está estabelecida. Esses resultados tornam possíveis comparações detalhadas das porções codificadoras e não-codificadoras desses genes, facilitando, assim, o estudo de relações filogenéticas entre eles e com outras espécies. Assim, por exemplo os genes ζ e $\psi\zeta$ foram sequenciados por PROUDFOOT e col (1982); a comparação das cadeias ζ com as cadeias α foi feita por CLEGG e col (1981); a comparação dos genes α_1 e α_2 foi feita por MICHELSON e col (1980) LIEBHABER e col (1980 e 1981) e ORKIN e col (1981); a homologia entre o gene $\psi\alpha$ e os genes α_1 e α_2 foi apresentada por LAUER e col (1980) e PROUDFOOT e col (1980); a homologia entre os genes α e β , por SPRITZ e col (1980) e LAWN e col (1980); a sequenciação do gene ϵ foi realizada por BARALLE e col (1980); a identificação de um sítio homólogo entre os genes γ^G e γ^A susceptível para trocas intergênicas foi feita por SHEN e col (1981); evidências para essa suposição foram propostas por SLIGHTON e col (1980) e TRENT e col (1981) e estimativas das divergências evolutivas entre os diferentes genes do complexo alfa e beta foram feitas por EFSTRATIADIS e col (1980).

As Hemoglobinopatias

Os diferentes mecanismos mutacionais que ocorrem no material genético, responsável pela síntese das globinas, determinam a ampla variabilidade de tipos de hemoglobina e alterações na síntese de cadeias alfa e do complexo beta. A varia-

bilidade de tipos de hemoglobina origina as hemoglobinas variantes e as alterações na síntese de cadeias determina um grupo de anomalias designado talassemia.

O desenvolvimento da tecnologia relacionada aos métodos de hibridização molecular, clonagem e análise por oligonucleotídeos tem demonstrado que todos os fenótipos anormais relacionados às moléculas de hemoglobina resultam de mecanismos mutacionais semelhantes, os quais podem ser sintetizados em: mutações de ponto; recombinação genética, deficiência e inserção de nucleotídeos no DNA. Estes eventos, ocorrendo nos genes alfa e beta têm resultado na existência de aproximadamente 568 variantes de hemoglobina e formas diferentes de talassemia (IHIC, 1986).

Hemoglobinas variantes

As hemoglobinas variantes podem ser agrupadas em diferentes categorias com base no mecanismo mutacional que as originou, sendo que em todas há variantes que não determinam alterações nos parâmetros hematológicos e clínicos (HUISMAN, 1986). Entre o total de variantes conhecidas, o maior número é decorrente da substituição de base nos segmentos codificadores dos genes. Similarmente ao que ocorre em outros sistemas proteicos, certas substituições de base são mais frequentes que outras. Segundo BUNN e col (1972) a transição purina-purina com a substituição adenina-guanina tem frequência superior à esperada como evento casual em mutantes de hemoglobina.

As mutações de ponto têm originado a existência de 202 variantes de cadeia α , 257 de cadeias β , 17 de cadeia δ



e 42 variantes de cadeia γ (IHIC, 1986). Este evento determina a substituição de um aminoácido nas diferentes regiões da molécula, produz codons sem sentido e altera codons de terminação, transformando-os em codificadores (GLASS, 1982). No primeiro caso, as variantes resultantes apresentam alterações físico-químicas de diferentes intensidades, sempre na dependência das características do aminoácido substituído e do local da molécula onde o evento ocorreu. A variante Hb S caracteriza um exemplo desse tipo de mutação na cadeia beta, na superfície externa da molécula ($\beta_6^{\text{Glu} \rightarrow \text{Val}}$), enquanto a Hb Chesapeake tem a substituição ($\alpha_{92}^{\text{Arg} \rightarrow \text{Leu}}$) no local de contato $\alpha_1\beta_2$ (WRIGHTSTONE, 1986). Duplas substituições na mesma cadeia têm sido descritas em cinco variantes: Hb C-Harlem ($\beta_6^{\text{Glu} \rightarrow \text{Val}}$), ($\beta_{73}^{\text{Asp} \rightarrow \text{Asn}}$); Hb Arlington Park ($\beta_6^{\text{Glu} \rightarrow \text{Lys}}$; $\beta_{95}^{\text{Lys} \rightarrow \text{Glu}}$); Hb C-Ziguinchor ($\beta_6^{\text{Glu} \rightarrow \text{Val}}$; $\beta_{58}^{\text{Pro} \rightarrow \text{Arg}}$); Hb S-Travis ($\beta_6^{\text{Glu} \rightarrow \text{Val}}$; $\beta_{142}^{\text{Ala} \rightarrow \text{Val}}$) e Hb J-Singapore ($\alpha_{78}^{\text{Asn} \rightarrow \text{Asp}}$; $\alpha_{79}^{\text{Ala} \rightarrow \text{Gly}}$). A hipótese para o surgimento desse tipo de variante é a recombinação entre genes homólogos de portadores dessas substituições em estado simples, pois foi verificado que elas ocorrem em populações onde as substituições em estado simples estão presentes (HONING & ADANS III, 1986).

A mutação de ponto que produz codons sem sentido origina cadeias com deficiência de aminoácidos. Foi descrita uma variante, a Hb Mc Kess Rocks, que possui um codon de terminação na posição β^{145} , a qual tem afinidade aumentada ao oxigênio e está associada à eritrocitose (HUISMAN, 1986). A substituição de base que origina codons com sentido determina as variantes com cadeia alongada no radical C-terminal, como a Hb Constant Spring ($\alpha_{141} + 31$), Hb Icaria ($\alpha_{141} + 31$),

Hb Koya Doha ($\alpha 141 + 17$), Hb α Seal Rock e no radical NH_2 terminal, como, a Hb Long Island-Marseille e Hb Doha, ambas variantes de cadeia β (WRIGHTSTONE, 1986).

O processo de recombinação genética, responsável pela origem de variantes estruturais de globina, refere-se à troca de partes de genes não homólogos em situações de pareamento irregular de cromossomos homólogos na meiose. As variantes apresentam os extremos N-terminal e C-terminal de cadeias diferentes. São conhecidas nove variantes com fusão de cadeias, e todas envolvendo cadeias do tipo beta. O desalinhamento desses genes é favorecido pela grande homologia de sequência que apresentam. Entre os códons 87 e 116 dos genes β e δ há um segmento com seqüências idênticas (SPRITZ e col 1980), e esses pontos representam locais de fusão no tipo mais comum de hemoglobina com cadeia híbrida, a Hb Lepore Boston. Foram descritas três variantes de Hb Lepore: Hb Lepore-Hollandia com o padrão $\delta 22-\beta 50$, a Hb Lepore Baltimore, com o padrão $\delta 50-\beta 86$ e a Hb Lepore Boston $\delta 87-\beta 116$ (HONING & ADANS III, para referências). Outras variantes com cadeias híbridas, e que presumivelmente se originam por processo semelhante ao descrito, são: Hb Myada ($\beta 12-\delta 22$); Hb Congo ($\beta 22-\delta 116$); Hb P-Nilotic ($\beta 22-\delta 50$); Hb Kenia ($\gamma 81-\beta 86$) e Hb Lincoln Park ($\beta 22-\delta 50-137 \rightarrow 0$). Indivíduos portadores dessas variantes apresentam características hematológicas de talassemia com baixo nível de síntese da cadeia híbrida (HUISMAN, 1986).

A deficiência e inserção de uma ou duas bases, ou de codons completos nos segmentos de DNA, representam formas especiais de recombinação genética. Verificou-se que esses eventos ocorrem em locais (ou próximo a locais) com seqüências

nucleotídicas repetidas, em geral de dois a oito pares de bases, o que, provavelmente, permite um pareamento não homólogo entre cromátides, seguida de recombinação (LANG & LORKIN, 1976). Esse evento foi observado em cadeias α , β e δ e explica a origem de 16 variantes. Desse total, quatro apresentam sequência de aminoácidos modificada, em decorrência da alteração na matriz de leitura do RNA_m. São elas: Hb α Wayne e Hb β Saverne - por deficiência de um nucleotídeo; Hb β Tak e Hb β Cranston - por inserção de dois nucleotídeos (HONING & ADAMS III, 1986 para referências).

De acordo com Heller (1968) e Saenz (1978), as hemoglobinas variantes podem ser classificadas em cinco grupos com base nas suas características funcionais: hemoglobinas sem alterações fisiológicas, hemoglobinas de agregação, hemoglobinas instáveis, hemoglobinas com alterações funcionais e variantes com fenótipos talassêmicos. O primeiro grupo compreende a maioria das variantes resultantes da substituição de aminoácidos na superfície externa da molécula. Essas hemoglobinas não produzem efeitos clínicos significativos nem alterações hematólógicas; são de interesse bioquímico, genético e antropológico. São exemplos dessas variantes, a Hb D Punjab ($\beta_{121}^{Glu \rightarrow Gln}$) freqüente na Índia, Europa e China, a Hb I ($\alpha_{16}^{Lys \rightarrow Glu}$), freqüente em Negros Norte Americanos e em Europeus, a Hb J Baltimore ($\beta_{16}^{Gly \rightarrow Asp}$), freqüente em Africanos e Europeus, a Hb G Philadelphia ($\alpha_{68}^{Asn \rightarrow Lys}$), freqüente na África e na América do Norte onde alcança freqüência de 0,0001 (WRIGHTSTONE, 1986), e a Hb E ($\beta_{26}^{Gly \rightarrow Lys}$) freqüente na Europa e no Sudeste da Ásia, on-

de atinge aproximadamente 30 milhões de pessoas e associa-se com talassemia alfa e beta. (BOSISIO e col, 1985). As hemoglobinas D Punjab, J Baltimore, I e G Philadelphia foram também descritas em diversas regiões brasileiras (NAOUM e col , 1986).

As hemoglobinas de agregação caracterizam-se pela formação de tactóides e cristais nas hemácias de portadores, com repercussões clínicas e hematológicas. Exemplos dessas variantes são a Hb S, a Hb C, a Hb C-Harlem, a Hb C-Ziguinchor e a Hb S-Travis (IHIC, 1986). A Hb C é freqüente entre os povos da África, especialmente África Ocidental, onde sua prevalência alcança valores entre 15 a 30%; a Hb S é freqüente em uma extensa área que vai da Costa Oeste à Costa Leste no terço médio superior do continente africano. Ambas são consideradas hemoglobinas africanas e têm prevalências consideradas altas em regiões latino-americanas como Jamaica, Honduras e Suriname, onde a freqüência de Hb AS é similar à dos países da Costa Ocidental da África (LEHMAN & HUNSTMAN, 1974; BARNHART e col, 1976; VOGEL & MOTULSKY, 1982). No Brasil, as prevalências das hemoglobinas S e C variam regionalmente, sendo mais altas no Nordeste e mais baixas no Sul (NAOUM e col , 1986).

As hemoglobinas instáveis apresentam graus variáveis de manifestações clínicas e hematológicas, expressando-se por meio de intensa instabilidade molecular sob calor e agentes químicos, ou pela presença de corpos de Heinz nos eritrócitos (WHITE, 1976; MILNER & WRIGHTSTONE, 1981). Foram descritas 112 variantes instáveis oriundas de substituições de aminoácidos, sendo 75% de cadeia beta (IHIC, 1986). Das variantes instáveis, 35% apresentam alterações na afinidade ao oxigênio, sempre associadas à anemia hemolítica; entre os exemplos destacamos a Hb Bibba

($\alpha 136^{\text{Leu} \rightarrow \text{Pro}}$) com mutação no pacote do heme, a Hb Atlanta ($\beta 75^{\text{Leu} \rightarrow \text{Pro}}$) com mutação na face interna e a Hb Toyoake ($\beta 142^{\text{Ala} \rightarrow \text{Pro}}$) com mutação nos locais de ligação com 2,3-DPG (WRIGHTSTONE, 1986).

As variantes com alterações funcionais agrupam aquelas que determinam metemoglobinemia e as que apresentam alterações na afinidade ao oxigênio. As primeiras resultam da substituição da histidina proximal ou distal por outro aminoácido, de características diferentes, em geral a tirosina (WINSLOW & ANDERSON, 1983; HEGESH e col, 1986). As variantes descritas são: Hb M Saskatoon ($\beta 63^{\text{His} \rightarrow \text{Tyr}}$), Hb M Milwaukee -I ($\beta 67^{\text{Val} \rightarrow \text{Glu}}$), Hb M Hyde Park ($\beta 92^{\text{His} \rightarrow \text{Tyr}}$), Hb M-Boston ($\alpha 58^{\text{His} \rightarrow \text{Tyr}}$), Hb M Iwate ($\alpha 87^{\text{His} \rightarrow \text{Tyr}}$), Hb F M-Osaka ($\gamma 63^{\text{His} \rightarrow \text{Tyr}}$) (WRIGHTSTONE, 1986). Essas variantes têm sido descritas em todos os continentes. Frequentemente, os portadores são filhos de pessoas normais, tal qual ocorre em portadores de Hb instáveis. As metemoglobinas determinam cianose e o estado homozigoto é incompatível com a vida, já que esta forma de hemoglobina é incapaz de transportar o oxigênio (BELLINGHAM, 1976). A metemoglobinemia é um estado fisio-patológico que ocorre quando há mais de 3% de hemoglobina oxidada para a forma férrica. (SAENZ, 1980). As hemoglobinas com afinidade aumentada ao oxigênio apresentam substituição dos aminoácidos que fazem os contatos $\alpha_1\beta_2$ (ou $\alpha_2\beta_1$) ou entre as duas subunidades beta ($\beta_1\beta_2$); são exemplos dessas variantes: Hb Chesapeake ($\alpha 92^{\text{Arg} \rightarrow \text{Leu}}$), Hb Hiroshima ($\beta 146^{\text{His} \rightarrow \text{Asp}}$) e Hb Legnano ($\alpha 141^{\text{Arg} \rightarrow \text{Leu}}$) (IHIC, 1986; WRIGHTSTONE, 1986). Esse grupo de variantes constitui hemoglobinas raras que frequentemente estão associadas à eritrocitose.

Entre as variantes com fenótipo talassêmico, des

tacam-se: a Hb Lepore Boston, descrita na Itália, Grécia, Austrália, Jamaica e Espanha e a Hb Lepore Hollandia, com alta afinidade ao oxigênio e de frequência rara (GIMFERRER e col, 1976; VILLEGAS e col 1984; IHIC, 1986). Ambas determinam fenótipo de beta talassemia e podem ser encontradas em estado homozigoto e heterozigoto (WHEATHERALL & WAINSCOT, 1985); a Hb Quong Sze ($\alpha_{125}^{\text{Leu} \rightarrow \text{Pro}}$) descrita na China, e a Hb Constant Spring são hemoglobinas instáveis, sendo que a última determina fenótipo de doença de Hb H e é relativamente comum na China, Malásia e Tailândia (WASI e col, 1975; HUISMAN; 1986). A Hb Constant Spring já foi detectada na população brasileira (NAOUM e col, 1984; NAOUM e col, 1986).

Talassemias

As talassemias são caracterizadas pela redução na taxa de síntese de uma ou mais das cadeias de globina, sendo classificadas de acordo com a cadeia polipeptídica produzida em taxa reduzida. Assim, as talassemias podem ser do tipo alfa (α), beta (β), delta-beta (δ - β), gama-delta-beta (γ - δ - β), epsilon-gama-delta-beta (ϵ γ δ β) e persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF) (WEATHERALL & CLEGG, 1982). As talassemias do tipo α e do tipo β são classificadas em α^0 e β^0 , quando estas cadeias não são sintetizadas, e α^+ e β^+ quando ocorre apenas redução na produção das mesmas (WHEATHERALL & WAINSCOOT, 1985). Os mecanismos determinantes das talassemias podem ser agrupados em dois tipos: os que se relacionam a mutações nas porções codificadoras e aqueles que se relacionam a alterações em regiões

não codificadoras, porém importantes na expressão gênica.

As talassemias do tipo α podem ser devidas a deficiências de segmentos de DNA no complexo alfa ou devidas a mutações por não deficiência. As endonucleases de restrição identificam alterações nos tipos decorrentes de deficiência gênica. (KAN e col , 1979). Essas alterações relacionam-se à extensão dos fragmentos de DNA quando separados por endonucleases de restrição, tal como a Eco RI (EMBURY e col , 1979; EMBURY e col . 1980). Com base no comprimento dos segmentos de DNA dos genes α separados, é possível relacioná-los aos quatro fenótipos descritos nessa síndrome: Normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), Hidropisia Fetal(--/--), Doença de Hemoglobina H (--/- α) e Estado do Portador Silencioso (--/ $\alpha\alpha$), (α -/ α -) e (- α / $\alpha\alpha$) (BANK, 1981 para referências). São descritos sete tipos de deficiências gênicas na talassemia do tipo alfa, sendo que dois foram reconhecidos como decorrentes de recombinação genética em diferentes pontos do complexo alfa (EMBURY e col , 1980; LIEBHABER & KAN, 1981; TRENT e col ,1981b). Em um deles ocorre a remoção de um segmento de 3,7 Kb, o que determina uma fusão dos genes α_1 e α_2 , no outro, há a remoção de um segmento de 4,2 Kb que elimina o gene α_2 . O primeiro tipo é mais comum e predomina nas populações mediterrâneas (PIRASTU e col , 1982) negras (HIGGS e col 1980) e árabes (PRESSLEY e col, 1980b), enquanto que o segundo tipo foi identificado em asiáticos e é raro no Mediterrâneo (TROUNGOS e col , 1984). Essas deficiências constituem formas de $\alpha\alpha^+$. TRENT e col (1981b) descreveram indivíduos com três genes alfa em um cromossomo e dois no outro, ou seja, cinco genes ao todo. A fre-



quência do locus triplicado é baixa, em torno de 0,004 na Sardênia e 0,05 nos gregos (BUNN e FORGET, 1986). Segundo esses autores, o produto de genes alfa triplicados é usualmente igual ao do loco duplicado normal, embora pareça haver um excesso de RNA_m em alguns indivíduos. Alguns locos triplicados são associados com níveis de síntese de cadeias alfa acima do normal, enquanto outros estão paradoxalmente associados com síntese diminuída e fenótipo talassêmico.

As demais deficiências descritas determinam o fenótipo de talassemia α^+ . Nesses tipos, os segmentos deficientes são mais extensos, tais como o de 5,2 Kb, em gregos (PRESSLEY e col 1980a) e um segmento de aproximadamente 25Kb, descrito na Malásia, Filipinas e África e relativamente comum em populações do Mediterrâneo (ORKIN & MICHELSON, 1980; FELICE e col, 1984) a qual impede a expressão do complexo α inteiro. Diferentes deficiências também têm sido descritas nos genes ζ , em populações negras da América (FELICE, 1986).

Outros eventos mutacionais, por não deficiência gênica, determinam fenótipos de talassemia α^+ (WEATHERALL e col 1984; WEATHERALL e col, 1985; KAN, 1986). Assim, foram detectadas quatro diferentes substituições de bases alterando o codon de terminação de cadeia (UAA) no 3º exon do gene α_2 , originando as variantes Hb Constant Spring (CLEGG e col, 1971), Hb Icaria (CLEGG e col, 1974), Hb Seal Rock (BRADLEY e col, 1975) e Hb Koya Dora (DEJONG e col, 1975). Indivíduos com Hb Constant Spring apresentam cerca de 5% dessa hemoglobina, RNA_m bastante diminuído na medula óssea e ausente nos reticulócitos; provavelmente isso ocorra devido à instabilidade dessa molécula com cadeia alongada. Foi também detectada uma substituição de base

(GTG $\rightarrow$ CCG) no 3º exon, determinando uma variante altamente instável - a Hb Quong Sze - que é rapidamente destruída em decorrência de essa mutação alterar a formação do dímero $\alpha_1\beta_1$ (GOOSSENS e col, 1982; LIEBHABER & KAN, 1983).

A deficiência de cinco pares de bases (TGAGG) na junção do 1º intron com o extremo 3' do 1º exon do gene α_2 , determina o "splicing" anormal do RNA_m transcrito, devido à perda da sequência GT, necessária para reconhecimento pela enzima de restrição; o RNA_m processado de forma anormal é rapidamente destruído (ORKIN e col, 1981). Esse tipo de talassemia α^+ é comum nas populações do Mediterrâneo. Pirastu e col (1984) descreveram uma substituição nucleotídica (AUG $\rightarrow$ ACG) no codon de iniciação do gene α_2 que resulta na ausência de cadeias a partir desse loco. Na Arábia Saudita é comum a doença de Hemoglobina H decorrente de alterações moleculares envolvendo os dois genes α do mesmo cromossomo. No gene α_2 ocorre uma substituição de base no sinal de poliadenilação (AATAAA $\rightarrow$ AATAAG) (HIGGS e col, 1983) e no gene α_1 , a deficiência de um nucleotídeo no codon 14 do 1º exon, o qual determina a alteração de matriz de leitura (KAN, 1986).

Segundo COLLINS e col (1984) e WEATHERALL e col (1985) são descritos quatro tipos básicos de alterações mutacionais determinando o fenótipo de talassemia beta: deficiência gênica, mutações para terminação de cadeia, mutações que resultam em alterações no promotor e mutações que resultam no processamento anormal do RNA_m.

ORKIN e col (1979) e THEIN e col (1984) descreveram uma deficiência de 619 pares de base, estendendo-se a



partir do extremo 3' do segundo intron, como causa de tal β^0 em algumas populações da Índia.

As mutações para terminação de cadeia compreendem as que alteram a matriz de leitura e as mutações sem sentido. Foram descritas mutações sem sentido nos codons 15, 17 e 39. Essas alterações afetam a estabilidade do RNAm no núcleo, o seu transporte para o citoplasma e determinam o fenótipo de tal β^0 (CHANG & KAN, 1979; MOSCHONAS e col, 1981; TRECARTIN e col, 1981; ORKIN & GOFF, 1981a; GORSKI e col, 1982; KAZAZIAN e col, 1984).

As alterações na matriz de leitura, decorrentes da inserção ou deficiência de 1, 2 e 4 bases têm sido descritas como causas de tal β^0 . A primeira dessas lesões descritas consta de uma deficiência de duas bases no codon nº 8 que origina um codon de terminação na posição nº 22 (ORKIN & GOFF, 1981b). KINNIBURG e col (1982) descreveram uma deficiência no codon 44 que determina um códon de terminação na trinca relativa ao nº 60. Esses autores sugerem que o RNAm resultante é instável por alteração da estrutura tridimensional da molécula, a qual tem susceptibilidade aumentada à ação das endonucleases.

As mutações que resultam na alteração das sequências promotoras determinam fenótipos de tal β^+ . Assim, já foram descritas duas mutações no "CCAAT box" e quatro no "TATA box" as quais determinam diminuição substancial de RNAm sintetizado (PONCZ e col, 1982; ORKIN e col, 1983; ANTONARAKIS e col, 1984; TAKIHARA e col, 1986). Esses eventos têm sugerido que o gene para globina δ pode ser considerado do tipo que determina fenótipo talassêmico, já que a cadeia codificada por esse gene é sintetizada em baixa quantidade em decorrência de uma alteração na região do promotor (referências em NIENHUIS e col, 1984).

Um grande número de mutações descritas está relacionado com eventos de processamento do transcrito primário, tais como "splicing" e poliadenilação. Têm sido observadas substituições e deficiências de bases alterando as seqüências invariantes nos locais de junção entre introns e exons. Essas seqüências são importantes para o reconhecimento pelas enzimas de restrição. Outras substituições ocorrem nos introns, criando novos sítios de "splicing" (referências em ORKIN e col, 1982 ; COLLINS e col, 1984 ; NIENHUIS e col, 1984; WHEATHERALL e col, 1984; WHEATHERALL & WAINSCOT, 1985; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985). BANK e col (1985) descreveram uma mutação no codon 705 no intron 2 a qual ativa uma seqüência consenso na posição 580, determinando fenótipo de tal. β^0 estudos desse gene têm indicado que nos introns há seqüências responsáveis pela expressão ótima do gene. e que, quando modificadas, levam a padrões marcantes de alterações de "splicing"; substituições nos exons também têm sido relacionadas com a formação de novos sítios de "splicing". Um exemplo é a variante estrutural Hb E (β^{26} ^{GAG→AAG}). GOLDSMITH e col (1983), estudando a expressão do gene Hb E em células HeLa verificaram processamento anormal do RNA caracterizado pela excisão diminuída do intron 1 e um "splicing" alternativo no codon 26.

A mutação no sinal de poliadenilação, descrita em negros, altera a seqüência AATAA para AACAA, determinando redução acentuada no RNA processado normalmente. O fenótipo resultante é uma forma moderada de tal β^+ (ORKIN e col, 1985).

Alguns tipos de mutações do gene β parecem ser predominantes em determinados grupos étnicos (KAZAZIAN e col, 1984). Nas populações do Mediterrâneo, por exemplo, são

predominantes as mutações sem sentido no codon 39, alterações de matriz nos codons 6 e 8 e mutações nos sítios 1 e 6 do primeiro intron e nos sítios 1 e 745 do segundo intron. Na Itália, as duas formas mais frequentes são a mutação sem sentido GAG $\rightarrow$ TAG, que determina tal β^0 , e a substituição G $\rightarrow$ A no sítio 110 que determina tal β^+ , sendo que na Sardênia a mutação sem sentido no codon 39 é a mais comum (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985).

Deficiências de segmentos extensos no complexo beta têm sido relacionados aos fenótipos de tal $\delta\beta$, tal $\gamma\delta\beta$ e tal $\epsilon\gamma\delta\beta$ (FRITSCH e col, 1979; TUAN e col, 1980; KUTLAR e col, 1984). As tal $\delta\beta$ e algumas formas de PHHF resultam de grandes deficiências dos genes γ δ β . Essas condições são caracterizadas pela ausência de cadeias δ e β no homozigoto, o qual tem apenas HbF; em alguns casos a deficiência envolve o gene A_γ e a HbF contém apenas G_γ . As tal $\delta\beta$ e as formas de PHHF são todas associadas com altos níveis de síntese de cadeias δ na vida adulta e em maior quantidade na PHHF, o que determina ausência de efeitos clínicos nessa patologia (referências em COLLINS & WEISSMAN, 1984; WEATHERALL e col, 1984; HONING & ADAMS III, 1986).

Duas formas de PHHF devidas a deficiência têm particular importância na elaboração de hipóteses relativas aos mecanismos de controle das hemoglobinas fetal e adultas, as quais diferem nas extremidades 5' dos segmentos deficientes. Tem si-

do postulado que seqüências entre os genes A_γ e δ estão relacionadas a esse controle. Estudos comparando deficiências para PHHF e tal $\delta\beta$ permitiram concluir que a ausência da seqüência entre 4,1 e 2,5Kb para o extremo 5' do gene δ constitui-se em condição crítica para determinar a PHHF (HONING & ADAMS III, 1986 para referências).

A utilização de endonucleases de restrição demonstrou, por outro lado, que existem quatro tipos de PHHF não devidas a deficiência. Os tipos descritos são: o Grego, em que predominam as cadeias do tipo γ^A -o heterozigoto tem 10-20% de HbF com distribuição uniforme nos eritrócitos; o Chinês, em que predominam as cadeias do tipo A_γ -o heterozigoto tem 10-14% de HbF com distribuição heterogênea nos eritrócitos; o Africano, com ausência de cadeias A_γ -o heterozigoto tem 16-20% de HbF com distribuição uniforme nos eritrócitos e o Britânico, onde há produção de HbA e HbA₂, sendo que a HbF tem distribuição heterogênea nos eritrócitos (HONING & ADAMS III, para referências). Essas formas de PHHF são devidas a mutações de ponto. Foram descritas mutações na região do promotor dos genes A_γ e G_γ , que estão associadas ao aumento na eficiência transcricional desses genes (COLLINS e cols, 1984; GILMAN & HUISMAN, 1984; FEINGOLD e col 1985; WABER e col, 1986). Em outras formas foram identificadas mutações distantes dos genes γ (OLD e col 1982) e um caso associado a translocação cromossômica do tipo balanceada (JENSEN e col 1984).

