

MARIA LUIZA PETZL

ESTUDO DAS FREQUÊNCIAS DE RECOMBINAÇÃO ENTRE O LOCO DA CADEIA
BETA DA HEMOGLOBINA (Hb β) E OS LOCOS DO SISTEMA SANGUÍNEO MNSs
E DA CADEIA DELTA DA HEMOGLOBINA (Hb δ)

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

A meus pais,
com carinho

Í N D I C E

PREFÁCIO.....	5
AGRADECIMENTOS.....	7
INTRODUÇÃO.....	8
1. <u>Os locos da hemoglobina</u>	8
1.1 Locos estruturais.....	9
1.2 Sítios de controle.....	10
1.2.1 Persistência hereditária da hemoglobina fetal....	10
1.2.2 Talassemias.....	11
1.3 Relações de ligação do loco Hb β	13
1.3.1 Locos Hb α e Hb β	13
1.3.2 Locos Hb β e Hb δ	13
1.3.3 Locos Hb β e Hb γ	15
1.4 Atribuição cromossômica dos locos estruturais.....	15
2. <u>O loco MNSs</u>	17
2.1 Relações de ligação do loco MNSs.....	18
2.2 Atribuição cromossômica do loco MNSs.....	20
3. <u>Estudos sobre uma possível ligação Hbβ:MNSs</u>	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
1. <u>Caracterização da amostra</u>	25
2. <u>Metodologia da coleta</u>	27
2.1 Procedimentos usados na triagem dos probandos.....	27
2.2 Averiguação das famílias e coleta das amostras.....	28
3. <u>Tratamento do material no laboratório</u>	28

4. <u>Caracterização dos fenótipos</u>	29
4.1 Determinação dos grupos sanguíneos MNSs, ABO, Rh e Fy.....	30
4.1.1 Sistema MNSs.....	30
4.1.2 Sistemas ABO, Rh e Fy.....	31
4.2 Hemoglobina.....	31
4.3 Haptoglobina.....	33
4.4 Esterase D e Anidrase Carbônica II.....	34
5. <u>Metodologia da análise de ligação</u>	35
5.1 O método.....	35
5.2 A análise.....	37
RESULTADOS.....	43
1. <u>Recombinação entre os locos Hbβ e MNSs</u>	43
2. <u>Ligação Hbβ:Hbδ</u>	53
DISCUSSÃO.....	56
1. <u>Recombinação entre os locos Hbβ e MNSs</u>	56
2. <u>Ligação Hbβ:Hbδ</u>	60
SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....	61
BIBLIOGRAFIA CITADA.....	63
APÊNDICE 1.....	74
APÊNDICE 2.....	80
APÊNDICE 3.....	102

PREFÁCIO

Resultados provenientes de diferentes linhas de pesquisas tornam interessante o estudo das relações de recombinação entre os locos da cadeia beta da hemoglobina (Hb β) e do sistema sanguíneo MNSs. Estudos que se utilizaram de métodos numéricos para a análise de ligação em famílias, indicaram a possibilidade dos locos Hb β e MNSs estarem frouxamente ligados. Apesar das sugestões derivadas desses estudos serem por si só fracas, elas crescem de importância devido aos resultados de outros trabalhos, que levaram ao aumento da probabilidade de sintenia entre esses locos. Estes últimos trabalhos pertencem a duas categorias distintas: os que sugerem localização do loco Hb β no cromossomo 2 ou 4, através de experimentos com hibridação in situ, e os que tentam atribuir o loco MNSs ao cromossomo 2 através de mapeamento por deleção.

O presente estudo tem por objetivo aumentar a quantidade de informação proveniente de análises familiares, afim de procurar definir melhor a relação entre esses dois locos, contribuindo, desta maneira, para o mapeamento do genoma humano.

Durante o desenvolvimento do trabalho, foi descoberta uma família informativa para a relação Hb β :Hb δ , que levou a se considerar também esse par de ligação na presente tese.

Na redação desta tese, procurou-se empregar apenas os símbolos padronizados no 3º Congresso Internacional de Mapeamento do Genoma Humano (Baltimore Conference, 1975), para denominação de locos e alelos. Contudo, por motivo de simplificação, os alelos estruturais responsáveis pela síntese de variantes de hemoglobina serão

referidos pelo símbolo designativo da hemoglobina resultante. Assim, o alelo $Hb\beta^S$ será denominado HbS , deixando-se sempre claro, no texto, que se trata do alelo e não da hemoglobina variante. A mesma observação é válida para os alelos do loco $MNSs$, que serão designados pelos símbolos dos antígenos que determinam, ou seja: M, N e S, s.

Devido à ausência de informação na literatura quanto à maneira de distinção entre os dois locos estruturais para a cadeia α da hemoglobina, achou-se conveniente denominá-los $Hb\alpha_1$ e $Hb\alpha_2$.

Maria Luiza Petzl

Curitiba, agosto de 1977.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eleidi Alice Chautard Freire Maia, pela sugestão do tema desta tese, assim como pela orientação e estímulo no decorrer de todo o trabalho.

Ao estudante Sérgio Luiz Primo Parmo, pela amizade e inestimável auxílio no trabalho de laboratório.

Aos funcionários e médicos das Clínicas Hematológica e Pediátrica do Hospital de Clínicas de Curitiba, por possibilitarem o acesso aos fichários e prontuários de seus pacientes.

A Milton Vânius de Almeida Lima, bioquímico responsável pelo Laboratório de Hematologia da Clínica Médico Cirúrgica de Piraquara, pela indicação do probando de uma das genealogias.

Ao Prof. Dr. Moacyr A. Mestriner, por possibilitar e orientar a caracterização da amostra para Es D e CA II, e a Sérgio Luiz Primo Parmo, por realizá-la.

Aos Profs. Dr. Newton Freire-Maia e Lodércio Culpi, pela leitura crítica desta tese.

Aos professores, colegas e amigos do Departamento de Genética e do Curso de Pós-Graduação em Genética Humana, pela cooperação e sugestões, não só no decorrer deste trabalho, mas durante todo o curso de pós-graduação.

À Srta. Irene Sedoski, secretária do Departamento de Genética, pelo serviço de datilografia.

A Carlos A. Padilha, secretário do Curso de Pós-Graduação em Genética Humana e desenhista do Departamento de Genética, pela confecção das genealogias e dos gráficos.

Às famílias que possibilitaram o material deste estudo, pela colaboração sem a qual seria impossível a realização desta tese.

À Coordenação Central dos Cursos de Pós-Graduação da UFPR, pela bolsa concedida para o ano de 1975.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida durante os anos de 1976 e 1977.

INTRODUÇÃO

Neste item serão abordados, de maneira sucinta, aspectos gerais relacionados aos mecanismos genéticos responsáveis pela síntese das cadeias hemoglobínicas e dos antígenos do sistema MNSs. Atenção especial será dada apenas às relações de ligação e às atribuições cromossômicas dos locos Hb β e MNSs, por estarem esses aspectos ligados de maneira mais direta ao tema desta tese.

1. Os locos da hemoglobina

Todo indivíduo normal sintetiza, ao longo de seu desenvolvimento, diversos tipos de hemoglobina. De uma maneira geral, pode-se dizer que a molécula de hemoglobina é composta por quatro cadeias polipeptídicas, idênticas duas a duas, cada qual associada a um grupo prostético denominado "heme". Assim, a principal hemoglobina do adulto, a hemoglobina A (HbA), é produto da associação de duas cadeias α e de duas cadeias β , sendo representada por $\alpha_2\beta_2$. A HbA₂($\alpha_2\delta_2$) também ocorre no adulto, perfazendo de 1 a 3% da hemoglobina total. No feto e durante o período neo-natal, predomina a hemoglobina fetal (HbF: $\alpha_2\gamma_2$), porém a taxa de cadeias γ declina rapidamente após o nascimento, com um concomitante aumento na síntese de cadeias β . Após o primeiro ano de vida, restam apenas traços de HbF e o padrão hemoglobínico já é igual ao do adulto.

A cadeia α tem 141 resíduos de aminoácidos e as cadeias β , δ e γ têm 146. Essas cadeias diferem entre si em maior ou menor grau: β e δ diferem em 10 posições de aminoácidos e β e γ em 39 posições. A correspondência entre as cadeias α e β é de 42%.

No embrião e no início da vida fetal, até a 9^a semana de gestação, há síntese de cadeias ϵ (epsilon) e ζ (zeta), que participam da estrutura das hemoglobinas Gower I (ϵ_4), Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland 1 ($\zeta_2\gamma_2$), conhecidas genericamente por hemoglobinas embrionárias (revisão em Lorkin, 1973).

1.1 Locos estruturais

Desde que os vários tipos de cadeias, que ocorrem em todos os indivíduos normais, diferem em sua estrutura primária, torna-se evidente que sejam codificados por locos individuais. A ocorrência simultânea de mais de dois tipos de variantes de hemoglobina leva à mesma conclusão. Pouco se conhece acerca das hemoglobinas embrionárias, mas é muito provável que também as cadeias ϵ e ζ sejam determinadas por locos próprios.

As cadeias γ encontradas na HbF normal são de dois tipos: as que possuem glicina (γ^G) e as que possuem alanina (γ^A) na posição 136 (Schroeder e cols., 1968). Constatou-se que indivíduos portadores de variantes de cadeia γ apresentam só um dos tipos de cadeia γ alterado. Esses fatos, aliados às análises da HbF de indivíduos portadores de persistência hereditária da hemoglobina fetal (Huisman e cols., 1969, 1970), demonstraram a existência de dois locos para a estrutura da cadeia γ da hemoglobina, que possivelmente diferem por um único nucleotídeo.

A existência de dois locos Hb α foi sugerida por Lehman e Carrel (1968), ao verificarem que a hemoglobina variante, em heterozigotos para a cadeia α , perfazia apenas cerca de 25% da hemoglobina total, enquanto que em heterozigotos para a cadeia β cerca de 40% da hemoglobina é variante. Esta hipótese foi corroborada por Hollán e cols. (1972), Wasi (1973) e Lie-Injo e cols. (1974), ao constatarem a presença de HbA em indivíduos que apresentavam dois variantes de cadeia α . Há, porém, evidências de que em algumas populações exista apenas um loco para a cadeia α (Abramson e cols., 1970).

Deste modo, todo indivíduo normal apresenta, pelo menos, sete ou oito locos que determinam a estrutura da hemoglobina. Estes locos são denominados Hb α (Hb α_1 ; Hb α_2), Hb β , Hb δ , Hb γ (Hb γ^A ; Hb γ^G), Hb ϵ e Hb ζ .

Mais de 100 variantes de hemoglobina já foram descritas (Giblett, 1969; Huisman, 1969). Destas, cerca de 60% são mutantes β e cerca de 40%, mutantes α . Por outro lado, são conhecidas poucas variantes δ e γ . A maioria das variantes de hemoglobina difere em relação à hemoglobina normal pela substituição de um único aminoácido em uma das cadeias, mas também são conhecidas variantes com duas substituições simultâneas, com adição ou deleção de alguns aminoácidos, alongamento de cadeia, ou simplesmente agregação anormal das sub-unidades.

Devido à grande homologia entre as diferentes cadeias, Ingram (1961) propôs um modelo evolutivo segundo o qual todas as cadeias hemoglobínicas, assim como a cadeia da mioglobina (proteína responsável pela transferência de oxigênio no músculo), teriam evoluído a partir de um ancestral comum. Diversas duplicações gênicas, em diferentes tempos evolutivos, seguidas de evolução divergente dos locos duplicados, teriam conduzido ao padrão hemoglobínico observado atualmente.

1.2 Sítios de controle

Apesar dos locos estruturais serem relativamente bem identificados, pouco se conhece acerca dos mecanismos que regulam a síntese das cadeias polipeptídicas da hemoglobina. Sua existência pode ser inferida pela precisão com a qual a taxa de síntese de cada cadeia é controlada ao longo do desenvolvimento. Além disso, alterações tais como a persistência hereditária da hemoglobina fetal e certos tipos de talassemia também fazem pressupor a existência de sítios responsáveis pelo controle da taxa de síntese das cadeias hemoglobínicas.

1.2.1 Persistência hereditária da hemoglobina fetal

Dois tipos de persistência hereditária da hemoglobina fetal (PHHF) são conhecidos: o "africano" e o "grego". No primeiro, há supressão da síntese de cadeias β e δ , acompanhada de síntese persistente de cadeias γ , de modo que o homozigoto apresenta apenas HbF. No segundo, ocorre alguma síntese de cadeias β e δ , e a produção de HbF não atinge níveis tão altos (Harris, 1975). Ambas as condições são muito benignas, não havendo qualquer manifestação clínica.

O gene da PHHF do tipo africano, que é o mais estudado dos dois, se comporta como alelo ou como intimamente ligado ao loco Hb β , já que não se observaram recombinantes num total de 52 indivíduos analisados (Conley e cols., 1963; Bethlenfalvay, 1975). Além disso, também não foi constatada recombinação entre os locos da PHHF e Hb δ , após análise de 11 filhos de indivíduos duplamente heterozigotos (Bethlenfalvay, 1975).

Procurando interpretar o fenômeno observado na PHHF do tipo africano, foram propostas duas hipóteses. A primeira admite deleção de um "gene operador", comum aos locos Hb β e Hb δ , de modo que a passagem do padrão hemoglobínico fetal ao do adulto é impedida (Neel, 1961; Conley e cols., 1963). A outra hipótese considera a possibilidade de deleção dos locos Hb β e Hb δ (Bradley e Conley, 1960) e encontra sustentação nos estudos realizados nos indivíduos portadores de Hb Kenya. Nessa hemoglobina, as cadeias não- α são produto de uma fusão γ^A - β e, no cromossomo portador do loco "Hb Kenya", estão ausentes os locos Hb δ , Hb γ^A e Hb β normais. Portadores de Hb Kenya apresentam características hematológicas e padrão hemoglobínico similares aos encontrados em heterozigotos para a PHHF (Kendall e cols., 1973; Smith e cols., 1973). Entretanto, a simples perda dos locos estruturais Hb β e Hb δ parece ser insuficiente para explicar a persistência da HbF. Kendall e cols. (1973) consideraram necessária a interferência com a regulação da transcrição. Para isso, admitiram a existência de um sítio "Y", responsável pela inativação da síntese de cadeias γ , e que estaria incluído no segmento perdido. Assim, tanto na primeira como na segunda hipótese se faz necessária a consideração de um sítio de controle.

1.2.2 Talassemias

As talassemias são um grupo heterogêneo de anemias hemolíticas crônicas, ocasionadas pela diminuição ou ausência da síntese de uma determinada cadeia hemoglobínica. A verdadeira natureza dessas mutações é desconhecida para a maioria das talassemias, uma vez que é normal a estrutura das cadeias produzidas.

