

MARIA ANGELINA CANEVER

ESTUDO DE ALGUMAS RELAÇÕES DE RECOMBINAÇÃO EM FAMÍLIAS COM  
POROCERATOSE DE MIBELLI

Tese apresentada à Coordenação do  
Curso de Pós-Graduação em Genética  
Humana da Universidade Federal  
do Paraná, para obtenção do título  
de Mestre em Ciências, na área  
de Genética Humana.

Orientadora: Profa. Dra. Eleidi A. Chautard-Freire-Maia

1 9 7 7

Aos meus pais,  
com carinho.

## Í N D I C E

1. AGRADECIMENTOS.....	5
2. INTRODUÇÃO.....	7
2.1. Objetivos.....	8
2.2. Referência aos locos analisados.....	8
2.2.1. Poroceratose de Mibelli.....	8
2.2.2. Cadeia $\alpha$ da haptoglobina.....	9
2.2.3. Anidrase carbônica II.....	10
2.2.4. Esterase D.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Caracterização da amostra.....	12
3.2. Metodologia da caracterização dos fenótipos.....	20
3.2.1. Poroceratose de Mibelli.....	20
3.2.2. Cadeia $\alpha$ da haptoglobina.....	20
3.2.3. Esterase D e anidrase carbônica II.....	21
3.3. Metodologia da análise de ligação.....	23
3.3.1. Relação PM: $\alpha$ -Hp.....	28
3.3.2. Relação PM:Es-D.....	28
3.3.3. Relação CAII: $\alpha$ -Hp.....	29
3.3.4. Relação $\alpha$ -Hp:Es-D.....	29
4. RESULTADOS.....	30
5. DISCUSSÃO.....	38
6. SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....	42
7. BIBLIOGRAFIA CITADA.....	43

## 1 - AGRADECIMENTOS

É com satisfação que a autora agradece a todos os professores, colegas, amigos e entidades que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Deseja, no entanto, ressaltar as pessoas e instituições seguintes, sem as quais teriam sido impossíveis esta pesquisa e esta tese:

Profa. Dra. Eleidi A. Chautard-Freire-Maia, pela sugestão do trabalho, orientação e estímulo durante o curso de Pós-Graduação e, ainda, por ceder o material aqui usado.

Prof. Dr. Moacyr A. Mestriner e toda a equipe do Laboratório de Genética Bioquímica do Departamento de Genética e Matemática Aplicada à Biologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, pela orientação no desenvolvimento das técnicas eletroforéticas.

Prof. Dr. Newton Freire-Maia, pela leitura crítica desta tese e valiosas sugestões.

Dr. Jorge José de Souza Filho, da UFSC, do Hospital Celso Ramos e Fundação Hospitalar de Santa Catarina, pelo levantamento das famílias com Poroceratose de Mibelli e diagnóstico clínico dos seus membros.

Prof. Dr. Bento Arce-Gomez, pelo planejamento do projeto de estudo clínico-genético da Poroceratose de Mibelli e coordenação durante a coleta de dados.

Prof. Lodércio Culpi, pela participação na coleta das amostras de sangue.

Profs. Milton Divino Muniz e Elza Costa Netto Muniz, pela participação na coleta de dados.

Srta. Irene Sedoski, secretária do Departamento de Genética da UFPr, pelo serviço datilográfico.

Professores, colegas e amigos do Departamento de Genética e do Curso de Pós-Graduação da UFPr, pela cooperação e por valiosas sugestões.

Coordenação dos Cursos de Pós-Graduação da UFPr, pela bolsa concedida durante o ano de 1974.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida durante o período compreendido entre março de 1975 e março de 1977.

## 2 - INTRODUÇÃO

Nos municípios de Florianópolis, Biguaçu, Governador Celso Ramos, Tijucas, Canelinha, Porto Belo, Camboriú, Balneário Camboriú, Itajaí e Joinville, em Santa Catarina, constatou-se a presença de cerca de 100 indivíduos, provavelmente pertencentes a uma mesma unidade familiar, afetados por uma genodermatose rara determinada por um gene autossômico dominante, denominada Poroceratose de Mibelli.

Em fevereiro de 1974, realizou-se uma expedição a esses municípios, coordenada pelos professores Dr. Bento Arce-Gomez e Dra. Eleidi A. Chautard-Freire-Maia, com o objetivo de coletar dados genealógicos, dermatoglíficos e amostras de sangue para posteriores estudos de diversos parâmetros genéticos. As amostras de sangue foram coletadas visando, principalmente, a estudos de ligação genética.

Em 1975, parte dessa mesma amostra foi objeto da tese "Investigações dermatoglíficas em pacientes com Poroceratose de Mibelli", apresentada pelo Prof. Lodércio Culpí no curso de Mestrado em Genética Humana da UFPr.

No presente trabalho, desenvolvido sob a orientação da Profa. Dra. Eleidi A. Chautard-Freire-Maia, a autora tipou as amostras de sangue coletadas, visando a um estudo das relações de recombinação entre os locos da Poroceratose de Mibelli (PM), da cadeia  $\alpha$  da haptoglobina ( $\alpha$ -Hp), da anidrase carbônica II (CAII) e da esterase D (Es-D). Entre as combinações possíveis, só foram encontradas famílias informativas para as relações PM:  $\alpha$ -Hp, PM:Es-D,  $\alpha$ -Hp:CAII e  $\alpha$ -Hp:Es-D. Este trabalho é parte de um plano maior de estudo clínico-genético da Poroceratose de Mi-

belli, que também incluirá outras análises de ligação genética.

## 2.1 - Objetivos

Tratando-se da análise de uma única unidade familiar, é pequeno o número de indivíduos que são objeto deste trabalho e, obviamente, reduzido o número de famílias informativas para cada loco analisado. Considerando-se que a probabilidade a priori de dois locos autossômicos, tomados ao acaso, estarem ligados é cerca de 0,023 (Renwick, 1969), não tivemos por objetivo pretender constatar uma nova ligação genética entre os locos analisados. Entretanto, levando em conta que a Poroceratose de Mibelli é uma anomalia genética rara e que não se encontram, na literatura, trabalhos referentes a estudos de ligação com o seu respectivo loco, achamos interessante utilizar essas famílias para um estudo dessa natureza, visando a obter alguma informação que contribua para o mapeamento do genoma humano.

O nosso objetivo ao analisar a relação  $\alpha$ -Hp:Es-D está fundamentado no fato do loco condicionador da  $\alpha$ -Hp ter sido atribuído ao cromossomo 16 e de terem surgido divergências quanto à localização do loco da Es-D neste mesmo cromossomo.

A inclusão da análise da relação  $\alpha$ -Hp:CAII foi considerada de interesse, uma vez que não há informações a esse respeito na literatura.

## 2.2 - Referências aos locos analisados

Faremos a seguir uma rápida exposição sobre cada uma das características condicionadas pelos locos considerados durante a análise.

### 2.2.1 - Poroceratose de Mibelli

A Poroceratose de Mibelli é uma genodermatose caracterizada por eflorescências cutâneas. As eflorescências primárias assumem, às vezes, o aspecto da ceratose pilar ou lembram um corno cutâneo em forma de garra de pássaro. Podem permanecer como lesões imperceptíveis por meses ou anos. Na maioria das vezes, sofrem um crescimento centrífugo, lento, culminando com a formação de placas de 2 a 3 cm de diâmetro, nitidamente desenhadas na superfície da pele. Possuem certa predileção pelas super-

fícies expostas ao sol, podendo, entretanto, atingir qualquer região do corpo, inclusive as palmas das mãos e as plantas dos pés. Nessas últimas, costumam assumir um caráter verrugoso ou caloso (Bopp, 1954). Nem sempre é possível determinar, com exatidão, a data do aparecimento dos primeiros sinais, uma vez que, na maioria dos casos, as lesões iniciais passam despercebidas em vista da ausência de sintomas ou inobservância por parte dos afetados. Já foram verificadas em pacientes de 4 semanas, podendo também manifestar-se tardiamente (Saunders e Portland, 1961).

Esta anomalia foi descrita pela primeira vez por Mibelli, em 1893, em três pacientes pertencentes à Clínica Dermatológica de Parma, na Itália. Simultaneamente, Emílio Respighi, da Universidade de Pisa, a descreveu em sete outros pacientes (apud Bopp, 1954). Posteriormente, foram descritos casos de PM em vários países. Gilchrist, ainda no século passado, demonstrou de forma inequívoca a existência de um fator genético em sua etiologia. Pasini, em 1912, observou 26 casos em uma mesma família (apud Bopp, 1954). Embora seja uma anomalia muito estudada sob o ponto de vista clínico, não temos informação alguma sobre estudos de ligação ou de atribuição cromossômica do loco da Poroceratose de Mibelli.

### 2.2.2 - Cadeia $\alpha$ da haptoglobina

A haptoglobina é uma proteína sérica que tem sido muito estudada desde 1938. O termo haptoglobina foi introduzido por Polonovski e Jayle, em 1940, para designar uma das proteínas pertencentes à fração  $\alpha$ -2-globulina, que apresentava alta afinidade pela hemoglobina (apud Nosslin e Nyman, 1958). Smithies e Walker (1955, 1956) sugeriram que os três fenótipos da  $\alpha$ -Hp ( $\alpha$ -Hp11,  $\alpha$ -Hp22 e  $\alpha$ -Hp21), verificados através de técnicas eletroforéticas, sejam determinados por dois alelos ( $\alpha$ -Hp1 e  $\alpha$ -Hp2).