Os fenótipos talassêmicos podem, portanto, ser determinados por alterações relacionadas à transcrição dos ge-

nes estruturais, aos mecanismos de processamento do RNAm e à instabilidade da molécula protéica.

Os indivíduos homozigotos para talassemia α^0 apresentam ausência total de cadeias alfa e desse fato decorre o acúmulo de cadeias beta despareadas, durante a fase fetal, com conseqüente formação de tetrâmeros γ_4 (Hb Barts) e manutenção da síntese de Hb Portland ($\delta_2\gamma_2$). A Hb Bart's constitui cerca de 90% da hemoglobina total do feto sendo a causa da hipóxia com conseqüente hidropisia fetal, provocando morte nessa fase ou morte neo-natal. Os heterozigotos apresentam, ao nascer, 5-10% de Hb Bart's e baixos níveis de HCM e VCM. Indivíduos homozigotos para talassemia α^+ , por deficiência gênica, apresentam as mesmas características de heterozigotos para tal α^0 , enquanto que os heterozigotos têm, ao nascer, 0-2% de Hb Bart's e discretas alterações hematológicas. Indivíduos homozigotos para talassemia α^0 devido à não-deficiência têm doença de HbH e os heterozigotos têm 0-2% de Hb Bart's ao nascer, e graves alterações hematológicas. Portadores de Hb Constant Spring em homozigose têm 5-6% dessa hemoglobina enquanto o heterozigoto tem, ao nascer, 0,5-1% de Hb Constant Spring e 0-2% de Hb Bart's. Portadores da doença de HbH apresentam grau variado de anemia e esplenomegalia e usualmente não requerem transfusões de sangue. As células vermelhas têm hipocromia evidente e variação no tamanho. Ao nascer, o indivíduo apresenta 1-25% de Hb Bart's e o adulto tem 5-40% de HbH. Portadores silenciosos têm 0 a 2% de Hb Bart's ao nascer (WHO WORKING GROUP, 1982).

O fenótipo de talassemia α^0 é raro em negros, enquanto que a talassemia α^+ heterozigota e homozigota ocorre com frequências respectivas de 30% e 4% entre os negros da Jamaica

e América do Norte (EMBURY e col ,1985; STEVENS e col , 1986 ; STEINBERG e col, 1986). Nessas populações é comum a interação entre talassemia α e o gene para Hb S em homozigose e heterozigose, foi observado que essa interação modifica o quadro hematológico da falcemia (EMBURY, 1986; STEVENS e col, 1986).

A ausência ou diminuição de cadeias beta gera um desequilíbrio na síntese de hemoglobina o que determina a precipitação do excesso de cadeias alfa nos eritroblastos. Essa precipitação, no núcleo, leva a um bloqueio da síntese do DNA, e parada na fase G1 do ciclo celular. A eritropoiese ineficaz é responsável pela anemia, e aumento da absorção do ferro - características da talassemia (referências em WEATHERALL & CLEGG , 1981).

Os tipos mais comuns de talassemia beta são: β^0 , β^+ - Mediterrâneo, β^{++} - Africano, β^+ -Silencioso, e β^+ ou β^0 com Hb A₂ normal (WHO, 1982). Fenotipicamente distinguem-se três formas: 1) talassemia beta homozigota ou beta maior; 2) talassemia beta heterozigota ou beta menor e 3) talassemia beta intermédia.

Indivíduos β^0/β^0 tem cerca de 100% de Hb Fetal enquanto que aqueles com β^+/β^+ , do tipo Mediterrâneo, apresentam cerca de 20 a 80% de Hb Fetal. Esses indivíduos apresentam um conjunto de manifestações que caracterizam a anemia de Cooley ou talassemia maior, com alterações clínicas decorrentes de anemia hemolítica crônica grave, apresentando repercussão acentuada sobre o crescimento e o desenvolvimento, hepatomegalia, esplenomegalia e alterações ósseas típicas. Essas manifestações podem, contudo, estar presentes também em portadores dos genótipos β^0/β^+ ou tal $\delta\beta$ homozigota. Indivíduos heterozigotos β^0 e β^+ - Mediterrâ-

neo apresentam talassemia menor com níveis de Hb A₂ que variam de 3,5 a 7,0% e anemia leve que piora nas situações de estresse e na gravidez. Indivíduos homozigotos β^{++} -Africano apresentam talassemia intermêdia, Hb Fetal variável de 20-40% e Hb A₂ variável de 2-5%. O heterozigoto tem talassemia menor e Hb A₂ variável de 3,5-7,0%. Indivíduos com o gene β^0 -Silencioso em homozigose tem talassemia intermêdia e Hb Fetal variável de 10-30% enquanto em heterozigose os portadores são considerados normais. Indivíduos com o gene β^+ ou β^0 , que tem Hb A₂ normal, apresentam características mais graves, o homozigoto tem talassemia maior e o heterozigoto, talassemia menor (referências em WEATHERALL & CLEGG, 1981; WHO, 1982; NAOUM 1987).

A talassemia intermêdia compreende um conjunto de tipos de talassemia beta em que o indivíduo pode sobreviver sem transfusões de sangue e não apresentam comprometimento do crescimento e da fertilidade. O quadro fenotípico é variável entre talassemia maior e menor (WHO, 1982). Os mecanismos moleculares relacionados a esse fenótipo compreendem: 1) presença de genes β^+ , pois nesses casos ocorre apenas redução na síntese de cadeias beta; 2) síntese aumentada de cadeias γ , o que ocorre nos casos de PHHF e 3) associação com talassemia alfa, por redução do desbalanceamento entre as cadeias alfa e beta (WHO, 1985).

Os avanços na determinação precisa do defeito molecular nas talassemias muito tem contribuído para o diagnóstico pré-natal dessas alterações e sem dúvida constituem a base para a utilização de uma terapia adequada.

Variabilidade genética e polimorfismo

O termo população é limitado, pelos estudiosos da Genética de Populações, a um grupo de indivíduos, da mesma espécie, com propriedades comuns em termos de espaço e tempo e que estão potencialmente em cruzamento (METTLER & GREGG, 1973).

"Cada indivíduo possui um patrimônio genético — o genótipo — que é único e diferente em todos os indivíduos que constituem uma determinada população. Esta singularidade genética é o resultado do mecanismo mendeliano da herança, e como consequência, sempre poderá ser observada variabilidade genética intra e inter populacional" (DOBZHANSKY, 1973).

A variabilidade é introduzida em uma população por meio da mutação, fenômeno pelo qual se originam novos alelos, ou pela imigração de genes a partir de outras populações. Uma vez introduzida, essa variabilidade pode ser consideravelmente aumentada pela recombinação (METTLER & GREGG, 1973; LEWONTIN, 1974).

Há dois tipos de variabilidade genética nas populações naturais: a que é mantida por pressão de mutação e confinada pela seleção normalizadora, e a que é mantida por seleção balanceada; a essa última denomina-se "polimorfismo genético". Ford, em 1965, definiu o polimorfismo genético como "a ocorrência concomitante, na mesma localidade, de duas ou mais formas descontínuas de uma espécie, em proporções tais que a mais rara não pode ser mantida simplesmente por mutação recorrente" (DOBZHANSKY, 1973). Nessa definição está implícita a idéia da ação da seleção natural como força mantenedora dos polimorfismos nas po-

pulações. MORTON (1967), considerando que a frequência gênica é uma propriedade fundamental de um sistema genético, define polimorfismo como sendo "a ocorrência em uma mesma população de dois ou mais alelos de um locus com frequências entre 0,01 e 0,99". O polimorfismo, desde que estabelecido, pode ser balanceado, de transição e em qualquer geração, ser neutro ou sofrer, com intensidades variáveis, a ação da seleção. O polimorfismo balanceado é aquele mantido pela seleção balanceadora, a qual se fundamenta na elevada aptidão darwiniana do heterozigoto, que pode ser superior em apenas um dos componentes do valor adaptativo, como por exemplo, a viabilidade (MORTON, 1967; DOBZANSKY, 1973).

Na espécie humana, apesar das tentativas feitas para correlacionar a manutenção dos polimorfismos com seleção natural, pouco se conseguiu até o momento, tendo-se evidências apenas do polimorfismo de hemoglobinas e deficiência de G-6PD (ALLISSON, 1955, 1964; MORTON, 1967). Assim, tem-se postulado que as altas frequências de anemia falciforme, deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e síndromes talassêmicas, em áreas historicamente endêmicas para a malária, são devidas à proteção dada por essas doenças hematológicas contra a infestação parasítica (LUZZATTO, 1979). Indivíduos com o gene S em homozigose têm anemia falciforme, doença, geralmente, letal nos primeiros anos de vida; indivíduos homozigotos HbA/HbA são selecionados pelo *Plasmodium falciparum*, e indivíduos heterozigotos HbA/HbS, portadores do traço siclêmico, não apresentam anemia falciforme. ALLISSON (1965) verificou que em determinadas regiões da África onde a malária é endêmica eram observadas frequências elevadas do gene S, devidas à proteção conferida

por esse gene às formas graves de malária, tendo o heterozigoto, portanto, nítidas vantagens sobre os homozigotos. O heterozigoto não tem anemia falciforme e nem contrai a forma grave de malária. Esta patologia exerce seu efeito seletivo, principalmente através de uma viabilidade diferencial dos indivíduos com e sem o gene para siclemia, no período compreendido entre o nascimento e a idade reprodutiva.

Nos últimos anos tem sido demonstrado experimentalmente "in vitro" a habilidade do *P. falciparum* para crescer em vários tipos de eritrócitos normais e anormais (TRAGER, 1976), tendo sido observado um crescimento inferior desse parasita em eritrócitos de siclêmicos (FRIEDMAN, 1978; PASVOL, 1978), deficientes da enzima G-6PD (ROTH, 1983), homozigotos para HbC (FRIEDMAN, 1979), homozigotos para HbE (NAGEL, 1981) e em células com níveis aumentados de Hb Fetal (PASVOL, 1977). Investigando o crescimento do *P. falciparum* "in vitro" em eritrócitos de indivíduos com genótipos diferentes para o complexo gênico do tipo α , IFEDIBA e col (1985) verificaram alta frequência de mortalidade do parasita nos eritrócitos com Hb H, mostrando, dessa forma, que fenótipos talassêmicos graves acompanhados ou não de níveis aumentados de Hb Fetal inibem o desenvolvimento desse parasita in vitro. Por outro lado, FLINT e col (1986), comparando a endemicidade da malária com as frequências de talassemia do tipo alfa através da análise de 1800 amostras de DNA, concluíram que as frequências gênicas para essa hemoglobinopatia se correlacionam fortemente com a malária, e que a seleção é, mais que a oscilação genética e o efeito do fundador, o mecanismo responsável pela manutenção das altas frequências da talassemia alfa, em muitas partes do mundo.

Os avanços recentes nas técnicas de análise dos ácidos nucleicos têm permitido detectar variabilidade genética não só pela ocorrência de diferenças na estrutura ou função do produto gênico, mas ao nível do DNA. Dessa forma a utilização de endonucleases de restrição forneceu grande quantidade de informações relativas ao polimorfismo de seqüências nos genes para globina, bem como de sua associação à mutações específicas, que determinam as talassemias e outras hemoglobinopatias.

Polimorfismos genéticos nos sítios de clivagem de endonucleases de restrição foram descritos, pela primeira vez nos genes das globinas tipo beta, por KAN e DOZY (1978). Esses autores detectaram alterações no sítio de reconhecimento da enzima HpaI associado à presença da mutação β^S , e verificaram que os fragmentos obtidos eram variantes herdadas como características monogênicas.

O padrão de sítios de clivagem para cada gene homólogo é denominado haplótipo (ORKIN & KAZAZIAN, 1984). Considerando-se que diversas mutações podem reduzir ou eliminar a expressão gênica e produzir fenótipos talassêmicos, diferentes haplótipos podem estar associados a diferentes mutações para essa característica, em uma dada população (ORKIN e col, 1982). Segundo WHEATHERALL & WAINSCOAT (1985), a clonagem de genes a partir de diferentes haplótipos associados a uma mutação específica, parece ser uma forma eficiente de detectar novas mutações. A associação de haplótipos específicos com mutações para hemoglobinopatias pode ter contribuição significativa no esclarecimento da evolução desses genes em populações de diferentes regiões, permitindo, assim, verificar as relações antropológicas existentes entre elas (KAN & DOZY, 1980; WAINSCOAT e col, 1983; PAGNIER e col, 1984; NAGEL & LABIE, 1985).

A Formação Populacional do Estado do Piauí

Aspectos históricos

A colonização do estado do Piauí coincidiu com o direcionamento estabelecido pela política colonial portuguesa, no século XVII, a qual objetivava conquistar o interior do Brasil para integralização de seus domínios (BARBOSA, 1984). Antes mesmo do início da colonização, as terras piauienses já eram conhecidas; muitas expedições vindas do Maranhão para Pernambuco, e vice-versa, percorriam o território piauiense sem, no entanto, aí se fixarem. Em 1674, por iniciativa da poderosa Casa da Torre, penetrou pelo Sul do Piauí uma expedição de combate contra os índios Gueguês revoltados no São Francisco; um dos comandantes dessa expedição, Domingos Afonso Sertão, ficou no território e fundou 30 fazendas de gado nos vales dos rios Piauí e Canindê. Atualmente essas fazendas são denominadas Fazendas Estaduais do Piauí (PORTO, 1974; ALENCASTRE, 1981). A fazenda de gado foi a origem do povoamento, constituindo o modelo dominante de ocupação do território (MOTT, 1978).

A colonização propriamente dita do território piauiense teve início na segunda metade do século XVII, quando a Coroa Portuguesa concedeu as primeiras sesmarias (BARBOSA, 1984). O sistema sesmarial beneficiou o grupo dedicado à atividade pastoril pelo seu interesse na incorporação de novas áreas, resultando daí a formação do latifúndio - principal característica do Piauí, graças às peculiaridades ecológicas regionais e o baixo nível técnico da pecuária. O latifúndio consolidou-se

no Piauí por todo o século XVIII, quando, então, provocou o sério conflito social entre sesmeiros e posseiros.

A vitória dos posseiros deu início a gerações de oligarquias verdadeiramente piauienses, sem, no entanto, modificar a estrutura sócio-econômica com relação ao regime de alta concentração da terra.

Aceita-se a idéia de que a expansão e a intensificação da pecuária no sertão nordestino, atingindo a Bacia do Parnaíba, estiveram diretamente relacionadas com o crescimento do negócio açucareiro. Ela foi implantada pelos portugueses no início do processo de colonização do Brasil, quando da crise que a economia açucareira vivenciou no fim do século XVII e início do século XVIII (BARBOSA, 1984).

A ocupação do estado do Piauí no século XVII ocorreu com uma população muito reduzida. Dados relativos a essa época indicam a existência de 438 habitantes distribuídos em 129 fazendas, ou seja, uma média de 3,4 pessoas por fazenda (MOTT, 1978). Cerca de oitenta anos depois, com o crescimento do rebanho e incorporação de novas áreas, tinha-se uma população de 14.342 habitantes distribuídos em 536 fazendas, o que significa pequena alteração da densidade demográfica (CEPRO*, 1979; MOTT, 1978).

A economia pecuarista caracterizava-se principalmente pela falta de retorno dos lucros dos fazendeiros no beneficiamento da terra. A maior parte dos investimentos dos fazendeiros era feita em escravos. A manutenção do contingente

* Fundação CEPRO - Centro de Pesquisas Econômicas e Sociais do Piauí.

de trabalho dedicado à criação dependia da coleta de produtos da natureza, o que era feito numa forma extremamente predatória (CEPRO, 1979). Observa-se que a formação econômica do Piauí manteve a tendência à monocultura - característica da colonização brasileira - fortalecendo o pacto colonial e a interdependência entre esta região e as demais (BARBOSA, 1984).

Durante o período colonial, o Piauí foi considerado "o curral e o açougue do Brasil". Por todo o século XVIII os currais da capitania de São José do Piauí monopolizaram os mercados consumidores de gado tais como as capitanias do Pará, Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia e Minas Gerais (BARBOSA, 1984), perdendo-se este monopólio na década de 1730 quando os bois do sertão passaram a enfrentar a concorrência do gado dos pampas. Apesar de toda a versatilidade da pecuária em se manter imune à crise econômica colonial, as dificuldades econômicas para o Piauí foram fatais, pois não surgiu qualquer outra atividade como alento para a economia da capitania (CEPRO, 1979).

Nessa época, o Piauí possuía nove freguesias ou povoações paroquiais. Em 1761, a vila da Mocha, atual Oeiras, foi elevada aos foros de cidade e capital da capitania de São José do Piauí.

Durante os séculos XVIII e XIX não surgiram centros urbanos de importância comercial. As pequenas concentrações urbanas situavam-se nas rotas de gado a caminho das feiras e não dispunham de escola, serviços de saúde e casas bancárias (CEPRO, 1979).

Por volta de 1850 verificou-se a descapitalização da pecuária piauiense, fato que se refletiu nas vendas ma-

ciças de escravos. Alguns setores oligárquicos, preocupados em encontrar uma saída para a crítica situação da economia, conseguiram fundar a nova capital da província - a cidade de Teresina - que, graças a sua localização, deveria inaugurar uma nova era de progresso no Piauí (CEPRO, 1979). Entretanto só o extrativismo - atividade que consistiu basicamente de produtos vegetais como borracha (látex da maniçoba), cera de carnaúba, amêndoa de babaçu, oiticica, tucum, caroá e malva - conseguiu dar um centro para a economia piauiense. A comercialização desses produtos, assim como do fumo e algodão, era realizada na cidade de São João da Parnaíba - única cidade litorânea do Piauí que se afirmou como seu principal centro comercial, graças a suas oficinas de charque, permanecendo nesse nível até metade do século atual (CEPRO, 1979).

Formação populacional

Durante os dois primeiros séculos da história do Piauí, verificou-se uma grande concentração da população no setor rural, já que os moradores se achavam dispersos pelos latifúndios sem núcleo demográfico de grande importância. Até o ano de 1762, um século depois de iniciada a ocupação do Piauí, não existia vida urbana na capitania. Para corrigir esta tendência dispersa e rarefeita do povoamento, o rei de Portugal determinou que fosse fundada uma vila em cada uma das sete freguesias existentes. Dez anos após a fundação, as vilas continuavam despovoadas e insignificantes com apenas 14,2% da população total residindo em área urbana (MOTT, 1979). Interessante



destacar que, na ocasião da instalação da freguesia de Oeiras, a mando do governador do Maranhão, vieram muitas famílias para habitá-la bem como 300 degredados a mando da coroa portuguesa. O primeiro cronista da região informa assim: "*Compõe-se o Piauí de fazendas de gado, sem mais moradores. Estão situadas as fazendas em vários riachos distantes uma da outra ordinariamente mais de duas léguas. Em cada uma vive um homem branco com um negro (escravo) e em algumas se acham mais escravos e também mais brancos, mas no comum se acha um homem branco só*" (MOTT, 1978). Do total de 129 fazendas, 97,6% possuíam pelo menos um morador branco (vaqueiro ou proprietário); os escravos negros apareciam em 84,4% das unidades residenciais, enquanto que os índios estavam presentes em apenas 23,2%. Havia quarenta mulheres distribuídas em 18,6% das fazendas. Nas primeiras décadas seguintes à conquista, o crescimento demográfico do Piauí deveu-se mais à chegada de imigrantes do que ao crescimento das primeiras famílias de colonizadores ou a incorporação de ameríndios, já que em 65 anos a população cresceu de 438 para 12.744 habitantes (MOTT, 1978).

O Piauí foi o único Estado povoado exclusivamente pelos portugueses, excetuando-se apenas a família Clark, de Parnaíba, que aí chegou em 1884, e de sírios e libaneses que chegaram na cidade de Teresina em 1903. Embora não houvesse plano diretor do Reino para o povoamento do Piauí, cinco jovens casais portugueses tiveram conhecimento da descoberta de suas terras e, por iniciativa própria, dirigiram-se para as três regiões de pastagens naturais: Oeiras, Campo Maior e Parnaguá (CASTELO BRANCO, 1983).



A imigração para o Piauí, principalmente nas primeiras décadas do século XVIII, proveio do próprio Brasil — da zona açucareira nordestina, Recôncavo Baiano e Maranhão. Esses migrantes buscavam o Piauí para fugir do marasmo econômico decorrente da estagnação da economia canavieira, e atraídos pela pecuária (MOTT, 1978). Segundo o Ouvidor da Capitania, em 1772 não apenas brancos buscavam os sertões piauienses, mas igualmente toda sorte de gente, *evacuando todas as capitâneas vizinhas dos maus humores que as alteravam: criminosos, insolentes, falidos. ... Vinham os pretos parte em cativo, parte fugitivos das mais comarcas e todos vieram a misturar e confundir, tornando um só povo...* (MOTT, 1978).

A composição da população do Piauí com relação à cor da pele no ano de 1772 pode ser observada no quadro 1. A participação do índio no cômputo geral da população declinou após fins do século XVII, passando a representar apenas 6% da população. O elemento branco, que em 1697 representava 35%, passou a constituir apenas 17% da população, o mesmo ocorrendo com o elemento negro que de 48% passou a 33%, em 1772. O grupo dos mestiços, entretanto, aumentou de 2% a 44%. A grande massa populacional (77%) era, portanto, negróide (MOTT, 1978). O peculiar relacionamento racial mantido entre os elementos livres da população piauiense, durante o século XVIII, explicam até certo ponto os dados citados acima:

Nesse sertão, por costume antiquíssimo, a mesma estimação tem brancos, mulatos e pretos, e todos, uns e outros, se tratam com recíproca igualdade, sendo rara a pessoa que se separa deste ridículo sistema, porque se seguirem o contrário

expõem as suas vidas. (BARBOSA, 1984).

O povoamento do Piauí ocorreu em cinco zonas distintas: Extremo-Sul, Centro-Sul, Norte, Litoral e Barra do Poti (CASTELO BRANCO, 1983).

Na região Norte destacou-se a conquista do vale do Longá, o que ocorreu no começo do século XVII pela participação de vaqueiros anônimos da Bahia e Pernambuco, entre eles os da Casa da Torre, bem como pelas missões jesuíticas. Das fazendas de gado surgiu a atual cidade de Campo Maior, e desta o povoamento irradiou-se para o Norte com as cidades de Barras, José de Freitas, Piracuruca, Batalha, Piripiri, Alto Longá e Pedro II.

A ocupação do litoral iniciou-se com Parnaíba, fundada no início do século XVII quando chegou ao delta do Parnaíba o português Pedro Barbosa Leal e, aí, fundou o povoado Vila Velha. Seus primeiros povoadores foram portugueses, vindos diretamente a Parnaíba, descendentes portugueses vindos do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Maranhão, Ceará e Oeiras, bem como ingleses provindos diretamente da Inglaterra. Em Parnaíba, os gaúchos desenvolveram as charqueadas e a família inglesa o comércio de exportação de peles e cereais.

No Centro Sul do Estado, destacou-se a cidade de Oeiras, então capital da província. Foi povoada por portugueses vindos diretamente de Portugal ou de outros estados como Pernambuco. De Oeiras o povoamento irradiou-se para Jerumenha, Castelo (Marvão), Valença, Jaicós, Regeneração e Paulistana.

O Extremo Sul do Estado foi povoado por descendentes de portugueses, oriundos de São Paulo, que ocuparam as



cabeceiras do Gurguéia originando os povoados de Parnaguá e Corrente.

O povoamento da Barra do Poti iniciou-se em fins do século XVII. Em 1852 foi fundada a cidade de Teresina para ser a sede do governo, época em que foi grande a imigração do elemento humano de ascendência portuguesa, vindo diretamente de Portugal ou de outras regiões do Brasil ou do próprio Estado, bem como sírios e libaneses. Destacaram-se comerciantes cearenses e maranhenses acompanhados de suas famílias, que em Teresina estabeleceram armazéns de cereais, armarinhos e casas de modas.

As zonas sócio-econômicas características do povoamento foram Oeiras, Campo Maior, Parnaíba e Parnaguá. Os principais proprietários rurais dessas regiões, decorridos já 300 anos, são descendentes dos primeiros povoadores (CASTELO BRANCO, 1983).

Principais componentes étnicos

Branco: No início do processo de povoamento o elemento branco constituía-se em um dos maiores grupos participantes da formação populacional do atual estado do Piauí. Com base em dados populacionais obtidos em 1697 e 1797, percebe-se um declínio desse segmento étnico que de 36% passou a contribuir com apenas 16% da população total. Como justificativas para esse episódio, podem ser citados fatores como clima regional não adaptável ao povo europeu, a grande miscigenação decorrente das características ocupacionais da terra, bem como a entrada preferencial de negros, já que a colonização do território

piauiense deu-se com a utilização do braço escravo. Nesse grupo incluem-se os imigrantes portugueses, ingleses, sírios e libaneses.

Portugueses: A imigração européia para o Brasil iniciou-se logo após o seu descobrimento, sendo que dessa data até 1808 os únicos europeus que chegaram ao país eram portugueses e somavam 465.000 (SALZANO, 1986). A partir dessa data aumentou o fenômeno imigratório da Europa e Ásia, de sorte que de 1820 a 1963 entraram no Brasil pelo menos 5.350.889 imigrantes dos quais 31,06% eram de origem portuguesa, 30,32% italiana, 13,38% espanhola, 4,63% japonesa, 4,18% alemã e 16,42% de origens não especificadas. Com base na proporção de estrangeiros no Estado, em relação ao total dessa população no Brasil, Levy (1974) coloca o Piauí no grupo de Estados em que a população estrangeira se manteve sempre em níveis mais baixos que 1%.

Os portugueses, responsáveis pela colonização, destacaram-se como os elementos mais abundantes no povoamento de todas as zonas sócioeconômicas do território piauiense. Suas atividades de destaque foram a pecuária e a indústria de carnes.

Ingleses: A história do Piauí registra a chegada de apenas um indivíduo natural da Inglaterra, que chegou a Parnaíba em 1864 e destacou-se no comércio de exportação de carnes e cereais e tem hoje sua descendência distribuída por todo o estado do Piauí.

Sírios e Libaneses: Os primeiros árabes entraram no Brasil em 1871, sendo sua imigração lenta e irregular

até fins do século XIX. A partir da Primeira Guerra Mundial houve o estabelecimento de uma corrente migratória regular para o nosso país, e esse movimento permaneceu até a Segunda Guerra Mundial; a partir de então as facilidades para imigração desapareceram cessando, dessa forma, as principais causas que estimularam a vinda maciça dos povos árabes (KNOWLTON, 1960).

Excluindo-se o português colonizador, os sírios e libaneses foram os elementos étnicos vindos com maior contingente populacional a fixar-se no Piauí, onde chegaram na segunda metade do século XIX.

Os primeiros sírios chegados a Teresina eram naturais da aldeia Malula em Damasco, Capital da Síria, bem como outros oriundos de São Paulo e de alguns outros estados do Brasil; os libaneses por sua vez eram provenientes da aldeia de Zahle. Atualmente, as famílias piauienses constituídas pelos enlaces dos descendentes dos pioneiros sírios e libaneses estão espalhados por todo o Estado.

Sírios e libaneses destacaram-se no comércio de miudezas e de modas, ramo de negócios que iniciaram na capital Teresina, na época de sua fundação.