Através de estudos de hibridação, sabe-se que, na forma mais grave de α -talassemia, há deleção de ambos os locos Hba

(Hb α_1 e Hb α_2) no cromossomo afetado (Ottolenghi e cols., 1974; Taylor e cols., 1974). Isto leva a crer na possibilidade da deleção de apenas um loco Hb α na forma menos grave de α -talassemia. Além disso, não se pode desconsiderar a possibilidade, nesse último caso, de uma mutação em um gene operador.

As β -talassemias são ainda menos conhecidas que as α -talassemias, com respeito a esse aspecto. Constatou-se que, em algumas, há diminuição na taxa de produção do RNAm específico, ficando assim excluídos eventuais problemas de tradução ou de estabilidade do produto polipeptídico, para esse tipo de β -talassemia. Em outras β -talassemias, com ausência total de cadeias β (β^0 -talassemias), tanto pode estar ocorrendo a deleção do loco Hb β como a regulação defectiva do processo de transcrição (revisão em Clegg, 1976).

Estudos de segregação, em indivíduos heterozigotos para β -talassemia e para variantes estruturais da cadeia β , indicam "alelismo" ou ligação íntima entre esses genes. Weatherall e cols. (1976) citam que, entre quase 200 filhos de indivíduos duplamente heterozigotos, registrados na literatura, não foi observado nenhum caso inequívoco de recombinação. A fase do pai duplamente heterozigoto era sempre de repulsão. Estes achados justificam que, em vários trabalhos sobre ligação do loco Hb β , o gene da β -talassemia seja considerado como um alelo seu.

A dificuldade de se identificarem recombinantes deve ser ressaltada, pois uma permuta que situar β^0 -talassemia e o alelo variante de Hb β no mesmo cromossomo pode não ser verificada, devido à ausência de síntese da cadeia variante. Por outro lado, indivíduos normais classificados como recombinantes sempre têm uma certa possibilidade de serem filhos ilegítimos.

A grande heterogeneidade entre as talassemias também não pode ser esquecida. É possível que, em certos casos, haja comprometimento do próprio loco estrutural, enquanto que, em outros, ocorra alteração em sítios distintos, relacionados com a regulação da síntese, porém sempre muito próximos do loco estrutural, como indicam os estudos familiares.

1.3 Relações de ligação do loco Hb β

Nenhuma proteína humana foi tão bem investigada como a hemoglobina. Nos últimos 25 anos, foram estudadas muitas famílias com segregação para uma ou mais variantes de hemoglobina. Do grande número de variantes de cadeias α e β descritas, algumas constituem polimorfismos em várias populações. No entanto, apesar desta situação tão privilegiada, só foram obtidas fortes evidências de ligação entre alguns dos próprios locos de hemoglobina. A seguir, serão revistos os trabalhos de ligação referentes ao loco Hb β .

1.3.1 Locos Hb α e Hb β

A análise de uma série de famílias, nas quais segregavam variantes estruturais das cadeias α e β , permitiu excluir ligação próxima entre esses dois locos (Schwartz e cols., 1957; Smith e Torbert, 1958; Atwater e cols., 1960; Raper e cols., 1960; Wong e Huisman, 1972). As relações entre Hb α e β -talassemia e entre α -talassemia e Hb β também puderam ser observadas em algumas famílias. Schwartz e cols. (1957) observaram recombinação entre o loco Hb α e o da β -talassemia. Motulsky (1964), sumariando dados de Cohen e cols. (1959) e de Tuchinda e cols. (1964), concluiu a favor da segregação independente do loco Hb β e o da α -talassemia.

Deisseroth e cols. (1975b), valendo-se de uma associação dos métodos de hibridação somática e de hibridação molecular, determinaram assintenia entre os locos Hb α e Hb β .

1.3.2 Locos Hb β e Hb δ

Num total de 69 indivíduos, filhos de heterozigotos duplos para variantes estruturais das cadeias β e δ , não foi constatado nenhum recombinante (Ceppellini, 1959; Horton e cols., 1961; Horton e Huisman, 1963; Ranney e cols., 1963; Boyer e cols. 1963; Pearson e Moore, 1965; Schwartz e cols., 1967; Mishu e Nance, 1969; Weatherall e cols., 1976). Nesta tese, será apresentada uma família adicional que segrega para as variantes HbS e HbB₂ e fornece mais oito filhos não recombinantes.

Huisman e cols. (1961), Weatherall (1964), Pearson e Moore (1965) e Weatherall e cols. (1976) descreveram famílias informativas para ligação entre Hb δ e β -talassemia. Entre 54 indivíduos

estudados, observaram-se dois possíveis recombinantes, dos quais somente um pode ser tido como altamente provável (Weatherall, 1964; Pearson e Moore, 1965). Em ambos os casos, não foi possível excluir paternidade, mesmo após tipagem para uma série de marcadores genéticos. Na família estudada por Weatherall (1964), no entanto, o indivíduo classificado como recombinante, de fenótipo normal (a fase, no pai, era de repulsão), pertencia a uma irmandade na qual fôra constatado um filho ilegítimo. Pearson e Moore (1965) e Weatherall e cols. (1976) interpretaram esses resultados, com relação à ausência de recombinação entre os locos Hb β e Hb δ , como indicação de que o loco Hb δ estaria mais próximo do loco Hb β que do loco da β -talassemia. Esta sugestão é favorecida pelo fato dos alelos para variantes estruturais de β e δ só terem sido observados numa fase (repulsão), o que não acontece com os alelos da β -talassemia e de variantes estruturais de δ . Essas considerações são válidas apenas para as β -talassemias observadas em negros, pois há sugestões de que elas sejam entidades distintas das observadas em outros grupos raciais.

Thompson e cols. (1965) relataram uma irmandade com um indivíduo heterozigoto para HbS e HbB₂. Seu pai é heterozigoto para β -talassemia e HbB₂, em acoplamento, enquanto a mãe possui os alelos da HbS e da HbB₂ em repulsão. O filho é, necessariamente, recombinante (não pôde ser constatada ilegitimidade). Não foi possível, no entanto, determinar se a permuta ocorreu entre β -talassemia e Hb δ (no pai) ou entre Hb β e Hb δ (na mãe), pois ambos os casos podem conduzir ao resultado observado.

Não só os resultados dos estudos familiares, mas também a descoberta de um grupo de hemoglobinas variantes, as Hbs Lepores e anti-Lepores, forneceram sugestões a favor da proximidade dos locos Hb β e Hb δ . Nessas hemoglobinas, as cadeias não- α representam, respectivamente, uma fusão δ - β e β - δ (Gerald e cols., 1960; 1961; Baglioni, 1962; Ohta e cols., 1971). Como origem dessas cadeias incomuns, Baglioni (1962) sugeriu a ocorrência de permuta intragênica, após pareamento incorreto, que é favorecido pela proximidade e homologia entre os locos Hb β e Hb δ . As Hbs Lepores diferem entre si pelo ponto de fusão δ - β . O cromossomo portador do loco Hb δ -Hb β resultante não possui locos Hb β e Hb δ íntegros, não podendo produzir HbA e HbA₂. A falta de cadeias β provoca efeito

talassêmico. O outro cromossomo resultante dessa permuta desigual possui um loco "anti-Lepore" (Hb β -Hb δ), além dos locos Hb β e Hb δ íntegros. A Hb Miyada é um exemplo de hemoglobina anti-Lepore. Seus portadores sintetizam cadeias β a níveis normais, não ocorrendo o quadro hematológico e clínico da β -talassemia.

1.3.3 Locos Hb β e Hb γ

Devido à ausência de quantidade significativa de HbF no adulto, não foi possível determinar a relação entre os locos Hb β e Hb γ através de análises genealógicas. Toda informação sobre ligação fundamenta-se no estudo da Hb Kenya, uma hemoglobina análoga à Hb Lepore. As cadeias α da Hb Kenya são normais, porém as cadeias não- α são híbridas, resultantes de uma fusão γ - β (Huisman e cols., 1972). O sítio de fusão localiza-se entre os resíduos 81 e 86^{de} ambas as cadeias (Kendall e cols., 1973). Acredita-se que, do mesmo modo que as cadeias δ - β da Hb Lepore, essa cadeia tenha se originado por pareamento incorreto, seguido de permuta desigual entre os locos Hb β e Hb γ , mais precisamente Hb β e Hb γ^A . A diminuição verificada na taxa de síntese das hemoglobinas A e A₂ sugere que no cromossomo portador do loco Hb γ^A -Hb β , os locos Hb β e Hb δ tenham sido perdidos. Há aumento no nível da Hb fetal, observando-se apenas cadeias γ^G na HbF produzida, fato este que sugere a retenção do loco Hb γ^G (Kendall e cols., 1973; Smith e cols., 1973).

Pela presença ou ausência da síntese de determinadas cadeias em indivíduos portadores das hemoglobinas Lepores, anti-Lepore e Kenya, foi possível não só corroborar ligação íntima entre os locos Hb β , Hb δ e Hb γ , mas também sugerir a sua seqüência no cromossomo normal. Esta é, muito provavelmente, Hb γ^G -Hb γ^A -Hb δ -Hb β , a partir do terminal NH₂.

McKusick (1977) inclui, provisoriamente, o loco Hb ϵ no grupo de ligação Hb γ -Hb δ -Hb β , citando, ainda, uma possível ligação entre os locos Hb α e Hb ζ .

1.4 Atribuição cromossômica dos locos estruturais

Price e cols. (1972), valendo-se da técnica de hibridação

in situ, atribuíram os locos estruturais das cadeias hemoglobínicas aos braços longos de dois autossomos: o cromossomo 2 e um dos cromossomos do grupo B, mais tarde identificado como o 4 (Price e Hirschhorn, 1974). Este veio a ser o primeiro grupo de locos pouco repetitivos cuja atribuição cromossômica foi conseguida com essa técnica. A hibridação in situ consiste, basicamente, em produzir híbridos DNA-RNA em cromossomos metafásicos humanos. No primeiro experimento o RNA para hemoglobina, marcado radioativamente pela ^3H -uridina, foi purificado a partir de reticulócitos de coelho. A utilização desse animal foi justificada pela grande semelhança de suas cadeias hemoglobínicas com as humanas.

Logo surgiram críticas a esse trabalho, baseadas na aparente impossibilidade técnica de se conseguirem tais resultados, devido à baixa atividade específica do ^3H -RNA utilizado (Bishop e Jones, 1972; Prenskey e Holmquist, 1973).

Em resposta às críticas, sem dúvida muito bem fundamentadas, Price e Hirschhorn (1974) idealizaram novo experimento, desta feita utilizando DNA complementar (DNAc), copiado do RNA de reticulócitos pela transcriptase reversa do vírus da mieloblastose aviária. Foi conseguida maior atividade específica e os resultados do trabalho original foram corroborados. Através de procedimento análogo, Price e Hirschhorn (1974) também conseguiram hibridação para os locos de RNA_t e RNA_r. Com poli-dA, observaram marcação difusa em todo o DNA, como consequência de hibridação não-específica.

Atwood e cols. (1974, 1975) também confirmaram os resultados iniciais de Price e cols. (1972), conseguindo não só hibridação com os locos da hemoglobina humana, mas também com os de camundongo, cuja atribuição cromossômica já havia sido determinada anteriormente. Tais resultados sugerem que seja realmente possível localizar locos pouco repetitivos, como os das cadeias hemoglobínicas, pelo método de hibridação in situ.

O passo seguinte seria determinar qual dos dois cromossomos - o 2 ou o 4 - contém cada um dos complexos de locos hemoglobínicos - o de cadeias α e o de cadeias γ , δ e β . Price e cols. (1972) propuseram a localização do complexo Hb γ -Hb δ -Hb β no cromossomo 4, baseados apenas no comprimento relativo das duas re-

giões marcadas. Anderson e cols. (1975) e Deisseroth e cols. (1975a) empregaram uma combinação das técnicas de hibridação somática e de hibridação molecular. Resultados preliminares excluíram, entre outros, o cromossomo 2 como possível portador do loco Hb β . Este resultado é conflitante com o obtido por Gandini e cols. (1977) que, indiretamente, leva a atribuir o loco Hb β ao cromossomo 2. Estes últimos autores atribuíram os locos Hb α ao braço longo do cromossomo 4, tomando como mais provável o segmento compreendido entre as bandas 4q28 e 4q34. Esta conclusão derivou de estudos sobre a relação α/β (" α " e " β " representam a taxa de síntese dessas duas cadeias), em quatro pacientes portadores de trisomias parciais do cromossomo 4. Dois desses pacientes, com duplicação 4q28 \rightarrow 4qter, apresentavam excesso de cadeias α . A banda 4q35 foi excluída, pois em um terceiro paciente, com monossomia dessa região e duplicação do segmento 4p13 \rightarrow 4p16, a razão α/β era igual a 1, como nos controles. Um quarto paciente, com duplicação 4q25 \rightarrow 4q34, que inclui as bandas duplicadas nos dois primeiros pacientes citados, apresentava excesso de cadeias β . Os autores explicaram esse último resultado, aparentemente conflitante, através de técnicas citogenéticas, que evidenciaram inativação do braço longo do cromossomo 4 portador da duplicação, com consequente depressão na síntese de cadeias α .

Pelo que foi exposto acima, pode-se notar que, até o momento, há dúvidas quanto à localização do loco Hb β no cromossomo 2.

2. O loco MNSs

O sistema sangüíneo MNSs é comparável, em complexidade, ao Rh. M e N se comportam como alelos, o mesmo ocorrendo com S e s. Uma série de alelos raros foram descritos, tanto para MN como para Ss. Através de reações imunológicas, é possível o reconhecimento de quatro combinações principais - MS, Ms, NS e Ns - que, para efeitos práticos, podem ser consideradas como se fossem os quatro alelos mais freqüentes do sistema. Contudo, ainda não foi possível determinar se os sítios mutacionais MN e Ss se situam ou não no mesmo loco. Existindo locos individuais, estes devem estar intimamente ligados, devido à freqüência de recombinação

extremamente baixa entre eles. A reunião de dados da literatura forneceu informação sobre 1538 divisões meióticas, com respeito à permuta, sendo encontrados seis possíveis casos de recombinação, dos quais apenas três podem ser tidos como altamente prováveis (Gedde-Dahl Jr. e cols., 1967; Race e Sanger, 1975).

Os produtos polipeptídicos dos alelos do sistema MNSs ainda não puderam ser identificados. Os antígenos M e N são glicoproteínas, não podendo, por isto, serem produtos gênicos primários. Sua atividade antigênica depende da presença de ácido siálico nos receptores M e N. A diferença entre a estrutura desses dois antígenos ainda não é conhecida, porém N possui mais β -D-galactopiranosil que M. Por outro lado, o antígeno N_{VG} , reconhecido por Vicia graminea, não depende do ácido siálico. Este fato, associado ao reconhecimento de alguma atividade N no antígeno M, conduziu à elaboração de um esquema genético-bioquímico, segundo o qual o antígeno N_{VG} seria precursor de N que, por sua vez, seria precursor de M. Assim, o gene N poderia ser independente do loco MN, e o alelo de M, que denominamos N, seria na realidade um amorfo análogo ao alelo I^O do sistema ABO. Existem, porém, várias observações que ainda não puderam ser conciliadas com esse esquema (revisão em Race e Sanger, 1975).