Vários estudos, alguns com resultados contraditórios, foram realizados visando à atribuição cromossômica do loco da  $\alpha$ -Hp. Geralde cols. (1964, 1967) descreveram o caso de uma criança portadora de um cromossomo do grupo D, em anel, com ausência do alelo  $\alpha$ -Hp paterno. Segundo esses autores, o loco  $\alpha$ -Hp provavelmente teria sido perdido na formação desse cromossomo, o que sugeria sua atribuição a um dos cromossomos do grupo D, possivelmente o cromossomo 13.

Mais tarde, evidência no mesmo sentido foi dada pelo trabalho de Cook e cols. (1969) que descreveram uma família na qual mãe e filho mostravam segregação anômala de  $\alpha$ -Hp. Ambos os cariótipos apresentavam uma deleção do braço longo de um cromossomo do grupo D, provavelmente o cromossomo 13, o que os levou a sugerir a localização do loco  $\alpha$ -Hp neste cromossomo.

Nesse mesmo ano, Robson e cols. (1969), através do método dos escores lod, analisaram 16 heredogramas com indivíduos portadores de translocações D/D ou D/G, ou portadores de uma variante de um dos cromossomos do grupo D. Esse estudo sugeriu a atribuição do loco  $\alpha$ -Hp ao cromossomo 16, com uma probabilidade de 0,97.

Magenis, Hecht e Lovrien (1970) usaram um sítio frágil do braço longo do cromossomo 16 como marcador. Através da análise da frequência de recombinação entre esse marcador e o gene da  $\alpha$ -Hp, sugeriram a localização do loco da  $\alpha$ -Hp num segmento do cromossomo 16, localizado entre o meio e o terço distal do braço longo. Considerando-se todas essas evidências, aceita-se a atribuição do loco da  $\alpha$ -Hp ao cromossomo 16.

### 2.2.3 - Anidrase carbônica II

A presença de esterases eritrocitárias em hemácias humanas foi verificada por Wachstein e Wolf (1958) e por Davis (1959). Adotando técnicas eletroforéticas no estudo de gêmeos, Tashian (1961) sugeriu a existência de variantes geneticamente determinados em algumas dessas esterases.

Tashian e Shaw (1962) descreveram um variante genético de uma acetilesterase humana. Rickli, Ghazanfar, Gibbons e Edsall (1964) obtiveram duas esterases distintas que apresentavam a atividade característica das anidrases carbônicas e as referiram como anidrase carbônica B e C. Neste mesmo ano, Nyman e Lindskog (1964), estudando a composição de aminoácidos dessas esterases, as referiram como HCA B e HCA C.

Baseando-se nas características eletroforéticas, na especificidade ao substrato e na inibição característica, Tashian (1965) classificou essas isoenzimas em três grupos distintos: propionilesterases, butirilesterases e acetilesterases. Nesse último grupo, estão incluídas as anidrases carbônicas I ou B e II ou C (CAI e CAII). Além disso, sugeriu que as CAII sejam as

mais primitivas e que as CAI tenham tido origem na duplicação e posteriores mutações do loco das CAII. Moore, Funakoshi e Deutsch (1971), aplicando técnicas imunológicas, descreveram o polimorfismo da CAII em negros. Esse polimorfismo ainda não foi descrito em brancos.

Até a presente data, não conhecemos informação alguma quanto à atribuição cromossômica do loco da CAII.

#### 2.2.4 - Esterase D

Hopkinson, Mestriner, Cortner e Harris (1973) descreveram um novo polimorfismo humano: o da esterase D (Es-D). Análises de hemácias humanas, através de técnicas eletroforéticas, indicaram três fenótipos (Es-D11, Es-D22 e Es-D21).

Estudos de hibridação de células somáticas, a princípio, deixaram dúvidas sobre a localização cromossômica do gene da esterase D. Shows e Brown (1975) sugeriram sua atribuição ao cromossomo 16, sem contudo excluir a possibilidade de sua localização no 13 ou 15. Heyningen e cols. (1975) atribuíram-no ao cromossomo 13. Simultaneamente, Chen, Creagan, Nichols e Ruddle (1975) obtiveram algumas linhagens celulares que apresentavam atividade enzimática da Es-D e outras em que esta atividade estava ausente. Nas primeiras, o cromossomo 13 encontrava-se presente enquanto que nas últimas ele havia sido perdido. Estes resultados os levaram a atribuir a localização do gene da Es-D ao cromossomo 13.

Posteriormente Robson e cols. (1976) ao analisarem a frequência de recombinação entre o loco da Es-D e o centrômero do cromossomo 13, através do método dos escores lod, excluíram ligação deste loco com a região centromérica, e sugeriram sua possível localização na metade distal do braço longo.

Alguns desses pontos serão novamente referidos no capítulo Discussão.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Caracterização da amostra

Dados referentes a 112 indivíduos, predominantemente caucasóides (com uma minoria negróide), coletados em dez municípios de Santa Catarina, situados entre Joinville e Florianópolis, constituem a amostra analisada. (A Fig. 1, obtida de Culpi, 1975, apresenta um mapa da região). Uma pequena fração desses indivíduos pertence à zona urbana e mora nas sedes dos municípios, mas a grande maioria encontra-se dispersa na zona rural, em áreas relativamente extensas, sem formarem isolados populacionais. Pertencem a um nível sócio-econômico médio-baixo, característico da região. A maioria das suas habitações oferece boas condições de higiene.

Dados genealógicos levantados através de sete gerações possibilitaram o delineamento de dois grandes heredogramas referidos no presente trabalho como genealogia A (Tabela 1) e genealogia B (Tabela 2). Em vista da raridade da anomalia (PM) e da estreita proximidade geográfica das famílias analisadas, aceitamos que essas genealogias pertençam a uma mesma unidade familiar. Em vista das genealogias serem formadas por famílias que se separaram há muitos anos, não conseguimos, no entanto, informações precisas que nos permitissem uní-las em um só heredograma. Esse problema não tem, aliás, a menor importância metodológica para nossa pesquisa e vai aqui registrado apenas para justificar a separação da família, supostamente única, em duas sub-unidades familiares.

As amostras de sangue foram coletadas através de visitas domiciliares. As hemácias, separadas do plasma, foram tra-

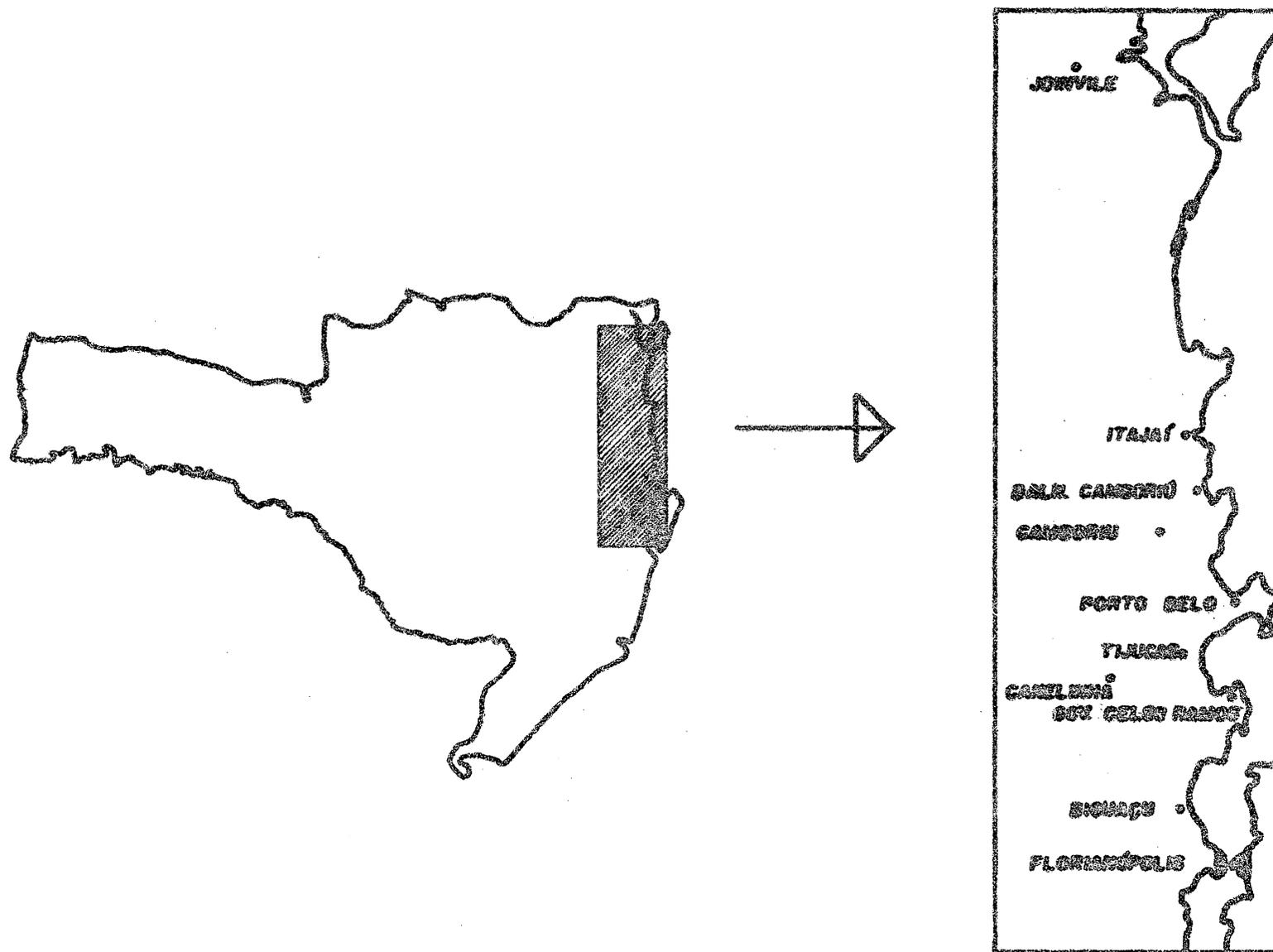


Fig. 1 - Mapa do Estado de Santa Catarina, com indicações das sedes dos municípios onde foram localizados os indivíduos portadores de Poroceratose de Mibelli.