Negro: A procedência da quase totalidade dos imigrantes africanos para o Brasil era de duas regiões: Costa da Mina e Angola. De Angola correspondem cerca de dois terços dos escravos entrados de 1700 a 1850 pelos portos do Rio de Janeiro e Pernambuco. O terço restante provinha da Costa da Mina e foi recebido principalmente pelo Porto da Bahia. Negros de outras regiões africanas, como Cacheu, Cabo Verde, Moçambique e Madagascar, concorreram em pequena proporção para a massa imi-

grante que aqui aportou (RODRIGUES, 1932; SALZANO & FREIRE-MAIA, 1967). Calcula-se que entre 1550 e 1850 entraram no Brasil cerca de 3.500.000 negros africanos (SALZANO, 1986).

Os negros aqui introduzidos eram povos de várias culturas, entretanto foram a sudanesa e a banto que mais contribuíram na formação cultural do povo brasileiro (RODRIGUES, 1932).

É provável que os escravos africanos introduzidos no Piauí tenham sido provenientes do Maranhão, ou preferencialmente da Bahia, visto ser lá o principal porto ancoradouro de navios negreiros no Nordeste, e por ter sido a mais importante praça consumidora do gado piauiense.

Com relação às nações de origem, predominaram, no Piauí, os procedentes de Angola (56,7%) seguidos pelos Minas (13,2%), Benguela (9,7%), Guiné (9,4%), Congos (9,4%) e Gegês (2,4%). Havia ainda Moçambiques, Rebolos e Cassangue, com um percentual de 0,97% cada, e os negros sem nação de origem explícita (BARBOSA, 1984).

No início da colonização do Piauí, os negros representavam 47,9%, ou seja, contavam 208 indivíduos em uma população total de 434 habitantes. Em todos os censos dos séculos XVII e XVIII a presença do negro suplantava a do branco. Em 1772 o negro passou a representar 33% da população geral. Esse declínio pode ser explicado por possíveis exportações de escravos para a zona de mineração, repetindo-se no Piauí um fato observado em outras regiões da colônia.

A opção dos fazendeiros pelo trabalho escravo do negro deu-se ainda no início da implantação da pecuária, quando foi necessário importar a mão de obra juntamente com as matrizes do gado. Além da postura negativa dos indígenas e do fato

de os ricos sofrerem com os trabalhadores livres, há de se levar em conta que os fazendeiros do Piauí, vindos de regiões escravistas, eram tradicionalmente acostumados com o trabalho escravo do negro.

Os negros exerciam funções de encarregado geral da fazenda, vaqueiro, dedicavam-se ao tratamento do gado, à agricultura de subsistência, confecção de utensílios rústicos como celas, arreios, artefatos de madeira, barro e fabricação de tecidos para a escravaria e até de enfermagem. Outra forma de trabalho, realizada pelo negro que o constituía um agente economicamente produtivo, era o serviço na indústria do charque, principal atividade econômica responsável pelo desenvolvimento da vila de Parnaíba (BARBOSA, 1984).

Indio: É provável que os ancestrais do nosso indígena tenham migrado do território da atual República Popular da Mongólia, na Ásia Central, a cerca de dez mil anos atrás (SALZANO, 1986). As crônicas do primeiro século do descobrimento classificaram os índios do Brasil, com base na língua falada, em dois grupos, os tupis e os não tupis ou tapuias. Os mais antigos documentos que se referem ao Piauí citam os Tremembês, Aroás, Cupinharões, Tabajaras e Amoipiras como povoadores da bacia do Parnaíba. Tabajaras e Amoipiras eram Tupis e penetraram o Piauí pelo rio São Francisco povoando os campos do sul do Piauí; eram mansos e dóceis. Os Tremembês eram Tapuias do ramo Cariri, formosos e bravos. Os Cupinharões eram Tapuias e ocuparam o Canindé; converteram-se em aliados dos devassadores e mais tarde lhes ofereceram resistência, abandonando-os (NUNES, 1974).

As tribos Pimenteiras, habitantes das cabeceiras

do rio Piauí, e também os Gueguês e Acoroás, foram os que resistiram por mais tempo ao estabelecimento dos portugueses; eram vingativos e turbulentos. Essas tribos, os Jaicós e os Aroás, Tapuias, que povoaram o município de Valença, subsistiram até poucos anos atrás perdendo os hábitos e feições primitivas pela miscigenação. As tribos de Cabucus, Moipurás, Aitatus, Ubirajara e Tapacuás habitavam as solidões do Parnaguá, Uruçuí e margens do rio Gurguéia (ALENCASTRE, 1981).

Nas primeiras povoações piauienses, a preocupação fundamental dos povoadores e governos de origem era a luta contra o gentio. O desenvolvimento da economia pecuária fez-se paralelamente ao apresamento de índios, que em algumas regiões subsistiu até fins do século XVIII. A luta contra o gentio dava-se não apenas para efeito de "limpeza de área" mas também para comercialização de índios escravizados (CEPRO, 1979).

A posição do índio no esquema geral de produção diferia bastante da do negro: menos adaptável que esse às tarefas que exigiam certa disciplina, eram empregados sobretudo nas indispensáveis funções de "guarda-costas" dos brancos, vigilantes dos negros, rastreadores de fugitivos e na defesa contra eventuais ataques aos rebanhos. As mulheres indígenas cativas ocupavam-se das atividades domésticas; eram os índios os responsáveis pela agricultura de subsistência. Boa parcela dos gentios apresados era comercializada em outras capitanias para o trabalho na lavoura, pois nos séculos XVII e XVIII as irregularidades no abastecimento do negro e o seu alto preço abria perspectivas para o tráfico de índios capturados.

A população nativa declinou em ritmo acelerado

durante o século XVIII, vitimada pela guerra, doenças, e pelo próprio regime a que foi submetida. Seguramente ocorreu uma assimilação dos sobreviventes dessa população indígena, sendo esses apresentados nos registros estatísticos como "mestiços".

Miscigenação

Tomando como referência o ano de chegada dos portugueses (1500) e o último censo demográfico (1980) pode-se perceber a tremenda variação sofrida pela população brasileira ao longo dos 480 anos (quadro 2). A miscigenação verificada na população piauiense pode ser avaliada pela análise do quadro 1, onde se verifica que em 1692 o mestiço representava apenas 1,8% da população total, passando para 44,4% em 1772 paralelamente à diminuição da representatividade do branco e negro.

No comércio de escravos, a mulher de nacionalidade brasileira entre 20 e 29 anos era a mais cara. Estes dois requisitos se explicam, por elas estarem mais socializadas e capacitadas para reprodução e desenvolvimento de trabalhos pesados. No entanto, o valor comercial da jovem escrava brasileira poderia ainda achar-se relacionado às características sociais do Piauí, que, desde o século XVII até o final do século XVIII, apresentou um desequilíbrio entre o número de habitantes do sexo feminino e masculino. Algumas fontes históricas de autoria de padres e administradores fazem referência à vida desregrada e fora dos princípios da Igreja Católica, que levavam os habitantes do Piauí: *A maior parte destas três espécies, vive em huma mancebia continuada, e o mais hé que há brancos que preferem esta amizade illicita com huma mulata, negra, ou india, ao mais ajustado casamento. Outros há que já ligados ao estado matrimonial, abandonão huma mulher formosa, e que muitas vezes*

fez a sua fortuna, por humã negra, ou mestiça, que certamente não mereceria a menor predileção, ao negro mais feio da Costa da África. Se se lhe perguntasse de onde procedia hum gosto tão extravagante, ficarião estacados (GAYOSO, 1818 cf. MOTT, 1978).

Tais fatos, adicionados ainda à presença de mulheres indígenas como únicos elementos femininos existentes na grande maioria das fazendas, levam a crer que a miscigenação entre o branco, o negro e o índio, principais grupos formadores da população brasileira, deve ter sido muito intensa no Piauí.

No século atual, os censos realizados indicam que a população predominante no estado do Piauí, é a parda ou mestiça, conforme pode ser visto no quadro 3.

Negra	308	48	6343	33
Indígena	64	15	1131	6
Mestiça	8	2	8512	44
TOTAL	434	100,0	19.191	100,0

Fontes: MOTT (1978); BARBOSA (1984)

Quadro 1. Distribuição da população do Piauí de acordo com a cor da pele dos habitantes - fim do século XVII e 1772.

População	fim do século XVII		1772	
	Frequência Absoluta	%	Frequência Absoluta	%
Branca	154	35	3205	17
Negra	208	48	6343	33
Indígena	64	15	1131	6
Mestiça	8	2	8512	44
TOTAL	434	100,0	19.191	100,0

Fontes: MOTT (1978); BARBOSA (1984)



Quadro 2. Variação da composição étnica brasileira em 480 anos.

GRUPO ÉTNICO OU GEOGRÁFICO	ANOS		
	1500	1890	1980
Indígena	2.000.000	440.000	200.000
Branco	-	6.302.000	65.000.000
Misto	-	6.000.000	46.000.000
Negro	-	2.000.000	7.000.000
Asiático recente	-	-	755.000
TOTAL	2.000.000	14.742.000	118.955.000

Fonte: SALZANO (1986)

Quadro 3. Distribuição da população do Piauí de acordo com a cor da pele dos habitantes, no século atual.

POPULAÇÃO	1940	%	1950	%	1960	%	1980	%
Branca	369.764	45,22	292.618	27,98	302.768	24,23	329.596	15,41
Preta	261.137	31,94	134.977	12,91	142.634	11,42	136.581	6,38
Amarela	97	0,01	9	-	218	0,02	2.112	0,10
Parda	185.155	22,65	616.782	58,98	803.367	64,31	1.664.170	77,79
Sem declaração	1.448	0,18	1.310	0,13	213	0,02	6.737	0,32
TOTAL	817.601	100	1.045.696	100	1.249.200	100	2.139.196	100

Fonte: Censos Demográficos - FIBGE



OBJETIVOS

Conforme publicação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1985), 4% da população mundial traz um gene para hemoglobinopatia. Obviamente, o processo migratório de populações humanas introduziu essas alterações genéticas em muitas áreas onde elas não estavam originariamente presentes. Esse fato pode ser evidenciado, por exemplo, no trabalho de SALZANO (1979), em que o gene Hb^S determinante de Anemia Falciforme estava ausente em uma amostra de 4.184 índios, e presente em 3,4% nos mestiços branco/índio/negro. Esse mesmo autor (1985) descreve que dos 121 milhões de pessoas, no Brasil, com indicações de mistura negra, 5 a 6% são portadores do gene Hb^S .

Considerando-se os dados acima, as informações históricas e antropológicas da população do estado do Piauí, e, sabendo-se que as hemoglobinopatias hereditárias se constituem em uma das doenças genéticas mais frequentes na população brasileira, e, somado ao fato de que as hemoglobinas humanas são importantes marcadores genéticos para estudos populacionais, desenvolveu-se a presente investigação com os seguintes objetivos: 1) identificar a variabilidade genética da hemoglobina na população do estado do Piauí; 2) verificar a distribuição regional das hemoglobinas anormais; 3) procurar estabelecer as possíveis associações entre frequências de tipos de Hb anormais nos caucóides e negróides, entre faixas etárias, origem de sobrenome, e o processo de colonização do Estado.

* PSA = Programa de Suplementação Alimentar.



II. MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado no presente trabalho consistiu de amostras de sangue de 5.455 indivíduos, aparentemente saudáveis, na faixa etária de 3 meses a 86 anos, provenientes de 22 cidades do estado do Piauí (Tabela 1).

As amostras foram obtidas de indivíduos que frequentavam Postos de Saúde com fins de obterem vacinas, carteiras de saúde e que eram beneficiados pelo "PSA"^{*}. Além desse grupo, foram obtidas, também, amostras de sangue de escolares e de funcionários pertencentes a instituições públicas e privadas.

As coletas foram efetuadas por punção digital, utilizando-se lancetas descartáveis e tubos de microhematócrito heparinizados. Esses tubos eram vedados, numa de suas extremidades, com massa de modelar e colocados em "bolacha plástica" (apêndice 1); estas eram acondicionadas em caixas de isopor para o transporte até o local de análise.

A identificação de cada indivíduo foi realizada por catalogação do nome, sobrenome, idade, sexo, grupo étnico e procedência (apêndice 2). Com relação ao grupo étnico, os indivíduos foram classificados em caucasóides (brancos) e negróides (negros e pardos), com base na cor da pele e outras características morfológicas, como tipo de cabelo, lábios e nariz.

Cerca de 2.400 amostras foram remetidas, por via postal aérea, ao Laboratório do Centro de Referência de Hemoglobina, onde foram submetidas a análise. As 3.055 amostras res

* PSA = Programa de Suplementação Alimentar.

Tabela 1. Informações gerais sobre as cidades selecionadas para o presente estudo.

CIDADE	Nº DE HABITANTES (1980)*	LAT/LONG.		INDIVÍDUOS ANALISADOS	
		**		Nº	%
Luis Correia	25.617	2,53 S	41,40 W	83	0,3
Parnaíba	102.181	2,54 S	41,47 W	1.170	1,1
Buriti dos Lopes	25.824	3,10 S	41,52 W	126	0,5
Piracuruca	29.399	3,56 S	41,42 W	151	0,5
Batalha	21.465	4,01 S	42,05 W	53	0,2
Barras	43.677	4,15 S	42,18 W	107	0,2
Piripiri	55.093	4,16 S	41,47 W	179	0,3
José de Freitas	25.370	4,45 S	42,35 W	100	0,4
Campo Maior	67.700	4,49 S	42,10 W	300	0,4
Teresina	377.774	5,05 S	42,49 W	1.155	0,3
Palmeirais	12.561	5,58 S	43,04 W	96	0,8
Angical do Piauí	5.327	6,05 S	42,44 W	100	1,9
Amarante	14.521	6,14 S	42,50 W	92	0,6
Valença do Piauí	18.717	6,24 S	41,45 W	107	0,6
Floriano	43.137	6,47 S	43,01 W	500	1,2
Oeiras	47.315	7,01 S	42,08 W	117	0,2
Picos	71.018	7,05 S	41,28 W	303	0,4
Jerumenha	7.860	7,05 S	43,30 W	125	1,6
S.R. Nonato	57.721	9,01 S	42,42 W	154	0,3
Bom Jesus	14.370	9,04 S	44,22 W	103	0,7
Gilbuês	8.692	9,50 S	45,21 W	71	0,8
Corrente	21.548	10,27 S	45,10 W	263	1,2
TOTAL	1.096.887	-o-		5.455	0,5

Fonte: * ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO PIAUÍ (1980-1982)

** BRITANNICA LONDON, ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA, 1972



tantes foram analisadas no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Piauí. As coletas e análises das amostras ocorreram no período de outubro de 1984 a março de 1986.

A seleção das cidades para a pesquisa obedeceu aos critérios de importância administrativa regional, relevância histórica e pólo de atração médica. A disposição geográfica das cidades selecionadas consta na Figura 1.

Manteve-se um contato inicial, por carta, com os prefeitos das cidades selecionadas, comunicando a inclusão da mesma no projeto de pesquisa, determinando os dias para coleta de sangue, sendo solicitado, naquela oportunidade, o apoio necessário para a sua realização (apêndice 3).

Em todas as sessões de coleta, inicialmente, eram fornecidos à população esclarecimentos quanto aos objetivos do trabalho em realização. Nessa oportunidade cada doador recebia uma cartilha explicativa sobre Anemias Hereditárias (apêndice 4).

Após as análises, e de posse de todos os resultados, remeteu-se a "Carteira de Identidade de Anemia Hereditária" (apêndice 5) aos indivíduos portadores de diagnósticos positivos.

Os resultados foram interpretados conforme padrões estabelecidos no Laboratório do Centro de Referência de Hemoglobinas - Departamento de Biologia- IBILCE/UNESP-São José do Rio Preto-São Paulo e de acordo com conceitos da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1982).

As frequências gênicas foram calculadas de acordo com as fórmulas padronizadas e procedeu-se à análise estatística segundo Zar (1974).



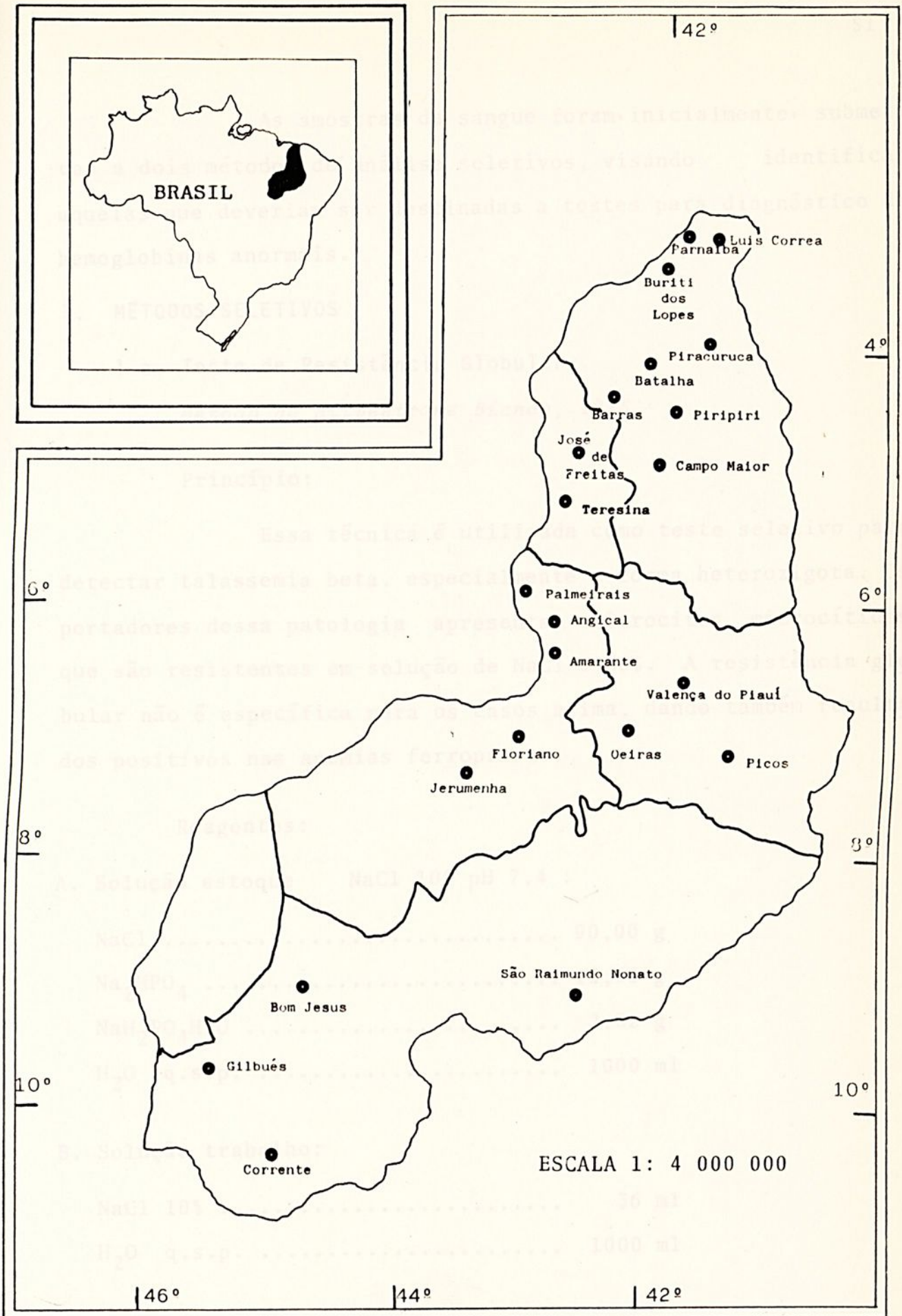


Figura 01 - Distribuição geográfica das cidades selecionadas para a pesquisa.

As amostras de sangue foram, inicialmente, submetidas a dois métodos de análise seletivos, visando identificar aquelas que deveriam ser destinadas a testes para diagnóstico de hemoglobinas anormais.

1. MÉTODOS SELETIVOS

1.a. Teste de Resistência Globular

Método de Silvestrone Bianco, 1975

Princípio:

Essa técnica é utilizada como teste seletivo para detectar talassemia beta, especialmente a forma heterozigota. Os portadores dessa patologia apresentam eritrocitos microcíticos que são resistentes em solução de NaCl 0,36%. A resistência globular não é específica para os casos acima, dando também resultados positivos nas anemias ferroprivas.

Reagentes:

A. Solução estoque NaCl 10% pH 7,4 :

NaCl	90,00 g
Na ₂ HPO ₄	13,65 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	2,82 g
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

B. Solução trabalho:

NaCl 10%	36 ml
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

C. Procedimento:

Colocar 1,5 ml da solução de NaCl 0,36% em um tu



bo de ensaio. Adicionar 5 μl de sangue. Agitar suavemente por inversão. Aguardar por 10 minutos.

D. Interpretação:

Coloca-se o tubo contendo a solução de cloreto de sódio 0,36% com o sangue à distância de 2,5 cm de uma folha branca, contendo uma linha horizontal negra. A presença de eritrócitos com resistência aumentada à hemólise confere à amostra um aspecto turvo que não permite visualizar a linha negra.

1.b. Eletroforese em ágar-amido

Método de Naoum e cols, 1980

Princípio:

Esse método permite a análise de 90 a 100 amostras de sangue por vez; separa frações mais lentas e mais rápidas que a hemoglobina A em pH alcalino; detecta alterações quantitativas de hemoglobina A₂ e de hemoglobina Fetal, bem como revela a presença de metahemoglobina por mudança da cor da hemoglobina durante o processo eletroforético.

Reagentes:

A. Tampão Borato, pH 8,6

(utilizado nos compartimentos eletrolíticos)

Solução estoque:

Ácido Bórico	18,6 g
Hidróxido de sódio	2,4 g
Água destilada q.s.p.	1,0 l

Solução trabalho; 600 mg

Solução estoque 125 ml

Água destilada q.s.p. 500 ml

B. Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB), pH 8,8

(utilizado na composição do gel de ágar-amido)

Solução estoque:

Tris-hidroximetil-aminometano 10,10 g

Ácido etileno di-amino tetracético . 1,00 g

Ácido bórico 0,76 g

Água destilada q.s.p. 100 ml

Solução trabalho:

Solução estoque 4 ml

Água destilada q.s.p. 40 ml

C. Corante de piramido:

Solução de piramido a 5%

Piramido 5 g

Álcool etílico q.s.p. 100 ml

Solução trabalho:

Solução de piramido a 5% 5 ml

Ácido acético 30% 5 ml

H₂O₂ - 10 vol. 2 ml

D. Gel de ágar-amido:

Bacto-ágar 300 mg

Arrozina 600 mg



Maisena 600 mg

Tampão TEB pH 8,8 40 ml

Procedimento:

- Colocar a solução de ágar-amido em Erlenmayer de 250 ml e aquecê-la em bico de Bunsen até que haja dissolução de todo o ágar-amido, requerendo para isso ebulições suaves por três ou quatro períodos de dez segundos. Distribuir todo o conteúdo na placa de gel previamente fixada por grampos em um suporte. Esperar o resfriamento para adquirir consistência, por 15 minutos.

- Após a gelificação, iniciar a aplicação das amostras a 1,5 centímetros do cátodo, transferindo cerca de $0,2 \mu\text{l}$ de sangue contido no capilar, suficiente para umedecer a lâmina de aplicação das amostras. Depois de cada aplicação, limpar o aplicador por meio de papel absorvente e utilizá-lo para a amostra seguinte.

- Transferir a placa para a cuba de eletroforese (Fig. 3) e colocar as pontes de conexão entre o gel e o tampão dos compartimentos, feitos por triplo papel de filtro Whatman nº 1 MM ou "perfex" triplo.

- Passar 300 volts (50 mA) por 45 minutos, a temperatura ambiente.

- Remover a placa e analisar as posições das hemoglobinas sem submetê-la a coloração. Identificar os frascos cujo sangue apresente frações com alterações qualitativas ou quantitativas.

- Corar com piramido e verificar se há frações com mobilidades alteradas, bem como aumento das frações de hemoglobinas A_2 e Fetal.



Interpretação:

Consultar mapa de disposição de hemoglobina em eletroforese alcalina (Figura 2).

2. ELETROFORESE EM CELULOSE, pH 8,6 - Métodos Qualitativo e Quantitativo.

Método de Marengo-Rowe, 1965

Princípio:

Hemoglobinas anormais, com alterações de cargas elétricas, oriundas por substituições de aminoácidos com diferentes pontos isoelétricos, são qualificáveis e quantificáveis por esse método. Hemoglobinas mutantes de cadeia alfa mostram, com muita sensibilidade, além de Hb A₁ e frações anormais, duas outras frações menores, quais sejam: Hb A₂ e Hb X₂.

Hemoglobinas instáveis podem ser detectadas pela presença de fração de "heme depleted" e cadeias alfa livres.

Metahemoglobinas exibem alterações na cor da fração da hemoglobina durante o processo eletroforético.

Reagentes:

A. Tampão borato, pH 8,6

(utilizado em compartimentos eletrolíticos)

Solução estoque:

Ácido bórico	18,6 g
Hidróxido de sódio	3,4 g
Água destilada q.s.p.	1,0 l

MOBILIDADE RELATIVA DE HEMOGLOBINAS EM ACETATO DE CELULOSE (T.E.B., pH 8,6)

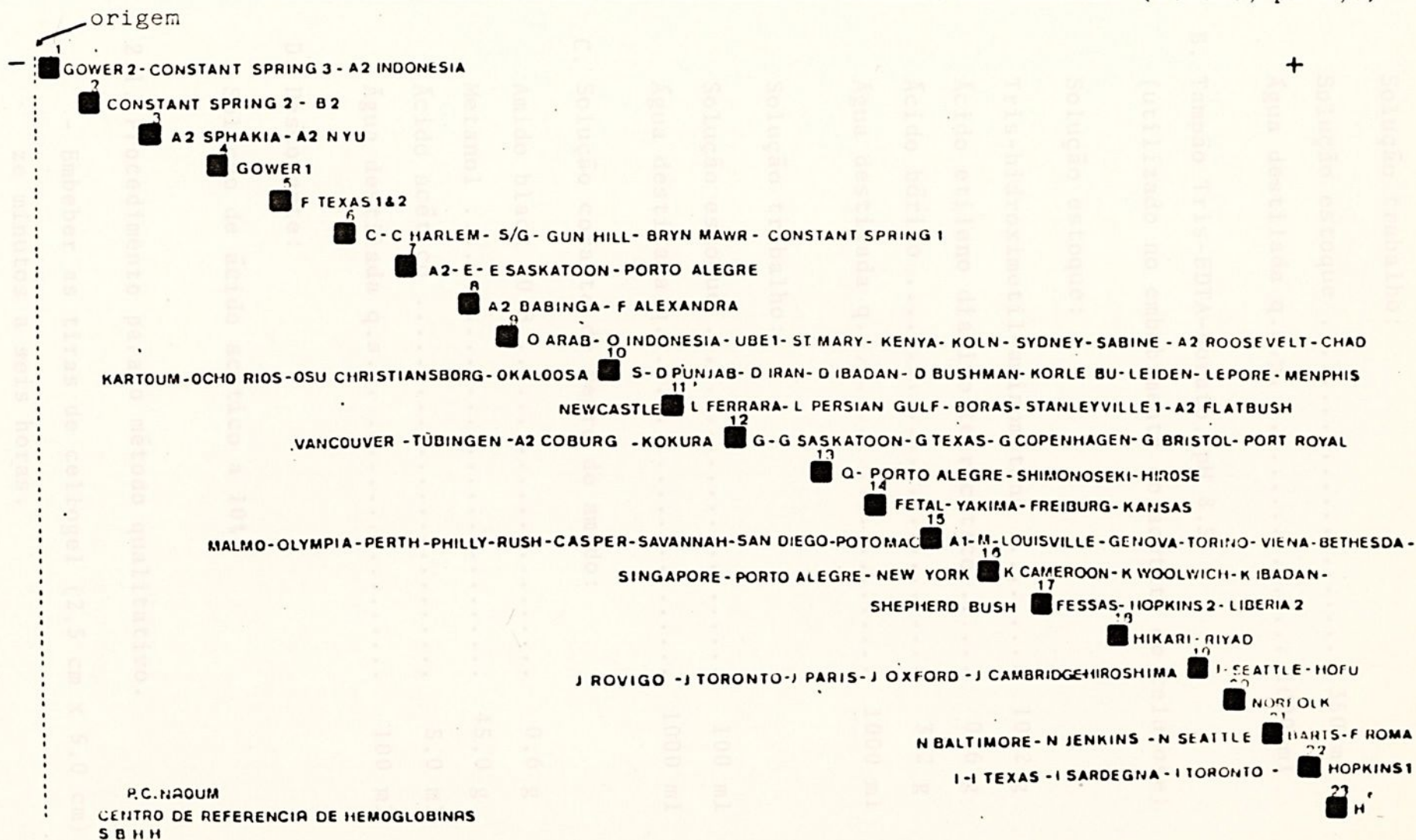


Figura 02 - Disposição das mobilidades de 118 tipos de hemoglobinas humanas em eletroforese alcalina (agar-amido e cellogel), pH 8,6 (Naum, 1979).