2.1 Relações de ligação do loco MNSs

O único exemplo de ligação com o loco MNSs é o do loco da esclerotilose (Tys), uma genodermatose esclero-atrofiante. O alelo que condiciona essa anomalia é raro, com mecanismo de herança autossômico dominante. A ligação MNSs:Tys é próxima, com frequência de recombinação da ordem de 4,5% nas famílias estudadas por Deminatti e cols. (1968).

Todos os demais trabalhos de ligação, relacionados com o loco MNSs, a serem referidos, apenas indicaram fracas sugestões de ligação.

Höslí e cols. (1957) sugeriram ligação entre o loco MNSs e o da ptose hereditária congênita simples, com base em uma grande genealogia com 107 pessoas afetadas.

Mais de 700 famílias informativas foram analisadas, na tentativa de se estabelecer ligação entre os locos MNSs e ACP_1

(fosfatase ácida dos eritrócitos). O estudo da relação entre esses locos apresentou interesse, pois o loco ACP_1 foi atribuído à porção distal do braço curto do cromossomo 2 (2p23→2pter) por Ferguson-Smith e cols. (1973) e por Povey e cols. (1974), existindo sugestões de localização do loco MNSs no mesmo cromossomo.

A primeira indicação de ligação frouxa MNSs: ACP_1 foi relatada por Mace e Robson (1974), após análise de 485 famílias com 1248 filhos informativos. As frequências de recombinação mais prováveis foram 39% em dados masculinos e 50% em dados femininos. A adição de novas famílias não aumentou o valor da sugestão de ligação (Chautard-Freire-Maia, 1974; Weitkamp e cols., 1975; Mace e cols., 1975a; Heiberg e Berg, 1975; Mayr, 1976). Weitkamp e cols. (1975) e Mace e cols. (1975a) reuniram dados de trabalhos anteriores e estimaram diretamente a frequência de recombinação entre esses dois locos, obtendo um valor de 45% para dados masculinos e de 52% para dados femininos. Estes mesmos autores, ao avaliarem os resultados totais, consideraram improvável que a adição de novas famílias informativas pudesse levar à decisão entre ligação frouxa e recombinação independente. Caso os dois locos sejam realmente sintênicos, o estabelecimento de uma ligação de ambos com um terceiro loco, intermediário, poderia reforçar a hipótese de ligação frouxa. Os escores mais altos para o par MNSs: ACP_1 foram observados em dados brasileiros (Chautard-Freire-Maia, 1974), o que é surpreendente devido ao pequeno número de famílias analisadas. Além disto, as frequências de recombinação (θ) encontradas são inferiores às observadas por outros autores ($\theta = 20\%$ para os homens e $\theta = 30\%$ para as mulheres).

Uma possível ligação entre os locos dos sistemas MNSs e Dombrock (Do) foi sugerida pelos resultados da análise de segregação em 86 famílias com um total de 290 filhos (Tippett, 1967; Tippett e cols., 1972). Os resultados sugerem uma frequência de recombinação de 33%, tanto para homens como para mulheres. Esta sugestão é conflitante com as de trabalhos de atribuição cromossômica, que situam os locos Do e MNSs, respectivamente, nos cromossomos 1 e 2 (cf. McKusick, 1977). Contudo, ambas as atribuições ainda necessitam de confirmação.

Por outro lado, há indicação de ligação do loco MNSs com o

complexo HLA (Mayr e Mayr, 1974), a uma frequência de recombinação próxima a 30%; e com o loco PGM_3 (Bissbort e cols., 1975), a uma frequência de recombinação de 20%. Estas sugestões, que ainda não puderam ser corroboradas, implicam em localização do loco MNSs no cromossomo 6, ao qual os locos PGM_3 e HLA foram atribuídos (Chen e cols., 1973; Jongsma e cols., 1973; Lamm e cols., 1974).

2.2 Atribuição cromossômica do loco MNSs

German e cols. (1968, 1969) descreveram uma criança portadora de um síndrome dismórfico acompanhado de retardo mental. Análise cariotípica demonstrou uma translocação recíproca entre segmentos dos braços longos dos cromossomos 2 e 4. Quanto ao sistema MNSs, o paciente apresentava fenótipo MS, porém seu pai era do tipo Ns. Ilegitimidade não pôde ser constatada, após o exame de 14 outros sistemas genéticos e comparações entre o tamanho dos cromossomos Y do paciente, de seu pai e de um irmão. Considerou-se como mais provável a ocorrência de perda ou de inativação de um pequeno segmento cromossômico, portador do loco MNSs, por ocasião da translocação. Testes de dosagem corroboraram esta hipótese. O pai do probando apresentava reação de dupla dose com soro anti-N; sua mãe e irmãos, do tipo MN, apresentavam reações de dose única com ambos os aglutinógenos, porém o probando apresentava apenas reação de dose única com soro anti-M. A ocorrência de antígenos raros foi excluída, após tipagens com anti-soros apropriados. Com base nessas observações, German e cols. (1968, 1969) sugeriram a localização do loco MNSs na porção média do braço longo do cromossomo 2 ou na porção distal do braço longo do cromossomo 4. Weitkamp (1969) considerou o cromossomo 4 como o mais provável, após estudo de segregação em uma família portadora de rearranjo cromossômico com participação do cromossomo 2. Wikramanayake e cols. (1971), analisando uma família portadora de inversão pericêntrica do cromossomo 2, reduziram a 6,7% a possibilidade do loco MNSs estar situado neste cromossomo. Em 1973, German e Chaganti, reanalisando os cromossomos translocados de seu probando pela técnica de bandeamento cromossômico, determinaram, no entanto, o ponto de deleção como sendo a banda 2q14.

As conclusões de German e seus colaboradores, apesar de muito bem fundamentadas, não puderam ser confirmadas em estudos posteriores. As análises de segregação entre o loco MNSs e rearranjos cromossômicos que incluem o cromossomo 2, principalmente translocações, resultaram em forte evidência contrária à localização do loco MNSs na banda 2q14 (Weitkamp e cols., 1969; Wikramanayake e cols., 1971; Thompson e cols., 1976; Mace e cols. 1975b; Higgins e cols., 1976).

Mace e cols. (1975b), reunindo dados de três famílias da literatura e de quatro famílias originais, determinaram a razão de verossimilhança contra a localização do loco MNSs na banda 2q14 como sendo da ordem de um milhão para 1. Obtiveram, porém, uma fraca sugestão de localização do loco MNSs no braço curto do cromossomo 2, próxima ao centrômero. Segundo os autores, a localização neste segmento estaria mais de acordo com uma ligação frouxa entre os locos MNSs e ACP₁, sugerida em trabalhos anteriores, em vista do loco ACP₁ ter sido atribuído, por vários métodos, ao segmento 2p23→2pter (Ferguson-Smith e cols., 1973; Povey e cols., 1974).

Higgins e cols. (1976) relataram mais duas famílias portadoras de translocações incluindo o cromossomo 2. Com base nos resultados reunidos concluíram que, se o loco MNSs estiver localizado no cromossomo 2, deve estar na região 2p12→2p23.

O loco IDH₁ (isocitrato desidrogenase), atribuído à região 2q1 - que inclui a banda 2q14 - demonstrou ser independente do loco MNSs nas poucas ocasiões em que se teve oportunidade de acompanhar a segregação desses dois locos (Mace e cols., 1975a, b). Além disto, a possibilidade de ligação entre MNSs e HLA e entre MNSs e PGM₃, implica na localização do loco MNSs no cromossomo 6.

Várias hipóteses foram levantadas, na tentativa de conciliar as observações de German e Chaganti (1973) com as de outros autores. Mace e cols. (1975b) consideraram a possibilidade do rearranjo ocorrido na família de German e Chaganti ser, na realidade, mais complexo, apresentando, além da translocação, uma pequena inversão pericêntrica no cromossomo 2. Além disso, consideraram a possibilidade da existência de um alelo silen-

cioso, que não pode ser descartada, apesar dos testes de dosagem indicarem homozigidade para o alelo N no pai do probando.

A técnica de mapeamento por exclusão, cuja importância foi muito bem ressaltada por Ferguson-Smith (1975), excluiu o loco MNSs de 22,6% do genoma humano (Ferguson-Smith, 1975; Aitken e cols., 1976). Entre os segmentos excluídos está a região 2p23→2pter. Do cromossomo 4, considerado inicialmente como alternativo para o loco MNSs (German e cols., 1968, 1969), foram excluídos os segmentos 4p16→4pter e 4q33→4qter. As exclusões derivaram unicamente do estudo de indivíduos portadores de deleções parciais ou totais, reunidos da literatura, cuja análise familiar permitiu informação sobre o loco MNSs.

3. Estudos sobre uma possível ligação Hb β :MNSs

Antes de ser identificado o primeiro exemplo de ligação autossômica no homem, entre os locos Lutheran e Secretor (Mohr, 1951a, b), Snyder e cols. (1947) sugeriram ligação entre o loco que condiciona hemácias falciformes e o loco MN. Na época, o fenômeno da falcização ainda não era atribuído a nenhuma alteração bioquímica específica. Dois anos depois Pauling e cols. (1949) o correlacionaram a uma hemoglobina, qualitativamente diferente da principal hemoglobina do adulto normal (HbA), que viria a ser conhecida como HbS. A natureza da diferença foi elucidada por Ingram (1957, 1959), ao descobrir que a alteração é devida à substituição de um único aminoácido na cadeia β . A sexta posição dessa cadeia é ocupada por ácido glutâmico na HbA, sendo substituída por valina na HbS.

Snyder e cols. (1947) reuniram 5 famílias, com um total de 15 filhos informativos. Analisando os resultados pelo método dos escores u de Fisher, tal como foi desenvolvido por Finney (1940), encontraram evidência significativa contra a hipótese de segregação ao acaso.

Snyder e cols. (1949) analisaram 4 famílias adicionais (16 filhos). Reunindo seus dados aos de Snyder e cols. (1947), estimaram a frequência de recombinação como 22%. Analisando o loco das "hemácias falciformes" em relação aos locos ABO e Rh,

não observaram qualquer indicação de desvio com relação à segregação independente.

Ludwin e cols. (1952) estudaram a segregação do loco da β -talassemia com respeito aos locos MN, ABO, PTC e "côr de olhos". A análise, pelo método de Finney, não forneceu evidência de ligação entre o loco da β -talassemia e qualquer dos outros locos considerados. Para a relação Hb β :MN, os autores analisaram 8 famílias, com 18 filhos informativos.

Neel e cols. (1952) concluíram não haver ligação entre o gene responsável pelo fenômeno da falcização e o gene que condiciona os tipos M, N e S. Esta conclusão derivou da análise de 41 famílias informativas, das quais 28 com ambos os progenitores examinados (90 filhos informativos) e 13 com apenas um progenitor examinado. Assim como os autores anteriores, Neel e cols. (1952) se utilizaram do método de Finney e não separaram as famílias informativas femininas das masculinas.

No maior estudo de ligação com variantes de hemoglobina realizado até agora, Nance e cols. (1970) reuniram 117 famílias brasileiras (510 filhos), que segregavam para variantes de cadeia β ou de cadeia δ da hemoglobina. Foram analisadas as relações de ligação entre o complexo Hb β -Hb δ e 17 outros locos polimórficos. O tratamento de variantes β e δ como pertencentes ao mesmo loco foi justificado pela ausência de exemplos de recombinação entre eles. As variantes estruturais de cadeias β e δ foram identificadas por eletroforese em gel de amido. Foram tipados os antígenos M, N e S do sistema MNSs. Para o par Hb β -MNSs, 66 famílias foram informativas: 33 com informação paterna (142 filhos tipados) e 33 com informação materna (148 filhos tipados). Esta e as pesquisas posteriores valeram-se do método dos escores lod de Morton (1955), para a análise dos dados. Para o par Hb β -MNSs foi obtida uma fraca sugestão de ligação, a altas frequências de recombinação. Para a amostra total, a frequência de recombinação foi de 41%, sendo de 36% para os homens e de 46% para as mulheres.

Weitkamp e cols. (1972a, b) analisaram 41 famílias que segregavam para variantes estruturais da cadeia β ou para β -talassemia. Para 7 delas foi necessário inferir o genótipo de um dos progenitores. Os resultados de todos os trabalhos anteriores foram

reunidos, após reanálise das famílias pelo método dos escores lod, obtendo-se uma fraca sugestão de ligação frouxa. Como os trabalhos anteriores ao de Nance e cols. (1970) não separavam as famílias informativas masculinas das femininas, seus resultados foram incluídos apenas para cálculo da frequência de recombinação da amostra total. Esta foi estimada como próxima a 40%. Para dados masculinos, a frequência de recombinação situava-se próxima a 35% e, para os femininos, próxima a 40%. Os resultados individuais de Weitkamp e cols. (1972b) são, entre todos, os mais sugestivos de ligação e indicam frequências de recombinação de 25% para os homens e de 40% para as mulheres. A ocorrência de uma menor frequência de recombinação nos homens, associada às evidências de sintonia entre os locos Hb β e MNSs (Price e cols., 1972; German e cols., 1968, 1969), fizeram Weitkamp e cols. (1972b) proporem ligação frouxa entre esses dois locos.

Barbosa e cols. (1975) relataram mais 28 famílias informativas em uma amostra brasileira. Destas, 15 forneceram informação sobre recombinação masculina (48 filhos informativos) e 12 sobre recombinação feminina (42 filhos informativos). Seus resultados se distribuem de maneira semelhante aos de Nance e cols. (1970), estando a frequência de recombinação mais provável situada próxima a 35% para a amostra masculina e a 50% para a amostra feminina. A reunião de seus resultados aos dos estudos anteriores levou a uma fraca sugestão de ligação a uma frequência de recombinação de 40% para o total de famílias analisadas, sendo de 35% para os homens e de 40% para as mulheres. Com base nesses mesmos resultados, os autores excluíram frequências de recombinação inferiores a 20% para os homens e a 30% para as mulheres e para os dados totais.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Caracterização da amostra

A amostra é composta por 28 genealogias, com um total de 64 famílias nucleares. Dessas genealogias, 21 forneceram 40 famílias nucleares informativas para o estudo da frequência de recombinação entre os locos Hb β e MNSs. Cerca de 15% das famílias nucleares contactadas e alguns indivíduos isolados, pertencentes a famílias analisadas, negaram colaboração.