Tabela 1. Informações dos indivíduos tipados pertencentes à genealogia A e de seus ascendentes diretos.

Amostra	Indivíduos	Pai	Mãe	Sexo	PM	$\alpha$ -Hp	Es-D	CAII
-	III.002	-	-	M	Pp	-	-	-
-	IV.007	-	III.001	F	Pp	-	-	-
-	IV.009	III.002	-	F	Pp	-	-	-
-	IV.010	III.002	-	M	Pp	-	2-1 <sup>+</sup>	-
094	IV.011	-	-	F	pp	2-1	1-1	1-1
-	IV.018	III.002	-	M	Pp	-	-	-
-	IV.019	III.005	-	M	Pp	-	-	-
238	V.002	-	IV.007	M	Pp	2-1	1-1	1-1
120	V.003	-	-	F	pp	2-2	2-1	1-1
324	V.011	-	IV.009	F	Pp	2-1	-	1-1
022	V.012	IV.010	IV.011	M	pp	1-1	1-1	1-1
072	V.013	IV.010	IV.011	M	Pp	2-1	2-1	1-1
155	V.014	-	-	F	pp	2-1	1-1	1-1
-	V.029	IV.017	-	F	Pp	-	-	-
014	V.032	-	-	M	pp	1-1	-	1-1
048	V.033	IV.018	-	F	Pp	1-1	1-1	1-1
049	V.035	IV.018	-	M	Pp	2-1	1-1	1-1
-	V.036	-	-	F	pp	-	-	-
112	V.037	-	-	F	pp	2-1	1-1	1-1
001	V.046	IV.019	-	M	Pp	1-1	1-1	1-1
250	VI.004	V.002	V.003	M	pp	2-1	2-1	1-1
035	VI.007	V.002	V.003	M	Pp	2-1	-	1-1
012	VI.008	V.002	V.003	M	Pp	2-1	2-1	1-1
302	VI.010	V.002	V.003	F	pp	2-1	2-1	1-1

+ = fenótipo inferido.

continua

continuação da Tabela 1.

Amostra	Indivíduos	Pai	Mãe	Sexo	PM	$\alpha$ -Hp	Es-D	CAII
087	VI.038	-	-	M	pp	1-1	-	1-1
233	VI.039	-	V.011	F	Pp	1-1	1-1	1-1
125	VI.044	-	-	M	pp	1-1	-	1-1
055	VI.045	-	V.011	F	Pp	2-1	-	1-1
110	VI.047	-	V.011	M	Pp	2-1	2-1	1-1
256	VI.048	-	-	F	pp	2-1	-	1-1
111	VI.063	V.013	V.014	M	pp	2-2	1-1	1-1
092	VI.064	V.013	V.014	M	Pp	1-1	1-1	1-1
053	VI.065	V.013	V.014	M	Pp	2-1	1-1	1-1
011	VI.067	V.013	V.014	F	pp	2-2	1-1	1-1
044	VI.069	V.013	V.014	F	pp	1-1	1-1	1-1
085	VI.086	-	-	M	pp	2-1	1-1	1-1
026	VI.087	-	V.029	F	Pp	2-1	1-1	1-1
151	VI.090	-	V.029	M	Pp	2-1	1-1	1-1
034	VI.091	-	-	F	pp	2-2	1-1	1-1
081	VI.107	V.032	V.033	M	Pp	1-1	1-1	1-1
089	VI.120	V.035	V.036	M	Pp	2-2	2-1	1-1
141	VI.121	V.035	V.036	F	pp	2-2	1-1	1-1
091	VI.122	V.035	V.036	F	Pp	2-2	1-1	1-1
079	VI.126	V.035	V.037	F	Pp	2-1	1-1	1-1
004	VI.128	V.035	V.037	M	pp	2-2	1-1	1-1
006	VI.157	V.046	-	M	Pp	1-1	1-1	1-1
069	VI.161	V.046	-	M	pp	2-1	-	1-1
088	VII.006	VI.038	VI.039	F	Pp	1-1	1-1	1-1
850	VII.007	VI.038	VI.039	M	Pp	1-1	-	1-1

continua

continuação da Tabela 1.

Amostra	Indivíduos	Pai	Mãe	Sexo	PM	$\alpha$ -Hp	Es-D	CAII
115	VII.008	VI.038	VI.039	F	Pp	1-1	1-1	1-1
109	VII.022	VI.044	VI.045	F	Pp	1-1	-	1-1
144	VII.075	VI.086	VI.087	M	pp	2-1	1-1	1-1
043	VII.076	VI.086	IV.087	M	Pp	2-2	1-1	1-1
122	VII.077	VI.086	IV.087	F	Pp	2-1	1-1	1-1
096	VII.078	VI.086	VI.087	F	pp	1-1	1-1	1-1
211	VII.083	VI.090	VI.091	F	pp	2-1	1-1	1-1
135	VII.085	VI.090	VI.091	M	pp	2-1	1-1	1-1

Tabela 2. Informações dos indivíduos tipados pertencentes à genealogia B e de seus ascendentes diretos.

Amostra	Indivíduos	Pai	Mãe	Sexo	PM	a-Hp	Es-D.	CAII
-	II.002	-	-	M	Pp	-	-	-
-	III.003	-	II.001	M	pp	-	-	-
-	III.004	II.002	-	F	Pp	-	-	-
-	III.005	II.002	-	M	Pp	-	2-1 <sup>+</sup>	-
071	III.006	-	-	F	pp	1-1	1-1	1-1
-	III.010	II.004	-	M	Pp	-	-	-
063	IV.001	-	-	M	pp	2-2	2-1	1-1
075	IV.002	III.003	III.004	F	Pp	2-1	2-1	1-1
136	IV.004	-	-	M	pp	1-1	1-1	1-1
-	IV.005	III.003	III.004	F	Pp	-	-	-
-	IV.006	-	III.002	F	Pp	-	-	-
436	IV.008	III.005	III.006	M	Pp	1-1	2-1	1-1
265	IV.009	-	-	F	pp	2-1	2-1	2-1
134	IV.010	III.005	III.006	M	pp	1-1	1-1	1-1
-	IV.012	III.008	-	M	Pp	-	-	-
161	IV.016	III.010	-	M	Pp	2-1	2-1	1-1
140	IV.017	-	-	F	Pp	2-2	1-1	1-1
270	IV.019	-	-	M	pp	2-2	1-1	1-1
100	IV.020	III.010	-	F	Pp	2-1	2-1	1-1
-	V.003	IV.001	IV.002	M	Pp	2-1 <sup>+</sup>	-	-
062	V.004	-	-	F	Pp	1-1	1-1	1-1
054	V.005	IV.001	IV.002	F	pp	2-1	2-1	1-1
156	V.006	IV.001	IV.002	F	pp	2-1	1-1	1-1
196	V.007	IV.001	IV.002	M	Pp	2-1	2-1	1-1

+ = fenótipo inferido.

continua

continuação da Tabela 2.

Amostra	Indivíduos	Pai	Mãe	Sexo	PM	$\alpha$ -Hp	Es-D	CAII
076	V.019	IV.004	IV.005	F	Pp	1-1	1-1	1-1
282	V.020	-	IV.006	M	Pp	2-1	2-1 <sup>+</sup>	1-1
131	V.021	IV.004	IV.005	F	Pp	1-1	1-1	1-1
176	V.022	IV.004	IV.005	F	Pp	1-1	2-1	1-1
084	V.023	-	-	M	pp	2-2	2-1	1-1
154	V.024	IV.004	IV.005	F	Pp	1-1	1-1	1-1
107	V.026	IV.004	IV.005	M	Pp	1-1	1-1	1-1
066	V.039	IV.008	IV.009	F	Pp	2-1	2-1	2-1
047	V.041	IV.008	IV.009	F	pp	2-1	1-1	2-1
182	V.043	IV.012	-	M	Pp	2-1	2-1 <sup>+</sup>	1-1
104	V.044	-	-	F	pp	1-1	1-1	1-1
235	V.052	-	-	M	pp	2-1	1-1	1-1
056	V.053	IV.016	-	F	Pp	2-2	1-1	1-1
315	V.063	IV.016	IV.017	M	pp	2-1	2-1	1-1
045	V.065	IV.016	IV.017	F	Pp	2-2	2-1	1-1
266	V.066	IV.016	IV.017	F	pp	2-1	-	1-1
029	V.067	IV.016	IV.017	F	pp	2-1	1-1	1-1
251	V.068	IV.019	IV.020	F	Pp	2-2	2-1	1-1
121	V.069	IV.019	IV.020	M	Pp	2-1	1-1	1-1
231	VI.017	V.003	V.004	M	Pp	2-1	-	1-1
164	VI.022	V.003	V.004	F	pp	1-1	1-1	1-1
074	VI.023	V.003	V.004	F	Pp	1-1	-	1-1
077	VI.025	V.003	V.004	F	Pp	2-1	-	1-1
142	VI.061	IV.010	V.019	M	Pp	1-1	-	1-1

continua

continuação da Tabela 2.