Solução trabalho:

Solução estoque 350 ml

Água destilada q.s.p.1000 ml

B. Tampão Tris-EDTA-Borato, pH 8,5

(utilizado no embebimento do acetato de celulose)

Solução estoque:

Tris-hidroximetil-aminometano 10,2 g

Ácido etileno diamino tetracético 0,6 g

Ácido bórico 3,2 g

Água destilada q.s.p. 1000 ml

Solução trabalho:

Solução estoque 100 ml

Água destilada q.s.p. 1000 ml

C. Solução corante de Negro de amido:

Amido black 10 B 0,6 g

Metanol 45,0 g

Ácido acético 5,0 ml

Água destilada q.s.p. 100 ml

D. Descorante:

Solução de ácido acético a 10%

2.1. Procedimento para o método qualitativo.

- Embeber as tiras de cellogel (2,5 cm x 5,0 cm) por quinze minutos a seis horas.



- Preparar o hemolizado - 1 gota de sangue total e 1 gota de saponina a 1%.
- Absorver o excesso de tampão nas fitas, colocando-as entre duas folhas de papel de filtro.
- Colocar as fitas no suporte da cuba eletroforética, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos por meio de papel de filtro; aplicar os hemolizados em estudo, utilizando aplicadores de tamanho médio, cerca de 2 μ l de amostra, a 1,0 centímetro da extremidade da fita que está em contato com o pólo negativo.
- Passar corrente elétrica de 250 volts, por trinta a cinquenta minutos, a temperatura ambiente.
- Analisar a disposição das frações sem coloração.
- Corar com negro de amido por cinco minutos e descorar com ácido acético a 10%.

Interpretação:

Consultar mapa de disposição de hemoglobinas em eletroforese alcalina (Figura 2).

2.2. Procedimento para o método quantitativo:

- Embeber as tiras de acetato de celulose (2,5cm x 5,0cm) por quinze minutos a seis horas
- Retirar o excesso de tampão das tiras de acetato de celulose, absorvendo-o entre duas folhas de papel de filtro.
- Colocar as tiras no suporte da cuba eletroforética e

aplicar 20 μl de solução de hemoglobina, com concentração de 10 g%, por meio de pipeta de Shalli.

- Passar corrente elétrica de 250 volts, por trinta a cinquenta minutos, a temperatura ambiente.
- Recortar as frações de Hb A₁ e Hb A₂ e eluí-las, respectivamente, em dois tubos contendo 15 e 3 ml de água destilada, por quatro a doze horas.
- Leitura e cálculo - ler as D.O. das soluções em 540 nm, usando água destilada como branco. Calcular os resultados utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{Hb A}_2 = \frac{\text{D.O. Hb A}_2 \times 100}{\text{D.O. Hb A}_1 \times 5 + \text{D.O. Hb A}_2}$$

Os valores iguais ou superiores a 4% foram considerados suspeitos de talassemia beta heterozigota.

3. ELETROFORESE EM ÁGAR-FOSFATO pH 6,2

Método de Vella, 1968

Princípio:

O emprego da eletroforese em pH 6,2 propicia a separação de hemoglobinas anormais mais lentas que a Hb A, quais sejam: hemoglobinas S, F, G, C Harlem, E e O Arab, além de detectar semiquantitativamente a Hb Fetal. As hemoglobinas S, D e G apresentam mobilidades eletroforéticas similares em pH alcalino, o mesmo ocorrendo com as Hb C, C Harlem, E e O Arab que também possuem posições próximas. Entretanto, nesse sistema eletroforético essas hemoglobinas podem ser diferenciáveis.



Reagentes:

A. Tampão Fosfato pH 6,2:

(utilizado nos compartimentos eletrolíticos e na composição do gel de ágar).

Ortofosfato di-sódico	2,02 g
Ortofosfato mono-sódico mono-hidratado	7,66 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

B. Gel de ágar-fosfato:

Bacto-ágar	300 mg
Tampão Fosfato, pH 6,2	30 ml

Colocar a solução de ágar em Erlenmayer de 100 ml e aquecê-la em fogareiro até que haja dissolução de todo o ágar, requerendo para isso ebulições suaves por três a quatro períodos de dez segundos. Distribuir 3 ml do gel de ágar por lâmina de microscopia.

C. Solução corante de Negro de Amido - conforme 2.C.

Procedimento:

- Após gelificação do ágar, aplicar as soluções de hemoglobina em estudo, com concentrações entre 8 a 12 g%, a 2,5 centímetros do cátodo, utilizando lamínula de 0,5 centímetros de largura.
- Transferir as lâminas para a cuba de eletroforese e colocacar as pontes, feitas com triplo papel Whatman 1 MM ou similar, para fazer conexão entre o gel e a solução tampão dos compartimentos eletrolíticos.

- Passar corrente elétrica de 200 volts, por vinte a trinta minutos, a temperatura ambiente.

- Remover as lâminas e corá-las com negro de amido, por cinco minutos, e, posteriormente, descorá-las com ácido acético a 10%.

Interpretação:

Consultar o mapa de disposição de hemoglobinas em eletroforese ácida (Figura 3).

4. MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS

A separação eletroforética de cadeias polipeptídicas anormais se constitui em uma pré-análise molecular, muitas vezes conclusiva para o diagnóstico de hemoglobina anormal, sem que haja necessidade de se aplicar métodos de disposição bidimensional de péptidos e análises de aminoácidos:

4.1. Eletroforese de Cadeias Polipeptídicas

Método de Schneider, 1974

A aplicação desse método é útil na qualificação de hemoglobinas anormais que não puderam ser caracterizadas pelos métodos já descritos. Esta eletroforese é seguida da separação prévia dos grupos heme das globinas pela ação do 2-mercaptoetanol e da separação das cadeias tipo alfa e beta pela ação da uréia.



MOBILIDADE RELATIVA DE HEMOGLOBINAS EM AGAR (pH 6,2).

ORIGEM

S-C HARLEM

MONTGOMERY

KORLE BU-O ARAB-RAINIER

A-D-E-G-MOST FAST MOVING Hb

CAMDEN

F-K WOOLWICH-HOPE

Figura 03 - Disposição das mobilidades dos tipos de hemoglobinas humanas que são diferenciáveis por eletroforese em agar pH 6,2; (Naoum, 1979).

Reagentes:

A. Tampão Tris-EDTA-Borato, pH 8,4.

Solução estoque:

Tris-hidroximetil-aminometano	10,2 g
Ácido etileno diamino tetracético	0,6 g
Ácido bórico	3,2 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

B. Tampão T.E.B/Uréia:

(deve ser preparado em momentos antes do uso)

Uréia	144 g
Tampão TEB q.s.p.	280 ml

C. 2-mercaptoetanol

D. Hemolisado --preparado como no item 2.

E. Coloração

Solução Ponceau	0,5 g
Ácido tricloroacético 5% q.s.p.	100 ml

F. Descoloração

Ácido acético 5%.

Procedimento:

- Diluir 50 μ l do hemolisado em 50 μ l do tampão TEB e 50 μ l de 2-mercaptoetanol. Agitar por inversão e incubar, a temperatura ambiente, por 30 minutos.

- Adicionar, 3,2 ml de 2-mercaptoetanol ao tampão restante; misturar e utilizá-lo para embebedimento das fitas e na cuba.
- Embeber as fitas de acetato de celulose neste tampão, por 30 minutos.
- Colocar 50 ml do tampão acima em cada compartimento da cuba.
- Enxugar as fitas, absorvendo-as entre duas folhas de papel de filtro.
- Colocar as fitas no suporte da cuba de eletroforese, conectando-as aos compartimentos eletrolíticos, usando triplo papel de filtro Whatman 1 MM ou perfex. Aplicar 2 a 3 μ l da amostra na região central da fita.
- Cobrir a cuba e passar 150 volts, por 80 minutos.
- Corar com solução Ponceau 0,5%, por 15 minutos e descorar com solução de ácido acético 5%.

Interpretação:

Consultar mapa de disposição das cadeias polipeptídicas de hemoglobinas normais e anormais no sistema alcalino (Fig.4).

5. DOSAGEM BIOQUÍMICA DE Hb Fetal

Esta dosagem quantifica o grau de resistência de hemoglobinas submetidas a soluções fortemente alcalinas. A Hb Fetal é mais resistente que outros tipos de hemoglobinas, quando

ELETROFORESE DE CADEIAS POLIPEPTÍDICAS

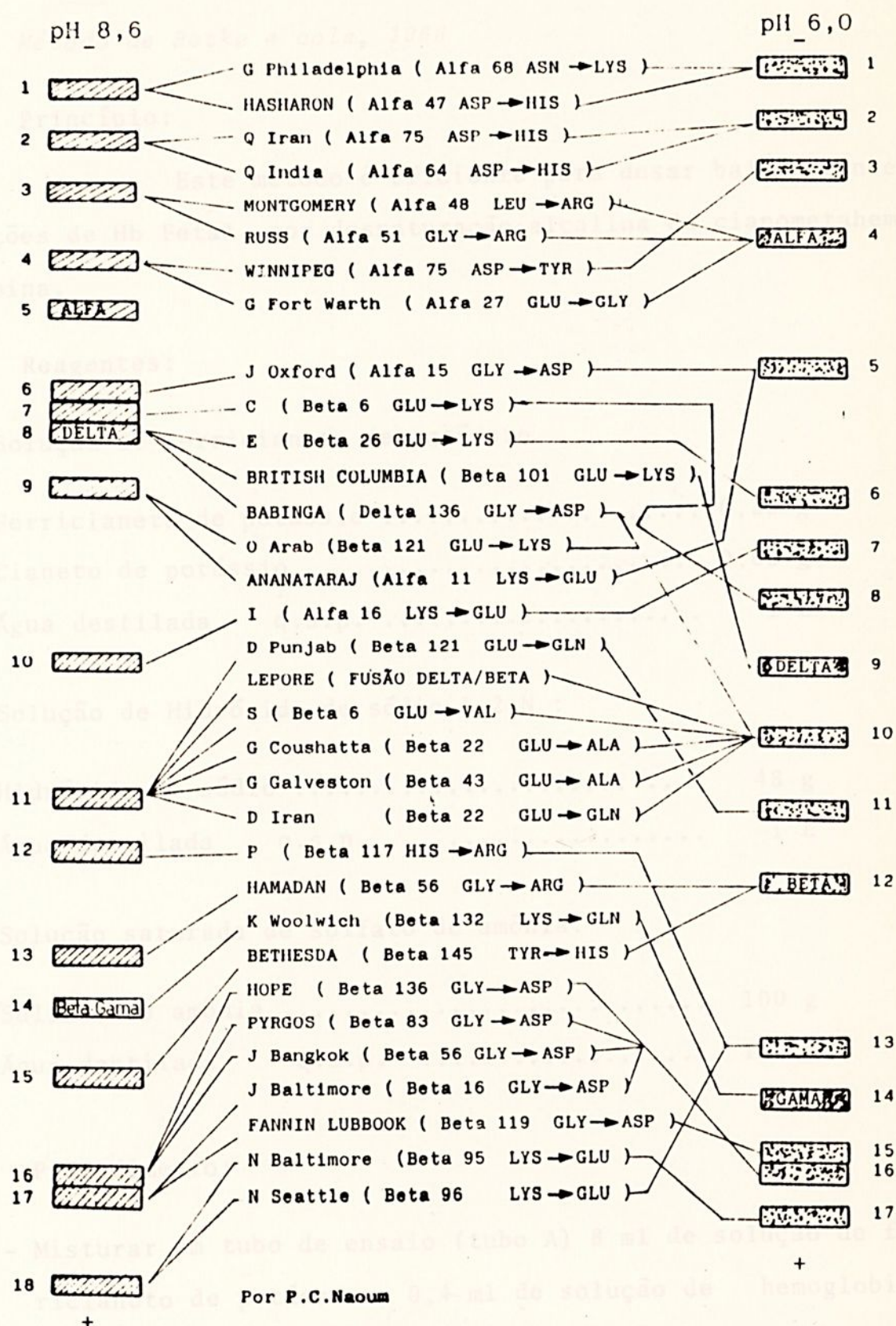


Figura 04 - Disposição das mobilidades das cadeias polipeptídicas alfa, beta, gama e delta por eletroforese em cellogel ou acetato de celulose, pH 6,0 e pH 8,6 (Condensado obtido de: Schneider, 1974; Schneider, 1978).

do tratada com soluções alcalinas.

Método de Betke e cols, 1966

Princípio:

Este método é eficiente para dosar baixas concentrações de Hb Fetal, por desnaturação alcalina da cianometahemoglobina.

Reagentes:

A. Solução de Ferricianeto de potássio

Ferricianeto de potássio	0,20 g
Cianeto de potássio	0,05 g
Água destilada q.s.p.	1 ℓ

B. Solução de Hidróxido de sódio 1,2 N :

Hidróxido de sódio	48 g
Água destilada q.s.p.	1 ℓ

C. Solução saturada de sulfato de amônia:

Sulfato de amônia	100 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

Procedimento:

- Misturar em tubo de ensaio (tubo A) 8 ml de solução de ferricianeto de potássio e 0,4 ml de solução de hemoglobina com concentração de 8 a 12 g%.



- Transferir para outro tubo de ensaio (tubo B) 5,6 ml da mistura do tubo A e adicionar 0,4 ml de solução de hidróxido de sódio 1,2 N. Exatamente dois minutos após, acrescentar 4 ml da solução de sulfato de amônio saturado. Homogeneizar por inversão, e deixar em repouso por cinco minutos. Filtrar a solução em triplo papel Whatmann nº 1 MM ou Toyo nº 1. Essa solução filtrada contém Hb Fetal.
- Adicionar ao tubo A, 0,2 ml de água destilada e 2 ml de sulfato de amônio. Homogeneizar por inversão. Essa solução contém Hb total.
- Leitura e cálculo. Ler as densidades ópticas das soluções dos dois tubos em 540 nm, utilizando a solução de ferricianeto de potássio como branco. Calcular o valor de hemoglobina não desnaturável ou Hb Fetal, usando a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{D.O. do tubo B}}{\text{D.O. do tubo A}} \times 10 = \% \text{Hb Fetal}$$

Os valores normais variam de 0 a 1%.

6. MÉTODO CITOLÓGICO

Coloração intraeritrocitária de Hb Fetal

Método de Kleiwaue, 1974.

Princípio:

Esse método é baseado na diferença de capacidade de dissociação das subunidades entre Hb A e Hb F, em pH abaixo



de 4,0. A Hb Fetal é ácido-resistente e, por isso, não é eluída das células, corando-se facilmente com eritrosina ou similar; enquanto outros tipos de hemoglobinas, por serem eluídas, não fixam o corante.

Reagentes:

A. Tampão Citrato-Fosfato pH 3,3

Ácido cítrico 0,1 M 100 ml

Fosfato di-sódio hidratado 0,2 M 30 ml

B. Solução aquosa de eritrosina a 0,1%

C. Solução de etanol a 80%.

Procedimento:

- Fazer esfregaços finos e fixá-los com solução de etanol a 80%, por cinco minutos. Lavar, a seguir, com água corrente e secar ao ar.
- Introduzir os esfregaços em vasilha contendo tampão citrato-fosfato pH 3,3, previamente aquecido a 37°C, por cinco minutos. Lavar com água corrente e secar ao ar.
- Corar os esfregaços com solução aquosa de eritrosina, por dois a cinco minutos. Lavar com água corrente e secar ao ar.
- Examinar em microscópio com aumento de 400X.

Interpretação:

Os eritrócitos contendo Hb Fetal aparecem cora-



dos internamente, enquanto os outros que não a contém permanecem sem coloração interna.

A coloração é homogênea quando todos os eritrócitos aparecem uniformemente corados e são encontrados em sangue de cordão umbilical, em recém-nascidos e portadores de PHHF.

A coloração é heterogênea quando existem duas populações eritrocitárias distintas, ou seja, uma corada e outra sem coloração, e esses casos são características de talassemia beta homozigota.



III. RESULTADOS

As coletas de sangue foram realizadas com intensa participação das entidades estaduais e municipais, facilitando as atividades dentro do quadro carencial em que se apresentavam. As Figuras 5 e 6 mostram aspectos do cotidiano vivenciado em algumas cidades, nas coletas de sangue. Destaca-se o interesse manifestado pelos médicos dos Postos de Saúde, que contribuíram no esclarecimento ao público durante as sessões de coleta, bem como no interesse em obter informações referentes às anemias detectadas. Com relação às condições de trabalho, deve ser destacada a colaboração especialmente recebida da Vice-Reitoria da Universidade Federal do Piauí, pelo fornecimento de auxílio financeiro e transporte para a coleta de material.

A análise de 5.455 amostras demonstrou que 339 (6,21%) indivíduos apresentaram hemoglobinas anormais classificadas em variantes moleculares (5,43%) e talassemias (0,78%).

As 296 variantes moleculares identificadas incluíram os genótipos AS, AC, AI, AM, AD e variantes de Hb A₂. Do total de hemoglobinas variantes 69% era composto pelo genótipo AS, 18% por AC e 13% pelas formas raras: AI, AD, AM e variantes de Hb A₂ (Tabela 2).

Entre os 43 casos caracterizados como formas talassêmicas, e que constituíram 0,78% da amostra total analisada, a talassemia beta heterozigota — classificada clinicamente como "menor" — foi a mais freqüente, representando 84% dessas síndromes, seguida pela persistência hereditária de hemoglobina



Figura 5 :- Coleta de sangue na cidade de Oeiras (PI).

Tabela 1. Tipos de hemoglobinas anormais detectadas em 3.455 indivíduos da cidade de Piauí.

TIPOS	GENÓTIPO	Nº	FREQ. % NA AMOSTRA
Variantes estruturais			
S-	Hb AS	203	5,92
C-	Hb AC	34	0,99



Figura 6 :- Coleta de sangue na cidade de Piripiri (PI).

Tabela 2. Tipos de hemoglobinas anormais detectadas em 5.455 indivíduos do estado do Piauí.

TIPOS	GENÓTIPO	Nº	FREQ. % NA AMOSTRA
Variantes estruturais			
S	Hb AS	203	3,72
C	Hb AC	54	0,99
I	Hb AI	02	0,04
M*	Hb AM	25	0,46
D	Hb AD	06	0,11
Não identificada	(lentas)	05	0,09
Variante de Hb A ₂	Hb AB ₂	01	0,02
SUB-TOTAL		296	5,43
Síntese desbalanceada de cadeias FENÓTIPO			
Hb A ₂	(βtal.)	36	0,65
Hb F	(PHHF)	04	0,07
Forma interativa	(β/S)	01	0,02
Hb H	(αtal.)	02	0,04
SUB-TOTAL		43	0,78
TOTAL		339	6,21

* As formas de metemoglobina não puderam ser diferenciadas em suas causas: induzida, deficiência enzimática ou alteração de globina.



fetal com 9%, talassemia alfa com 5% e formas interativas com 2% (Tabela 2). O apêndice 6 apresenta os sobrenomes dos indivíduos portadores de talassemia, por cidade estudada.

A análise da Tabela 3 permite verificar a diferença entre frequências de tipos de hemoglobinas anormais nos caucasóides e negróides. Nos 1.467 caucasóides examinados, a frequência de hemoglobinas anormais foi de 4,09%, enquanto nos negróides foi de 7,00%. Esta diferença é estatisticamente significativa ($\chi^2_1 = 15,55$; $P < 0,01$). A relação entre portador de hemoglobina anormal e habitante foi de 1:24 nos caucasóides e 1:14 entre os negróides. Os dados referentes à Tabela 3 indicam, também, que as frequências de hemoglobinas anormais de origem africana (Hb S e Hb C) foram superiores nos negróides quando comparados com os caucasóides, com uma diferença estatisticamente significativa ($\chi^2_1 = 44,32$; $P < 0,01$).

No que se refere às talassemias, observa-se que a diferença entre as frequências nos dois grupos raciais não foi significativa. As formas raras de hemoglobina, não obstante suas baixas frequências, foram identificadas nos dois grupos raciais. É interessante destacar que entre as formas de hemoglobinas raras, a metemoglobina apresentou maior frequência com a relação de 1 portador para 218 habitantes; a seguir situou-se a hemoglobina AD com a relação de 1:900 habitantes. Apenas um caso de interação entre hemoglobina variante e talassemia foi observado, sendo o mesmo classificado como talassemia beta/Hb S, e esta alteração foi detectada em um indivíduo negróide.

A Tabela 4 apresenta os resultados dos testes de significância estatística referentes às prevalências de tipos de hemoglobinas anormais em caucasóides, em negróides e na



Tabela 3. Frequências dos tipos de hemoglobinas anormais nos caucasóides, negróides e amostra total analisada, de 22 cidades do estado do Piauí.

População	Total analisado Nº / %	Total Hb anormal nº / %	TIPOS DE HEMOGLOBINAS ANORMAIS										
			AS	AC	AH	AD	β /S	AI	A2†	Meta†	Fetal†	Variante Hb A ₂	Não Identificada
Caucasóide	1467	60	34	07	-	01	-	-	08	08	01	-	01
	26,89 %	4,09 %	2,32%	0,48%	-	0,07%	-	-	0,54%	0,54%	0,07%	-	0,07%
Negróide	3988	279	169	47	02	05	01	02	28	17	03	01	04
	73,11 %	7,00 %	4,24%	1,18%	0,05%	0,12%	0,02%	0,05%	0,70%	0,43%	0,08%	0,03%	0,10%
TOTAL	5455	339	203	54	02	06	01	02	36	25	04	01	05
	100 %	6,21 %	3,72%	0,99%	0,04%	0,11%	0,01%	0,04%	0,66%	0,46%	0,07%	0,02%	0,09%

Tabela 4. Valores de χ^2 de igualdade para a proporção 1:1 das frequências de diferentes Hb anormais em caucasóides e negróides e na amostra total (*: $P < 0,05$. C = caucasóide; N = negróide).

Hemoglobinas anormais	C	N	População Total
Hb AS X Hb AC	17,78*	68,91*	86,39*
Hb AS X Talassemias	14,53*	89,78*	104,06*
Hb AS X Outras Hb anormais	13,09*	98,99*	101,14*
Hb AC X Talassemias	0,25	2,09	1,25
Hb AC X Outras Hb anormais	0,53	4,26*	2,42
Talassemias X Outras Hb anormais	0,05	0,396	0,19



amostra total. Nesta tabela pode-se verificar que a prevalência da Hb AS sobre as formas de Hb AC, "outras Hb anormais" e talassemias é estatisticamente significativa, tanto em caucasoídes quanto em negróides e na amostra total. Com relação a Hb AC sua prevalência foi superior às formas raras representadas como "outras Hb anormais" nos negróides ($X_1^2 = 4,26; P < 0,01$).

A quantidade da variabilidade genética para hemoglobinas anormais, apresentada na Tabela 3, foi medida pelos índices de diversidade genética, segundo Zar (1974). Esses índices medem a quantidade da variabilidade genética dada pelos genes determinantes de hemoglobinas anormais, no conjunto das 22 cidades de onde as amostras foram obtidas. A Tabela 5 contém os valores obtidos para caucasoídes e negróides em relação às frequências de hemoglobinas anormais de cada cidade. A diferença entre os dois valores de H é estatisticamente significativa ($t = 2,282; P < 0,05$), indicando maior heterogeneidade entre os negróides. Quanto à diversidade relativa, os valores de J são muito próximos nos dois grupos raciais, pouco maiores que 80%. A Tabela 6 contém os valores obtidos para os índices de diversidade nos grupos caucasoíde e negróide, considerando agora as frequências dos diferentes tipos de hemoglobinas anormais no conjunto de indivíduos analisados. Os valores de H não diferem significativamente ($t = 0,084; P > 0,05$), indicando homogeneidade nos dois grupos.

A Tabela 7 apresenta as frequências dos genes determinantes de variantes estruturais de hemoglobinas na amostra total. Verifica-se que nos negróides as frequências desses genes foram superiores quando comparadas com as dos caucasoídes, e que os genes Hb^I (variante de Hb A₁) e Hb^{B₂} (variante de Hb A₂) es-

Tabela 5. Índices de diversidade de caucasóides e negróides em relação às frequências de hemoglobinas anormais de cada cidade.

Índice	Caucasóides	Negróides	Total
H	0,992	1,132	1,126
t_{42}	2,282*		
$H_{\text{máx.}}$	1,204	1,342	1,342
J	0,824	0,843	0,839

H = índice de diversidade; $H_{\text{máx.}}$ = diversidade máxima observada

J = diversidade relativa

* = significativo

Tabela 6. Índices de diversidade de caucasóides e negróides em relação às frequências dos tipos de hemoglobinas anormais observadas nas 22 cidades

Índice	Caucasóides	Negróides	Total
H	0,570	0,565	0,564
t_{18}	0,084		
$H_{\text{máx.}}$	0,845	1,041	1,041
J	0,675	0,542	0,541

H = índice de diversidade; $H_{\text{máx}}$ = diversidade máxima observada

J = diversidade relativa.

Tabela 7. Genótipos e frequências gênicas das variantes estruturais de hemoglobina.

GRUPO ÉTNICO	GENÓTIPO							TOTAL	FREQUÊNCIAS GÊNICAS					
	AA	AS	AC	AD	AI	β/S	variante de Hb A2 (AB ₂)		Hb ^A	Hb ^S	Hb ^C	Hb ^D	Hb ^I	Hb ^{B2}
Caucasóides	1425	34	7	1	-	-	-	1467	0,9857	0,0116	0,0024	0,0003		
Negróides	3762	169	47	5	2	1	1	3988	0,9715	0,0213	0,0059	0,0006	0,0002	0,0001
Amostra total	5187	203	54	6	2	1	1	5455	0,9753	0,0187	0,0049	0,0005	0,0002	0,00009

tiveram presentes apenas em negróides, com as menores frequências encontradas.

A Tabela 8 apresenta os resultados das frequências de Hb anormais em caucasóides, em negróides e na amostra total, por classe etária. A análise dessa tabela indica que a maior prevalência de hemoglobinas anormais entre os caucasóides e entre os negróides ocorreu na classe etária < 10 anos; ent tanto, quando essas prevalências foram comparadas entre as diferentes classes etárias, os resultados não foram significativos em ambos os grupos raciais ($\chi^2_5 \text{ cauc} = 9,76; P > 0,05$ e $\chi^2_5 \text{ negr} = 4,28; P > 0,05$). Merece destaque a observação sobre a prevalência homogênea de hemoglobinas anormais em todas as classes etárias, entre negróides, fato que não ocorre nos caucasóides.