Entre as 40 famílias nucleares informativas, 21 forneceram informação sobre segregação materna (79 filhos informativos), 18 sobre segregação paterna (74 filhos informativos) e uma se constitui num duplo entrecruzamento (4 filhos informativos). Em 11 das famílias informativas femininas e em 7 das masculinas, foi possível identificar a fase dos alelos (acoplamento ou repulsão), no progenitor duplamente heterozigoto. Essas famílias apresentam, respectivamente, 34 e 10 filhos informativos.

Sete das genealogias (Hb 1, Hb 2, Hb 3, Hb 4, Hb 5, Hb 23 e Hb 28) têm probandos afetados por anemia falciforme, enquanto que os probandos das demais genealogias são heterozigotos para HbS.

A amostra pertence a uma população originária das regiões sudeste, sul e nordeste do país, que contribuem, respectivamente, com 45%, 28% e 26% da amostra, quando se consideram as regiões de origem dos avós de cada irmandade. O restante (1%) é de proveniência estrangeira (italianos e alemães). Os estados de Minas Gerais, Paraná e Bahia são os mais representados, tendo dado origem, res-

pectivamente, a 34%, 24% e 17% da amostra.

As famílias são, com poucas exceções, de nível sócio-econômico muito baixo. As moradias são quase sempre de madeira e apresentam condições precárias. O índice médio "pessoas/cômodo" é de $2,1 \pm 1,1$. No que se refere ao grau de instrução dos pais das irmandades estudadas, registraram-se 25% de analfabetos, 40% com curso primário incompleto, 20% com primário completo, 11% com secundário incompleto, 2% com secundário completo e 2% com nível universitário. Entre as mães, essas freqüências são, respectivamente, 40%, 35%, 20%, 3%, 2% e 0%.

Quanto à ocupação dos pais, 32% desempenham serviços manuais não-especializados, 38% serviços manuais especializados, 22% serviços não-manuais de rotina e 8% são desempregados ou aposentados. Entre as mães, há uma predominância de donas de casa (67%), as demais realizam serviços manuais não-especializados (30%) e serviços manuais especializados (3%).

Os indivíduos foram classificados em negros, mulatos escuros, mulatos médios, mulatos claros e brancos. Para esta classificação, considerou-se principalmente a cor da pele, mas outras características, como formato do nariz e dos lábios e tipo de cabelo também foram levadas em conta, principalmente na distinção entre mulatos claros e brancos. Os grupos raciais acima constituem, respectivamente, 5%, 13%, 31%, 24% e 27% da amostra masculina e 3%, 11%, 18%, 45% e 23% da amostra feminina, quando se consideram os progenitores de cada irmandade.

A idade média dos progenitores é de $38,8 \pm 12,0$ anos ($36,9 \pm 11,6$ para as mães e $40,7 \pm 12,4$ para os pais). Do total de gestações, foram registrados 10,8% de abortos e 2,3% de natimortos. O número médio de filhos nascidos vivos é de $5,8 \pm 3,9$ por casal. Destas crianças, 14,1% faleceram no decorrer do primeiro ano de vida; foi de 18,9% a mortalidade infanto-juvenil (do nascimento até a idade de 20 anos).

Quando se consideram apenas as irmandades informativas para Hb β :MNSs, a idade média dos progenitores é de $39,5 \pm 13,2$ anos ($37,6 \pm 12,6$ para as mães e $41,3 \pm 13,9$ para os pais). O número médio de filhos nascidos vivos é $6,4 \pm 4,1$, sendo o número de filhos vivos por ocasião da coleta igual a $5,2 \pm 3,0$. Foi

colhido material de 90% desses filhos, porém só 85% dos examinados foram informativos para o estudo das relações entre os locos Hb β e MNSs, com uma média de $3,9 \pm 2,6$ filhos informativos por família nuclear ($4,1 \pm 3,1$ para as famílias informativas masculinas e $3,8 \pm 2,1$ para as femininas).

2. Metodologia da coleta

2.1 Procedimentos usados na triagem dos probandos

No início deste trabalho, planejava-se coletar toda a amostra através de hospitais de Curitiba, em especial do Hospital de Clínicas da UFRP, tomando-se como probandos indivíduos afetados por hemoglobinopatias devidas a alterações estruturais da cadeia β , ou a β -talassemia. Apesar de se obter o endereço de um número considerável de pacientes, somente 20 (quase todos afetados por anemia falciforme) residiam em Curitiba e imediações. Entretanto, apenas 4 desses indivíduos e suas respectivas famílias (Hb 1, Hb 2, Hb 3 e Hb 4) puderam ser localizados. Sendo este um número muito reduzido para o trabalho idealizado, resolveu-se, então, fazer uma triagem para detecção de portadores de HbS, pelo teste de falcização de hemácias (Hsia, 1966). A triagem se realizou entre mais de 1500 escolares, predominantemente negróides, de Curitiba (Petzl e cols., em redação). O teste consistiu em se misturar, sobre uma lâmina, uma gota de sangue colhida por punção digital, com uma gota de uma solução aquosa de bissulfito de sódio 0,1 M, recém-preparada. Cobria-se, a seguir, com lamínula; as lâminas eram examinadas, ao microscópio, após 24 horas em câmara úmida. Verificando-se pelo menos um campo com hemácias falciformes, admitia-se a presença de HbS e o indivíduo e sua família eram procurados.

Testes de falcização positivos foram encontrados em 23 crianças. Em ocasião posterior, os hemolisados pertencentes a 22 crianças, cujas famílias colaboraram, foram submetidos a eletroforese, tendo se constatado os seguintes fenótipos: 20 HbA HbS, 1 HbS e 1 HbA. Os pais do indivíduo HbA também não apresentaram HbS (genealogia Hb 27). A explicação mais provável para esse achado é admitir que tenha havido passagem de células falciformes da lâmina adjacente à do probando dessa genealogia, também positiva, du-

rante o transporte e conservação das lâminas em câmara úmida.

Após essa triagem, foi possível reunir mais 21 genealogias: Hb 5 a Hb 22 e Hb 24 a Hb 26.

Pôde-se contar, ainda, com mais dois probandos afetados por anemia falciforme, que foram indicados por laboratoristas da Clínica Médico Cirúrgica de Piraquara (PR) e do Hospital de Clínicas da UFPR (genealogias Hb 23 e Hb 28).

2.2 Averiguação das famílias e coleta das amostras

As famílias eram procuradas em suas casas e, nessa ocasião, preenchia-se uma ficha (modelo no Apêndice 3). Cada membro da família do probando (o probando, seus pais e irmãos) contribuía com 10 ml de sangue, colhidos em tubo "Venoject", com EDTA dissódico como anticoagulante. Principalmente no caso de veias pouco visíveis ou de crianças pequenas, o sangue era colhido com seringa descartável comum, usando-se então o anticoagulante heparina. Bebês contribuía normalmente com poucas gotas de sangue, obtidas por punção no calcanhar ou no 1º artelho, colhidas em tubo com solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) e anticoagulante. Consanguíneos do progenitor portador de HbS eram averiguados em outra ocasião, sendo adotado o mesmo procedimento para a coleta de dados familiares e de sangue.

A cada indivíduo era conferido um código de identificação, composto pela sigla "Hb", seguida dos números da família, da geração e do indivíduo. Ex.: Hb 2-II-4. A relação completa dos indivíduos tipados é dada no Apêndice 2. Todos conservam o código original, sob o qual também o material (hemácias e soro) foi estocado. Em algumas genealogias identificou-se a primeira geração como 0, devido a não estar prevista a sua averiguação, por ocasião da representação inicial da genealogia. Todas as genealogias, com exceção da Hb 27, são apresentadas no Apêndice 1. A ordenação dos indivíduos dentro de cada irmandade corresponde à ordem de nascimento.

3. Tratamento do material no laboratório

O sangue era guardado em refrigerador por um período que

variava de poucas horas até três dias após a coleta. No laboratório, o sangue total era centrifugado (1000 rpm durante aproximadamente 5 minutos), retirando-se o plasma sobrenadante e estocando-o diretamente em congelador a -20°C . As hemácias eram lavadas três vezes em solução salina fisiológica. Uma parte era utilizada no preparo de uma solução a 5%, em salina fisiológica, e o restante era estocado em congelador a -20°C , após mistura com solução de glicerol, preparada segundo as especificações de Mollison (1972):

Citrato de potássio tribásico (monoidratado).....	19,4g
Fosfato de sódio monobásico (diidratado).....	3,1g
Fosfato de sódio bibásico (anidro).....	2,8g
Água destilada.....	600 ml
Glicerol.....	400 ml

O glicerol era adicionado após dissolução dos três primeiros componentes na água destilada. Misturavam-se partes iguais de hemácias e da solução de glicerol, afim de obter uma concentração final 3 M de glicerol, ideal para estocagem de hemácias a -20°C .

4. Caracterização dos fenótipos

As amostras foram examinadas com relação a oito sistemas genéticos: Hemoglobina (Hb), MNSs, ABO, Rh, Duffy (Fy), Haptoglobina (Hp), Esterase D (Es D) e Anidrase Carbônica II (CA II). A determinação dos seis últimos sistemas visava a caracterizar melhor a amostra sob o aspecto genético, para pesquisas posteriores com o mesmo material, assim como diminuir a possibilidade de inclusão de filhos ilegítimos na análise de ligação. Este procedimento levou à detecção de seis indivíduos que apresentaram fenótipo incompatível com o de um dos progenitores. Destes, dois puderam ser aproveitados na análise de ligação, conforme explicação posterior (item 5.2).

Foram examinados 345 indivíduos; a relação dos resultados de todas as tipagens, com exceção das realizadas nos indivíduos da genealogia Hb 27, é dada no Apêndice 2.

4.1 Determinação dos grupos sanguíneos MNSs, ABO, Rh e Fy

As tipagens para caracterização desses sistemas foram feitas até cinco dias após a coleta do material, com soros da marca Johnson, de acordo com as respectivas técnicas recomendadas pelo fabricante.

Cada amostra foi tipada duas vezes para cada antígeno, por pessoas diferentes, que utilizavam diferentes frascos de soro. Os resultados eram comparados e, em caso de discrepância, o teste era realizado uma terceira vez, com um terceiro frasco de soro.

Para as tipagens, utilizavam-se tubos de ensaio pequenos (10 ou 12 x 75 mm). A leitura era feita macroscopicamente mas, em casos de dúvida, utilizava-se uma lupa com aumento de 10.

O procedimento na escolha dos indivíduos a serem tipados para cada sistema será descrito logo abaixo. Foi seguido para a maioria, porém não para todas as famílias, como pode ser observado pelos resultados apresentados no Apêndice 2.

4.1.1 Sistema MNSs

O procedimento geral foi tipar o progenitor heterozigoto para hemoglobina (HbA HbS) com os soros anti-M e anti-N. Quando homozigoto (fenótipo M ou N), era também tipado para S e s. Se o indivíduo fosse informativo, isto é, heterozigoto MN ou Ss, seu cônjuge e filhos também eram tipados. Quando o conhecimento da fase do sistema MNSs pudesse levar à inclusão de mais filhos informativos em casamentos do tipo HbA HbS, MN (ou Ss) x HbA HbA, MN (ou Ss), uma família já informativa para MN era tipada também para Ss, ou vice-versa. Tipagens adicionais para M, N e S, s em alguns pais, cônjuges, filhos e/ou netos também possibilitaram o aproveitamento de maior número de famílias informativas, assim como a inferência do genótipo de progenitores não tipados para esse sistema. Genótipos inferidos serão comentados no item 5.2.

Entre os indivíduos caracterizados para Ss, uma parte foi tipada apenas uma vez para s. Numa pequena fração da amostra, indivíduos com reação negativa para S não foram tipados para s, inferindo-se o seu genótipo como sendo ss.

4.1.2 Sistemas ABO, Rh e Fy

A determinação fenotípica desses sistemas foi feita, preferencialmente, para indivíduos pertencentes a famílias nucleares informativas, devido à escassez de soros em nosso laboratório. Em famílias informativas nas quais o fenótipo de um dos progenitores é desconhecido, esses sistemas também não foram determinados.

As tipagens para o sistema ABO foram feitas com os soros anti-A, anti-B e anti-AB. Com este último, não foram feitas tipagens em duplicata.

Todos os antígenos principais do sistema Rh (D, C, c, E, e) foram testados. Uma parte da amostra foi tipada uma única vez com anti-e, e outra parte (principalmente indivíduos E negativos) não foi testada com este anticorpo.

Para o sistema Fy, as tipagens foram feitas com soro anti-Fy^a. Parte da amostra foi tipada só uma vez para este sistema.

4.2 Hemoglobina

Todos os indivíduos que contribuíram com seu sangue foram caracterizados com relação a esse sistema. Os diferentes fenótipos foram identificados por eletroforese horizontal em gel de amido. A técnica para o preparo do gel é uma modificação (Petzl e Primo-Parmo, em redação) da desenvolvida por Carvalho e Azevêdo (1976). Um gel, para um suporte de 13cm x 20cm x 7mm de tamanho, foi preparado com 30g de amido de milho comercial (marca Maizena)* e 300 ml de tampão. No caso da hemoglobina, conseguiu-se uma boa separação com o tampão Tris-EDTA-Borato, pH 8,6, em sistema contínuo (cf. Huehns, 1968). Uma solução estoque foi preparada com:

Tris (tris hidroximetil-aminometano).....	109,00g
EDTA dissódico (etilenodiamina tetra acetato dissódico)...	5,84g
Ácido bórico.....	30,90g
Água destilada q.s.p.....	1000 ml

A solução estoque foi diluída, com água destilada, de 1

* Carvalho e Azevêdo (1976) descreveram duas misturas: 20g de "Maizena" com 10g de "Arrozina" e 20g de "Arrozina" com 10g de amido "Sigma", sempre em 300 ml de tampão.

para 20 (15 ml para 300 ml) para o preparo do gel, e de 1 para 7 (100 ml para 700 ml) para as cubas.

Um bom cozimento do gel, durante aproximadamente 15 minutos, sob agitação constante, é fator decisivo para a obtenção de uma boa separação eletroforética. Logo após retirado do fogo, o gel foi despejado sobre a placa. Não é necessário retirar as bolhas de ar. Depois de frio, o gel foi coberto com uma folha de plástico e guardado em refrigerador durante 4 a 24 horas, o que facilita o corte por torná-lo menos elástico. A separação eletroforética também melhora após esse período em refrigerador.

No preparo do hemolisado, hemácias lavadas foram lisadas com água, para obtenção de uma solução com cerca de 0,5g% de hemoglobina.

As amostras foram inseridas no gel, embebidas em papel filtro Whatman nº 3, de tamanho 5 x 7mm. A corrida, na direção do menor comprimento do suporte, se dava em refrigerador, durante aproximadamente 6 horas, com 2 mA/cm.