Amostra	Indivíduos	Pai	Mãe	Sexo	PM	$\alpha$ -Hp	Es-D	CAII
095	VI.062	IV.010	V.019	F	pp	1-1	1-1	1-1
010	VI.064	IV.010	V.019	F	pp	1-1	1-1	1-1
551	VI.066	V.020	V.021	F	Pp	1-1	2-1	1-1
244	VI.067	V.020	V.021	M	Pp	1-1	1-1	1-1
184	VI.068	V.020	V.021	M	Pp	1-1	2-1	1-1
036	VI.069	V.020	V.021	M	Pp	2-1	2-1	1-1
421	VI.070	V.020	V.021	F	Pp	1-1	1-1	1-1
190	VI.075	V.023	V.024	M	Pp	2-1	2-1	1-1
041	VI.077	V.023	V.024	F	pp	2-1	2-1	1-1
024	VI.087	V.043	V.044	M	Pp	2-1	2-1	1-1
025	VI.088	V.043	V.044	F	pp	2-1	-	1-1
202	VI.091	V.043	V.044	M	Pp	2-1	-	1-1
031	VI.092	V.043	V.044	F	pp	1-1	1-1	1-1
032	VI.093	V.043	V.044	F	pp	2-1	1-1	1-1
152	VI.119	V.052	V.053	M	Pp	2-2	1-1	1-1
051	VI.121	V.052	V.053	M	pp	2-1	1-1	1-1
216	VI.122	V.052	V.053	M	pp	2-1	1-1	1-1
082	VI.124	V.052	V.053	M	pp	2-2	-	1-1
101	VI.125	V.052	V.053	M	pp	2-1	1-1	1-1

tadas com glicerol. Ambos foram transportados em caixas de isopor com gelo e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Foram também estocadas amostras de soro. Caracterizaram-se eletroforeticamente 21 famílias com 112 indivíduos estudados.

### 3.2 - Metodologia da caracterização dos fenótipos

#### 3.2.1 - Poroceratose de Mibelli

Dentre os 112 indivíduos incluídos no presente estudo, encontraram-se 61 afetados por Poroceratose de Mibelli. Todas as famílias estudadas têm sido clinicamente acompanhadas pelo dermatologista Dr. Jorge José de Souza Filho, que constatou e diagnosticou a anomalia nessa região, tendo feito o levantamento dos casos e examinado os afetados e seus parentes descritos como normais.

De acordo com Saunders e Portland (1961), a idade de aparecimento da PM é variável. Segundo o Dr. Jorge José de Souza Filho (comunicação pessoal), que vem acompanhando clinicamente, durante cerca de dez anos, as famílias estudadas, o aparecimento dessa anomalia, nessa amostra, se dá com maior frequência na faixa dos 7 aos 9 anos, em poucos se manifestando na faixa até os 15 anos. Há, pois, uma possibilidade de que um ou outro indivíduo considerado como normal e com idade entre 10 e 15 anos venha a manifestar a doença. As condições climáticas da região litorânea (com sol frequente durante todo o ano) em que vivem esses indivíduos favorecem a manifestação da Poroceratose de Mibelli.

Não foram coletadas amostras de sangue de crianças com idade inferior a 7 anos. Nas famílias aqui analisadas, encontram-se, porém, apenas crianças com idade superior a nove anos.

#### 3.2.2 - Cadeia $\alpha$ da haptoglobina

A caracterização da  $\alpha$ -Hp se deu por eletroforese em gel de amido. Adotou-se o sistema de tampão descontínuo desenvolvido por Poulik (1957): tampão tris-citrato 0,076 M e 0,007 M, respectivamente, de pH 8,6 no gel, e tampão borato 0,3 M de pH 8,0 nas cubas. A eletroforese correu em câmara fria, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Foram aplicados 35 mA, mantidos constantes durante cinco horas.

a) Preparo dos tampões

Tampão tris-citrato pH 8,6.

Dissolveram-se 9,2 g de tris (hidroximetil) aminometano e 149 g de ácido cítrico em 1000 ml de água destilada. Essas concentrações já nos fornecem o pH 8,6 desejado.

Tampão borato pH 8,0.

Foram dissolvidos 18,5 g de ácido bórico em 1000 ml de água destilada. Foi ajustado o pH 8,0 com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M.

b) Preparo do gel e aplicação das amostras

Os géis foram preparados segundo a técnica de Smithies (1955), contendo 24 g de amido Connaught, em 200 ml de tampão tris-citrato, pH 8,6.

As amostras para aplicação no gel foram preparadas com uma gota de hemolisado de hemácias padrão em duas gotas de soro. Foram inseridas nos géis com papel filtro Whatman número 3 (5mm x 7mm).

c) Coloração

Na coloração foram usados 200 mg de benzidina e 200 mg de nitroprossiato de sódio dissolvidos em 100 ml de uma solução contendo 0,01 de ácido acético. Após derramar a solução sobre a superfície cortada do gel, acrescentaram-se 3 ml de água oxigenada a 20 v. Zonas azuladas foram observadas entre cinco e dez minutos, em todas as regiões de migração do complexo haptoglobina-hemoglobina.

3.2.3 - Esterase D e anidrase carbônica II

A princípio, o mesmo método foi aplicado na caracterização de ambas as isoenzimas Es-D e CAII. Fez-se eletroforese horizontal em gel de amido, tampão tris-maleato 0,1 M e 0,1 M, respectivamente, de pH 7,5, em câmara fria, a 4°C. Foram aplicados 45 V medidos no gel, mantidos constantes por cerca de 17 horas.

a) Tampão tris-maleato

Foram preparadas duas soluções. Uma, referida como solução A, contendo 11,6 g de ácido malêico dissolvidos em 1000 ml de água. Outra, referida como solução B, contendo 24,228 g de tris (hidroximetil) amino metano dissolvidos em 2000 ml de

água destilada. A solução A foi adicionada à solução B, até ser atingido pH 7,5. O mesmo tampão foi usado nas cubas e no preparo do gel, sendo que no gel foi diluído de 1:9.

b) Preparo do gel e aplicação das amostras

Os géis foram preparados de acordo com o procedimento de Smithies (1955), contendo 24 g de amido Connaught em 200 ml de tampão. As amostras foram inseridas nos géis com papel filtro Whatman número 17 (5mm x 5mm).

c) Coloração

Os métodos de coloração usados foram diferentes para as duas isoenzimas estudadas. Uma das partes do gel foi usada na coloração da Es-D e a outra na da anidrase carbônica II.

O substrato usado na coloração da Es-D foi acetato de umbeliferona (1 mg) dissolvido em acetona (0,5 ml), a que se adicionaram 10 ml de tampão acetato 0,1 M de pH 5,0. Essa solução foi espalhada sobre a superfície cortada do gel. Zonas fluorescentes foram vistas após cerca de 10 a 15 minutos, em câmara escura, à luz ultra-violeta.

Na coloração das CAII, usou-se substrato fluorogênico (diacetato de fluoresceína), de acordo com Hopkinson, Coppock, Mühlmann e Edwards (1974). A 1 mg de diacetato de fluoresceína dissolvido em 0,5 ml de acetona, adicionaram-se 10 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5, diluídos de 1:1. Essa solução foi espalhada sobre a superfície cortada do gel com auxílio de uma fita de papel filtro. O gel, aderido ao papel filtro, foi coberto com um plástico fino. Incubou-se, então, o gel a 37°C, durante cerca de meia hora. Zonas fluorescentes foram vistas após o tempo de incubação, em câmara escura, à luz ultra-violeta.

Ao serem constatados os heterozigotos para CAII, a análise eletroforética foi repetida em tampão tris-EDTA-borato 0,9 M, 0,02 M e 0,5 M, respectivamente, de pH 8,6. Estas condições oferecem melhor resolução para a CAII. Uma solução estoque foi preparada contendo 108,9 g de tris (hidroximetil) aminometano, 7,44 g de EDTA e 30,8 g de ácido bórico. Essa solução foi diluída de 1:6 para ser usada nas cubas e de 1:9 para o preparo do gel. Na coloração adotou-se o mesmo método fluorogênico. Houve confirmação dos três indivíduos heterozigotos verificados com tampão tris-maleato de pH 7,5.

### 3.3 - Metodologia da análise de ligação

Com o método dos escores lod, só se analisam famílias com apenas um filho informativo quando a fase do duplo heterozigoto (acoplamento ou repulsão) for conhecida. Por esta razão, não se coletou material das famílias com apenas um filho presente e que não ofereciam a possibilidade de se determinar a fase dos marcadores genéticos através de informação da geração anterior. As amostras de sangue foram coletadas preferencialmente das famílias onde havia possibilidade de se coletar material dos dois cônjuges.

As Tabelas 3 a 6 mostram as famílias informativas para cada relação dos marcadores considerados nas análises de ligação.

A maioria dos casos de ligação determinados na espécie humana tem demonstrado uma maior susceptibilidade feminina à permuta (Cook, 1965; Renwick e Schulze, 1965; Robson, Sutherland e Harris, 1966; Weitkamp, Guttormsen e Greendyke, 1971; Lamm, Svejgaard e Kissmeyer-Nielsen, 1971; Cook e cols. 1972). Na presente análise conservaram-se separados os resultados obtidos das famílias em que somente o pai ou somente a mãe é o cônjuge informativo. Consideraram-se cinco hipóteses alternativas com frequências de recombinação iguais a 0,05, 0,10, 0,20, 0,30 e 0,40.