Ao se comparar os tipos anormais de hemoglobinas entre caucasóides e negróides nota-se que as hemoglobinas de origem africana — Hb AS e Hb AC — foram mais frequentes nos negróides em todas as classes etárias, tendo apresentado significância estatística nas classes de 10 — 20 anos ($\chi^2_1 = 4,33; P < 0,05$) de 20 — 30 anos ($\chi^2_1 = 5,08; P < 0,05$) e > 50 anos ($\chi^2_1 = 5,93; P < 0,05$). Quanto às talassemias e "outros tipos de Hb anormais" suas frequências entre caucasóides e negróides mostraram-se heterogêneas em todas as classes etárias.

As frequências de hemoglobinas anormais, por cidade, nos caucasóides, nos negróides e na amostra total são mostradas na Tabela 9. A análise desses dados permite verificar que as frequências dessas hemoglobinas mostraram-se heterogêneas entre as cidades analisadas. Como tentativa de agrupar as cidades com base nessas frequências, utilizou-se a $\bar{X} \pm S$. Assim, calculou-se a média e o desvio padrão dos percentuais das

Tabela 8. Distribuição dos indivíduos portadores de hemoglobinas normais (Hb AA) e anormais, em cauc_as_oides (C) e negróides (N), por classe etária (%).

Classe etária	Nº analisado		Hb AA		GENÓTIPOS ANORMAIS								Total anormais	
					AS		AC		Talassemicos		Outros			
					C	N	C	N	C	N	C	N	C	N
< 10	105	422	98	388	03	16	01	06	02	05	01	07	07	34
			(93,33)	(91,94)	(2,86)	(3,79)	(0,95)	(1,42)	(1,90)	(1,18)	(0,95)	(1,66)	(6,67)	(8,05)
10 20	298	1011	291	955	05	36	-	07	02	08	-	05	07	56
			(97,65)	(94,46)	(1,68)	(3,56)	-	(0,69)	(0,67)	(0,79)	-	(0,49)	(2,35)	(5,54)
20 30	448	1114	425	1032	12	55	03	14	04	06	04	07	23	82
			(94,87)	(92,64)	(2,68)	(4,94)	(0,67)	(1,26)	(0,89)	(0,54)	(0,89)	(0,63)	(5,13)	(7,36)
30 40	292	742	276	688	09	33	02	08	01	08	04	05	16	54
			(94,52)	(92,72)	(3,08)	(4,45)	(0,68)	(1,08)	(0,34)	(1,08)	(1,37)	(0,67)	(5,48)	(7,28)
40 50	175	395	171	366	03	18	01	03	-	04	-	04	04	29
			(97,71)	(92,66)	(1,71)	(4,56)	(0,57)	(0,76)	-	(1,01)	-	(1,01)	(2,28)	(7,34)
> 50	149	304	146	280	02	11	-	09	-	03	01	01	03	24
			(97,99)	(92,11)	(1,34)	(3,62)	-	(2,96)	-	(0,99)	(0,67)	(0,33)	(2,01)	(7,89)
TOTAL	1467	3988	1407	3709	34	169	07	47	09	34	10	29	60	279



Tabela 9. Frequências de hemoglobinas anormais, por cidade do estado do Piauí, nos caucasóides, nos negróides e na amostra total.

CIDADES	CAUCASÓIDES			NEGRÓIDES			TOTAL		
	Total analis.	Hb Nº	Anor. %	Total analis.	Hb Nº	Anor. %	Total analis.	Hb Nº	Anor. %
Amarante	37	-	-	55	03	5,45	92	03	3,26
Angical	44	-	-	56	04	7,14	100	04	4,00
Barras	30	01	3,33	77	03	3,90	107	04	3,74
Batalha	12	-	-	41	01	2,44	53	01	1,89
Bom Jesus	30	03	10,00	73	08	10,95	103	11	10,68
B. dos Lopes	63	03	4,80	63	07	11,11	126	10	7,94
Campo Maior	82	04	4,90	218	08	3,67	300	12	4,00
Corrente	61	-	-	202	19	9,40	263	19	7,22
Floriano	120	04	3,33	380	26	6,84	500	30	6,00
Gilbuês	12	01	8,30	59	07	11,90	71	08	11,27
Jerumenha	18	01	5,55	107	13	12,15	125	14	11,20
J. de Freitas	20	03	15,00	80	09	11,25	100	12	12,00
Luis Correia	41	-	-	42	01	2,38	83	01	1,20
Oeiras	18	01	5,55	99	15	15,15	117	16	13,67
Palmeiras	15	01	6,66	81	08	9,88	96	09	9,37
Parnaíba	210	09	5,28	960	61	6,35	1170	70	5,98
Picos	102	03	2,94	201	20	9,95	303	23	7,59
Piracuruca	69	02	2,90	82	06	7,32	151	08	5,30
Piripiri	58	03	5,20	121	07	5,78	179	10	5,59
S.R.Nonato	39	-	-	115	03	2,61	154	03	1,95
Teresina	350	20	5,71	805	46	5,71	1155	66	5,71
Valença	36	01	2,77	71	04	5,63	107	05	4,67
TOTAL	1467	60	4,09	3988	279	6,99	5455	339	6,21

hemoglobinas anormais em relação ao número total de indivíduos analisados em cada localidade; os valores obtidos foram $6,56 \pm 3,54$. Dessa forma pode-se considerar três grupos de frequência: abaixo de 3,02%, variável de 3,02% a 10,10% e acima de 10,10%, conforme mostra a Tabela 9. O primeiro grupo congrega três cidades constituindo 18% das cidades analisadas; o segundo grupo congrega a maioria das cidades ou 59% do total e o terceiro grupo congrega cinco cidades representando 23% do total.

As frequências de hemoglobinas anormais nos caucásios, negróides e na amostra total analisada, por região, podem ser vistas na Tabela 10. É importante destacar que as regiões consideradas foram classificadas geograficamente, fato que permitiu estabelecer a relação de hemoglobina anormal por habitante nas regiões Norte, Nordeste, Noroeste, Leste, Oeste e Sul do estado do Piauí. Para a amostra total, a relação portador de hemoglobina anormal por habitante foi de 1:21 a 25 na região Nordeste, 1:16 a 20 nas regiões Norte e Noroeste, e de 1:10 a 15 nas regiões Leste, Oeste e Sul (Figura 7). Apenas entre as regiões Nordeste e Leste a diferença entre frequência de hemoglobinas anormais foi significativa ($X^2 = 7,93$; $P < 0,01$).

Entre os caucásios, a relação Hb anormal por habitante foi de 1:>25 nas regiões Norte, Leste, Oeste e Sul; 1:20 a 25 na região Nordeste, e de 1:10 a 20 na região Noroeste (figura 8); entretanto, as diferenças de frequências entre as regiões não foram significativas. Entre os negróides, a relação portador de hemoglobina anormal por habitante, nas diferentes regiões, foi de 1:20 a 25 na região Nordeste; 1:16-20 na região Noroeste; 1:10-15 nas regiões Norte, Oeste e Sul, e de 1:<10 na região Leste (Figura 9). Entre as regiões, as dife-

Tabela 10. Frequências de hemoglobinas anormais em caucasóides, negróides e na amostra total analisada por região.

Regiões estudadas	CAUCASÓIDES			NEGRÓIDES			TOTAL		
	Total analys.	Hb Anor. Nº %		Total analys.	Hb Anor. Nº %		Total analys.	Hb Anor. Nº %	
Norte	341	12 3,82		1065	69 6,48		1379	81 5,87	
Nordeste	251	10 3,98		539	25 4,64		790	35 4,43	
Noroeste	370	23 6,22		885	55 6,21		1255	78 6,22	
Leste	156	05 3,20		371	39 10,51		527	44 8,35	
Oeste	234	06 2,56		679	54 7,95		913	60 6,57	
Sul	142	04 2,82		449	37 8,24		591	41 6,94	
TOTAL	1467	60 4,09		3988	279 7,00		5455	339 6,21	

Região Norte (cidades: Buriti dos Lopes, Luis Correia, Parnaíba); Região Nordeste (cidades: Campo Maior, Barras, Batalha, Piracuruca, Piripiri); Região Noroeste (cidades: José de Freitas, Teresina); Região leste (cidades: Valença, Oeiras, Picos); Região Oeste (cidades: Amarante, Angical, Palmeiras, Floriano, Jerumenha); Região Sul (cidades: Bom Jesus, São Raimundo Nonato, Corrente, Gilbuês).

Tabela 11.- Valores de χ^2 de igualdade para a proporção 1:1 das freqüências de Hb anormais entre caucasóides e negróides por região (*: $P < 0,05$).

Região	χ^2
Norte	2,63
Nordeste	51,75*
Noroeste	0,02
Leste	6,74*
Oeste	7,38*
Sul	4,11*

renças de freqüências de hemoglobinas anormais foram significativas entre Norte e Leste ($X_1^2 = 5,87$; $P < 0,05$), Nordeste e Oeste ($X_1^2 = 4,90$; $P < 0,05$); Nordeste e Leste ($X_1^2 = 10,71$; $P < 0,01$); Nordeste e Sul ($X_1^2 = 4,81$; $P < 0,05$), e entre Nordeste e Leste ($X_1^2 = 6,36$; $P < 0,05$). Comparando-se essas freqüências entre caucásios e negróides, por região (Tabela 11), observa-se que as mesmas não foram significativas nas regiões Norte e Noroeste.

As freqüências dos tipos de hemoglobinas anormais detectadas na amostra total, nos caucásios e negróides, por região, estão apresentadas na Tabela 12, e sua representação gráfica, nas figuras 7, 8 e 9. De um modo geral nota-se que a Hb AS prevalece praticamente em todas as regiões, tanto nos caucásios quanto nos negróides e na amostra total; o segundo tipo mais freqüente é variável conforme o grupo e a região considerados. Dessa forma, a análise dos resultados pode ser realizada para cada população, separadamente.

A análise da Figura 7 permite verificar que na amostra total analisada, a Hb AS prevaleceu sobre as demais em todas as regiões. A Hb AC foi a segunda forma mais freqüente nas regiões Sul e Leste. É interessante destacar que, na região Nordeste, a segunda forma mais freqüente foi o grupo de hemoglobinas anormais raras que inclui Hb AD, Hb AI, variantes de Hb A₂, metemoglobina e formas não identificadas.

No grupo caucásioide (Figura 8), a Hb AS apresentou-se prevalente em cinco das seis regiões do estado do Piauí, sendo a única forma de hemoglobina anormal detectada na região Sul. A variante AC apresentou prevalência heterogênea nas diversas regiões, com valor maior (33%) na região Norte do Estado. Com relação às talassemias observa-se que sua freqüência entre



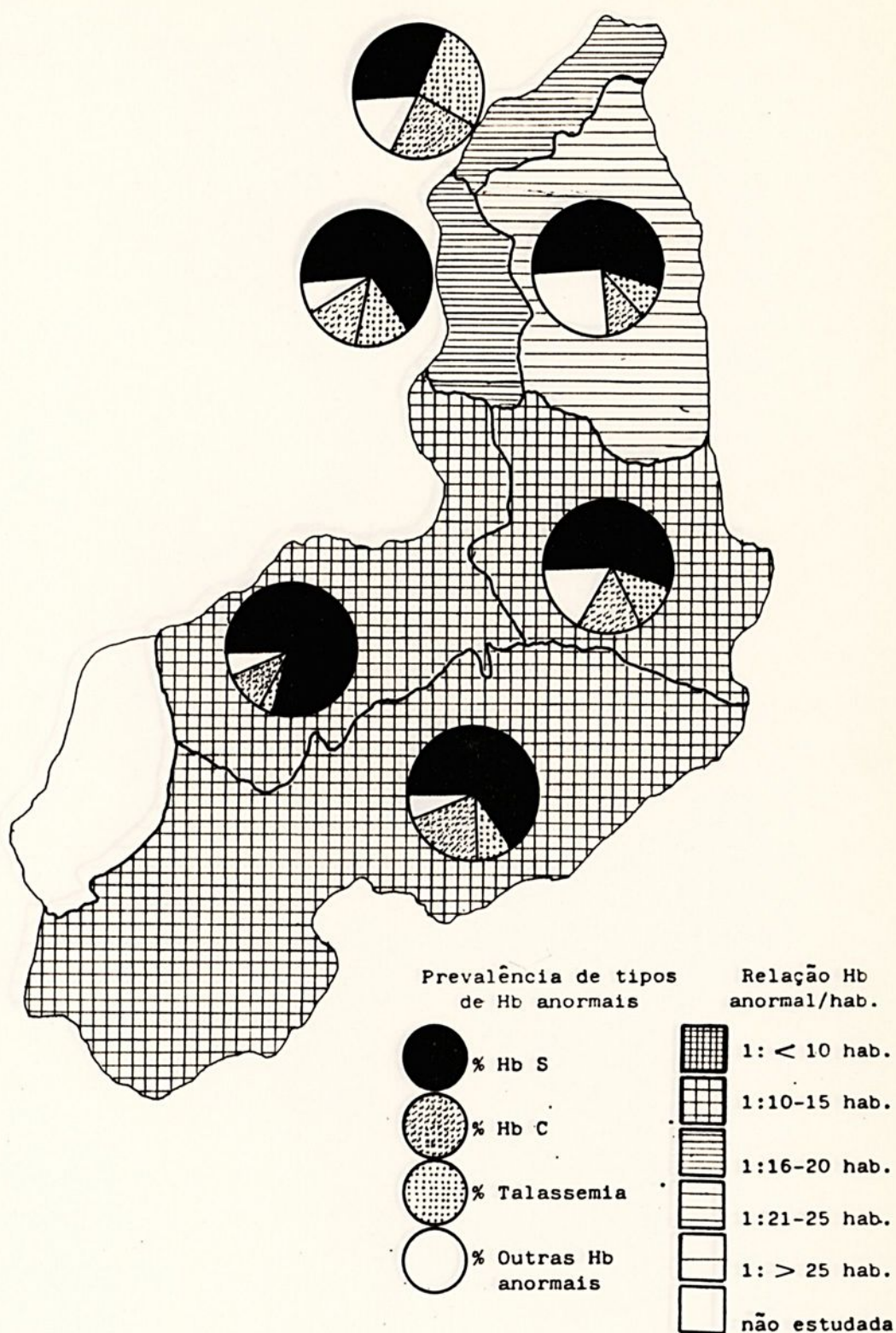


Figura 07 - Distribuição das prevalências de hemoglobinas anormais e dos seus tipos, por região, na amostra total.

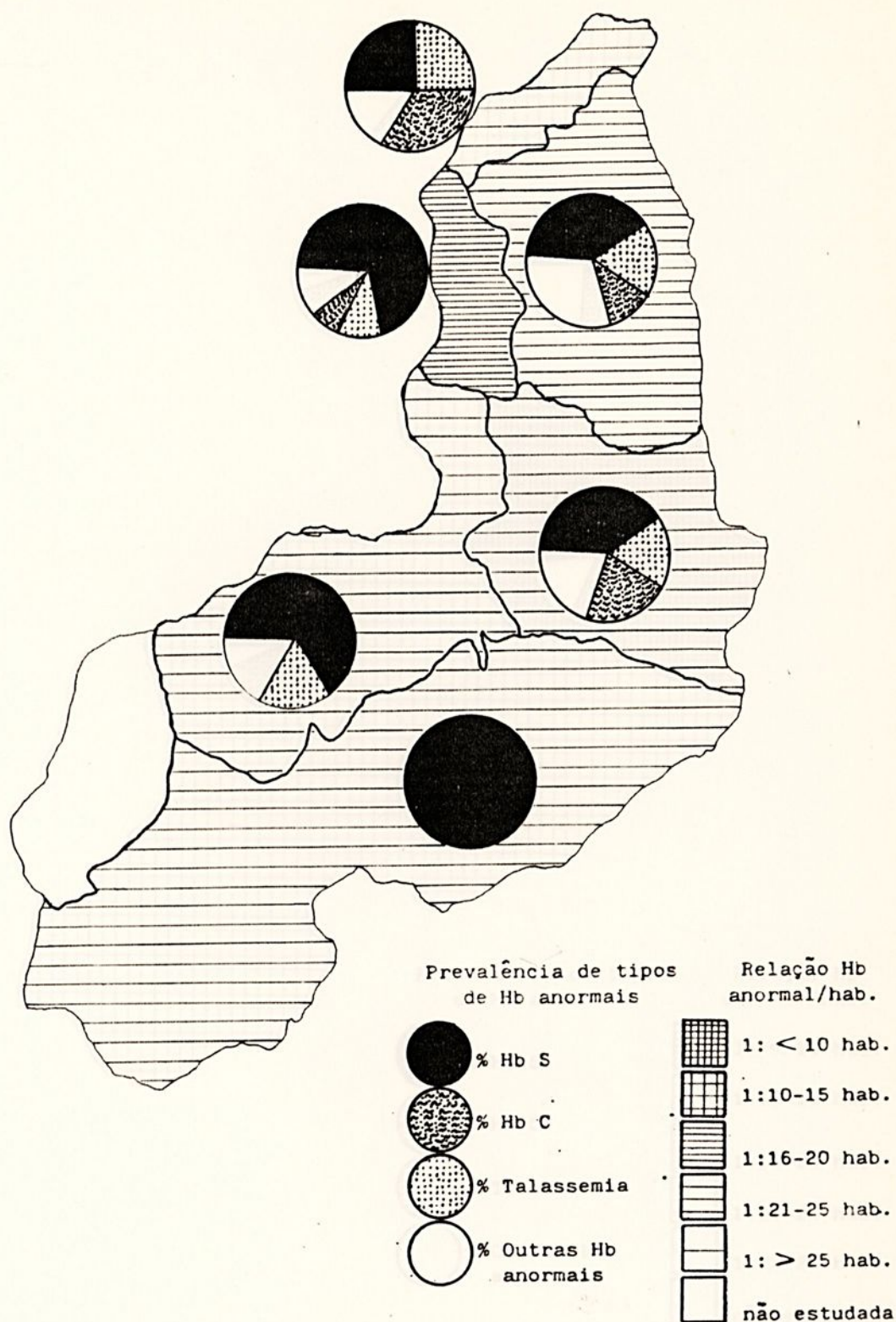


Figura 08- Distribuição das prevalências de hemoglobinas anormais e dos seus tipos, por região, no grupo caucasóide.

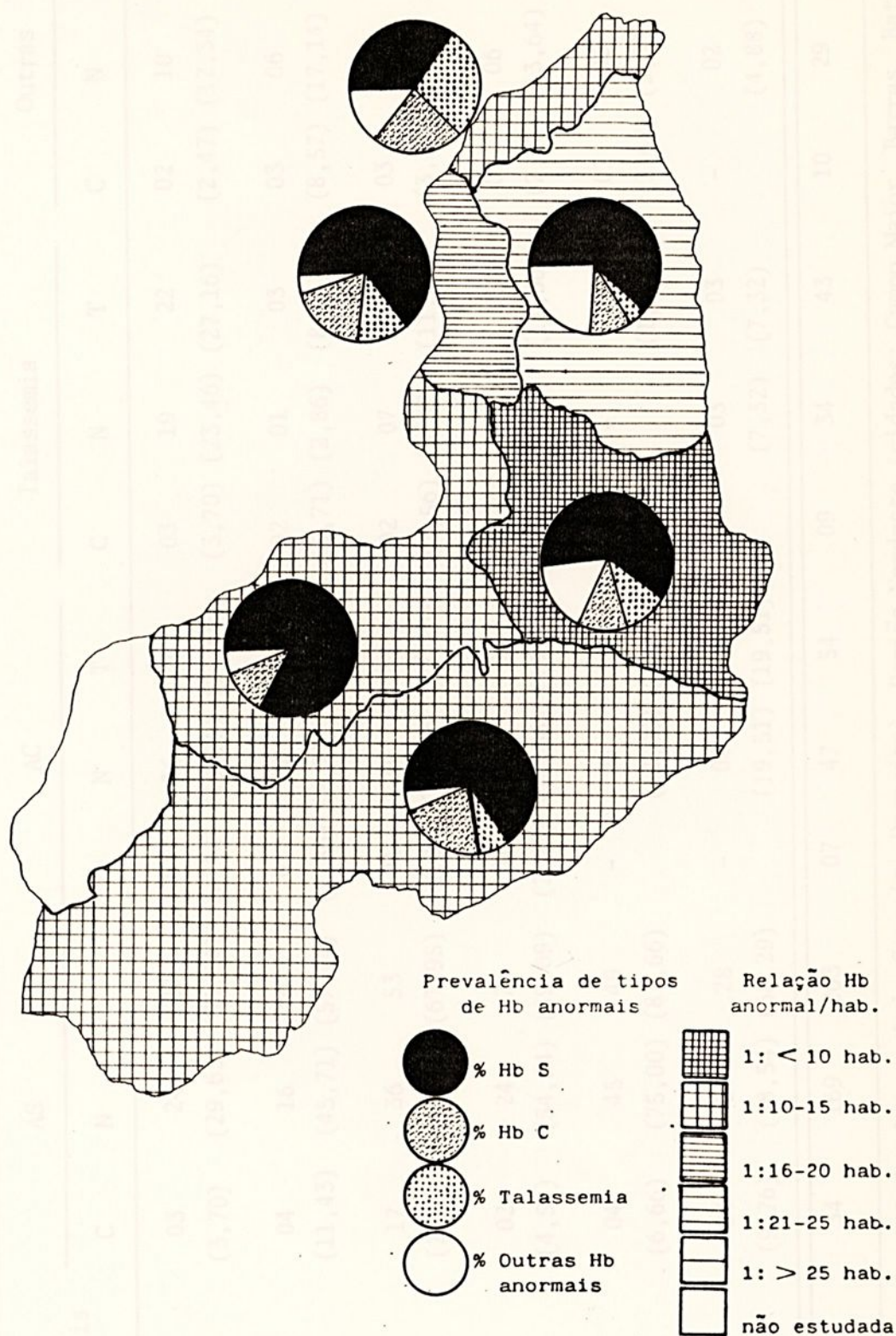


Figura 09 - Distribuição das prevalências de hemoglobinas anormais e dos seus tipos, por região, no grupo negróide.

Tabela 12. Frequências dos tipos de hemoglobinas anormais em caucasóides (C), negróides (N) e na amostra total (T) analisada, por região.

Região	Total Hb.Anormais	AS			AC			Talassemia			Outras		
		C	N	T	C	N	T	C	N	T	C	N	T
Norte	81	03 (3,70)	24 (29,63)	27 (33,34)	04 (4,94)	16 (19,75)	20 (24,69)	03 (3,70)	19 (23,46)	22 (27,16)	02 (2,47)	10 (12,34)	12 (14,81)
Nordeste	35	04 (11,43)	16 (45,71)	20 (57,14)	01 (2,86)	02 (5,71)	03 (8,57)	02 (5,71)	01 (2,86)	03 (8,57)	03 (8,57)	06 (17,14)	09 (25,72)
Noroeste	78	17 (21,79)	36 (46,15)	53 (67,95)	01 (1,28)	10 (12,82)	11 (14,10)	02 (2,56)	07 (8,97)	09 (11,54)	03 (3,85)	02 (2,56)	05 (6,41)
Leste	44	02 (4,54)	24 (54,54)	26 (59,09)	01 (2,27)	05 (11,36)	06 (13,64)	01 (2,27)	04 (9,09)	05 (11,36)	01 (2,27)	06 (13,64)	07 (15,91)
Oeste	60	04 (6,66)	45 (75,00)	49 (81,66)	-	06 (10,00)	06 (10,00)	01 (1,67)	-	01 (1,67)	01 (1,67)	03 (5,00)	04 (6,67)
Sul	41	04 (9,76)	24 (58,54)	28 (68,29)	-	08 (19,51)	08 (19,51)	-	03 (7,32)	03 (7,32)	-	02 (4,88)	02 (4,88)
TOTAL	339	34	169	203	07	47	54	09	34	43	10	29	39

Região Norte (cidades: Buriti dos Lopes, Luis Correia, Parnaíba); Região Nordeste (cidades: Campo Maior, Barras, Batalha, Piracuruca, Piripiri); Região Noroeste (cidades: José de Freitas, Teresina); Região Leste (Valença, Oeiras, Picos); Região Oeste (Amarante, Angical, Palmeiras, Floriano, Jerumenha); Região Sul (Bom Jesus, S.R.Nonato, Corrente, Gilbuês).

as hemoglobinas anormais foi de 25% na região Norte, próxima de 15% nas regiões Nordeste, Leste e Oeste, e de 10% na região Noroeste. As demais hemoglobinas anormais, detectadas e consideradas como "outras Hb anormais" correspondendo às Hb AD, metemoglobina e casos não identificados, só não foram observadas na região Sul.

No grupo negróide (Figura 9) prevaleceu a Hb AS em todas as regiões, sendo, inclusive, superior a 50% em cinco das seis regiões analisadas. Nas regiões Noroeste, Oeste e Sul a variante AC foi a segunda forma mais freqüente. Quanto às talassemias, a análise da Figura 9 permite verificar que sua freqüência foi superior a 25% na região Norte e variou de 5 a 15% nas regiões Nordeste, Noroeste, Leste e Sul, sendo ausente na região Oeste. As hemoglobinas anormais raras, representadas pelas variantes AI, Hb AB₂ e metemoglobina, estiveram presentes entre as hemoglobinas anormais com freqüência de 24% na região Nordeste.



IV. DISCUSSÃO

A população brasileira caracteriza-se pelo alto grau de miscigenação racial desenvolvida desde o início de nossa colonização. Para este fato contribuiu a dispersão dos escravos africanos e colonizadores estrangeiros nas diferentes regiões brasileiras, à medida que estas iniciavam seu ciclo de desenvolvimento. Desta forma, o geneticista que se interessa em conhecer a variabilidade genética humana encontra na análise da população brasileira ampla diversidade manifestada pelo polimorfismo genético. Salzano (1986) destaca que uma das finalidades do estudo genético das populações é compreender o que ocorre com as características originalmente presentes nos grupos formadores, quando esses estão sujeitos, na população híbrida, a condições ambientais, sócio-econômicas e culturais, muitas vezes, bastante diversas daquelas que cercavam os estoques originais. Pela facilidade de sua obtenção, o sangue tem sido o tecido preferido para esses estudos, e já foram identificados várias centenas de caracteres hereditários que nele se expressam; entre esses destacam-se os tipos de hemoglobinas. Pela típica formação da população brasileira, pode-se considerar que os africanos — especialmente provenientes da costa ocidental da África, e os europeus — notadamente aqueles oriundos de Portugal, Espanha e Itália (SALZANO e col, 1967), contribuíram para que os tipos de hemoglobinas anormais, predominantes no Brasil, fossem a Hb S, a talassemia beta e a Hb C (NAOUM e cols, 1986). Entretanto, a diferente fixação regional desses principais colonizadores e a utilização da mão de obra escrava provavelmente expliquem as va



riações na distribuição desses três tipos de hemoglobinas anormais no território brasileiro.