O corante foi preparado com 200mg de benzidina e 200mg de nitroprussiato de sódio, dissolvidas em 100 ml de solução aquosa de ácido acético a 1%. A mistura foi despejada sobre o gel previamente cortado. Adicionavam-se 3 ml de água oxigenada (20 vol.). Após poucos minutos, as bandas azuladas se tornavam evidentes e a leitura podia ser feita.

Além da variante HbS, esperada em todas as genealogias devido ao modo de seleção dos probandos, constataram-se ainda HbC e HbB₂, respectivamente variantes de cadeia β (β^6 Glu→Lys) e de cadeia δ (δ^{16} Gly→Arg).

Na genealogia Hb 15, a mãe (I-4) é heterozigota HbA HbC, o pai (I-3) é HbA HbS e, entre seis filhos examinados, quatro são HbA HbS e dois são HbS HbC. Uma das crianças HbS HbC (II-9, 13 anos de idade) havia sido medicada por "reumatismo", sem que se obtivesse melhora significativa, tratando-se, provavelmente, de um erro no diagnóstico da doença. Seu irmão (II-14, 3 anos), apesar de também ser portador de ambas as hemoglobinas anormais, não apresentara, até o momento, qualquer sinal da doença. Após aconselhamento genético, essas crianças foram encaminhadas ao Hospital de Clínicas da UFPR.

Na genealogia Hb 28, ao se tiparem consangüíneos de I-4, em busca de um maior número de famílias para estudo, constatou-se que, apesar de seu irmão, I-1, não possuir HbS, a esposa deste, I-2, é heterozigota não só para o loco Hb β (HbA HbS), mas também para o loco Hb δ (HbA₂HbB₂). Dos oito filhos tipados, cinco são heterozigotos para o loco Hb δ e três, heterozigotos para o loco Hb β .

As variantes HbC e HbB₂ foram identificadas pela sua posição e proporção relativas às hemoglobinas A e A₂, após migração eletroforética.

4.3 Haptoglobina

Todos os indivíduos cujo soro estava estocado em congelador tiveram seus fenótipos determinados com relação a este sistema.

O mesmo gel de "Maizena" já descrito para hemoglobina foi utilizado aqui, variando somente o tampão. Para haptoglobina, conseguiu-se uma boa separação eletroforética com os tampões tris-citrato (pH 8,6) e borato (pH 8,0), respectivamente, para o gel e para as cubas (Poulik, 1957):

- Tampão tris-citrato

Tris..... 9,20g
 Ácido cítrico..... 1,05g
 Água destilada q.s.p.....1000 ml

- Tampão borato

Ácido bórico.....18,55g
 NaOH 1 M.....60 ou 50 ml
 Água destilada q.s.p.....1000 ml

Sendo a haptoglobina evidenciada por coloração específica para hemoglobina, com a qual forma complexos, misturavam-se 2 gotas de soro de cada indivíduo com 1 gota de hemolisado padrão (concentração aproximada: 0,5g% de hemoglobina), preparado com hemácias de indivíduo homozigoto para HbA.

A aplicação foi feita com papel filtro Whatman nº 17, de 5 x 7mm. A corrida, na direção do menor comprimento do suporte, se deu em refrigerador, durante cerca de 15 horas, a 100 V.

A coloração foi feita da mesma maneira descrita para hemo-

globina, no item anterior.

Entre os indivíduos homozigotos HbS HbS, nenhum dos examinados para Hp apresentou essa proteína em quantidade constatável pela técnica descrita acima. Alguns outros indivíduos também apresentaram anaptoglobulinemia.

4.4 Esterase D e Anidrase Carbônica II

Foram caracterizados, para estes sistemas, todos os indivíduos cujas hemácias haviam sido estocadas. Desta feita, o gel foi preparado com amido hidrolisado padrão, marca "Connaught", numa concentração de 10%, ou seja, 22g em 220 ml de tampão, para um suporte de 18cm x 13cm x 7mm de tamanho.

O tampão utilizado foi tris-maleato, pH 7,5, em sistema contínuo (Lewis e Harris, 1967). Duas soluções, denominadas A e B, foram preparadas da seguinte maneira:

- Solução A

Tris.....48,4g

Água destilada q.s.p.....4000 ml

- Solução B

Anidrido maléico.....19,6g

Água destilada q.s.p.....2000 ml

Adicionaram-se cerca de 1500 ml da solução B aos 4000 ml da solução A, afim de se obter uma solução estoque com pH = 7,5.

Para o preparo do gel, a solução estoque foi diluída de 1 para 10; para as cubas, a sua concentração original era conservada.

As hemácias concentradas foram inseridas no gel, embebidas em papel Whatman nº 17, de 5 x 8mm de tamanho.

A corrida se dava em refrigerador, na direção do maior comprimento do gel, por aproximadamente 5 horas, a 100 V.

Nesse tampão, a Es D migra em direção ao polo positivo e a CA II em direção ao polo negativo. Uma das partes do gel foi utilizada na coloração de Es D e a outra na de CA II.

O substrato para coloração da Es D é acetato de 4-metil-umbeliferona (Hopkinson e cols., 1973), sendo o corante preparado com:

Ácido acético 0,2 M.....	1 ml
Acetato de sódio 0,2 M.....	4 ml
Água destilada.....	5 ml
Acetato de 4-metil-umbeliferona.....	1 mg
Acetona.....	0,5 ml

Dissolvia-se o acetato de 4-metil-umbeliferona na acetona, adicionando-se, a seguir, os outros componentes. A solução era espalhada sobre a superfície cortada do gel e após 10 a 15 minutos, já se podiam ver zonas fluorescentes, em câmara escura, à luz ultravioleta.

Como substrato para a coloração da CA II, empregou-se diacetato de fluoresceína (Hopkinson e cols., 1974). O corante foi preparado com:

Tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5.....	5 ml
Água destilada.....	5 ml
Diacetato de fluoresceína.....	1 mg
Acetona.....	0,5 ml

Dissolvia-se o diacetato de fluoresceína na acetona, antes da adição dos outros componentes. Colocava-se uma fôlha de papel filtro sobre a superfície cortada do gel, despejando-se o corante sobre ele. Após incubação a 37°C, por 30 minutos, podiam ser vistas zonas fluorescentes, à luz ultravioleta, em câmara escura.

O tampão tris-maleato não possibilita uma boa distinção entre os fenótipos 2-1 e 2 da CA II. Devido a isto, todas as amostras que apresentaram o componente 2 eram novamente examinadas, por eletroforese com tampão tris-EDTA-borato, pH 8,6. A solução estoque, preparada da maneira já descrita para hemoglobina, foi diluída de 1:14 para as cubas e de 1:40 para o gel (Hopkinson e cols., 1974).

5. Metodologia da análise de ligação

5.1 O método

Não é objetivo deste trabalho fazer uma descrição minuciosa do método numérico empregado para a análise dos dados. Serão comentados apenas os seus aspectos principais.

Para que uma família seja considerada informativa para um estudo de ligação Hb β :MNSs, é necessário que um dos cônjuges seja heterozigoto com relação aos dois locos considerados. Não são aproveitadas as famílias nas quais se desconhece a fase do genótipo do progenitor informativo e há apenas um filho informativo.

A análise foi feita de acordo com o método dos escores lod, desenvolvido por Morton (1955, 1956, 1957) e Steinberg e Morton (1956).

O procedimento consiste em se avaliarem diferentes hipóteses alternativas, representadas por diferentes frequências de recombinação (θ_i), com relação à hipótese nula, de segregação independente ($\theta_0 = 0,50$).

Para cada irmandade e cada valor de θ_i considerado, calcula-se o quociente da razão entre as funções de verossimilhança da hipótese alternativa e da hipótese nula. O logaritmo do valor obtido é chamado escore lod (ou escore \underline{z}).

O escore \underline{z} é função da frequência de recombinação observada nos filhos informativos da irmandade, isto é, da maneira como os fenótipos desses se distribuem em duas classes complementares: "recombinantes" e "não recombinantes". Somente quando é conhecida a fase dos alelos dos locos sob análise (acoplamento ou repulsão), no progenitor informativo, as condições "recombinante" e "não recombinante" do genótipo dos filhos podem ser identificadas. De outra forma, essa classificação é meramente convencional.

Os escores finais (\underline{Z}_i) resultam da soma dos escores individuais (\underline{z}_i) de cada irmandade, para cada valor de θ_i .

Para a avaliação dos resultados, Morton estabeleceu limites de confiança, que são decorrentes da probabilidade a priori de verificação de ligação autossômica no homem, da ordem de 0,023 para dois locos tomados ao acaso (Renwick, 1969). Com esses limites, espera-se que mais de 95% dos casos de ligação verificados sejam verdadeiros. Um escore \underline{Z} de valor igual ou inferior a -2 permite rejeitar frequências de recombinação igual e inferiores à frequência na qual se observou este valor de \underline{Z} . Valores iguais ou superiores a 3 levam à aceitação da frequência

de recombinação que corresponder ao pico da distribuição de \underline{z} . Valores entre 3 e -2 podem ser sugestivos, porém não decisivos, para aceitação de uma ou outra hipótese. Neste caso, é conveniente aumentar o tamanho da amostra, afim de se atingir um dos limites de significância. Quanto maior a frequência de recombinação real entre dois locos, maior a amostra necessária para o estabelecimento de uma ligação, caso ela exista.

Para a maioria dos casos conhecidos de ligação, observou-se que as frequências de recombinação masculina e feminina diferem, sendo quase sempre inferiores para os homens. Em vista disso, as famílias devem ser separadas em duas classes para a avaliação dos resultados - as informativas "masculinas" e as informativas "femininas" - de acordo com o sexo do progenitor que fornece a informação.

5.2 A análise

A família Hb 1 é um duplo entrecruzamento, classificado como z_5 por Morton. Todas as demais famílias podem ser enquadradas na categoria z_1 . Consideraram-se oito hipóteses alternativas, correspondentes às frequências de recombinação de 0,05; 0,10; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40 e 0,45. Para a obtenção dos escores, consultaram-se as tabelas elaboradas por Maynard-Smith e cols. (1961), posteriormente aperfeiçoadas por C. A. B. Smith para os escores z_1 e publicadas em Race e Sanger (1975). As fórmulas de Morton (1955) foram aplicadas diretamente, nos seguintes casos: para cálculo dos valores de z_5 da família Hb 1; sempre que o número de filhos informativos ultrapassava sete e nas famílias em que mais de um genótipo era possível para o progenitor inferido.

Na maioria das famílias informativas, conhecia-se o genótipo de ambos os progenitores; para seis delas, no entanto, foi necessário inferir o genótipo de um deles, tomando-se como base os genótipos dos cônjuges e dos filhos. Existindo mais de um resultado possível para o sistema MNSs, no progenitor desconhecido, todas as possibilidades eram levadas em conta no cálculo de \underline{z} . Com relação a hemoglobina, só foi considerado o genótipo mais provável, devido à baixa frequência do alelo HbS (1,05% +

± 0,21%) na população negróide de Curitiba (Petzl e cols., em redação).

Para as inferências referentes às genealogias Hb 18 e Hb 19, os indivíduos que serão citados, a seguir, estão representados na Fig. 1, com seus respectivos genótipos para hemoglobina e MNSs.

Inferiu-se que o genótipo de Hb 18-0-1 é HbA HbS para hemoglobina e NS/Ns para o sistema MNSs porque: a) três de seus filhos são heterozigotos para HbS, porém seu cônjuge apresenta só HbA; b) o genótipo de seu cônjuge 0-2, para o sistema MNSs, é MS/Ms. Todos os seus quatro filhos tipados são do tipo MN, sendo dois deles Ss (I-6 e I-8) e 2 ss (I-2 e I-4). Esses dois últimos devem ter recebido a combinação Ns do pai. O indivíduo II-19, filho de I-6, é Ms/Ms, concluindo-se que a fase em I-6 é Ms/NS, e que este deve ter recebido a combinação NS de seu pai, 0-1, já que sua mãe é homozigota para M. Analisando-se os tipos MN e Ss em II-25 e II-27, filhos de I-8, chega-se à mesma conclusão quanto ao genótipo de 0-1: NS/Ns.

O genótipo de Hb 18-I-1 também foi inferido. O genótipo de I-2, sua esposa, é HbA HbS, Ms/Ns. Este casal teve três de seus filhos examinados, dos quais um (II-3) é Ms/Ns. Apesar de não sabermos qual dessas duas combinações é proveniente do pai, sem dúvida este contribuiu com um s. Outro filho (II-7) é MS/Ms. Sendo sua mãe homozigota ss, a combinação MS deve ser originária do pai, chegando-se assim à conclusão de que este é MS/-s. Conhecendo-se, em parte, o genótipo de I-1, foi possível inferir a fase para o sistema MNSs em II-6 como MS/Ns.