Na análise das relações de recombinação entre os diferentes marcadores, aplicou-se o método dos escores lod desenvolvido por Morton (1955, 1956 e 1957). De acordo com esse método, consideram-se hipóteses alternativas de diferentes valores de recombinação ( $\theta_1$ ), que são testadas contra uma hipótese nula com valor de  $\theta = 0,50$ . Em uma família informativa, considerando-se um determinado valor de  $\theta_1$ , a função de verossimilhança esperada nos filhos, é calculada com base no observado. O logaritmo obtido da razão de probabilidade entre as funções de verossimilhança, quando testamos uma hipótese alternativa contra a hipótese nula, é o escore lod ou escore z.

Selecionadas as famílias com pelo menos um cônjuge duplamente heterozigoto para cada relação de dois locos estudados, classificaram-se os fenótipos dos filhos em recombinantes e não recombinantes. Nas famílias em que a fase era desconhecida, os resultados dos escores lod foram consultados nas tabelas

Tabela 3. Especificação das famílias nucleares informativas para a análise das relações de ligação entre os locos da PM e  $\alpha$ -Hp.

Genealogia A							
Família	Pai	Mãe	Filhos informativos				
M15	V.002	V.003	VI.004	VI.007	VI.008	VI.010	
M27	V.013	V.014	VI.063	VI.064	VI.067	VI.069	
M22	V.035	V.036 e 037	VI.120	VI.121	VI.122	VI.126	VI.128
M34	VI.086	VI.087	VII.075	VII.076	VII.077	VII.078	
B28	VI.090	VI.091	VII.083	VII.085			

Genealogia B							
M01	IV.001	IV.002	V.003	V.005	V.006	V.007	
B07	IV.016	IV.017	V.063	V.065	V.066	V.067	
B18	IV.019	IV.020	V.068	V.069			
B21	V.003	V.004	VI.017	VI.022	VI.023	VI.025	
B10	V.020	V.021	VI.066	VI.067	VI.068	VI.069	VI.070
B15	V.043	V.044	VI.087	VI.088	VI.091	VI.092	VI.093

Tabela 4. Especificação das famílias nucleares informativas para a análise das relações de ligação entre os locos da PM e Es-D.

Genealogia A							
Família	Pai	Mãe	Filhos informativos				
M29	IV.010	IV.011	V.012	V.013			
M27	V.013	V.014	VI.063	VI.064	VI.065	VI.067	VI.069

Genealogia B							
M05	III.005	III.006	IV.008	IV.010			
B22	IV.008	IV.009	V.041				
B07	IV.015	IV.017	V.063	V.065	V.067		
B18	IV.019	IV.020	V.068	V.069			
B10	V.020	V.021	VI.066	VI.067	VI.068	VI.069	VI.070
B15	V.043	V.044	VI.087	VI.092	VI.093		

Tabela 5. Especificação das famílias nucleares informativas para a análise das relações de ligação entre os locos da  $\alpha$ -Hp e CAII.

Genealogia B				
<u>Família</u>	<u>Pai</u>	<u>Mãe</u>	<u>Filhos informativos</u>	
B22	IV.008	IV.009	V.039	V.041

Tabela 6. Especificação das famílias nucleares informativas para a análise das relações de ligação entre os locos da  $\alpha$ -Hp e Es-D.

Genealogia A							
Família	Pai	Mãe	Filhos informativos				
M27	V.013	V.014	VI.063	VI.064	VI.065	VI.067	VI.069
Genealogia B							
B07	IV.016	IV.017	V.063	V.065	V.066	V.067	
B18	IV.019	IV.020	V.068	V.069			
B10	V.020	V.021	VI.066	VI.067	VI.068	VI.069	VI.070
B15	V.043	V.044	VI.087	VI.092	VI.093		

de Maynard-Smith, Penrose e Smith (1961). Para o caso de fase conhecida, consultaram-se as tabelas desses mesmos autores em Race e Sanger (1975).

### 3.3.1 - Relação PM: $\alpha$ -Hp

Na análise das relações de ligação entre os locos da PM e  $\alpha$ -Hp, obtiveram-se 11 famílias informativas (Tabela 3): cinco pertencentes à genealogia A e seis pertencentes à genealogia B. Foram inferidos os fenótipos dos indivíduos V.036 (A) e V.003 (B).

Os resultados obtidos pelo métodos dos escores lod, na análise da família M22 (A), foram calculados considerando-se juntos os filhos que o indivíduo V.035 teve com duas esposas (V.036 e 037). O fenótipo de V.036, por inferência baseada nos fenótipos dos filhos, poderá ser 2-1 ou 2-2. Em qualquer caso, tratar-se-á de um cruzamento do tipo  $z_1$ , em que se pretende analisar a recombinação paterna.

### 3.3.2 - Relação PM:Es-D

As relações de ligação entre os locos PM e Es-D (Tabela 4) foram analisadas em oito famílias nucleares informativas: duas pertencentes à genealogia A e as restantes à genealogia B.

Na tipagem dos fenótipos da Es-D, verificou-se que algumas das amostras de sangue estavam deterioradas e, em certos casos, houve dúvidas sobre o verdadeiro fenótipo do indivíduo. Isto ocorreu em uma família da genealogia A (M29) e em três da genealogia B (M05, B10 e B15), nas quais fizeram-se inferências. A inferência só foi feita quando se tinha certeza dos fenótipos dos filhos e não restava outra alternativa possível para o fenótipo de um dos pais. Na família M29 existem dois filhos informativos. Um deles é fenotipicamente 1-1 e outro é 2-1. A mãe (IV.011) é 1-1. Excluídas as hipóteses de ilegitimidade e de mutação nova, o fenótipo paterno só poderá ser 2-1. Na família B10, existem cinco filhos informativos; três são fenotipicamente 2-1 e os demais são 1-1. A mãe (V.021) é 1-1. O fenótipo paterno só poderá ser 2-1. O mesmo critério foi adotado na família M05 para o indivíduo III.005 e na família B15 para o indivíduo V.043.

### 3.3.3 - Relação CAII: $\alpha$ -Hp

Até a presente data, o polimorfismo CAII só foi descrito em negros, sendo considerado um marcador da raça negróide. A amostra, que é objeto desta análise, foi retirada de uma população basicamente caucasóide. Ainda assim, resolvemos considerar o loco CAII, em vista da facilidade técnica de realizar a tipagem de seus fenótipos simultaneamente com os da Es-D, numa mesma corrida eletroforética. Dos 112 indivíduos examinados, somente três são heterozigotos: o cônjuge de um afetado (IV.009) e suas duas filhas (V.039 e V.041). Essa é a única família informativa para o estudo das relações de ligação entre os locos ca CAII e  $\alpha$ -Hp (Tabela 5).

### 3.3.4 - Relação $\alpha$ -Hp:Es-D

Na análise das relações de recombinação entre os locos  $\alpha$ -Hp e Es-D, obtiveram-se 5 famílias informativas: uma pertencente à genealogia A e quatro à genealogia B (Tabela 6). Foram feitas inferências fenotípicas relativas a Es-D, nas famílias nucleares B10 e B15, da genealogia B, já referidas anteriormente.

#### 4 - RESULTADOS

Os resultados estão apresentados nas Tabelas 1 a 10 e nas Figs. 2 a 4, de acordo com as indicações constantes nas respectivas legendas. Em algumas, usaram-se abreviações devidamente explicadas ao pé das tabelas ou figuras em que aparecem pela primeira vez.

A Tabela 1 mostra de forma pormenorizada as informações dos indivíduos pertencentes à genealogia A, com os respectivos resultados das tipagens dos marcadores analisados. A Tabela 2 apresenta os dados referentes aos indivíduos pertencentes à genealogia B. Nessas tabelas, fez-se a identificação dos indivíduos na base de sua geração e sua posição no heredograma. Também está registrada, para cada indivíduo, a identificação que sua amostra de sangue recebeu por ocasião da coleta de dados. Com os dados das Tabelas 1 e 2, selecionaram-se as famílias nucleares informativas para as relações PM: $\alpha$ -Hp, PM:Es-D, CAII: $\alpha$ -Hp e  $\alpha$ -Hp:Es-D e elaboraram-se as Tabelas 3 a 6, respectivamente.

Nas Tabelas 7 a 10, encontram-se os resultados obtidos na análise da frequência de recombinação em todos os tipos de famílias nucleares informativas. Os resultados foram classificados de acordo com a frequência de recombinação e o sexo do progenitor informativo.

As Figs. 2, 3 e 4 mostram as curvas de distribuição dos escores lod, de acordo com as frequências de recombinação alternativas, para as relações PM: $\alpha$ -Hp, PM:Es-D e  $\alpha$ -Hp:Es-D, respectivamente.

Tabela 7. Escores lod obtidos da análise de ligação entre os locos PM e a-Hp.

		Informação paterna					
		Frequência de recombinação					
Famílias	n	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	
B15	5	-1,442	-0,887	-0,388	-0,151	-0,035	
M15	4	-1,442	-0,887	-0,388	-0,151	-0,035	
B28	2	0,258	0,215	0,134	0,064	0,017	
M27	4	-0,464	-0,229	-0,060	-0,011	-0,001	
M22	4	-1,442	-0,887	-0,388	-0,151	-0,035	
B21	4	0,063	0,052	0,031	0,015	0,004	
B10	5	0,063	0,052	0,031	0,015	0,004	
B07	4	0,649	0,568	0,395	0,217	0,065	
Total	08	32	-3,757	-2,003	-0,633	-0,153	-0,016
		Informação materna					
M01	4	-1,442	-0,887	-0,388	-0,151	-0,035	
B18	2	-0,721	-0,444	-0,194	-0,076	-0,018	
M34	2	0,258	0,215	0,134	0,064	0,017	
Total	03	8	-1,905	-1,116	-0,448	-0,163	-0,036
Total	11	40	-5,662	-3,119	-1,081	-0,316	-0,052

n = filhos informativos.