Ao considerarmos a distribuição geográfica de hemoglobinas variantes no estado do Piauí, três fatores devem ser destacados: a posição geográfica do estado, o elemento colonizador e a atividade econômica predominante no início de sua colonização. O estado situa-se próximo à zona equatorial, tendo um clima excessivamente quente. A aridez de grande parte do seu território e o espectro constante das secas periódicas devem ter contribuído para que não houvesse imigração espontânea de estrangeiros. A partir de 1674, quando houve a primeira fixação de colonizadores no sul do Piauí, verificou-se uma grande concentração no setor rural, em decorrência da atividade econômica implantada. Desde a época da sua colonização até meados do século XIX, a atividade econômica reinante era a pecuária com predominância do latifúndio, cujos proprietários eram portugueses que, na maior parte, não residiam na região. Com o avanço na conquista de terras no Estado e o gradativo desenvolvimento demográfico, os portugueses foram atraídos para as diferentes regiões, constituindo quase que exclusivamente o contingente colonizador europeu. Nas primeiras décadas do século XVIII a imigração para o Piauí era oriunda do próprio Brasil, da zona Açucareira Nordestina, Recôncavo Baiano e Maranhão. Em meados do século XIX, ocorreu pequena imigração de ingleses e sírio-libaneses que se destinaram às regiões Norte e Noroeste do Estado, respectivamente. A contribuição dada pelos imigrantes europeus à população que se formava pode, portanto, ser considerada incipiente, quando comparada ao mesmo processo efetivado nas re



giões do Sul do Brasil (CALMON, 1933 e 1939).

Os proprietários dos latifúndios piauienses eram oriundos de regiões escravistas e tradicionalmente acostumados com o trabalho escravo do negro. Esse fato, juntamente com a postura negativa dos nativos para o trabalho nas fazendas, explica a razão pela qual a imigração de escravos se deu paralelamente à implantação da pecuária. Durante todo o século XVII os escravos africanos constituíram a massa populacional mais representativa (quadro 1).

A miscigenação inicial ocorreu predominantemente entre africanos e nativos (MOTT, 1978), porém o peculiar relacionamento de igualdade mantido entre os diferentes grupos raciais, durante o século XVIII (BARBOSA, 1984), sugere que deve ter sido intensa a miscigenação nessa população. Em uma amostra populacional da atual capital do Estado, os componentes raciais foram estimados em 58% de brancos, 25% de negros, e 17% de índios (GUERREIRO e cols., 1986).

A análise de 5.455 pessoas, provenientes de 22 cidades distribuídas por todo o estado do Piauí, permitiu a obtenção de uma amostragem regional mais representativa. O sistema adotado para selecionar as cidades a serem estudadas (utilizando os critérios de importância administrativa regional, relevância histórica e pólo de atração médica) possibilitou relacionar o processo de formação da população do estado do Piauí com a frequência e distribuição de tipos de hemoglobina; notadamente daquelas formas características dos diferentes povos que participaram na formação da população piauiense.

Com relação às coletas de material, devem ser



considerados dois aspectos básicos. O primeiro, diz respeito às diversas condições experimentadas durante a execução dessa atividade, cujas adversidades são características de um trabalho desse porte. O segundo aspecto refere-se à intensa participação da população e apoio recebido dos médicos dos Postos de Saúde. A dificuldade principal foi sem dúvida alguma, o acesso às cidades, muitas das quais localizadas em regiões de grande carência, no agreste sertão piauiense.

A metodologia utilizada foi diferenciada em seletiva e diagnóstica. As técnicas seletivas consistiram de eletroforese em gel de ágar-amido e teste de resistência osmótica em NaCl 0,36%. A eletroforese em ágar-amido foi utilizada para análise de todas as amostras coletadas, enquanto que o teste de resistência osmótica foi utilizado somente nas 3.055 amostras cuja análise se realizou no laboratório da FUFPI. A técnica de eletroforese em ágar-amido mostrou ser um teste de grande sensibilidade analítica, conforme já foi demonstrado em outras pesquisas populacionais (NAOUM, 1984; RUIZ, 1985). Os resultados obtidos pelo teste de resistência osmótica não foram considerados na presente pesquisa, pois 60% (ou 1.830 amostras) foram positivos. Esse fato provavelmente aconteceu em decorrência da anemia ferropênica altamente incidente no Estado. Como se sabe, a positividade do teste ocorre em portadores de talassemia beta heterozigota e naqueles com aquela forma de anemia.

A identificação de hemoglobinopatias por métodos laboratoriais específicos incluiu: — eletroforese em cellogel pH 8,6 e eletroforese em ágar pH 6,2. Estas revelaram a maior parte dos genótipos das hemoglobinopatias identificadas

(HbAF[↑], Hb AS, Hb AC, Hb AD, Hb AI, Hb AB₂, Hb AH e A₂ aumentada); — método quantitativo em acetato de celulose pH 8,6, utilizado para determinação da concentração de Hb A₂; — dosagem de Hb Fetal, que, associada à pesquisa citológica da distribuição intraeritrocitária dessa hemoglobina, permitiu diferenciar as amostras pertencentes a indivíduos com beta talassemia, daqueles com persistência hereditária de hemoglobina fetal; — eletroforese de cadeias polipeptídicas, utilizada para as amostras com suspeita de Hb AD e Hb AI. A Hb D apresentou-se com as mesmas características da HbD Punjab e a Hb I apresentou-se na posição da Hb I (α^{16} Lis $\rightarrow$ Glu). É importante esclarecer que o diagnóstico laboratorial das talassemias alfa e beta foi, inicialmente, considerado pela presença de Hb H e aumento de HbA₂, respectivamente, e comprovados clinicamente pelos médicos dos Postos de Saúde dos municípios de onde as amostras foram coletadas. Cinco variantes de hemoglobinas, com mobilidades eletroforicamente lentas, não tiveram identificação conclusiva por dificuldades em se obter novas amostras. A metodologia, utilizada no presente trabalho, mostrou pois, ser eficiente para o estudo das hemoglobinopatias, especialmente em populações.

A prevalência de hemoglobinas anormais (6,21%), observada no estado do Piauí, é considerada alta quando comparada com as obtidas no estado de São Paulo por ZAGO e col (1983) (4,0%) e NAOUM e col (1984) (2,5%). Em uma publicação recente sobre a prevalência de hemoglobinas anormais no Brasil, NAOUM e col (1986) mostraram que nos estados do Nordeste, especialmente Bahia, Alagoas, Rio Grande do Norte, Maranhão, Ceará e Paraíba, a média das frequências foi de 5,44%, sendo que a menor pre

valência foi verificada no estado da Paraíba (1,86%) e a maior no estado da Bahia (8,56%). Vários autores realizaram estudos em cidades de diferentes regiões brasileiras, assim, TONDO & SALZANO (1962) e SALZANO e col. (1968b) estudando grupos populacionais de Porto Alegre, CAMPOS (1968) estudando uma população hospitalar de Belo Horizonte, RAMOS (1970) e AZEVEDO (1980) estudando grupos populacionais na Bahia, Culpi (1981), a população de Curitiba, SILVA (1979) e SILVA e col. (1981), a população de Natal, SANTOS (1982), a população de Manaus e RUIZ (1985) estudando recém-nascidos da cidade de Santos, obtiveram resultados diversos, notadamente no que se refere à frequência de talassemias e ao número de genótipos descritos nesse trabalho.

Com o presente estudo determinou-se que, na população total analisada, uma pessoa em cada dezesseis é portadora de alterações genéticas para hemoglobina. Entre as hemoglobinas alteradas as formas variantes foram 6,8 vezes mais frequentes que as talassemias. A análise conjunta dos resultados indica uma evidente predominância de genes para hemoglobinas de origem africana, pois 75,8% das hemoglobinas anormais da população analisada são compostas pelos genes S e C. Esse resultado evidencia a intensa contribuição do negro na formação da população do Piauí, e mostra, inclusive, uma prevalência tão intensa quanto aquelas observadas em populações da Bahia, Alagoas, Maranhão e Rio de Janeiro, sendo superior aos resultados encontrados em Minas Gerais, Goiás, Pernambuco, Paraná, São Paulo, Paraíba, Rio Grande do Norte e Pará (NAOUM e col, 1986). Entretanto, não obstante a contribuição do negro na constituição populacional do Piauí, com relação a alta prevalência de indivíduos heterozigotos para Hb AS, vale destacar a endemicidade da malária no estado do Piauí, cujas citações datam de 1819, tendo sido agravada, especialmente na década de quarenta (Porto



& SILVA, 1948). Registra-se que, de 1939 a 1945 a malária incidiu, em média, em 40% da população, apresentando-se persistente, até 1973, em algumas áreas do Sul do Estado, como Corrente e Parnaguá (PORTO, 1974). Os dados obtidos nesse trabalho permitem observar uma coincidência entre maiores frequências do genótipo Hb AS e regiões mais atingidas por essa doença.

Os dez casos de Hb raras, que foram verificados, incluíram os genótipos Hb AD, Hb AI e HbAB₂ os quais representam variantes já descritas na população brasileira. A Hb D, frequente no Paquistão e Noroeste da Índia (WINTER, 1981), foi detectada anteriormente em algumas regiões brasileiras (TONDO & SALZANO, 1962; ARAÚJO, 1971; SALZANO, 1979; RUIZ, 1985; NAOUM e col 1986). Entretanto, merece destaque a alta prevalência desse genótipo na população estudada (1:56,5 Hb anormais identificadas). Esse resultado é considerado interessante quando comparado ao obtido no estado de São Paulo por NAOUM e col (1984) (1:88,6 hemoglobinas anormais), uma vez que o procedimento técnico adotado nos dois estudos foi semelhante. A Hb I detectada em negros americanos e na Austrália (WINTER, 1981) já foi identificada no Nordeste brasileiro e no estado de São Paulo (NAOUM e col 1984 e 1986); e a Hb B₂ descrita por CEPPELLINI e col (1958), e cuja frequência é de cerca de 1% na Venezuela (ARENDS, 1960), foi também detectada por SILVA e cols (1981), na população de Natal, por ZAGO e col (1983) e NAOUM e col (1986), no estado de São Paulo.

A identificação de quatro genótipos talassêmicos cuja prevalência na amostra foi de 0,78%, representando 12,7% entre os tipos anormais, indica, inicialmente, conside



rável difusão desses genes, que foram detectados apenas em heterozigose. Dos casos talassêmicos, predominaram os do tipo beta (0,74%), incluindo um caso de interação com o gene HbS. Os casos diagnosticados como talassemia do tipo α foram raros (0,04%).

Conforme pode ser avaliado pelos resultados obtidos, e ao contrário do que se tem observado em outras populações brasileiras (NAOUM e col, 1986), a prevalência de talassemia foi similar entre caucasóides e negróides analisados. Esse fato merece destaque, pois o contingente populacional no Piauí foi essencialmente português e africano, até o século XIX. Como já foi citado, de acordo com MOTT (1978) houve imigração para esse Estado, de outros pontos do país. Assim, hipoteticamente podemos admitir que as talassemias provieram de várias contribuições populacionais: portugueses, africanos, pernambucanos e, inclusive, libaneses que, a partir de fins do século XIX, imigraram para o Piauí. As frequências de talassemia do tipo beta não são muito variáveis nessas populações. Assim, oscila de zero a 2% nas regiões da África de onde provieram negros, é de 2% na Síria e variável de 1 a 2% em Portugal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985).

TAVARES-NETO & AZEVEDO (1977 e 1978), em seus trabalhos sobre origem racial e aspectos históricos de nomes familiares na Bahia, analisaram principalmente os sobrenomes de origem religiosa adotados pelos escravos. Sabe-se, conforme documentos históricos dos séculos XVIII e XIX, que a grande maioria dos escravos não possuía sobrenome; os poucos que os tinham haviam adotado, preferencialmente, os de conotação religiosa (AZEVEDO & FREIRE, 1983). Com a abolição da escravatura, al

guns negros africanos decidiram optar pelo sobrenome de seus "senhores" que eram de origem ibérica, predominantemente portugueses. No presente trabalho, a análise de sobrenomes (apêndice 6) revelou que todos os portadores de talassemia beta têm origem ibérica, evidentemente portuguesa. Esse resultado e as observações históricas consideradas, anteriormente, permitem supor que a presença dessa forma de talassemia no estado do Piauí seja, portanto, em grande parte, devida a contribuição portuguesa e africana.

O grupo caucasóide constituiu apenas 26,9% da amostra total; entretanto, foram identificadas 60 hemoglobinas anormais entre os 1.467 indivíduos analisados. Para essa população, a frequência de Hb anormais (4,09%), pode ser considerada alta quando comparada com valores obtidos em outras regiões do Brasil (ARAÚJO, 1971; NAOUM e col, 1984).

Segundo SALZANO (1985) a frequência do genótipo Hb AS em brasileiros identificados como brancos é de cerca de 1%. No estado do Piauí a frequência desse genótipo foi 2,32% e entre as hemoglobinas anormais, correspondeu a 57%, seguido da talassemia beta heterozigota (13,3%), da metemoglobinemia (13,3%), Hb AC (12%), e outros tipos restantes (4,4%). Esses resultados evidenciam a penetração de genes de origem africana (68%) em indivíduos classificados como caucasóides. A talassemia beta heterozigota apresentou uma prevalência menor na população caucasóide do Piauí quando comparada com os resultados obtidos no estado de São Paulo (NAOUM e col 1984). Esse resultado pode ser explicado, considerando-se a colonização do estado, tipicamente portuguesa, bem como a elevada incidência de

anemia ferropênica, cuja presença mascara o diagnóstico para talassemia beta, pela diminuição da síntese de Hb A₂. A alta incidência de metemoglobinemia detectada nessa população (1 para cada 7,6 hemoglobinas anormais) justifica a proposição de trabalhos relacionados à caracterização dessa patologia no Estado, especialmente nas regiões Norte, Nordeste e Leste, onde foi mais frequente. Apesar da impossibilidade de determinar a causa das metemoglobinemias detectadas, deve-se considerar que a deficiência de Glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6PD) — cuja incidência é considerada alta (6,17) no estado do Piauí (SOARES, 1987) — seja um fator a ser levado em conta.

Entre os negróides os genes africanos para Hb S e Hb C representaram 78% entre as hemoglobinas anormais detectadas, valores esperados para uma população, cujo contingente africano foi bastante expressivo até o século XVIII. É importante considerar que tal contingente avaliado entre 2,5 a 4 milhões, entrados no Brasil, eram provenientes de regiões africanas onde a prevalência de Hb AS é variável de 15 a 30%; a de Hb AC variável de 1 a 5% para a maioria das regiões de origem e de cerca de 20% em outras como a Costa do Ouro e do Marfim (COQUELET e col, 1978). Os valores obtidos são superiores aos encontrados por NAOUM e col (1984) na população do estado de São Paulo. A frequência de 4,24% do genótipo AS para essa população negróide, sem dúvida, indica aí a introdução de genes "caucasóides", e pouco difere do encontrado por SALZANO e col (1968a) na população negróide de Porto Alegre; mas é menor que o encontrado por ZAGO e col (1983) na população do Nordeste de São Paulo.

* Comunicação Pessoal.



A talassemia beta heterozigota representou, na população negróide, uma prevalência de 10% entre as hemoglobinas anormais. Esse resultado pode ser explicado considerando-se a miscigenação com os brancos, mas pode ser atribuído à existência dessa anormalidade, possivelmente a talassemia beta tipo "negro" (β^+/β^+), embora em baixa frequência, na costa ocidental da África (COQUELET e col, 1978).

Os valores obtidos para os índices de diversidade forneceram uma estimativa da quantidade de variabilidade genética para hemoglobina existente na população do estado do Piauí. Quando se refere às frequências de hemoglobinas anormais de cada cidade, os valores de H diferem significativamente; entretanto, este fato não ocorre quando o cálculo considera as frequências dos tipos de hemoglobinas anormais observadas no conjunto das 22 cidades. Tal fato pode ser explicado, considerando-se que as cidades diferiram quanto à incidência de anormalidades nos caucasóides e negróides, embora no total as frequências dos tipos de hemoglobinas anormais fossem semelhantes nos dois grupos. Assim, por exemplo, as frequências de hemoglobinas anormais, respectivamente, em caucasóides e negróides, foram de 2,94% e 9,95% em Picos, e 5,55% e 15,15% em Oeiras, mostrando, assim, uma distribuição espacial heterogênea. No segundo caso, em que são consideradas as frequências de hemoglobinas anormais para negróides e caucasóides, as diferenças se compensam, resultando em semelhanças de frequência na área total estudada.

As frequências observadas para os genes de hemo



globinas permite considerar que a população estudada é polimórfica para Hb^A e Hb^S . Quanto ao gene Hb^S a frequência encontrada foi superior à descrita por SILVA e col (1981) na população de Natal, WEIMER e col (1981), na população de Porto Alegre, SCHÜLER e col (1982) em uma população da Amazônia.

TONDO e cols (1962), ao estudarem a população negróide de Porto Alegre, encontraram frequência de 0,030 para o alelo Hb^S . Esta frequência e todas as descritas por ele para populações negróides da América Latina, a partir de trabalhos de vários pesquisadores, são superiores às descritas no presente trabalho. Quanto ao alelo Hb^C , a frequência encontrada foi igual à descrita por aquele autor, e superior apenas à descrita para população negróide de Puerto Rico.

Os genes $Hb D$, $Hb I$ e $Hb B_2$ apresentaram frequências que os caracterizam como alelos idiomorfos (MORTON, 1967). Segundo esse autor, os alelos idiomorfos não patológicos fornecem poucas informações sobre o valor adaptativo do fenótipo que eles determinam. OLVERA e col (1979) estudando diferentes tipos de inversões cromossômicas em *D. pseudo-obscura* e ALLISSON (1955) referindo-se à tipos de hemoglobinas presentes nas populações, com frequências muito baixas, admitem que essas variantes representam uma variabilidade genética "estocada" na população. Segundo esses autores, tais variantes podem representar, no momento, formas alternativas que não tiveram grande valor adaptativo, em uma determinada época. Entretanto, segundo KIMURA (1979) poderiam ser variantes genéticas, seletivamente neutras, já que não apresentam efeitos evidentes no valor adaptativo de seus portadores.

O efeito da idade na distribuição de hemoglobinas anormais apresentou resultados concordantes com os obtidos por NAOUM (1984), que verificou uma prevalência homogênea de hemoglobinas anormais para indivíduos negróides, nas diferentes faixas etárias. TONDO e col (1962), estudando a população negróide de Porto Alegre, não encontraram associação entre idade e prevalência de Hb AS e Hb AC. No presente trabalho, verificou-se uma maior incidência de Hb anormais em menores de 10 anos, e distribuição bastante heterogênea nos caucasóides, com valores mais baixos em indivíduos mais idosos. Entretanto, quando os subgrupos foram examinados separadamente, não mostraram diferenças significativas. As diferenças significativas observadas para hemoglobinas africanas, nas faixas etárias 10 — 20, 20 — 30 e > 50 anos, entre caucasóides e negróides, foram provavelmente consequência da maior frequência dessas formas de hemoglobinas na população negróide. Com relação a esse grupo racial, poder-se-ia aceitar, tal qual SALZANO e col (1968a), a possibilidade de existência de um valor adaptativo neutro para portadores de hemoglobinopatias, notadamente nos indivíduos AS. As informações obtidas no presente trabalho ainda são insuficientes para se admitir algum tipo de desvantagem nos indivíduos portadores de hemoglobinopatias, tal qual ocorre em regiões malarígenas como, por exemplo, na África (MOURANT, 1983). No entanto, sugerem a importância da realização de estudos direcionados à população infantil e idosa nas diferentes regiões do país.

A distribuição de hemoglobinopatias no estado do Piauí pode ser avaliada por cidade e por região geográfica. Com relação às cidades, percebe-se uma distribuição heterogênea na amostra total e nos grupos raciais caucasóide e negróide. Isto provavelmente evidencia diversidade nos processos de formação das populações das diferentes regiões em relação aos gens para hemoglobinas. Entretanto, considerando-se que a amostra analisada, para a maioria das cidades, foi pequena, decidiu-se por agrupá-las em regiões.

O estudo das frequências de hemoglobinopatias e de cada um de seus tipos em cada uma das regiões geográficas considerados, permite avaliar os deslocamentos populacionais que ocorreram durante a colonização e até o presente, e estabelecer áreas com diferentes prevalências das anormalidades estudadas. A análise da Figura 7 e Tabela 11, que mostram a distribuição regional de hemoglobinas anormais no estado do Piauí, permite verificar a alta prevalência e as variações regionais para essa anormalidade. Na região Centro-Sul, observa-se homogeneidade na prevalência de hemoglobinopatias, onde uma pessoa entre dez a quinze analisadas era portadora de alguma forma de hemoglobina anormal. Observa-se que, à medida que se dirige para as regiões Norte, Nordeste e Noroeste, ocorre um ligeiro decréscimo nessa proporção.

Na análise dos tipos de hemoglobinas, é evidente a predominância do gene Hb^S sobre os outros anormais, em todas as regiões. A segunda forma mais frequente variou regionalmente. Por exemplo, houve maior incidência de talassemia na região Norte, e de $Hb\ AC$ na região Sul. Essa diferença regional está relacionada diretamente com seus grupos formadores, pois,



na região Norte, provavelmente devido ao litoral, houve grande contribuição de portugueses e vaqueiros anônimos provenientes da Bahia e Pernambuco. Já nas regiões do Centro-Sul, locais de desenvolvimento rural e grandes fazendas latifundiárias, o elemento escravo constituiu a grande massa populacional.

Nos caucasóides, verificou-se grande homogeneidade de quanto à frequência de hemoglobinopatias, destacando-se apenas a região Noroeste, por sua alta prevalência. Na análise dos tipos, merece destaque a distribuição nas regiões Norte e Sul. Na região Norte, a Hb AC esteve mais frequente que as outras formas anormais identificadas. Esse fato pode ser resultante do número de casos com essa hemoglobinopatia, identificada na cidade de Buriti dos Lopes. É importante destacar que todos esses casos foram provenientes de indivíduos não aparentados. Buriti dos Lopes localiza-se no percurso rodoviário que comunica todas as cidades do interior do Estado com o litoral. Por isso, é provável que os grupos formadores que aí se fixaram tenham relação com o trajeto do gado, utilizado nas charqueadas presentes na cidade de Parnaíba. Entretanto, as informações históricas existentes não permitem a elaboração de hipóteses consistentes sobre o evento genético observado.

Na região Sul, a única forma anormal detectada nos caucasóides foi a Hb AS. Esse fato justifica a explicação anteriormente dada sobre a intensa contribuição do escravo africano e a conseqüente miscigenação ocorrida, o que também é demonstrado pela prevalência de talassemia (8%) entre as hemoglobinopatias aí detectadas, nos negróides.

No que se refere à população negróide, é evidente a heterogeneidade observada na distribuição de prevalências de

hemoglobinas anormais nas diferentes regiões. É importante destacar a alta prevalência ($1 < 10$ hab.) verificada na região Leste do Estado, provavelmente em consequência da alta concentração desse grupo racial, nos primórdios da sua colonização. Isto pode ser explicado pelo fato de situar-se, nessa região, a cidade de Oeiras, primeira capital do Estado. Conforme era esperada para uma população negróide, em todas as regiões a frequência dos tipos Hb AS e Hb AC foi predominante entre as formas anormais detectadas. Na região Norte, não obstante a alta frequência de Hb AC, a talassemia mostrou-se bastante expressiva (28%). Esse fato provavelmente seja demonstrativo da miscigenação ocorrida na região, já que o maior número de indivíduos analisados foi proveniente da cidade de Parnaíba. Essa é uma das cidades litorâneas onde se estabeleceram portugueses e ingleses, que aí desenvolveram as charqueadas e o comércio de exportação de peles e cereais. Entretanto, não pode ser descartada a hipótese da existência de talassemia beta tipo "negro", pois esta poderia ser frequente nos africanos que contribuíram para a formação populacional dessa região.

Obviamente, a utilização de uma metodologia mais refinada, no estudo das hemoglobinopatias detectadas na população desse Estado, será de grande valia para uma caracterização genética mais precisa. Considerando-se que a maioria dos polimorfismos humanos está presente em praticamente todos os grupos raciais, e com frequências diferentes para os diversos alelos, será de grande importância o estudo do maior número possível de sistemas polimórficos nessa população. Esse estudo associado a outros elementos da antropologia física, elementos culturais e demais informações históricas contribuirão, sem dúvida, na



elaboração de inferências sobre os movimentos migratórios e as interrelações dos contingentes formadores da população piauiense.

Nesse trabalho foi analisado um total de 3.453 amostras de sangue de indivíduos aparentemente saudáveis, na faixa etária de 3 meses a 80 anos, provenientes de 22 cidades do estado do Piauí. Esse estado situa-se na região Nordeste, ocupando uma extensão de 250.954 km² de território brasileiro, e tem uma população aproximada de 2.150.000 habitantes.

Os objetivos dessa investigação foram verificar a variabilidade genética devida à presença de hemoglobinas anormais na população piauiense; relacionar a distribuição regional de hemoglobinopatias com grupo racial, faixa etária, origem de sobrenome e o processo de colonização do Estado. Os resultados obtidos permitem, por um lado, considerar a realização de trabalhos similares de grande importância, pois contribuem para o conhecimento da variabilidade genética das hemoglobinas, em nosso país. Por outro lado, informam aos serviços de saúde a necessidade de implantação de programas de atendimento e conscientização da população com referência a esse tipo de patologia hereditária.

A sequência operacional do trabalho permitiu considerar plenamente enegável a sua realização em outras regiões do Brasil, também precárias.

As técnicas laboratoriais utilizadas permitiram detectar um total de 339 hemoglobinas anormais e identificar as variantes: S, C, H, D, I, E₂, além de concentrações aumentadas de HbA₂, Hb fetal e metemoglobina.

O número de indivíduos analisados re-

RESUMO E CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi analisado um total de 5.455 amostras de sangue de indivíduos aparentemente sadios, na faixa etária de 3 meses a 86 anos, provenientes de 22 cidades do estado do Piauí. Esse estado situa-se na região Nordeste, ocupando uma extensão de 250.954 km² do território brasileiro, e tem uma população aproximada de 2.150.000 habitantes.

Os objetivos dessa investigação foram verificar a variabilidade genética devida a presença de hemoglobinas anormais na população piauiense; relacionar a distribuição regional de hemoglobinopatias com grupo racial, faixa etária, origem de sobrenome e o processo de colonização do Estado. Os resultados obtidos permitem, por um lado, considerar que a realização de trabalhos similares é de grande importância, pois contribuem para o conhecimento da variabilidade genética das hemoglobinas, em nosso país. Por outro lado, informam aos serviços de saúde a necessidade de implantação de programas de atendimento e conscientização da população com referência a esse tipo de patologia hereditária.

A seqüência operacional do trabalho permitiu considerar plenamente enegável a sua realização em outras regiões do Brasil, também precárias.

As técnicas laboratoriais utilizadas permitiram detectar um total de 339 hemoglobinas anormais e identificar as variantes: S, C, H, D, I, B₂, além de concentrações aumentadas de HbA₂, Hb fetal e metemoglobina.

O número de indivíduos caucásios analisados re

presentou 26,9% da amostra e a frequência de hemoglobinas anormais nesse grupo foi 4,09%, enquanto nos negróides essa frequência foi 7,00%.

O estigma falciforme (HbAS) e a hemoglobina C em heterozigose (HbAC) constituíram 75,8% das 339 alterações detectadas, sendo que nos caucasóides a relação de Hb AC + Hb AS, por habitante, foi de 1:36 e nos negróides foi de 1:18, ou seja, exatamente o dobro. Entretanto, caucasóides e negróides não diferiram significativamente quanto às frequências de talassemias. Esses resultados são a consequência, ao nível genético, da miscigenação ocorrida entre brancos e negros. A incidência elevada de talassemia nos negróides faz com que se considere provável a existência de genes para talassemia nos africanos introduzidos no Piauí.

Não se observou incidência diferencial de Hb anormais nas várias faixas etárias. Entretanto, a menor incidência de hemoglobinopatias em caucasóides maiores de 40 anos, quando comparada com a distribuição verificada em negróides, estimula o desenvolvimento de estudos comparativos das frequências dessas alterações entre as faixas etárias, nas populações.