Considerando-se desprezível a probabilidade de I-1 ser heterozigoto para HbS, restam duas possibilidades quanto ao seu genótipo: a) HbA HbA, MS/Ms; b) HbA HbA, MS/Ns. Se a fôr verdadeira, há, entre os seus filhos, 2 recombinantes e 1 não recombinante, porém se b fôr verdadeira, há 1 recombinante e 2 não recombinantes. As frequências relativas das combinações Ms e Ns em uma população com composição racial considerada comparável à da presente amostra, são, respectivamente, 0,498 e 0,502 (Yasuda, 1969). As duas combinações possíveis foram levadas em conta, para cálculo dos escores lod. Neste caso, devido à grande semelhança entre

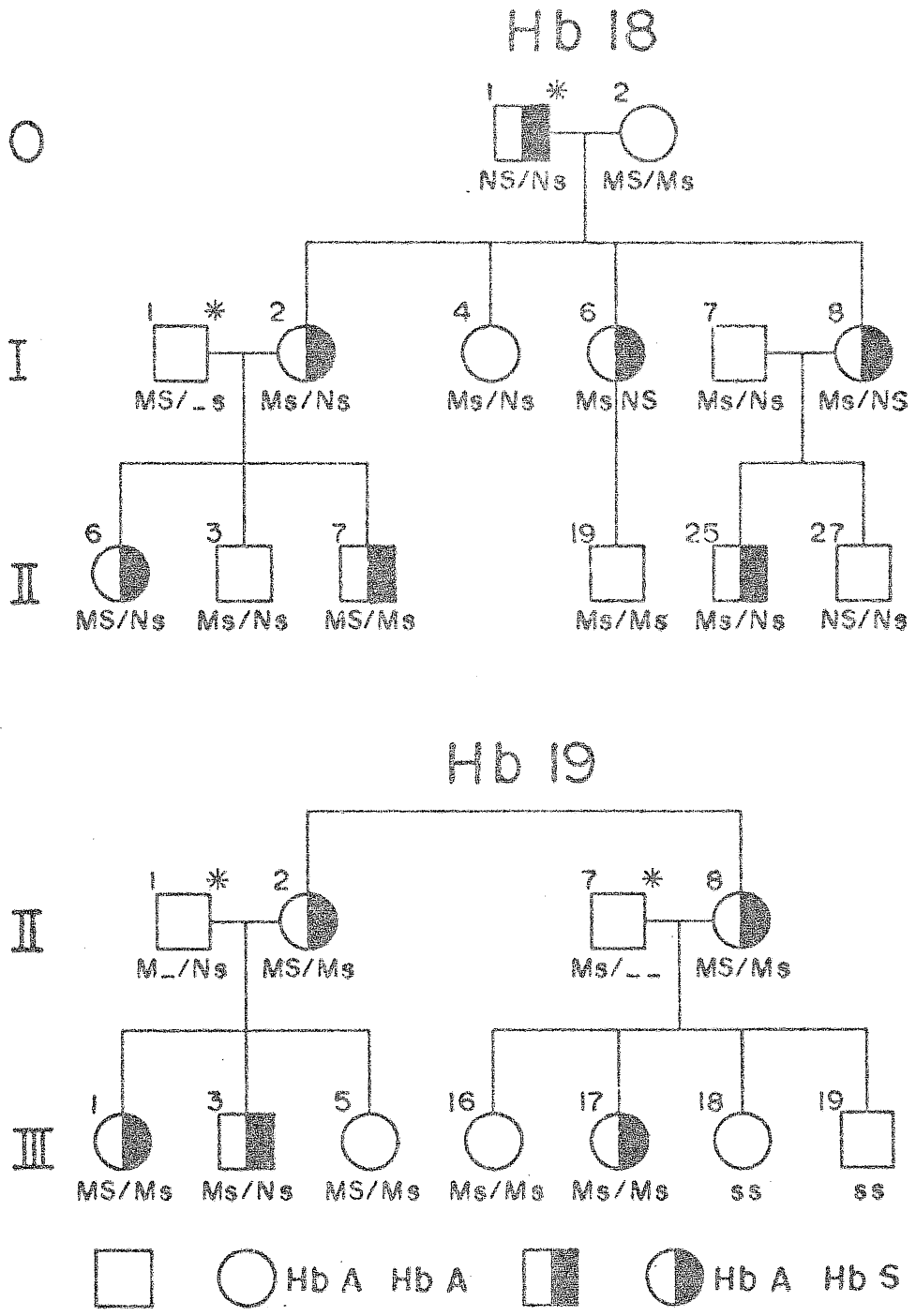


Fig. 1. Segmentos das genealogias Hb 18 e Hb 19, com reunião dos indivíduos que contribuíram para a inferência dos genótipos para hemoglobina e MNSs de seus consangüíneos. Os indivíduos cujo genótipo foi inferido estão indicados com um asterisco.

as probabilidades dos dois genótipos possíveis, os escores obtidos são praticamente iguais aos obtidos em caso de fase desconhecida (2:1).

Procedimento semelhante foi adotado para o cálculo dos escores lod para os filhos de Hb 19-II-1 e Hb 19-II-2. O genótipo do primeiro, o pai, é desconhecido. O genótipo de sua esposa é HbA HbS, MS/Ms. Três filhos foram tipados, sendo dois de genótipo MS/Ms e um de genótipo Ms/Ns. Sendo a mãe homozigota para M, o pai deve ter a combinação Ns. Por outro lado, este deve ser heterozigoto MN, pois dois de seus filhos são do tipo M. Não é possível concluir a favor de homozigose ss ou heterozigose Ss. Admitindo-se que II-1 seja homozigoto para HbA, restam duas possibilidades para o seu genótipo: a) HbA HbA, MS/Ns; b) HbA HbA, Ms/Ns. No primeiro caso, ocorre, entre seus filhos, 0 recombinante e 1 não recombinante e, no segundo, 1 recombinante e 2 não recombinantes. As probabilidades relativas de a e b são, respectivamente, 0,364 e 0,636 (Yasuda, 1969).

O genótipo do indivíduo Hb 19-II-7 também é desconhecido. Sendo sua esposa, II-8, heterozigota Ss, e seus 4 filhos homozigotos ss, não é possível saber se o genótipo de II-7 é Ss ou ss. Contudo, nessa família particular, os resultados dos escores lod independem do genótipo do pai para MNSs, pois, sendo este Ss ou ss, todos os filhos são informativos e se distribuem sempre da mesma maneira em 3 recombinantes e 1 não recombinante.

Na genealogia Hb 22, inferiu-se o genótipo de I-1 como HbA HbA, MN. Sua esposa, I-2, é HbA HbS, MN e, entre seus 5 filhos, 2 são do tipo M, 2 do tipo N e 1 é MN.

Na genealogia Hb 23, não foi possível tipar o indivíduo I-1. Sua esposa, I-2, é HbA HbA, NS/Ns. Entre 10 filhos analisados, há um de genótipo NS/NS, três de genótipo NS/Ns, cinco de genótipo Ns/Ns e um, tipado apenas para S e s, de genótipo SS. Quanto à hemoglobina, cinco são HbA HbS e cinco são HbA HbA. Portanto, o genótipo de I-1 deve ser HbA HbS, NS/Ns.

Todos os possíveis exemplos de exclusão de paternidade e maternidade serão aqui referidos no que diz respeito à informação sobre ligação.

Na família Hb 8, há inconsistência para o sistema Rh, no

que se refere aos fenótipos para E e e da mãe (II-3, fenótipo E) e filha (III-1, fenótipo e). Dado à complexidade do sistema Rh, isto não significa, necessariamente, que III-1 não seja filha de II-3. Inibição da reação antigênica para E na filha, considerando-se a possibilidade de seus alelos C e E estarem em trans, é uma explicação para esse achado (Race e Sanger, 1975). Um erro por ocasião das tipagens, apesar de pouco provável dadas às condições em que foram realizadas, é outra possibilidade. De qualquer maneira, considerando-se ou não III-1 filha de II-3, o pai, que é o informativo, e de fase conhecida, foi quem contribuiu para o genótipo de sua filha com os alelos HbA e s, respectivamente, para os sistemas hemoglobina e MNSs. A filha pode ser classificada como não recombinante, independentemente isto do genótipo de sua mãe.

Foi possível excluir o indivíduo Hb 9-I-3 como pai de II-6, pelos seus fenótipos referentes aos sistemas ABO e hemoglobina. O primeiro é do tipo O e homocigoto para HbA, enquanto o segundo é do tipo AB e heterocigoto HbA HbS. A mãe (I-4) é homocigota para HbA. Essa família não fornece informação para estudo de ligação Hb β :MNSs.

Na família Hb 16, o indivíduo I-4 foi excluído como pai de II-8 e II-12. O genótipo de I-4 é Es D 1-1 e Hp 2-2, enquanto o de II-8 é Es D 2-2 e o de II-12 é Hp 1-1. Resultou apenas um filho nesta irmandade, levando à sua exclusão da análise.

Na família Hb 20, observou-se inconsistência entre os fenótipos de II-6 e III-10 para o sistema MNSs. O primeiro, tido como pai, é do tipo s, enquanto o segundo, a filha, é do tipo S. A presença de um alelo "silencioso" no pai, transmitido à filha, pode ser considerada como hipótese alternativa à ilegitimidade; contamos, porém, com bases insuficientes para descartar qualquer uma dessas hipóteses. Apesar disto, calcularam-se escores lod para essa família. Isto porque o progenitor informativo, a mãe, heterocigota Ss para o sistema MNSs, transmitiu, de qualquer maneira, um alelo s para a primeira e um alelo S para a segunda filha. Independentemente do genótipo do pai de III-10 para o sistema MNSs, essa família se enquadra na categoria \underline{z}_1 , sendo ambas as filhas informativas.

Na família Hb 26, observou-se inconsistência entre os fenótipos para os sistemas Rh e Es D. O indivíduo II-2 é Cc e Es D 2-1, enquanto seus pais são ambos c e Es D 1-1. Apesar de seu genótipo para hemoglobina (HbA HbS) concordar com o da mãe, que é o progenitor informativo, não houve condições de incluí-lo na análise.

Em todos os casos de possível ilegitimidade, as repetições das tipagens três ou quatro vezes confirmaram os resultados obtidos. Para as famílias Hb 20 e Hb 26, repetiram-se as tipagens com sangue colhido em ocasiões diferentes.

O indivíduo Hb 23-III-5, afetado por anemia falciforme, recebeu transfusão cerca de um mês antes de ser averiguado para essa pesquisa. Foi possível determinar seu genótipo quanto à hemoglobina, pelo resultado da eletroforese realizada antes da transfusão, no Hospital de Clínicas da UFPR. Seu genótipo quanto ao sistema MNSs, entretanto, não pôde ser determinado, não sendo possível a sua inclusão na análise de ligação.

RESULTADOS

1. Recombinação entre os locos Hb β e MNSs

Nas Tabelas 1 e 2 encontram-se, de forma pormenorizada, os resultados para Hb β :MNSs de todas as famílias informativas deste estudo, para cada frequência de recombinação considerada. A Tabela 1 reúne famílias informativas masculinas e a Tabela 2, famílias informativas femininas. Na Tabela 3, são apresentados apenas os escores totais, para permitir melhor comparação entre os resultados masculinos e femininos. Os escores da família Hb 1, um duplo entrecruzamento, estão incluídos nessa Tabela.

A Figura 2 procura fornecer uma melhor visualização das distribuições dos escores masculinos, femininos e totais obtidos neste estudo.

Nas Tabelas 4 e 5, registraram-se os escores lod de todos os trabalhos sobre ligação Hb β :MNSs, sendo que a Tabela 4 apresenta somente os de estudos que separam as famílias informativas maternas das paternas. Na Tabela 5, reuniram-se os totais gerais. Esses contêm os resultados de todos os estudos, incluindo aqueles que não fazem separação pelo sexo do progenitor informativo.

A Figura 3 apresenta as distribuições dos lods masculinos (M), femininos (F) e totais (M+F), provenientes da soma dos resultados dos diversos trabalhos citados na Tabela 4, além da distribuição dos totais gerais da Tabela 5.

Os escores lod obtidos neste estudo sugerem segregação independente, tanto nas famílias com informação paterna como naquelas com informação materna. Com base nestes dados, é possível

Tabela 1. Escores lod para Hb β :MNSs. Famílias informativas masculinas.

Genealogia	Pai	Mãe	Filhos			Frequências de recombinação							
			N	NRC	RC	0,05	0,10	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45
Hb 2	II-1	II-2	2			-0,72	-0,44	-0,19	-0,13	-0,08	-0,04	-0,02	0,00
Hb 4	II-6	II-7	2	1	1	-0,72	-0,44	-0,19	-0,13	-0,08	-0,04	-0,02	0,00
Hb 5	I-4	I-5	6			-2,16	-1,33	-0,58	-0,38	-0,23	-0,12	-0,05	-0,01
Hb 6	I-5	I-6	1	0	1	-1,00	-0,70	-0,40	-0,30	-0,22	-0,16	-0,10	-0,05
Hb 8	I-1	I-2	9			-2,89	-1,78	-0,78	-0,50	-0,30	-0,16	-0,07	-0,02
Hb 8	II-2	II-3	1	1	0	0,28	0,26	0,20	0,18	0,15	0,11	0,08	0,04
Hb 10	II-1	II-2	1	1	0	0,28	0,26	0,20	0,18	0,15	0,11	0,08	0,04
Hb 11	II-2	II-3	2	2	0	0,56	0,51	0,41	0,35	0,29	0,23	0,16	0,08
Hb 12	I-1	I-2	2			0,26	0,22	0,13	0,10	0,06	0,04	0,02	0,00
Hb 13	I-1	I-2	9			-2,89	-1,78	-0,78	-0,50	-0,30	-0,16	-0,07	-0,02
Hb 15	I-3	I-4	6			-2,16	-1,33	-0,58	-0,38	-0,23	-0,12	-0,05	-0,01
Hb 18	0-1	0-2	4			-0,46	-0,23	-0,06	-0,03	-0,01	0,00	0,00	0,00

continua

Continuação da Tabela 1.

Genealogia	Pai	Mãe	Filhos			Frequências de recombinação							
			N	NRC	RC	0,05	0,10	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45
Hb 18	II-7	II-8	1	0	1	-1,00	-0,70	-0,40	-0,30	-0,22	-0,16	-0,10	-0,05
Hb 19	I-1	I-2	6			-1,19	-0,67	-0,25	-0,15	-0,09	-0,04	-0,02	0,00
Hb 21	I-1	I-2	10			-2,63	-1,56	-0,64	-0,40	-0,24	-0,13	-0,05	-0,01
Hb 21	II-5	II-6	2	1	1	-0,72	-0,44	-0,19	-0,13	-0,08	-0,04	-0,02	0,00
Hb 23	I-1	I-2	7			-2,16	-1,33	-0,58	-0,38	-0,23	-0,12	-0,05	-0,01
Hb 23	II-1	II-2	3			-0,72	-0,44	-0,19	-0,13	-0,08	-0,04	-0,02	0,00
T O T A L			74	6	4	-20,04	-11,92	-4,87	-3,03	-1,74	-0,84	-0,30	-0,02

N = número de filhos informativos; NRC = não recombinantes; RC = recombinantes.

Tabela 2. Escores lod para Hb β :MNSs. Famílias informativas femininas.

Genealogia	Pai	Mãe	Filhos			Frequências de recombinação							
			N	NRC	RC	0,05	0,10	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45
Hb 4	II-1	II-2	1	0	1	-1,00	-0,70	-0,40	-0,30	-0,22	-0,16	-0,10	-0,05
Hb 5	I-2	I-3	4			-0,46	-0,23	-0,06	-0,03	-0,01	0,00	0,00	0,00
Hb 5	II-4	II-5	2			0,26	0,22	0,13	0,10	0,06	0,04	0,02	0,00
Hb 6	I-1	I-2	3	2	1	-0,44	-0,19	0,01	0,05	0,07	0,07	0,06	0,04
Hb 12	II-3	II-4	7	4	3	-1,88	-1,08	-0,38	-0,20	-0,08	-0,01	0,03	0,03
Hb 16	II-1	II-2	6			-1,19	-0,67	-0,25	-0,15	-0,09	-0,04	-0,02	0,00
Hb 18	I-1	I-2	3	1	1	-0,72	-0,44	-0,19	-0,12	-0,08	-0,04	-0,02	0,00
Hb 18	I-5	I-6	6	3	3	-2,16	-1,33	-0,58	-0,38	-0,23	-0,12	-0,05	-0,02
Hb 18	I-7	I-8	2	0	2	-2,00	-1,40	-0,80	-0,60	-0,44	-0,31	-0,19	-0,09
Hb 18	II-5	II-6	5	4	1	0,12	0,32	0,42	0,40	0,36	0,30	0,22	0,12
Hb 19	II-1	II-2	3	1	0	0,16	0,16	0,15	0,14	0,12	0,10	0,07	0,04
Hb 19	II-7	II-8	4	1	3	-2,72	-1,84	-0,99	-0,73	-0,52	-0,35	-0,21	-0,10
Hb 20	II-6	II-7	2			0,26	0,22	0,13	0,10	0,06	0,04	0,02	0,00

continua

Continuação da Tabela 2.