Tabela 8. Escores lod obtidos da análise de ligação entre os locos PM e Es-D.

Informação paterna					Frequência de recombinação				
Famílias	<u>n</u>	<u>r</u>	<u>nr</u>	<u>0,05</u>	<u>0,10</u>	<u>0,20</u>	<u>0,30</u>	<u>0,40</u>	
M29	2			0,258	0,215	0,134	0,064	0,017	
M27	5	2	3	-1,163	-0,633	-0,184	-0,006	0,043	
B10	5			-0,082	-0,064	-0,035	-0,016	-0,004	
B15	3			0,533	0,465	0,318	0,170	0,049	
B07	3			-0,721	-0,444	-0,194	-0,076	-0,018	
M05	2			0,258	0,215	0,134	0,064	0,017	
B22	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0,279</u>	<u>0,255</u>	<u>0,204</u>	<u>0,146</u>	<u>0,079</u>	
<b>Total</b>	<b>07</b>	<b>21</b>	<b>2 4</b>	<b>-0,638</b>	<b>0,009</b>	<b>0,377</b>	<b>0,346</b>	<b>0,183</b>	

Informação materna									
B18	2			-0,721	-0,444	-0,194	-0,076	-0,018	
<b>Total</b>	<b>07</b>	<b>23</b>	<b>2 4</b>	<b>-1,359</b>	<b>-0,435</b>	<b>0,183</b>	<b>0,270</b>	<b>0,165</b>	

n = filhos informativos; r = recombinante; nr = não recombinante.

Tabela 9. Escores lod obtidos da análise de ligação entre os locos CAII e  $\alpha$ -Hp.

		Informação materna				
Família	n	Frequência de recombinação				
		0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
B22	2	0,258	0,215	0,134	0,064	0,017

Tabela 10. Escores lod obtidos da análise de ligação entre os locos Es-D e  $\alpha$ -Hp.

		Informação paterna					
		Frequência de recombinação					
Famílias	n	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	
M27	4	-1,442	-0,887	-0,388	-0,151	-0,035	
B10	5	-1,442	-0,887	-0,388	-0,151	-0,035	
B15	3	-0,721	-0,444	-0,194	-0,076	-0,018	
B07	3	-0,721	-0,444	-0,194	-0,076	-0,018	
Total	4	15	-4,326	-2,662	-1,164	-0,454	-0,106

		Informação materna					
B18	2	0,258	0,215	0,134	0,064	0,017	
Total	5	17	-4,068	-2,447	-1,030	-0,390	-0,089

n = filhos informativos.

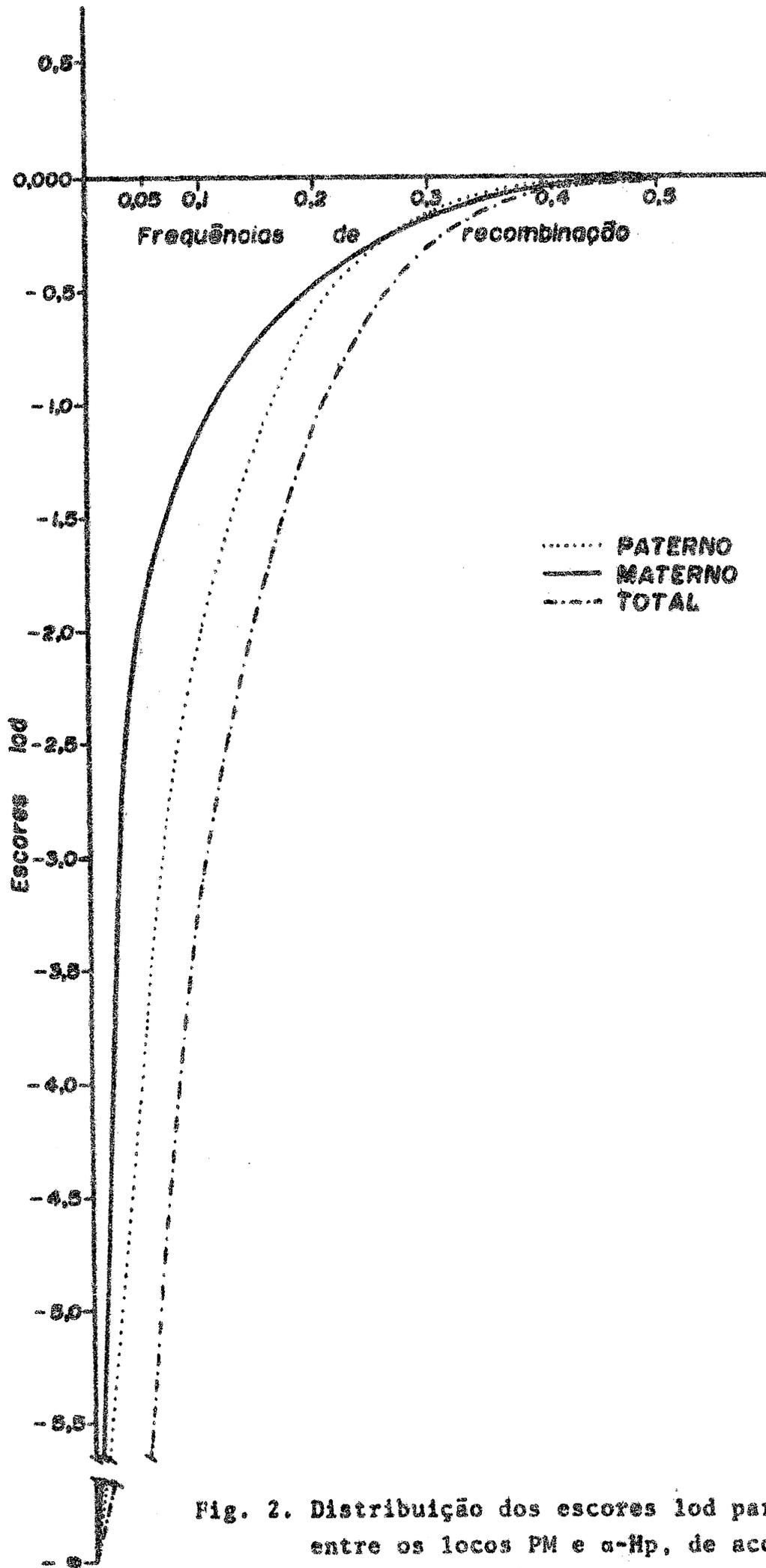


Fig. 2. Distribuição dos escores lod para a relação entre os locos PM e  $\alpha$ -Hp, de acordo com diferentes frequências de recombinação.

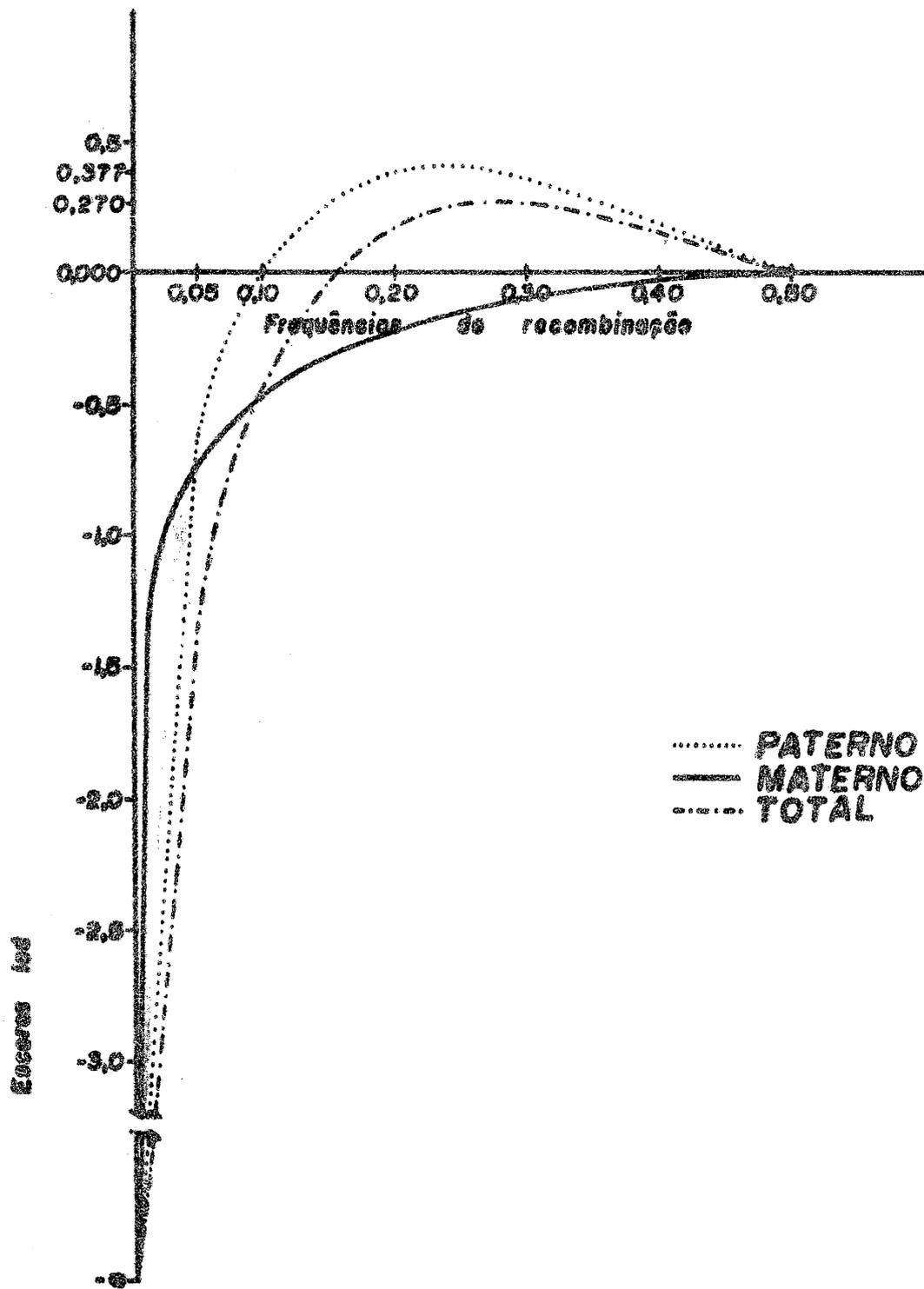


Fig. 3. Distribuição dos escores lod para a relação entre os locos PM e Es-D, de acordo com diferentes frequências de recombinação.