A distribuição geográfica das hemoglobinopatias, na amostra estudada e no grupo negróide, mostrou que em todas as regiões houve predomínio da Hb AS sobre outros tipos de hemoglobinas anormais. No grupo caucasóide, esse predomínio ocorreu em cinco das seis regiões do Estado, sendo a única hemoglobina anormal detectada na região Sul. Esses resultados são outra consequência da grande participação do contingente africano na colonização do estado do Piauí. A associação verificada entre tipos de Hb anormais na amostra estudada, cujas proporções



podem ser assim representadas:

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Hb AS > Hb AC > talassemia >
metemoglobinemia > outras Hb anormais

A total of 5,455 blood samples from apparently
comprovam a penetração, em maior intensidade, de genes caracte-
rísticos da população africana.

A ocorrência de metemoglobinemia sugere a neces-
sidade de serem realizados programas para a caracterização labo-
ratorial dessa alteração a fim de determinar se sua causa está
ligada à enzimopatias, especialmente à deficiência de G-6PD.

A distribuição geográfica dos genes para talasse-
mia na amostra estudada possibilita inferir sobre a mobilidade
e fixação do maior contingente de portugueses no Estado. Na re-
gião Norte esses genes tiveram a maior prevalência.

A diversificação nos tipos e frequências de hemo-
globinopatias nas seis regiões do Estado, com prevalências loca-
lizadas de alguns tipos, permite que se estabeleça associações
entre tipos de hemoglobinopatias e contingentes colonizadores.

lation with respect to this type of hereditary pathology.

The operational sequence of the present study
permits the conclusion that its application would be fully
feasible in other depressed regions of Brazil.

The laboratory technique utilized permitted the
detection of 339 abnormal hemoglobins and the identification
of S, C, H, D, T, E₂, as variants, as well as increased
concentrations of Hb A₂, fetal Hb and methemoglobin.

The number of caucasoid individuals analyzed
represented 26.9% of the sample, with a frequency of abnormal

SUMMARY AND CONCLUSIONS

A total of 5,455 blood samples from apparently healthy individuals aged 3 months to 86 years from 22 cities in the state of Piauí were analyzed. This state is located in the northeastern region of Brazil, occupying 250,954 Km² of the national territory, and has a population of approximately 2,150.000 habitants.

The objectives of the present investigation were 1) to determine the genetic variability of abnormal hemoglobins present in the population of the state of Piauí and 2) relate the regional distribution of hemoglobinopathies to racial group, age group, origin of family name and the process of colonization in the state. Studies of this kind are very important since they contribute to the knowledge of genetic hemoglobin variability in our country and inform the health services about the need for programs of treatment and education of the population with respect to this type of hereditary pathology.

The operational sequence of the present study permits the conclusion that its application would be fully feasible in other depressed regions of Brazil.

The laboratory technics utilized permitted the detection of 339 abnormal hemoglobins and the identification of S, C, H, D, I, B₂, as variants, as well as increased concentrations of Hb A₂, fetal Hb and methemoglobin.

The number of caucasoid individuals analyzed represented 26.9% of the sample, with a frequency of abnormal

hemoglobins of 4.09%, while among blacks this frequency was 7.00%.

The sickle-cell trait (Hb AS) and the C heterozygotic hemoglobin (Hb AC) represented 75.8% of the 339 alterations detected so that the ratio of Hb AC + Hb AS per inhabitant was 1:36, and 1:18 among blacks, i.e. exactly double. Nevertheless, caucasoids and blacks did not differ significantly in thalassemia frequency. These results are the genetic consequence of miscegenation between whites and blacks. The high incidence of thalassemia among the blacks suggests the probable existence of genes for thalassemia among the Africans introduced in to Piauí.

No significant association was observed between abnormal Hb and age group. However, the lower incidence of hemoglobinopathies in caucasoids older than 40 in relation to blacks opens perspectives for studies comparing age groups, within populations.

The geographical distribution of hemoglobinopathies in the total and black population showed that all regions had a predominance of the gene for Hb S over other types of pathological hemoglobins. In the caucasoid population, the gene predominated in 5 of the 6 regions of the state and was the only gene for abnormal Hb detected in the southern region. These results provide evidence of the great participation of the African contingent in the colonization of the state of Piauí. The association of abnormal Hb types in the total population, whose proportions can be represented as follows:

Hb As > Hb AC > thalassemia > methemoglobinemia
> other hemoglobinopathies



proves the more intense penetration of genes characteristic of the African population.

The presence of methemoglobinemia indicated the need for programs characterizing this alteration to determine if its cause is related to enzyme disturbances, especially G-6PD deficiency.

The geographical distribution of thalassemia genes in the total population permitted inferences as to the mobility or fixation of the major Portuguese contingent in the state. In the northern region, these genes had the second largest prevalence.

The diversification of pathological hemoglobins in the six regions of the state, with localized prevalence of some types, indicate an association between types of pathological hemoglobins and colonizing contingents.

ARAÚJO, J.T. Geographical Distribution and Incidence of Hemoglobin Variants in Brazil. In: *Proceedings of the First Inter-American Symposium on Hemoglobin: Genetic, Functional and Physical Studies on Hemoglobins*. Caracas, August 26-31, 1971.

ARENDT, T. Thalassemia and its variants in Venezuela. In: *Proceedings of the VIIIth International Congress of Hematology*. Tokyo: 1314-1317, 1960.

AZEVEDO, E.S.; ALVES, A.F.P.; SILVA, M.C. e cols. Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate-dehydrogenase variants in 1,200 school children of Bahia, Brazil. *Am. J. Phys. Anthropol.* 53:309-315, 1980.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCASTRE, J.M.P. Memória Cronológica, Histórica e Corográfica da Província do Piauí, Teresina, COMEPI, 1981.
- ALLISSON, A.C. Aspects of polymorphisms in man. *Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 20:239-255, 1955.
- ALLISSON, A.C. Polymorphism and Natural Selection in Human Populations. *Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol.*, 29: 137-149, 1964.
- ANTONARAKIS, S.E.; ORKIN, S.H.; CHENG, T.C.; SCOTT, A.F.; SEXTON, J.P.; TRUSKO, S.P.; CHARACHE, S.; KAZAZIAN, H.H., Jr. β Thalassemia in American blacks. Novel mutations in the "TATA" box and an acceptor site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1154-1158, 1984.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO PIAUÍ 1982-1983 - Fundação Centro de Pesquisas Econômicas e Sociais do Piauí.
- ARAÚJO, J.T. Geographical Distribution and Incidence of Hemoglobin Variants in Brazil. In: *Proceedings of the First Inter-American Symposium on Hemoglobins Genetic, Functional and Physical Studies on Hemoglobins*. Caracas, Karger 26-31, 1971.
- ARENDS, T. Thalassemia and its variants in Venezuela. In: *Proceedings of the VIIIth International Congress of Hematology*. Tokyo: 1214-1217, 1960.
- AZEVEDO, E.S.; ALVES, A.F.P.; SILVA, M.C. e cols. Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate-dehydrogenase variants in 1.200 school children of Bahia, Brazil. *Am.J. Phys. Anthropol.* 53:509-515, 1980.

- AZEVEDO, E.S. & FREIRE, N.B.V.M. Nome e sobrenomes na Interpretação da História do Povo. *Ciência e Cultura*. 36(5):753-758, 1983.
- BANK, A. Globin Gene Structure In Disorders of Hemoglobin. In: Brown, E.B. (ed) - Progress In Hematology. Vol. XII: 25-42, 1981.
- BANK, A.; DOBKIN, C.; DONOVAN-PELUSO, M. & YOUNG, K. - Abnormal Globin Gene Structure and Expression in β -thalassemia. Part I. Gene Defects in the Thalassemias. Fifth Cooley's Anemia Symposium. Vol. 445. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 1-9, 1985.
- BARALLE, F.E.; SHOULDERS, C.C. & PROUDFOOT, N.J. The Primary Structure of the Human ϵ -Globin Gene. *Cell*, 21: 621-626, 1980.
- BARBOSA, T.M.B. O Escravo na Formação Social do Piauí: Perspectiva Histórica do século XVIII. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 1984.
- BARG, R.; BARTON, P.; CAINE, A.; CLEMENTS, R.L.; FERGUSON-SMITH, M.A.; MALCOLN, S.; MORRISON, N. & MURPHY, C.S. - Regional localization of the human α -globin gene to the short arm of chromosome 16(16p12-pter) using both somatic cell hybrids and in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 32:252, 1982.
- BARNHART, M.J.; HENRY, R.L. & LUSHER, S.M. *Sickle cell*. Michigan, USA, Scope, 1976.
- BARTON, P.; MALCOLN, S.; MURPHY, C. & FERGUSON-SMITH, M.A. Localization of the Human α -globin gene cluster to the short arm of chromosome 16 (16p12-16pter) by hybridization in situ. *J.Mol. Biol.* 156:269-278, 1982.
- BELLINGHAM, A.J. Haemoglobins with altered oxygen affinity. *British Medical Bulletin*. 32(3): 234-238, 1976.



- BETKE, K.; MARTI, H.R.; SCHLICHT, I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. *Nature*, 212: 262, 1966.
- BOSISIO, A.B.; WAJCMAN, H.; ROCHETTE, J.; GIANAZZA, E. & RIGHETTI, G. Electrophoretic and chromatographic techniques for the differential diagnosis of a Haemoglobin abnormality: Hb E Heterozygosity. *J. of chromatography*. 330 (2):299-306, 1985.
- BRADLEY, T.B.; WOHL, R.C. & SMITH, G.T. Elongation of the α -globin chain in a black family: Interaction with Hb G Philadelphia. *Clin. Res.*, 23: 131A, 1975.
- BRITANNICA ATLAS. London, *Encyclopaedia Britannica*, 1972.
- BUNN, H.F.; BRADLEY, T.B.; DAVIS, W.E.; DRYSDALE, J.W.; BURKE, J.F.; BECK, W.S.; LAVER, M.B. Structural and functional studies on hemoglobin Bethesda ($\alpha_2\beta_2$ 145his), a variant associated with compensatory erythrocytosis. *J. Clin. Invest.*, 51:2299-2309, 1972.
- BUNN, H.F. & FORGET, B.G. *Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects*. W.B.Saunders Company ed. 1986.
- BUSCH, H.; RAMACHANDRA, R.; ROTHBLUM, L.; CHOI, Y.C. - SnRNA's, SnRNP's and RNA processing. *Ann. Rev. Biochem.*, 51: 617-654 1982.
- CALMON, P. *História da civilização brasileira*. Nacional, 1933.
- CALMON, P. *História do Brasil*. Nacional. Vol 1 e 2, 1939.
- CAMPOS, L.O. Hemoglobinas anormais em 1000 pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais. Belo Horizonte, Tese de Doutorado. UFMG, 1968.
- CASTELO BRANCO FILHO, M. *Ciclo do Vaqueiro*. Rio de Janeiro, C.B.A.G., 1983.

- CEPPELLINI, R.; KUNKEL, H. G. & DUNN, L. C. cit. LEHMANN, H.
Brit. Med. Bull. 15:40-60, 1959.
- CHANG, J. C. & KAN, Y. W. β^0 thalassaemia, a nonsense mutation in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 2886-2889, 1979.
- CLEGG, J. B. & GAGNON, J. Structure of the ξ chain of human embryonic hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(10): 6076-6080, 1981.
- CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J. & MILNER, P. F. Haemoglobin Constant Spring - A chain termination mutant? *Nature*, 234: 337-340, 1971.
- CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J.; CONTOPOULOU-GRIVA, I.; CAROUTSOS, K.; POUNGOURAS, P. & TSEVRENIS, H. - Haemoglobin Icaria, a new chain termination mutant which causes α -thalassaemia. *Nature*, 251: 245-247, 1974.
- COLLINS, F. S.; STOECKERT, C. J.; SERJEANT, G. R.; FORGET, B. G.; WEISSMAN, S. M. $\gamma^G\beta^+$ hereditary persistence of fetal hemoglobin: Cosmid cloning and identification of a specific mutation 5' to the γ^G gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 4894-4898, 1984.
- COLLINS, F. S. & WEISSMAN, S. M. The molecular Genetics of Human Hemoglobin. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 31: 315-462, 1984.
- COQUELET, M. L.; JAEGER, G.; MULLENDER, N. Anomalies de l'hémoglobine et données médico-biologiques chez 10.000 africains. *Nouv. Rev. Fr. D'Hémat.* 20: 465-477, 1978.
- CRAIK, C. S.; BUCHMAN, S. R. & BEYCHOK, S. O_2 binding properties of the product of the central exon of β -globin gene. *Nature* 291: 87-90, 1981.
- CULPI, L. Migração, Grupos sanguíneos ABO e Rh e tipos de Hemoglobinas na população de Curitiba. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1981.

- DEISSEROTH, A.; NIENHUIS, A.; LAWRENCE, J.; GILES, R.; TURNER, P.; RUDDLE, F.H. Chromosomal localization of human β globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75(3): 1456-1460, 1978.
- DEISSEROTH, A.; NIENHUIS, A.; TURNER, P.; VELEZ, R.; ANDERSON, W.F.; RUDDLE, F.; LAWRENCE, J.; CREAGAN, R. & KUCHERLAPATI, R. Localization of the human α globin structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular hybridization assay. *Cell*, 12: 205-218, 1977.
- DEJONG, W.W.; MEERA KHAN, P. & BERNINI, L.F. Hemoglobin Koya Dora: High frequency of α -chain termination mutant. *Am. J. Hum. Genet.*, 27: 81-90, 1975.
- DOBZHANSKY, Th. *Genética do Processo Evolutivo*. São Paulo, Polígono e EDUSP, 1973.
- EATON, W.A. The relationship between coding sequences and function in haemoglobin. *Nature*, 284: 183-185, 1980.
- EFSTRATIADIS, A.; POSAKONY, J.W.; MANIATIS, T.; LAWN, R.M.; O'CONNELL, C. et al. The structure and Evolution of the Human β -globin gene family. *Cell*, 21: 653-668, 1980.
- EMBURY, S.H. The interaction of coexistent α -thalassemia and sickle cell anemia: A model for the clinical and cellular results of diminished polymerization? Fifth Cooley's anemia symposium. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 445: 37-44, 1986.
- EMBURY, S.H.; GHOLSON, M.A.; GILLETTE, P.; RIEDER, R.F. & THE NATIONAL COOPERATIVE STUDY OF SICKLE CELL DISEASE. The Leftward Deletion α -thal-2 Haplotype in a Black Subject with Hemoglobin SS. *Blood*, 65(3): 769-771, 1985.



- EMBURY, S.; LEBOWITZ, R.; DOZY, A. & KAN, Y.W. Organization of the α globin genes in the Chinese α thalassemia syndromes. *J. Clin. Invest.*, 63: 1307-1310, 1979.
- EMBURY, S.H.; MILLER, J.A.; DOZY, A.M.; KAN, Y.W.; CHAN, V. & TODD, D. Two different molecular organizations account for the single α globin gene of the α thalassemia 2 genotype. *J. Clin. Invest.*, 66:1319-1325, 1980.
- FEINGOLD, E.A.; COLLINS, F.S.; WEATHERALL, J.E.; STOECKERT, Jr. C.J.; WEISSMAN, S.M. & FORGET, B.G. Molecular analysis of deletion and nondeletion hereditary persistence of Fetal Hemoglobin and Identification of a new mutation causing β thalassemia. Part III. Molecular Basis of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin and δ , β -thalassemia. Fifth Cooley's Anemia Symposium. Vol. 445. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 159-169, 1985.
- FELICE, A.E.; CLEEK, M.P.; MCKIE, K.; MCKIE, V. & HUISMAN, T. H. J. A rare α -thalassemia-1 of blacks is a $\xi\alpha$ -thalassemia-1 associated with deletion of all α and ζ -globin genes. *Blood*, 63:1253-1257, 1984.
- FELICE, A.E.; CLEEK, M.P.; MARINO, E.M.; MCKIE, K.M.; MCKIE, V.C.; CHANG, B.K.; HUISMAN, T.H.J. - Different ξ globin gene deletions among Black Americans. *Hum. Genet.*, 73 (3):221-224, 1986.
- FLINT, J.; HILL, V.S.; BOWDEN, D.K.; OPPENHEIMER, S.J.; SILL, P.R. et al. High frequencies of α -thalassaemia are the result of natural selection by malaria. *Nature*, 321:744-750, 1986.
- FRIEDMAN, M.J. Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1994-1997, 1978.
- FRIEDMAN, M.J.; ROTH, E.F.; NAGEL, R.L.; TRAGER, W. The role of hemoglobins C, S, and N Barts in the inhibition of malaria parasite development in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28: 777-780, 1979.

- FRITSCH, E.F.; LAWN, R.M.; MANIATIS, T. Characterisation of deletions which affect the expression of fetal globin genes in man. *Nature*, 279: 598-603, 1979.
- FUNDAÇÃO CEPRO - Centro de Pesquisas Econômicas e Sociais do Piauí - *Piauí - evolução, realidade e desenvolvimento*. Teresina, 1979.
- GILMAN, J.G. & HUISMAN, T.H.J. A mutation 158 base pairs 5' to the γ^G gene is associated with elevated γ^G production. *Blood*, 64, Suppl. 1, 62a, 1984.
- GIMFERRER, E.; BAIGET, M.; DARBRE, P.D.; LEHMANN, H.- Haemoglobin Lepore Boston in a spanish family. *Acta Haematol.* 56: 234-240, 1976.
- GLASS, R.E. *Gene Function*. London, Croom Helm London, 1982.
- GÕ, M. Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin. *Nature*. 291: 90-92, 1981.
- GOLDSMITH, M.E.; HUMPHRIES, R.K.; LEY, T.; CLINE, A.; KANTOR, J.A.; NIENHUIS, A.W. "Silent" nucleotide substitution in a β^+ thalassemia globin gene activates splice site in coding sequence RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 2318-2322, 1983.
- GOOSSENS, M.; LEE, K.Y.; LIEBHABER, S.A. & KAN, Y.W. - Globin structural mutant $\alpha^{\text{Leu} \rightarrow \text{Pro}}$ is a novel cause of α -thalassaemia. *Nature*, 296: 864-865, 1982.
- GORSKY, J.; FIORI, M. & MACH, B. A new nonsense mutation as the molecular bases for β^0 thalassemia. *J. Mol. Biol.*, 154: 537-540, 1982.
- GUERREIRO, J.F.; SAMPAIO, Z.A. & DIAS, F.C.S. - Sistemas da colinesterase do soro (Locos CHE₁ e CHE₂) e ABO na População de Teresina (Pi). *Ciência e Cultura*, 28 (7) Sup.: 863, 1986.

- HEGESH, E.; HEGESH, J. & KAFTORY, A. Congenital methemoglobine_mia with a deficiency of cytochrome b5. *The new Engl. J. Med.* 314: 757-761, 1986.
- HELLER, P. Hemoglobinopathic dysfunction of the red cell. *Am. J. Med.*, 41: 799-802, 1968.
- HIGGS, D.R.; GOODBOURN, S.E.Y.; LAMB, J.; CLEGG, J.B.; WEATHERALL, D.J. & PROUDFOOT, N.J. α -thalassemia caused by a polyadenylation signal mutation. *Nature*, 306: 398-400, 1983.
- HIGGS, D.R.; PRESSLEY, L.; CLEGG, J.B.; WEATHERALL, D.J. & SERJEANT, G.R. α thalassemia in black populations. *Johns Hopkins Med. J.* 146: 300-310, 1980.
- HONING, G.R. & ADAMS III, J.G. *Human Hemoglobin Genetics*. New York, Springer Verlag/Wien, 1986.
- HUISMAN, T.H.J. *The Hemoglobinopathy - (Methods in Hematology)*. New York, Churchill Livingstone, 1986.
- IFEDIBA, T.C.; STERN, A.; IBRAHIM, A.; RIEDER, R.F. *Plasmodium falciparum* in vitro: Diminished Growth in Hemoglobin H Disease Erythrocytes. *Blood*, 65(2): 452-455, 1985.
- IHC - International Hemoglobin Information Center Policies. *Hemoglobin*, 10 (3): 259-327, 1986.
- JENSEN, M.; WIRTZ, A.; WALTHER, J.V.; SCHEMKEN, E.M.; LARYEA, M. D.; DRIESEL, A.J. - Hereditary persistence of fetal haemoglobin (HPFH) in conjunction with a chromosomal translocation involving the haemoglobin β locus. *Br. J. Haemat.*, 56: 87-94, 1984.
- KAN, Y.W. - Molecular pathology of α -thalassemia. Fifth Cooley's Anemia Symposium. Vol. 445. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 28-36, 1985.

- KAN, Y.W.; DOZY, A.M. - Polymorphism of DNA sequence adjacent to the human β -globin structural gene: Relationship to sickle mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75: 5631-5635, 1978.
- KAN, Y.W. & DOZY, A.M. - Evolution of the Hemoglobin S and C. Genes in world populations. *Science*, 209: 388-391, 1980.
- KAN, Y.W.; DOZY, A.; STAMATOYANNOPOULOS, G.; HADJIMINAS, M.G.; ZACHARIDES, Z.; FURBETTA, M.; CAO, A. - Molecular basic of hemoglobin H disease in the Mediterranean population. *Blood*, 54: 1434-1438, 1979.
- KAZAZIAN, H.H. Jr.; ORKIN, S.H.; ANTONARAKIS, S.E.; SEXTON, J.P.; BOEHM, C.D.; GOFF, S.C. & WABER, P.G. - Molecular characterization of seven β -thalassemia mutations in Asian Indians. *EMBO, J.*, 3(3): 593-596, 1984.
- KILMARTIN, J.V. - Interaction of Haemoglobin with Protons, CO_2 , and 2,3-Diphosphoglycerate. *British Medical Bulletin*. 32(3): 209-212, 1976.
- KIMURA, M. The neutral theory of molecular evolution. *Scientific American* 241 (5): 94-104, 1979.
- KINNIBURGH, A.J.; MAQUAT, L.E.; SCHEDL, T.; RACHMILEWITZ, E. & ROSS, J. - mRNA- deficient β^0 -thalassemia results from a single nucleotide deletion. *Nucl. Acids. Res.* 10(18): 5421-5426, 1982.
- KLEIWAUER, E. - Determination of fetal hemoglobin: Elution technique. In: Standardization of laboratory reagents and methods for the detection of hemoglobinopathies. Center for Disease Control. Atlanta, Georgia, 1974.
- KNOWLTON, C.S. - *Sírios e Libaneses*. Ahambi, 1960.
- KOEFFLER, H.P.; SPARKES, R.S.; STANG, H. & MOHANDAS, T. - Regional assignment of genes for human α -globin and phosphoglycollate phosphatase to the short arm of chromosome 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78(11): 7015-7018, 1981.



- KUTLAR, A.; GARDINER, M.B.; HEADLE, M.G.; REESE, A.L.; CLEEK, M.P.; NAGLE, S.; SUKUMARAN, P.K. & HUISMAN, T.H.J. - Heterogeneity in the molecular basis of three types of hereditary persistence of fetal hemoglobin and the relative synthesis of the γ^G and γ^A types of γ chain. *Biochem. Genet.*, 22: 21-35, 1984.
- LANG, A. & LORKIN, P.A. - Genetics of Human Haemoglobins. *British Medical Bulletin*. 32 (3): 239-245, 1976.
- LAUER, J.; SHEN, C.J. & MANIATIS, T. The chromosomal arrangement of human α -like globin genes: Sequence homology and α -globin gene deletions. *Cell*. 20: 119-130, 1980.
- LAWN, R.M.; EFSTRATIADIS, A.; O'CONNELL, C. & MANIATIS, T. - The nucleotide sequence of the human β -globin gene. *Cell*, 21: 647-651, 1980.
- LEBO, R.V.; ANTHONY, V.C.; BURKHART-SCHULTZ, K.; DOZY, A.M.; Yu, L.C. & KAN, Y.W. - Assignment of human β -, γ -, and δ -globin genes to the short arm of chromosome 11 by chromosome sorting and DNA restriction enzyme analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76 (11): 5804-5808, 1979.
- LEHMANN, H. & CASEY, R. - Human haemoglobin. In: LEHMANN, H. & HUNTSMAN, R.G. (eds.). *Man's Hemoglobin*. Amsterdam, North Holland Publ., 1974. p. 347-417.
- LEHMAN, H. & HUNSTMAN, R.G. - *Man's haemoglobins*. Amsterdam, North Holland Publ., 1974.
- LEVY, M.S.F. - O Papel da migração internacional na evolução da população brasileira (1872 a 1972). *Rev. Saúde Pública*, São Paulo. 8 (supl.): 49-90, 1974.
- LEWONTIN, R.C. *The genetic basic of evolutionary change*. New York. Columbia University Press. 1974.
- LIEBHABER, S.A.; GOOSSENS, M.J. & KAN, Y.W. - Cloning and complete nucleotide sequence of human 5'- α -globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77:7054-7058, 1980.

- LIEBHABER, S.A. & KAN, Y.W. - Differentiation of the mRNA transcripts originating from the α_1 and α_2 -globin loci in normals and α -thalassemics. *J. Clin. Invest.* 68: 439-446, 1981.
- LIEBHABER, S.A. & KAN, Y.W. - α -thalassemia caused by an unstable α -globin mutant. *J. Clin. Invest.*, 71: 461-466, 1983.
- LUZZATTO, L. Genetics of red cells and susceptibility to malaria. *Blood*, 56: 961, 1979.
- MARENGO-ROWE, A.J. - Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. *J. Clin. Path.*, 18: 790-792, 1965.
- METTLER, L.E. & GREGG, T.G. - *Genética de Populações e Evolução*. São Paulo, Polígono; EDUSP, 1973.
- MICHELSON, A.M. & ORKIN, S.H. - The 3' untranslated regions of the duplicated human α -globin genes are unexpectedly divergent. *Cell*, 22: 371-377, 1980.
- MILNER, P.F. & WRIGHTSTONE, R.N. - The unstable hemoglobins: a review. *Prog. Clin. Biol. Res.* 51: 197-222, 1981.
- MORTON, N.E. - Genetic studies of Northeastern Brazil: Summary and conclusions. *Ciência e Cultura*. 19 (1): 14-30, 1967.
- MORTON, C.C.; KIRSCH, I.R.; TAUB, R.A.; ORKIN, S.H. & BROWN, J.A. - Localization of the beta-globin gene by chromosomal in situ hybridization in a normal male and a individual with erythroleukemia. *Cytogenet. Cell Genet.* 37: 544-545, 1984.
- MOSCHONAS, N.; DEBOER, E.; GROSVELD, F.G. DAHL, M.H.M.; WRIGHT, S.; SHEWMAKER, C.K. & FLAVELL, R.A. - Structure and expression of a cloned β^0 thalassaemia globin gene. *Nucl. Acids Res.*, 9: 4391-4401, 1981.
- MOTT, L.R.B. - Estrutura demográfica das fazendas de gado do Piauí - colonial: Um caso de povoamento rural centrífugo. *Ciência e Cultura*. 30 (10): 1196-1210, 1978.