Genealogia	Pai	Mãe	Filhos			Frequências de recombinação							
			N	NRC	RC	0,05	0,10	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45
Hb 21	II-12	II-13	2	0	2	-2,00	-1,40	-0,80	-0,60	-0,44	-0,31	-0,19	-0,09
Hb 22	I-1	I-2	4			-0,46	-0,23	-0,06	-0,03	-0,01	0,00	0,00	0,00
Hb 23	II-7	II-8	4			-1,44	-0,89	-0,39	-0,25	-0,15	-0,08	-0,04	-0,01
Hb 23	II-10	II-11	3			0,53	0,47	0,32	0,24	0,17	0,10	0,05	0,01
Hb 24	I-1	I-2	1	0	1	-1,00	-0,70	-0,40	-0,30	-0,22	-0,16	-0,10	-0,05
Hb 26	I-1	I-2	10			-3,61	-2,22	-0,97	-0,63	-0,38	-0,21	-0,09	-0,02
Hb 28	I-1	I-2	4			-1,44	-0,89	-0,39	-0,25	-0,15	-0,08	-0,04	-0,01
Hb 28	I-3	I-4	3			-0,72	-0,44	-0,19	-0,13	-0,08	-0,04	-0,02	0,00
T O T A L			79	16	18	-21,91	-13,26	-5,69	-3,67	-2,26	-1,26	-0,60	-0,20

N = número de filhos informativos; NRC = não recombinantes; RC = recombinantes.

Tabela 3. Escores lod totais para Hb β :MNSs, considerando famílias informativas masculinas, femininas e um duplo entrecruzamento (Hb 1). Resultados do presente estudo.

Sexo	Nº de famílias	Filhos			Frequências de recombinação								
		N	NRC	RC	0,05	0,10	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	
M	18	74	6	4	-20,04	-11,92	-4,87	-3,03	-1,74	-0,84	-0,30	-0,02	
F	21	79	16	18	-21,91	-13,26	-5,69	-3,67	-2,26	-1,26	-0,60	-0,20	
M+F	39	153	22	22	-41,95	-25,18	-10,56	-6,70	-4,00	-2,10	-0,90	-0,22	
Hb 1	1	4	-	-	-0,25	-0,08	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
TOTAL	40	157	22	22	-42,20	-25,26	-10,57	-6,70	-4,00	-2,10	-0,90	-0,22	

N = número de filhos informativos; NRC = não recombinantes; RC = recombinantes.

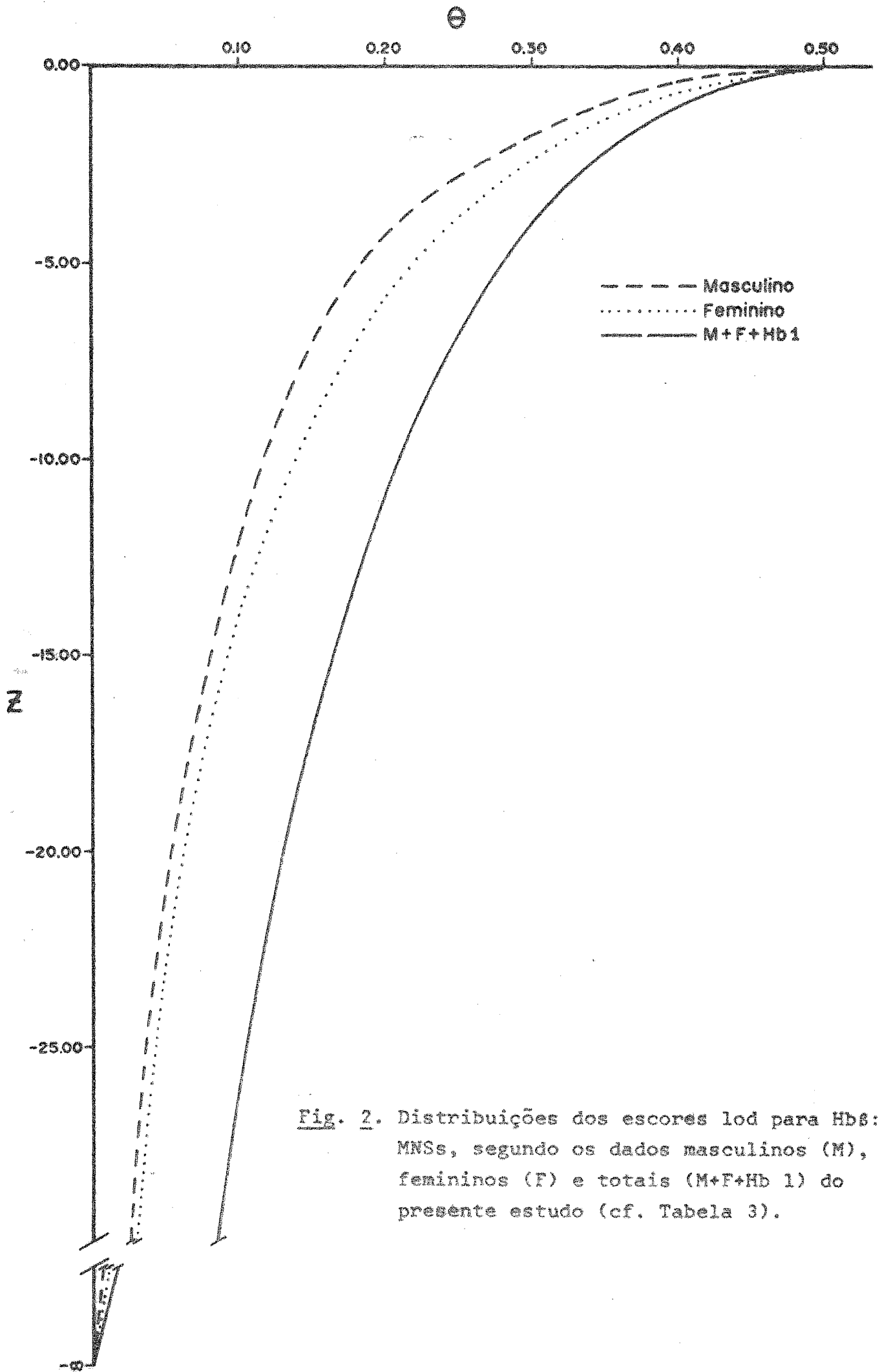


Fig. 2. Distribuições dos escores lod para HbS: MNSs, segundo os dados masculinos (M), femininos (F) e totais (M+F+Hb 1) do presente estudo (cf. Tabela 3).

Tabela 4. Escores lod para Hb β :MNSs. Resultados do presente estudo reunidos aos da literatura, com discriminação pelo sexo do progenitor informativo.

Sexo	Fonte	Filhos		Frequências de recombinação					
		NRC	RC	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45
M	Nance e cols. (1970)	-	-	-2,20	-0,72	0,02	0,27	0,22	0,08
	Weitkamp e cols. (1972b)	1	1	0,63	0,76	0,71	0,53	0,31	0,10
	Barbosa e cols. (1975)	-	-	-0,36	-0,04	0,09	0,11	0,07	0,02
	Presente estudo	6	4	-4,87	-3,03	-1,74	-0,84	-0,30	-0,02
	T O T A L	7	5	-6,80	-3,03	-0,92	0,07	0,30	0,18
F	Nance e cols. (1970)	-	-	-4,86	-2,46	-1,14	-0,42	-0,10	-0,01
	Weitkamp e cols. (1972b)	27	14	-2,12	-0,67	0,18	0,59	0,66	0,44
	Barbosa e cols. (1975)	-	-	-1,74	-1,04	-0,54	-0,26	-0,10	-0,02
	Presente estudo	16	18	-5,69	-3,67	-2,26	-1,26	-0,60	-0,20
	T O T A L	43	32	-14,41	-7,84	-3,76	-1,35	-0,14	0,21
M+F		50	37	-21,21	-10,87	-4,68	-1,28	0,16	0,39

NRC = não recombinantes; RC = recombinantes.

Tabela 5. Escores lod para Hb β :MNSs. Resultados totais de todos os estudos realizados.

Fonte	Nº de famílias	Frequências de recombinação			
		0,10	0,20	0,30	0,40
Snyder e cols. (1949)	9	0,49	0,67	0,45	0,15
Ludwin e cols. (1952)	8	-0,90	-0,31	-0,10	-0,02
Neel e cols. (1952)	41	-11,38	-4,31	-1,46	-0,30
Nance e cols. (1970)	66	-24,05	-6,89	-1,12	0,12
Weitkamp e cols. (1972b)	41	-9,19	-1,49	0,89	0,96
Barbosa e cols. (1975)	28	-6,35	-1,52	-0,12	0,07
Presente estudo	40	-25,26	-10,57	-4,00	-0,90
T O T A L	233	-76,64	-24,42	-5,46	0,08

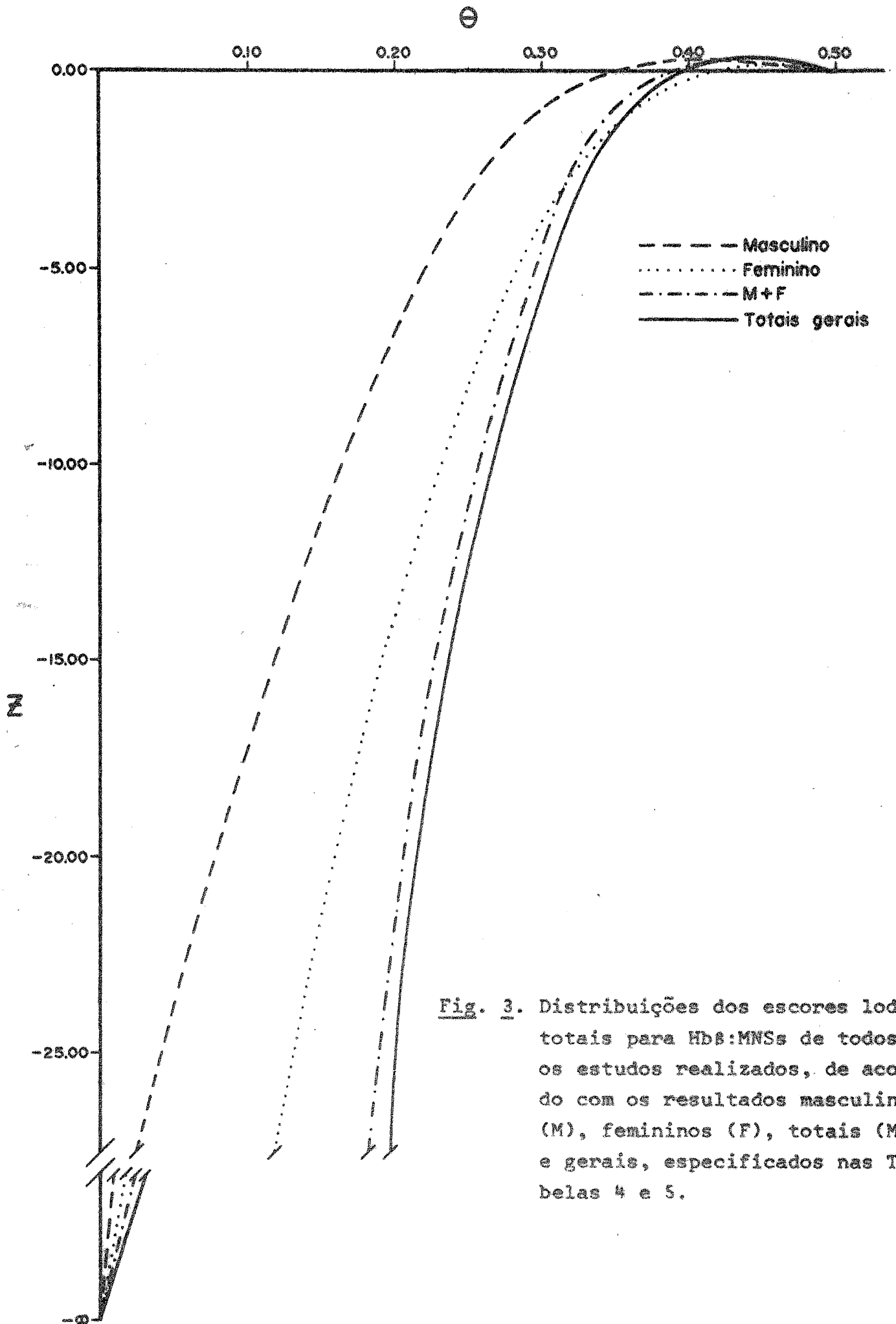


Fig. 3. Distribuições dos escores lod totais para Hb&:MNSs de todos os estudos realizados, de acordo com os resultados masculinos (M), femininos (F), totais (M+F) e gerais, especificados nas Tabelas 4 e 5.

excluir ligação até quase 30% de recombinação nos homens e até pouco além de 30% nas mulheres. Os resultados totais deste estudo permitem excluir ligação até cerca de 35% de recombinação. Considerando que as distribuições dos escores lod masculinos e femininos são estritamente comparáveis, pode-se aceitar o valor total de exclusão de ligação até 35% de recombinação, como representativo para ambos os sexos.

Quando se reúnem os dados da literatura, que distinguem as famílias informativas masculinas das femininas, com os do presente estudo (Tabela 4), é possível excluir ligação até cerca de 25% de recombinação nos homens e de 35% nas mulheres e nos dados totais. O valor máximo de \underline{Z} , calculado por interpolação gráfica (Fig. 3), é observado em $\theta = 40\%$ para dados masculinos e em $\theta = 45\%$ para dados femininos e totais (M+F). Esses valores máximos de \underline{Z} são, contudo, muito baixos, respectivamente próximos de 0,30, 0,20 e 0,40.

Após a reunião dos resultados totais de todos os estudos (Tabela 5), observa-se um valor máximo de \underline{Z} , calculado por interpolação gráfica, em $\theta = 45\%$ (Fig. 3). Também aqui o valor máximo é muito baixo ($\sim 0,40$). A estimativa direta da frequência de recombinação pode ser obtida por dados fornecidos pelas famílias com fase conhecida (Tabela 4). Neste estudo, existem 4 recombinantes para 6 não recombinantes, entre indivíduos com pai informativo, e 18 recombinantes para 16 não recombinantes, entre indivíduos com mãe informativa. Esses dados permitem estimar uma frequência de recombinação de $40\% \pm 15\%$ para os homens e de $53\% \pm 9\%$ para as mulheres. Os mesmos dados, reunidos aos de Weitkamp e cols. (1972b), únicos autores que haviam analisado famílias com fase conhecida, possibilitaram a estimativa da frequência de recombinação paterna em $42\% \pm 14\%$ (5 recombinantes e 7 não recombinantes) e da materna, em $43\% \pm 6\%$ (32 recombinantes e 43 não recombinantes).