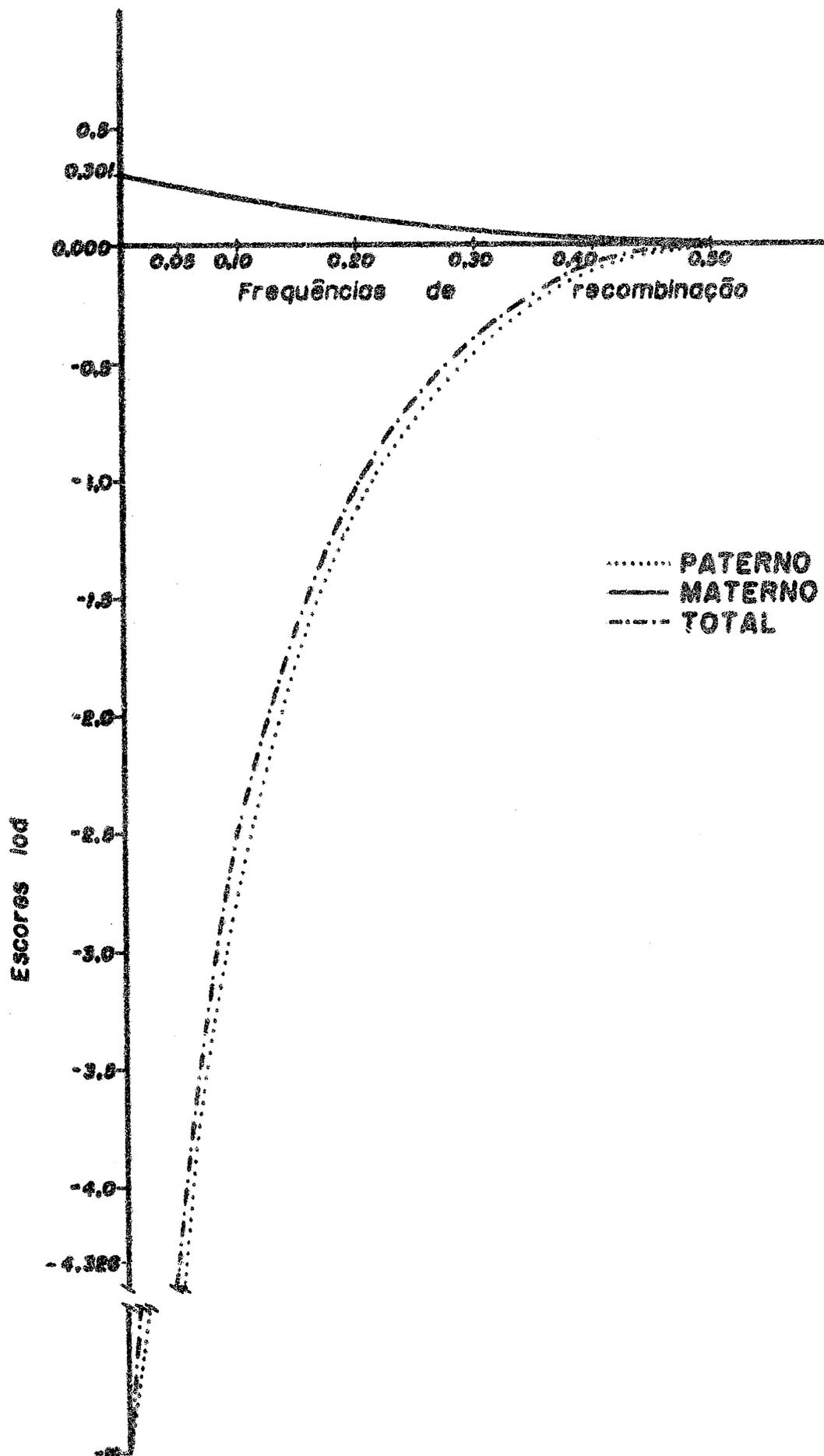


Fig. 4. Distribuição dos escores lod para a relação entre os locos  $\alpha$ -Hp e Es-D, de acordo com diferentes frequências de recombinação.

## 5 - DISCUSSÃO

Em vista da idade de manifestação da PM ser variável (Saunders e Portland, 1961) e segundo a orientação do Dr. Jorge José de Souza Filho, não foram coletadas amostras de sangue de indivíduos com idade inferior a sete anos.

No presente trabalho, as famílias analisadas só possuem crianças de idade igual ou superior a nove anos. Ainda assim, não podemos excluir a possibilidade de considerar como normal um indivíduo portador do gene da PM que ainda não tenha se expressado. Entretanto, ao acompanharmos a segregação do gene da PM nos diferentes cruzamentos, verificamos que a distribuição de poroceratósicos está de acordo com o esperado segundo as leis mendelianas. Esses dados (a serem futuramente publicados pelo Dr. B. Arce-Gomez e cols.) reduzem a possibilidade de que um indivíduo diagnosticado como normal seja portador do gene para a anomalia.

Na análise de ligação da relação PM:c-Hp (Tabela 7), tanto os resultados femininos como os masculinos distribuíram-se de forma semelhante. Os resultados obtidos quando se consideraram as hipóteses alternativas atingiram valores de escores lod variando entre -5,662 ( $\theta_1 = 0,05$ ) e -0,052 ( $\theta_1 = 0,40$ ). Apesar de que ligação entre esses locos só pode ser excluída até uma frequência de recombinação de 0,10, a distribuição dos escores lod (Fig. 2) segue uma curva típica de segregação independente.

Os resultados obtidos da análise da relação PM:Es-D não permitem exclusão de ligação, nem mesmo à frequência de 0,05 de recombinação. O número de famílias nucleares informativas é

pequeno (Tabela 4) e os valores de escores lod (Tabela 8) são baixos. Sua curva de distribuição (Fig. 3) apresenta um pico a uma frequência de recombinação de cerca de 0,24, quando se consideram os dados masculinos. A informação a respeito da recombinação feminina é representada por apenas uma família com dois filhos informativos. Quando somados os resultados femininos e masculinos, a curva atinge um pico quando  $\theta_1$  é cerca de 0,27. Apesar da quantidade de informação ser reduzida, achamos interessante que a análise dessa relação seja continuada em trabalhos posteriores.

Quanto ao loco CAII, contamos apenas com uma única família informativa para a relação CAII: $\alpha$ -Hp (Tabela 5). Os resultados dos escores lod (Tabela 9) foram relatados com a única finalidade de serem aproveitados em trabalhos posteriores.

Ao analisarmos a frequência de recombinação ocorrida entre os locos da PM e da  $\alpha$ -Hp (Tabela 10), obtivemos uma distribuição dos valores de escores lod (Fig. 4) característica de segregação independente, com possibilidade de exclusão significativa de ligação até 0,10 de frequência de recombinação. Achamos interessante fazer um estudo das relações de recombinação entre esses dois locos, adotando o método dos escores lod, em vista do loco da  $\alpha$ -Hp ter sido atribuído ao cromossomo 16 (Robson e cols. 1969) e de existirem dúvidas quanto à localização da Es-D neste mesmo cromossomo (Shows e Brown, 1975; Heyningen e cols., 1975).

Nossos resultados seguem a mesma direção dos encontrados recentemente por Robson e cols. (1976). Somando-se os valores de escores lod de ambos os trabalhos (Tabela 11), podemos excluir ligação nos dados masculinos até a frequência de recombinação de aproximadamente 0,30. De acordo com Chen, Creagan, Nichols e Ruddle (1975) que atribuíram, com maior segurança, o loco da Es-D ao cromossomo 13, esses resultados seriam esperados.

Já existem, entretanto, evidências da ausência de ligação entre o loco da Es-D e a região centromérica do cromossomo 13, restando ainda a possibilidade de sua localização na metade distal do braço longo, isto é, em 13q2 ou q3.

Convém ressaltar os valores de escores lod positivos entre os locos da Es-D e da  $\alpha$ -Hp, nos dados femininos, encontra-

Tabela 11. Escores lod obtidos na análise de ligação entre os locos da  $\alpha$ -Hp e Es-D.