- MOURANT, A.E. - *Blood relations - Blood Groups and Anthropology*. Oxford, 1983.
- NAGEL, R.L.; RAVENTOS-SUAREZ, C.; FABRY, M.E.; TARROWITZ, H.; SICARD, D.; LABIE, D. - Impairment of the growth of *P. falciparum* in Hb EE erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, 68:303-305, 1981.
- NAGEL, R.L. & LABIE, D. - The consequences and Implications of the multicentric origin of the Hb S gene. In: *Experimental Approaches for the study of hemoglobin switching*. Alan R. Liss: 93-103, Inc. 1985.
- NAOUM, P.C. Investigação laboratorial das hemoglobinopatias. *Rev. Bras. Pesquisas Med. Biol.*, 12: 213-221, 1979.
- NAOUM, P.C.; Hemoglobinopatias no Estado de São Paulo. Métodos de estudo, Prevalência, Distribuição Geográfica e Relações Históricas e Antropológicas. Tese de Livre-Docência. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". São José do Rio Preto, 1982.
- NAOUM, P.C. - *Diagnóstico das Hemoglobinopatias*. São Paulo, Sarvier, 1987.
- NAOUM, P.C.; DOMINGOS, C.R.B.; MAZZIERO, P.A.; CASTILHO, E.M. & GOMES, C.T. - Hemoglobinopatias no Brasil. *Boletim da S.B.H.H.* VIII (141): 180-188, 1986.
- NAOUM, P.C.; MATTOS, L.C. & CURI, P.R. - Prevalência e distribuição geográfica de hemoglobinas anormais no estado de São Paulo, Brasil. *Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 97 (6): 534-545, 1984
- NAOUM, P.C.; MOURA CAMPOS, M.C.R.; PARENTI, M.F. & SZYMANSKI, A.M. An improved eletrophoretic method for a screening program for haemoglobinopathies. *Experientia*, 36: 875-876, 1980.
- NIENHUIS, A.W.; ANAGNOU, N.P. & LEY, T.Y. - Advances in Thalassaemia Research. *Blood*, 63(4): 738-758, 1984.
- NUNES, O. - *Pesquisas para a História do Piauí*. Vol. 1, 2 ed., Rio de Janeiro, Artenova S.A., 1974.



- OLD, J.M.; AYYUB, H.; WOOD, W.G.; CLEGG, J.B.; WEATHERALL, D.J.
Linkage analysis of nondeletion hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Science*, 215: 981-982, 1982.
- OLVERA, O.; POWELL, J.R.; ROSA, M.E.; SALCEDA, V.M.; GASO, M.I.; GUZMAN, J.; ANDERSON, W.W. & LEVINE, L. - Population Genetics of Mexican *Drosophila* VI. Cytogenetic Aspects of the Inversion Polymorphism in *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution*. 33(1): 381-395, 1979.
- ORKIN, S.H.; CHENG, T.; ANTONARAKIS, S.E. & KAZAZIAN, H.H. Jr.
Thalassemia due to a mutation in the cleavage-polyadenylation signal of the human β -globin gene. *EMBO J.*, 4:453-456, 1985.
- ORKIN, S.H. & GOFF, S.C. - The duplicated human α -globin genes: Their relative expression as measured by RNA synthesis. *Cell*, 24:345-351, 1981a.
- ORKIN, S.H. & GOFF, S.C. - Nonsense and frameshift mutations in β^0 -thalassemia detected in cloned β -globin genes. *Journal of Biological Chemistry*, 256: 9782-9784, 1981b.
- ORKIN, S.H.; GOFF, S.C. & HECHTMAN, R.L. - Mutation in an intervening sequence splice junction in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 5041-5045, 1981.
- ORKIN, S.H.; KAZAZIAN, H.H., Jr. - The mutation and polymorphism of the human β -globin gene and its surrounding DNA. *Ann. Rev. Genet.*, 18: 131-171, 1984.
- ORKIN, S.H.; KAZAZIAN, H.H.; ANTONARAKIS, S.E.; GOFF, S.C.; BOEHM, C.D. et al - Linkage of β thalassaemia mutations and β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β -globin gene cluster. *Nature*, 296: 627-631, 1982.
- ORKIN, S.H. & MICHELSON, A. - Partial deletion of the α globin structural gene in human α thalassaemia. *Nature*, 286:538-540, 1980.
- ORKIN, S.H.; OLD, J.M.; WEATHERALL, D.J. & NATHAN, D.G. - Partial deletion of β -globin gene DNA in certain patients with β^0 -thalassemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 2400-2404, 1979.

- ORKIN, S.H.; SEXTON, J.P.; CHENG, T.; GOFF, S.C.; GIARDINA, P. J. V.; LEE, J.J.; KAZAZIAN, H.H., Jr. - ATA box transcription mutation in β -thalassemia. *Nucl. Acids Res.*, 11:4727-4734, 1983.
- PAGNIER, J.; MEARS, J.G.; DUNDA-BELKODJA, O.; REGO, K.E.; BELDJORD, C.; NAGEL, R.L.; LABIE, D. Evidence of the multicentric origin of the hemoglobin S gene in África. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1771, 1984.
- PASVOL, G.; WEATHERALL, D.J.; WILSON, R.J.M. - Effects of foetal hemoglobin on susceptibility of red cells to *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 270: 171-173, 1977.
- PASVOL, G.; WEATHERALL, D.J. & WILSON, R.J.M. - Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria. *Nature*, 274: 701-703, 1978.
- PERUTZ, M.F. Structure and mechanism of haemoglobin. *British Medical Bulletin*. 32(3): 195-208, 1976.
- PIRASTU, M.; LEE, K.Y.; DOZY, A.M.; KAN, Y.W.; STAMATOYANNOPOULOS, G.; HADJIMINAS, M.G.; ZACHARIADES, Z.; ANGIUS, A.; FURBETTA, M., ROSATELLI, C.; CAO, A.. Alpha-thalassemia in two mediterranean populations. *Blood*, 60: 509-512, 1982.
- PIRASTU, M.; SAGLIO, G.; CAO, A. & KAN, Y.W. - Initiations codon mutation as a cause of α -thalassemia. *J. Biol. Chem.*, 259: 12315-12317, 1984.
- PONCZ, M.; BALLANTINE, M.; SOLOWIEJCZYK, D.; BARAK, J.; SCHWARTZ, E.; SURREY, S. β -thalassemia in a kurdish jew. Single base changes in the T-A-T-A- Box. *J. Biol. Chem.*, 257: 5994-5996, 1982.
- PORTO, C.E. - *Roteiro do Piauí*. Rio de Janeiro, Artenova S.A., 1974.
- PORTO, C.E. & SILVA, CÂNDIDO - Contribuição ao estudo do problema da Malária no Piauí. *Rev. Associação Piauiense de Medicina*. 9: 3-20, 1948.



- ALLAND, P.M. - Abnormal hemoglobins studies and counseling in Brazil. In: *Proceedings of the First International Conference on Hemoglobinopathies*, 1980.
- PRESSLEY, L.; HIGGS, D.R.; ALDRIDGE, B.; METAXATOU-MAVROMATI, A.; CLEGG, J.B. & WEATHERALL, D.J. - Characterisation of a new α thalassemia 1 defect due to a partial deletion of the α globin gene complex. *Nucl. Acids Res.*, 8: 4889-4898, 1980a.
- PRESSLEY, L.; HIGGS, D.R.; CLEGG, J.B.; PERRINE, R.P.; PEMBREY, M.E. & WEATHERALL, D.J. - A new genetic basis for hemoglobin H disease. *N. Engl. J. Med.*, 303: 1383-1388, 1980b.
- PROUDFOOT, N.J. & MANIATIS, T. - The structure of a human α globin pseudogene and its relationship to α globin gene duplication. *Cell*, 21: 537-544, 1980.
- PROUDFOOT, N.J.; GIL, A. & MANIATIS, T. - The structure of the human zeta-globin gene and a closely linked, nearly identical pseudogene. *Cell*, 31: 553-563, 1982.
- RAMOS, K.K.L.; PEDREIRA, C.M. - Estimativas da frequência de Hb C em grupos populacionais da Bahia. *Ciência e Cultura*. (Suppl.) 22: 106, 1970.
- RODRIGUES, N. - *Os africanos no Brasil*. Nacional. 1932.
- ROTH, E.F. Jr.; RAVENTOS-SUAREZ, C.; RINALDI, A.; NAGEL, R.L. - Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 298, 1983.
- RUIZ, M.A. - Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos na cidade de Santos, São Paulo. Dissertação de Mestrado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1985.
- SAENZ, G.F. - Estudio de laboratorio de las hemoglobinopatias Y transtornos afines *Sangre*. 23: 358-360, 1978.
- SAENZ, G.F. & MOREIRA, J.F. - Laboratório hemoglobinopatias. *Manual latinoamericano*. Universidade de Costa Rica, 1980.

- SALZANO, F.M. - Abnormal hemoglobins studies and counseling in Brazil. In: *Proceedings of the First International Conference of sickle cell disease: A world health problem*. Scott, R.B. (ed), Howard University, Washington, 1979.
- SALZANO, F.M. - Incidence, effects, and management of sickle cell disease in Brazil. *The Am. J. Ped. Hematol/Oncology*, 7(3): 240, 1985.
- SALZANO, F.M. - Em busca das raízes. *Ciência Hoje*. 5(25): 48-53, 1986.
- SALZANO, F.M. & FREIRE-MAIA, N. - *Populações Brasileiras: aspectos demográficos genéticos e antropológicos*. São Paulo, Co. Ed. Nacional, 1967.
- SALZANO, F.M.; LEWGOY, F.; TONDO, C.V.; ROCHA, F.I. - G6-PD deficiency and abnormal hemoglobins in a Brazilian population. *Acta Genet. Med. Gemellol.* 17: 607-703, 1968b.
- SALZANO, F.M.; ROCHA, F.J. & TONDO, C.V. - Hemoglobin types and gene flow in Porto Alegre, Brazil, *Acta Genet., Basel*. 18: 449-457, 1968a.
- SANTOS, S.E.B.- Estudos Genéticos, demográficos e epidemiológicos na população de Manaus. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1982.
- SHEN, S.H.; SLIGHTOM, J.L.; SMITHIES, O. - A history of the human fetal globin gene duplication. *Cell*, 26: 191, 1981.
- SCHNEIDER, R.G. - Differentiation of electrophoretically hemoglobins - such as S, D. G and P ou A₂, C, E and O - by electrophoresis of the globin chains. *Clinical Chemistry*, 20: 1111-1115, 1974.
- SCHNEIDER, R.G. & BARWICK, R.C. - Measuring relative electrophoretic mobilities of mutant hemoglobins and globin chains. *Hemoglobin*, 2(5): 417-435, 1978.
- SCHULER, L.; SALZANO, F.M. & FRANCO, M.H.L.P. - Demographic and blood genetic characteristics in an Amazonian population. *Journal of Human Evolution*. 11: 549-558, 1982.

- SILVA, M.I.A.F. - Estudos Genéticos na População de Natal e em Anêmicos de Porto Alegre. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1979.
- SILVA, M.I.A.F. ; SALZANO, F.M. & LIMA, F.A.M.- Migration, imbreeding, blood groups and hemoglobin types in Natal, Brazil. *Studies in Physical Anthropology*, 7: 3-11, 1981.
- SILVESTRONI, E. & BIANCO, I. - Screening for microcytemia in Italy: Analysis of data collected in the past 30 years. *Am. J. Hum. Genet.*, 27: 198, 1975.
- SLIGHTOM, J.L.; BLECHI, A.E. & SMITHIES, O. - Human fetal γ^G - and γ^A - globin genes: Complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. *Cell*, 21: 627-638, 1980.
- SPRITZ, R.A. & SANTEN, V.L.V. - Deletion Analysis of the Human γ -Globin IVS2 Sequence requirements for RNA Splicing. *Annals New York Academy of Sciences*. 10-18, 1984.
- SPRITZ, R.A.; DERIEL, J.K.; FORGET, B.G. & WEISSMAN, S.M. - Complete nucleotide sequence of the human δ -globin gene. *Cell*. 21: 639-646, 1980.
- STEINBERG, M.H.; COLEMAN, M.B.; ADAMS III, J. G.; HARTMANN, R. C.; SABA, H. & ANAGNOU, N.P. - A new gene deletion in the α -like globin gene cluster as the molecular basis, for the Rare α -thalassemia 1 ($--/\alpha\alpha$) in Blacks: HbH disease in Sick cell trait. *Blood*, 67(2): 469-473, 1986.
- STEVENS, M.C.G.; MAUDE, G.H.; BECKFORD, M.; GRANDISON, Y.; MASON, K.; TAYLOR, B. et al. - α thalassemia and the Hematology of homozygous sickle cell disease in childhood. *Blood*, 67(2): 411-414, 1986.
- TAKIHARA, Y.; NAKAMURA, T.; YAMADA, H.; TAKAGI, Y. & FUKUMAKI, Y. - A novel mutation in the TATA Box in a Japanese Patient with β^+ -thalassemia. *Blood*, 67 (2): 547-550, 1986.

- TAVARES-NETO, J. & AZEVEDO, E.S. - Racial origin and historical aspects of family names in Bahia, Brazil. *Human Biology*. 49: 287-299, 1977.
- TAVARES-NETO, J. & AZEVEDO, E.S. - Family names and ABO blood group frequencies in a mixed population of Bahia, Brazil. *Human Biology*. 50: 361-367, 1978.
- THEIN, S.L.; OLD, J.M.; WAINSCOT, J.S.; PETROU, M.; MODELL, B.; WEATHERALL, D.J. - Population and genetic studies suggest a single origin for the Indian deletion β^0 thalassaemia. *British Journal of Haematology*, 57: 271-278, 1984.
- TONDO, C.V. & SALZANO, F.M. - Abnormal hemoglobins in a Brazilian negro population. *The American Journal of Human Genetics*. 14 (4): 401-409, 1962.
- TRAGER, W.; JENSEN, J.B. - Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193: 673-675, 1976.
- TRECARIN, R.F.; LIEBHABER, S.A.; CHANG, J.C.; LEE, K.Y.; KAN, Y.W.; FURBETTA, M.; ANGIUS, A. & CAO, A. - β^0 thalassemia in Sardinia is caused by a nonsense mutation. *J. Clin. Invest.*, 68: 1012-1017, 1981.
- TRENT, R.J.; BOWDEN, D.K.; OLD, J.M.; WAINSCOT, J.S.; CLEGG, J.B.; WEATHERALL, D.J. - A novel rearrangement of the human β -like globin gene cluster. *Nucleic Acid. Res.*, 9: 6723-6733, 1981a.
- TRENT, R.J.; HIGGS, D.R.; CLEGG, J.B. & WEATHERALL, D.J. - A new triplicated α -globin gene arrangement in man. *Br. J. Haemat.*, 49: 149-152, 1981b.
- TROUNGOS, C.; KRISHNAMOORTHY, R.; LOMBARDO, T.; SORTINO, G.; CACCIOLA, E. & LABIE, D. - A leftward deletion α^+ thalassemia found in East Sicily in conjunction with heterozygous β -thalassemia. *Hum. Genet.* 67: 216-218, 1984.

- TUAN, D.; MURNANE, M.J.; DE RIEL, J.K. & FORGET, B.G. - Heterogeneity in the molecular basis of hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Nature*, 285:335-337, 1980.
- VELLA, F. - "Acid agar-gel electrophoresis of human hemoglobins". *Am. J. Clin. Path.*, 49: 440, 1968.
- VILLEGAS, A.; ALVAREZ-SALA, J.L.; VALVERDE, F.; MARTINEZ, R.; JARA, N. & ESPINÓS, D. - Hemoglobinas Lepore Baltimore Y Lepore Boston en tres familias españolas. *N. Arch. Fac. Med.* 42(2): 67-74, 1984.
- VOGEL, F. & MOTULSKY, A.G. - *Human Genetics*. Berlin, Springer-Verlag, 1982.
- WABER, P.G.; BENDER, M.A.; GELINAS, R.E.; KATTAMIS, C.; KARAKLIS, A.; SOFRONIADOU, K. et al. - Concordance of a point mutation 5' to the γ^A -globin gene with $\gamma^A\beta^+$ hereditary persistence of fetal hemoglobin in greeks. *Blood*, 67 (2): 551-554, 1986.
- WAINSCOAT, J.S.; BELL, J.I.; THEIN, S.L.; HIGGS, D.R.; SERJEANT, G.R.; PETO, T.E.A. & WEATHERALL, D.J. - Multiple origins of the sickle mutation: evidence from beta S globin gene cluster polymorphisms. *Mol. Biol. Med.*, 1: 191-197, 1983.
- WASI, P.; POOTRAKUL, S. & WINICHAGOON, P. - Screening for thalassemia in Thailand. In: Schmidt, R.M. (ed.) - *Abnormal haemoglobins and thalassaemia*. New York, Academic Press, 1975.
- WEATHERALL, D.J. & CLEGG, J.G. - *Thalassaemia syndromes*. 3.ed. Oxford, Blackwell, 1981.
- WEATHERALL, D.J. & CLEGG, J.B. - Thalassaemia revisited. *Cell*, 29: 7-9, 1982.

- WEATHERALL, D.J., F.R.S.; HIGGS, D.H.; WOOD, W.G. & CLEGG, J.B.
Genetic disorders of human haemoglobin as models for
analysing gene regulation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*
307: 247-259, 1984.
- WEATHERALL, D.J. & WAINSCOT, J.B.- The molecular pathology of
thalassaemia. In: Hoffbrand, A.V. (ed.) - *Recent Advances in*
Hematology-4, Churchill - Livingstone, 1985.
- WHITE, J.M. - The unstable haemoglobins. *British Medical*
Bulletin. 32 (3): 219-222, 1976.
- WHO WORKING GROUP. Hereditary anaemias: genetic basis,
clinical features, diagnosis, and treatment. *Bulletin of the*
world health organization, 60: 643-660, 1982.
- WHO-UPDATE OF THE PROGRESS OF HAEMOGLOBINOPATHIES CONTROL;
Report of the third and fourth annual meetings of the WHO
working group on the community control of hereditary
anaemias. *Contents of DIVISION of NONCOMMUNICABLE DISEASES,*
WORLD HEALTH ORGANIZATION, Bangkok, 4-5 July, 1985.
- WINSLOW, R.M. & ANDERSON, W.F. - "The hemoglobinopathies". In:
Stanbury, J.B.; WYNGAARDEN, J.B.; FREDRICKSON, D.S.;
GOLDSTEIN, J.L. & BROWN, M. (eds.) - *The metabolic basis of*
inherited disease. New York, Mc Graw-Hill, 1983.
- WINTER, W.P.- Geographic and ethnic distribution of human
hemoglobin variants. *Texas Reports on Biology and Medicine*.
40: 179-190, 1980-1981.
- WRIGHTESTONE, R.N. - Abnormal properties of hemoglobin variants.
In: Huisman, T.H.J. (ed.). *The hemoglobinopathy - (Methods in*
hematology). New York, Churchill Livingstone, 1986.p.160-193.
- ZAGO, M.A.; COSTA, F.F.; TONE, L.G. & BOTTURA, C. - Hereditary hemoglobin
disorders in a brazilian population. *Human Heredity*.
33:125-129, 1983.
- ZAR, J.H. - *Biostatistical Analysis*. New Jersey, Prentice-Hall,
Inc., 1974.





Apêndice 1

"Bolscha Plástica" para acondicionamento
dos tubos de microhematócrito.

VIII. APÊNDICES

CENTRO DE REFERÊNCIA DE HEMOGLOBINAS FOLIC/UNESP - S. J. S. Paulo Rua General Câmara 2285 13.000 - S. J. Rio Preto - SP Fone 32-4555	PROCEDÊNCIA	FOLHA ☐ Data ____/____/____
--	-------------	---

N.º	Hb	Hct	Hb	Hct	C	OUTROS	ELETROFORESE			
							Alb	Alb	Alb	Alb
01										
02										
03										
04										
05										
06										
07										
08										
09										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										

Apêndice 1

"Bolacha Plástica" para acondicionamento
dos tubos de microhematócrito.

Apêndice 2

Ficha para identificação dos indivíduos analisados.

CENTRO DE REFERÊNCIA DE HEMOGLOBINAS IBILCE/UNESP - S. J. R. Preto Rua Cristóvão Colombo 2265 15.100 - S. J. Rio Preto - SP Fone 32-4966	PROCEDENCIA	FOLHA ☐ Data ____/____/____
---	--------------------	---

N.º	NOME	ID	SX	C	OUTROS	Resist.	ELETROFORESE		
						Globular	AGAR AMIDO	Celosep	AGAR
01									
02									
03									
04									
05									
06									
07									
08									
09									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									

Apêndice 3

Apêndice 2

Ficha para identificação dos indivíduos analisados.

São José do Rio Preto, 30 de outubro de 1985.

Exmo. Sr. Prefeito

Vimos por meio desta solicitar de Vossa Excelência a possibilidade de colaborar conosco em um Programa Científico e Comunitário que estamos desenvolvendo para conhecer a frequência de anemias hereditárias no Estado do Piauí.

Pertencemos ao Centro de Referência de Hemoglobinas sediado na cidade de São José do Rio Preto - São Paulo e estamos trabalhando em conjunto com a Universidade Federal do Piauí.

Pretendemos visitar sua cidade no dia / / . Nosso trabalho constará da obtenção de amostras de sangue (duas a três gotas) colhidas por punção digital (picada no dedo) com micro-lancetas descartáveis. Gostaríamos de poder contar com vossos préstimos no sentido de facilitar a obtenção dessas amostras de sangue, que permitirão conhecer a incidência desse tipo de anemia no Estado do Piauí.

Sem mais para o momento, aceite nossas cordiais saudações.

Zélia Arpini Sampaio

* Anexo segue uma cartilha explicativa que entregaremos no ato da coleta.

Apêndice 3

Modelo de carta enviada aos Prefeitos de cada cidade selecionada para o presente estudo.

VOCÊ TEM ANEMIA HEREDITÁRIA?

O Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP) e a Faculdade Regional de Medicina, de São José do Rio Preto, estão empenhados em saber se você é portador de anemia hereditária. Para isto serão necessárias apenas duas gotas de sangue, e você será informado do resultado em caso positivo.

O QUE É ANEMIA?

A anemia se caracteriza por um estado de fraqueza, desânimo, mal-estar e palidez. Por exames laboratoriais, a anemia é demonstrada por diminuição dos glóbulos vermelhos do sangue. Essa diminuição pode ser do tamanho e/ou da quantidade dos glóbulos.

QUAIS AS CAUSAS DE ANEMIA?

São muitas as causas que provocam a anemia. As principais são a subnutrição e as hemorragias. Entretanto, as anemias podem ser causadas por infecções bacterianas, doenças nos órgãos produtores de sangue, intoxicações a drogas e inseticidas, etc. Uma outra causa muito importante é a anemia hereditária.

O QUE É ANEMIA HEREDITÁRIA?

Anemia hereditária é aquela que é transmitida de pais para filhos. Este tipo de anemia pode se transmitir por muitas gerações. A anemia hereditária se manifesta de

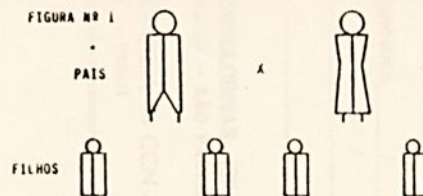
duas formas: a imperceptível e a perceptível. Na forma imperceptível, também chamada de heterozigota, a anemia está presente sem que a pessoa a perceba, pois quase não há sinais de anemia. Na forma perceptível, também chamada de homozigota, a anemia é facilmente percebida, e a pessoa além de ter muita fraqueza e mal-estar, é também amarelada (ictérica).

Atualmente, um em cada trinta brasileiros é portador da forma imperceptível, enquanto um em cada cinco mil é portador da forma perceptível de anemia hereditária.

COMO SE TRANSMITE A ANEMIA HEREDITÁRIA?

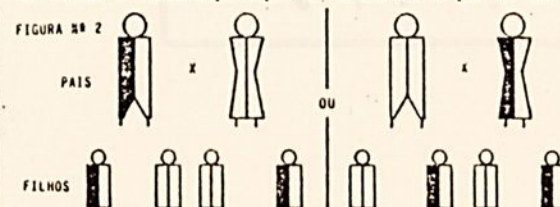
As figuras a seguir representam famílias com os pais e quatro filhos. A figura nº 1 mostra uma situação em que o pai e a mãe não tem anemia hereditária e, conseqüentemente, os filhos também não apresentarão essa anemia.

FIGURA Nº 1



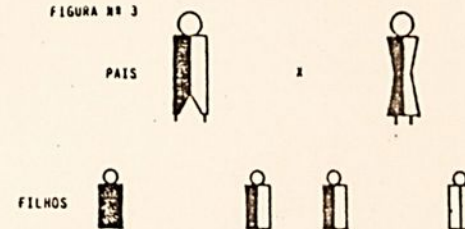
A figura nº 2 mostra duas situações que podem ocorrer: um dos pais tem a anemia hereditária imperceptível e, nesse caso, os filhos gerados têm a probabilidade de 50% de herdar a forma imperceptível transmitida por um dos pais.

FIGURA Nº 2



A figura nº 3 mostra uma família em que tanto o pai quanto a mãe são portadores da forma imperceptível de anemia. Nessa situação a chance de gerar filhos com a forma perceptível de anemia hereditária é de 25%, com a forma imperceptível é de 50% e, sem anemia, é de 25%.

FIGURA Nº 3



O QUE DEVE FAZER O PORTADOR DE ANEMIA HEREDITÁRIA?

O portador de anemia hereditária imperceptível, sempre que for ao médico se consultar, deve mostrar o cartão de identidade da anemia hereditária, que é distribuído pelo Centro de Referência de Hemoglobinas. O médico deverá informá-lo dos cuidados que o portador da anemia deve tomar. Entretanto, para melhor esclarecimento, deve ser procurado um médico hematologista. Quanto ao portador da forma perceptível, este deve ser imediatamente encaminhado ao hematologista.

Esse programa de conscientização de anemia hereditária oferece aos portadores atendimento gratuito no ambulatório de hematologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto.

Informações adicionais poderão ser obtidas no Centro de Referência de Hemoglobinas, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, com Prof. Paulo Cesar Naoun, e no Hospital de Base com o Dr. Ivan de Lucena Angulo e Prof. Luiz Carlos de Mattos.

Relação dos sobrenomes de indivíduos portadores de talassemia
beta na população total estudada:

<u>Sobrenome</u>	<u>Cidade</u>	<u>Total</u>
Souza	Campo Maior	1
Sacista		1
Macedo Araújo	Corrente	1
Gomes de Souza		1
Ferreira	Guirás	1
Coelho		1
Rios	Palmeirópolis	1
Souza	Parauapebas	1
Lopes		1
Oliveira		1
Silva		1
Costa		1
Martins		1
Chagas		1
Galvão		1
Bona Vaz		1
Freire		1
Dias de		1
Carvalho		1
Silva Santos		1
Muniz Silva		1
Almeida		1
Brito		1
Silva Oliveira		1
Silva Brito		1
Carvalho		1
Ferreira de Moura		1
Leite		1
Alves		1
Santana Oliveira		1
Aguiar		1
Souza		1
Prado		1
Araújo		1
Marques		1
Silva		1
<u>36</u>	<u>08</u>	<u>41</u>

IDENTIDADE DE ANEMIA HEREDITÁRIA

Nome

idade data do diagnóstico / /

tipo de anemia

CENTRO DE REFERÊNCIA DE HEMOGLOBINAS - IBILCE - UNESP
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SÃO PAULO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA - CCN - FUFPI
TERESINA - PIAUÍ

Apêndice 5

Relação dos sobrenomes de indivíduos portadores de talassemia beta na população total estudada:

<u>Sobrenome</u>	<u>Cidade</u>	<u>Total</u>
	Campo Maior	
Souza		1
Batista		1
	Corrente	
Macedo Araújo		1
Gomes de Souza		1
	Oeiras	
Ferreira		1
Coelho		1
	Palmeirais	
Rios		1
	Parnaíba	
Souza		1
Lopes		1
Oliveira		2
Silva		3
Costa		1
Martins		1
Chagas		1
Galeno		1
Bona Vaz		1
Freire Maciel		1
Dias de Farias		1
Carvalho Barros		1
Silva Santos		1
Nunes Silva		1
Freitas		1
Brito		1
Silva Oliveira		1
Silva Brito		1
	Picos	
Carvalho		1
Ferreira de Moura		1
Leite		1
	Piripiri	
Alves		1
Santana Oliveira		1
	Teresina	
Aguiar		1
Sousa		1
Prado		1
Araújo		2
Marques		2
Silva		1
36	08	41