Referência	Sexo	Famílias	Filhos	Frequências de recombinação						
		informativas	informativos	n	nr	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
Robson e cols. 1976	M	32	80	2	0	-15,75	-9,24	-3,78	-1,48	-0,42
Presente trabalho	M	4	15	-	-	-4,33	-2,66	-1,16	-0,45	-0,11
Total		36	95	2	0	-20,08	-11,90	-4,94	-1,93	-0,53
Robson e cols., 1976	F	24	61	1	5	-1,54	0,73	1,87	1,54	0,71
Presente trabalho	F	1	2	-	-	0,26	0,22	0,13	0,06	0,02
Total		25	63	1	5	-1,28	0,95	2,00	1,60	0,73

dos por Robson e cols. (1976) e no presente trabalho. Apesar desses resultados não serem significantes, e ocorrerem no sexo em que a susceptibilidade à permuta é maior, ainda assim, são curiosos em vista dos achados de Shows e Brown (1975).

## 6 - SUMÁRIO E CONCLUSÕES

I. A presente análise é parte de um plano maior de estudo clínico-genético da Poroceratose de Mibelli (PM) e teve por objetivo uma análise das seguintes relações de recombinação: PM: $\alpha$ -Hp, PM:Es-D,  $\alpha$ -Hp:Es-D e CAII: $\alpha$ -Hp.

II. Os indivíduos da amostra pertencem, provavelmente, a uma única unidade familiar cujos dados genealógicos foram coletados através de sete gerações.

III. As amostras de sangue permitiram a caracterização fenotípica de 112 indivíduos considerando-se os locos  $\alpha$ -Hp, Es-D e CAII.

IV. As análises das relações de ligação basearam-se no método dos escores lod.

V. Nossos dados permitem as seguintes conclusões:

A. Apontar a relação PM:Es-D como interessante para posteriores estudos de ligação genética.

B. Excluir ligação entre os locos PM e  $\alpha$ -Hp até uma frequência de recombinação de 0,10.

C. Excluir ligação entre os locos  $\alpha$ -Hp e Es-D, até a frequência de recombinação de aproximadamente 0,30, quando somados aos de outros autores, considerando-se apenas os dados masculinos.

7 - BIBLIOGRAFIA CITADA

- Bopp, C., 1954. Poroceratose de Mibelli. Tese de Livre Docência, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Livr. Globo, Porto Alegre.
- Chen, S., R. P. Creagan, E. A. Nichols e F. H. Ruddle, 1974.- Assignment of human esterase-D gene to chromosome 13. Rotterdam Conference (1974): Second International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series, XI(3):99-102, 1975. The National Foundation, Nova York.
- Cook, P. J. L., 1965. The Lutheran secretor recombination fraction in man: a possible sex difference. Annals of Human Genetics, 28:393-397.
- Cook, P. J. L., J. E. Gray, R. A. Brack, Elizabeth B. Robson e R. M. Howlett, 1969. Data on haptoglobin and the D group chromosomes. Annals of Human Genetics, 33:125-135.
- Cook, P. J. L., J. Noades, D. A. Hopkinson, Elizabeth B. Robson e T. E. Cleghorn, 1972. Demonstration of a sex difference in recombination fraction in the loose linkage, Rh and PGM<sub>1</sub>. Annals of Human Genetics, 35:239-242.
- Culpi, L., 1975. Investigações dermatoglíficas em pacientes com Poroceratose de Mibelli. Tese de Mestrado. Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

- Davis, B. J., 1959. Histochemical demonstration of erythrocyte esterases. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 101:90-93.
- Gerald, P. S., Susan Warner, J. D. Singer, Patricia A. Corcoran e I. Umansky, 1964. Possible identification of the chromosome bearing the haptoglobin locus. Journal of Clinical Investigation, 43:1297.
- Gerald, P. S., Susan Warner, J. D. Singer, Patricia A. Corcoran e I. Umansky, 1967. A ring D. chromosome and anomalous inheritance of haptoglobin type. The Journal of Pediatrics, 70: 172-179.
- Heyningen, V. von, M. Bobrow, W. F. Bodmer, S. Povey, S. E. Gardiner e D. A. Hopkinson, 1974. Assignment of the genes for human mitochondrial malate dehydrogenase to chromosome 7, for mannose phosphate isomerase and pyruvate kinase to chromosome 15, and, probably, for human esterase-D to chromosome 13 using man-mouse hybrids. Rotterdam Conference (1974): Second International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series, XI(3):183-187, 1975. The National Foundation, Nova York.
- Hopkinson, D. A., J. S. Coppock, M. F. Mühlemann e Y. H. Edwards, 1974. The detection and differentiation of the products of the human carbonic anhydrase loci CAI and CAII, using fluorogenic substrates. Annals of Human Genetics, 38:155-162.
- Hopkinson, D. A., M. A. Mestriner, J. Cortner e H. Harris, 1973. Esterase D: a new human polymorphism. Annals of Human Genetics, 37:119-139.
- Lamm, L. U., A. Svejgaard e F. Kissmeyer-Nielsen, 1971. PGM<sub>3</sub>:HL-A is another linkage in man. Nature, 231:109-110.
- Magenis, R. Ellen, F. Hecht, E. W. Lovrien, 1970. Heritable fragile site on chromosome 16: probable localization of haptoglobin locus in man. Science, 170:85-87.
- Maynard-Smith, Sheila, L. S. Penrose e C. A. B. Smith, 1961. Mathematical tables for research workers in Human Genetics. J. & A. Churchill, Londres.

- Moore, Mary J., S. Funakoshi e H. F. Deutsch, 1971. Human carbonic anhydrases. VII. A new C type isozyme in erythrocytes of American Negroes. Biochemical Genetics, 5:497-504.
- Morton, N. E., 1955. Sequential tests for the detection of linkage. The American Journal of Human Genetics, 7:277-318.
- Morton, N. E., 1956. The detection and estimation of linkage between the genes for elliptocytosis and the Rh blood type. The American Journal of Human Genetics, 8:80-96.
- Morton, N. E., 1957. Further scoring types in sequential linkage tests, with a critical review of autosomal and partial sex linkage in man. The American Journal of Human Genetics, 9: 55-75.
- Nosslin, B. F. e Margareta Nyman, 1958. Haptoglobin determination in diagnosis of haemolytic diseases. Lancet, i:1000-1001.
- Nyman, P. O. e Lindskog, 1964. Amino acid composition of various forms of bovine and human erythrocyte carbonic anhydrase. Biochimica et Biophysica Acta, 85:141-151.
- Poulik, M. D., 1957. Starch gel eletrophoresis in a discontinuous system of buffers. Nature, 180:1477-1479.
- Race, R. R. e Ruth Sanger, 1975. Blood groups in Man. Blackwell, Londres, 6<sup>a</sup> edição.
- Renwick, J. H., 1969. Progress in mapping human autosomes. British Medical Bulletin, 25:65-73.
- Renwick, J. H., Jane Schulze, 1965. Male and female recombination fractions for the nail-patella: ABO linkage in man. Annals of Human Genetics, 28:379-392.
- Rickli, E. E., S. A. S. Ghazanfar, Barbara H. Gibbons e J. T. Edsall, 1964. Carbonic anhydrases from human erythrocytes. The Journal of Biological Chemistry, 239:1065-1078.
- Robson, Elizabeth B., D. A. Hopkinson, K. E. Buckton, J. Robinson e P. E. Polani, 1976. Family studies on esterase D and chromosome 13 in man. Baltimore Conference (1975): Third

- International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series, XII(7):351-354, 1976. The National Foundation, Nova York.
- Robson, Elizabeth B., P. E. Polani, S. J. Dart, P. A. Jacobs, e J. H. Renwick, 1969. Probable assignment of the alpha locus of haptoglobin to chromosome 16 in Man. Nature, 223:1163-1165.
- Robson, Elizabeth B., I. Sutherland e H. Harris, 1966. Evidence for linkage between the transferrin locus (Tf) and the serum cholinesterase locus (E<sub>1</sub>) in man. Annals of Human Genetics, 29:325-336.
- Saunders, T. S. e M. D. Portland, 1961. Porokeratosis. Archives of Dermatology, 84:142-149.
- Smithies, O., 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochemical Journal, 61:629-641.
- Smithies, O. e Norma F. Walker, 1955. Genetic control of some serum proteins in normal humans. Nature, 176:1265-1266.
- Smithies, O. e Norma F. Walker, 1956. Notation for serum-protein groups and the gene controlling their inheritance. Nature, 178:694-695.
- Shows, T. B. e J. A. Brown, 1974. Segregation of esterase-D and adenine phosphoribosyl transferase in somatic cell hybrids: gene linkage or chromosome association? Rotterdam Conference (1974): Second International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series, XI(3):260-263, 1975. The National Foundation, Nova York.
- Tashian, R. E., 1961. Multiple forms of esterases from human erythrocytes. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 108:364-366.
- Tashian, R. E., 1965. Genetic variation and evolution of the carboxylic esterases and carbonic anhydrases of primate erythrocytes. The American Journal of Human Genetics, 17: 257-272.
- Tashian, R. E. e Margery W. Shaw, 1962. Inheritance of an erythrocyte acetylcetase variant in Man. The American Journal of Human Genetics, 14:295-300.

Wachstein, M. e G. Wolf, 1958. Histochemical demonstration of esterase activity in human blood and bone marrow smears. Journal of Histochemical & Cytochemical, 6:457.

Weitkamp, L. R., S. A. Guttormsen e R. M. Greendyke, 1971. Genetic linkage between a locus for 6-PGD and the Rh locus: Evaluation of possible heterogeneity in the recombination fraction between sexes and among families. The American Journal of Human Genetics, 23:462-470.