2. Ligação Hb β :Hb δ

Na genealogia Hb 28, o indivíduo I-2 é heterozigoto para os locos Hb β (HbA HbS) e Hb δ (HbA₂HbB₂). Entre seus 8 filhos,

Tabela 6. Distribuição dos fenótipos dos filhos em famílias informativas para a ligação Hb β :Hb δ . Reunião de todos os dados da literatura.

Tipo de casamento	Fonte	N ₁	Fenótipos dos filhos					N ₂	
			$\beta^* \delta$	$\beta \delta$	$\beta \delta^*$	$\beta \beta$	$\beta^* \beta^*$		$\beta^* \beta^{\circ}$
$\beta \delta^*/\beta^* \delta \times \beta \delta/\beta \delta$	Ceppellini (1959)	1	4		2				6
	Ranney e cols. (1963)	2	3		3				6
	Horton e Huisman (1963)	1	3		2				5
	Boyer e cols. (1963)	3	6		16				22
	Pearson e Moore (1965)	1	2		2				4
	Schwartz e cols. (1967)	1	5		1				6
	Mishu e Nance (1969)	1	5		3				8
	Presente estudo	1	3		5				8
$\beta \delta^*/\beta^* \delta \times \beta \delta/\beta^* \delta$	Ranney e cols. (1963)	1			1	2			3
$\beta \delta^*/\beta^* \delta \times \beta \delta/\beta^{\circ} \delta$	Weatherall e cols. (1976)	1	4		2		1	1	8
$\beta \delta^*/\beta^* \delta \times \beta \delta^*/\beta \delta$	Horton e cols. (1961)	1	1		4				1
$\beta \delta^*/\beta^* \delta \times -$	Ranney e cols. (1963)	2	1		2				3
	Horton e Huisman (1963)	2	1		2				3
T O T A L		18							83

β^* e δ^* = alelos para variantes estruturais de cadeias β e δ , respectivamente;

β° = alelo da β° -talassemia;

N₁ = número de casamentos analisados; N₂ = número de filhos informativos.

não há nenhum recombinante.

Na Tabela 6, são apresentados os dados de todos os estudos que trazem informação sobre o par de ligação Hb β :Hb δ . Com exceção dos 4 indivíduos heterozigotos para o loco Hb δ , apresentados por Horton e cols. (1961), todos os demais podem ser considerados informativos, perfazendo um total de 83 não recombinantes. Eliminando-se, ainda, os 6 indivíduos provenientes de casamentos nos quais o fenótipo de um dos progenitores é desconhecido, obtem-se um total de 77 filhos não recombinantes.

DISCUSSÃO

1. Recombinação entre os locos Hb β e MNSs

Os resultados dos vários trabalhos sobre a ligação Hb β :MNSs mostram uma certa heterogeneidade. Apesar dos escores lod dos que sugerem ligação não alcançarem níveis significativos, é interessante notar que os picos das distribuições correspondem a diferentes valores de θ . Assim, os resultados totais de Snyder e cols. (1949) sugerem ligação a $\theta \sim 20\%$, enquanto que os de outros autores alcançam um pico em $\theta \sim 40\%$ (Nance e cols., 1970; Weitkamp e cols., 1972b; Barbosa e cols., 1975). Por outro lado, os resultados de Ludwin e cols. (1952), de Neel e cols. (1952) e do presente estudo sugerem recombinação independente. Além disto, foi observada uma menor frequência de recombinação em dados masculinos (Nance e cols., 1970; Weitkamp e cols., 1972b; Barbosa e cols., 1975) o que levou ao reforço da fraca sugestão de ligação entre esses dois locos. Apesar desses três trabalhos concordarem quanto a uma menor frequência de recombinação masculina, ainda assim a heterogeneidade permanece: Nance e cols. (1970) e Barbosa e cols. (1975) obtiveram um valor máximo de Z em $\theta \sim 35\%$ para dados masculinos e em $\theta \sim 50\%$ para os femininos, enquanto Weitkamp e cols. (1972b) obtiveram, respectivamente, valores máximos em $\theta \sim 25\%$ e em $\theta \sim 40\%$. Entre os trabalhos que separam dados masculinos de femininos, o presente estudo é o único em que, para ambos os sexos, os resultados se distribuem da maneira característica de recombinação independente.

A seguir, será apresentada uma análise das possíveis causas dessa heterogeneidade.

a) Ilegitimidade

Weitkamp e cols. (1972b) procuraram interpretar os resultados sugestivos de recombinação independente, obtidos por Neel e cols. (1952), com base na alta frequência de filhos ilegítimos encontrada em algumas populações negróides dos E.U.A. Como é sabido, a inclusão de filhos ilegítimos na análise de ligação tende a produzir distorção na direção de maior frequência de recombinação. A frequência de filhos ilegítimos nas amostras estudadas por Ludwin e cols. (1952) e Neel e cols. (1952), que sugerem recombinação independente, não é, no entanto, conhecida, não se podendo avaliar a extensão da possível distorção introduzida nos seus resultados. Nas amostras estudadas por Nance e cols. (1970) e por Weitkamp e cols. (1972), que sugerem ligação frouxa, a probabilidade de inclusão de filhos ilegítimos foi muito reduzida, por tipagem dos indivíduos para, respectivamente, 18 e 19 locos polimórficos. No presente estudo, essa probabilidade foi reduzida pela caracterização de 8 sistemas genéticos.

Deve-se notar, entretanto, que, quando os filhos ilegítimos não constatados são filhos do pai informativo e é possível a identificação dos alelos provindos deste, não há distorção nos resultados. Haja visto o caso de Hb 8-II-1 e Hb 20-III-10, que foram incluídos na análise. Este fato, associado a um menor efeito relativo da ilegitimidade sobre ligações frouxas, diminui a sua importância na heterogeneidade dos resultados. Assim, deve ser mínima a distorção produzida em amostras com baixa taxa de ilegitimidade não verificada, como provavelmente a deste estudo, não podendo ela ser a única responsável pelos resultados negativos aqui observados.

b) Erros técnicos e seleção

Uma distorção na direção de menor frequência de recombinação também pode ocorrer, desde que certo fenótipo esteja mais representado entre os filhos do que se espera por acaso, e que este fenômeno esteja ocorrendo em ambos os locos sob análise.

Shine e Lal (1977), ao avaliarem diversas técnicas utilizadas na verificação de heterozigotos para β -talassemia, concluí-

ram que todas podem conduzir a resultados falsos, representados principalmente pela ocorrência de falsos positivos.

A ineficiência do teste de falcização de hemácias é bem conhecida. Por exemplo: ao se realizar eletroforese nas amostras coletadas para esse trabalho, constatou-se a presença de HbS em duas crianças (irmãos de probandos) que, por ocasião da triagem pelo teste de falcização, haviam apresentado reação negativa.

Também a seleção contra o homocigoto HbS HbS, ou favorável ao heterocigoto HbA HbS, esta última em populações em que a malária se constitui em endemia, provoca distorção na frequência esperada dos vários fenótipos. Isto por si só não poderia gerar uma distorção na análise de ligação, desde que os fenótipos para o sistema MNSs estivessem sendo observados de acordo com as proporções mendelianas.

Considerando-se o sistema MNSs, verificam-se observações conflitantes sobre uma possível distorção de segregação. Alguns autores observaram excesso de filhos MN, em casamentos do tipo MN x MN, e procuraram explicar este achado como consequência de um efeito seletivo (Taylor e Prior, 1939). Outros não encontraram distorção significativa na frequência dos diversos fenótipos (Wiener, 1951; Wiener e cols., 1953; Morton e cols., 1966). Wiener (1951) acredita que o excesso de filhos MN, observado por certos autores, seja devido, em parte, a erros técnicos e, em parte, a variação estatística acidental. Race e Sanger (1975) também não admitem desvio devido à ação de seleção favorável ao heterocigoto.

É interessante avaliar a importância desses fatores nos trabalhos de ligação Hb β :MNSs até agora realizados.

Snyder e cols. (1949), que sugerem ligação, identificaram os fenótipos para hemoglobina pelo teste de falcização de hemácias, sendo possível que alguns dos indivíduos tidos como "normais" fossem, na realidade, portadores de HbS. Não existem, contudo, informações sobre uma possível distorção na frequência dos fenótipos para o sistema MNSs, na sua amostra. Ludwin e cols. (1952) analisaram apenas famílias nas quais segregava um alelo da β -talassemia, porém obtiveram resultados compatíveis com a hipótese de segregação independente. Resultados na mesma

direção foram obtidos por Neel e cols. (1952), que empregaram o teste de falcização. Nance e cols. (1970), Weitkamp e cols. (1972b) e Barbosa e cols. (1975) identificaram os variantes estruturais da hemoglobina por eletroforese em gel de amido, porém Weitkamp e cols. (1972b) incluem algumas famílias que segregam para β -talassemia. Nos estudos de Nance e cols. (1970) e de Barbosa e cols. (1975), erros de tipagem para MNSs foram praticamente eliminados, devido à repetição das tipagens em laboratórios distintos. O mesmo procedimento foi adotado no presente estudo, porém não constam informações sobre este aspecto nos demais trabalhos.

Em resumo, ou as informações que poderiam justificar a hipótese de distorção por erros técnicos e/ou seleção são insuficientes, ou apontam para a não ocorrência de tal tipo de desvio. Além disto, existindo uma distorção na direção de menor frequência de recombinação, seria de se esperar que esta se manifestasse igualmente em famílias informativas masculinas e femininas. Contudo, as menores frequências de recombinação foram observadas sempre nos dados masculinos.

Levando em conta as duas possíveis causas de distorção examinadas, até aqui, conclui-se que, apesar de ser possível a ocorrência de uma ou outra em alguns dos estudos realizados, nenhuma das explicações dadas satisfaz, nem é capaz de reforçar as hipóteses de segregação independente ou de ligação frouxa.

c) Variação casual

A ocorrência de variação casual, na direção de menor frequência de recombinação nos estudos que sugerem ligação frouxa, ou na direção de maior frequência de recombinação nos que sugerem segregação independente, é outra possibilidade que deve ser considerada. Esta é, provavelmente, a principal causa da heterogeneidade observada.

No caso de haver realmente recombinação independente entre os locos Hb β e MNSs, é possível que o acúmulo de maior informação proveniente de estudos familiares venha a corroborar essa hipótese. Tenha-se em conta, para isso, os resultados altamente negativos obtidos no presente estudo, que permitiram des-

viar as exclusões de ligação masculina, feminina e total, respectivamente, de $\theta \sim 20\%$, $\theta \sim 30\%$ e $\theta \sim 30\%$, para $\theta \sim 25\%$, $\theta \sim 35\%$ e $\theta \sim 35\%$, além de terem desviado e reduzido os valores máximos de \underline{Z} masculinos, femininos e totais de, respectivamente, $\underline{Z} \sim 0,90$ ($\theta \sim 35\%$), $\underline{Z} \sim 0,45$ ($\theta \sim 40\%$) e $\underline{Z} \sim 1,00$ ($\theta \sim 40\%$), para $\underline{Z} \sim 0,30$ ($\theta \sim 40\%$), $\underline{Z} \sim 0,20$ ($\theta \sim 45\%$) e $\underline{Z} \sim 0,40$ ($\theta \sim 45\%$). Além disso, os últimos trabalhos sobre a atribuição cromossômica do loco MNSs puseram em dúvida sua possível localização no cromossomo 2 (Mace e cols., 1975b; Higgins e cols., 1976), reduzindo, desta maneira, a probabilidade de sintenia entre os locos Hb β e MNSs.

Por outro lado, existindo ligação frouxa, é improvável que a adição de uma maior número de famílias informativas permita alcançar valores de \underline{Z} significantes, a altas frequências de recombinação (Barbosa e cols., 1975). A demonstração de ligação dos dois locos com um terceiro, ou a confirmação de sintenia entre eles, por outros métodos, com atribuição regional a uma distância cromossômica tida como compatível com ligação, viria a corroborar esta hipótese.

2. Ligação Hb β :Hb δ

Os dados registrados na literatura mostram que, sempre que se teve a oportunidade de analisar a segregação em indivíduos duplamente heterozigotos para variantes estruturais de cadeias β e δ , a totalidade dos filhos analisados demonstrou ausência de recombinação. Todos os indivíduos duplamente heterozigotos estudados possuíam os alelos variantes de Hb β e Hb δ em repulsão. A família analisada neste estudo não foge a esta regra, corroborando a já bem conhecida ligação íntima entre esses locos.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Neste estudo de ligação entre os locos Hb β e MNSs, foram analisadas 40 famílias informativas, distribuídas da seguinte maneira:

- a) 18 famílias com informação paterna (74 filhos informativos);
- b) 21 famílias com informação materna (79 filhos informativos);
- c) 1 duplo entrecruzamento (4 filhos informativos).

A análise de ligação foi baseada no método dos escores lod de Morton.

Os resultados deste estudo sugerem segregação independente, em ambos os sexos.

Os totais obtidos pela reunião dos resultados do presente estudo com os dos demais autores sugerem frequência de recombinação próxima de 40% nos homens e de 45% nas mulheres e dados totais. Essas sugestões são, no entanto, muito fracas, podendo facilmente ter ocorrido por simples acaso.

Estimativas diretas baseadas em famílias com fase conhecida (Weitkamp e cols., 1972b e o presente estudo), indicam recombinação de 42% \pm 14% nos homens e de 43% \pm 6% nas mulheres.

O acúmulo de um maior número de famílias informativas provavelmente não possibilitará corroborar a hipótese de ligação frouxa entre os locos Hb β e MNSs. Por outro lado, estudos de atribuição cromossômica e de ligação de Hb β e MNSs com outros locos, poderiam alcançar este objetivo, ou justificar a hipótese de segregação independente.

Foi também estudada uma família que fornece informação adicional para a já conhecida ligação íntima entre os locos Hb β e Hb δ . Entre 8 filhos não se observou recombinante algum. A soma desses dados aos relatados na literatura perfaz um total de 77 não recombinantes, todos filhos de indivíduos nos quais os alelos variantes de Hb β e de Hb δ encontram-se em repulsão.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Abramson, R. K., Rucknagel, D. L., Shreffler, D. C. e Saave, J.J., 1970. Homozygous Hb J Tongariki: Evidence for only one alpha chain structural locus in Malesians. Science, 169:194-196.
- Aitken, D. A., Ferguson-Smith, M. A. e Dick, H. M., 1976. Gene mapping by exclusion: the current status. In BALTIMORE CONFERENCE (1975): Third International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series XII:256-265. The National Foundation, Nova York.
- Anderson, W. F., Deisseroth, A. B., Velez, R., Nienhuis, A. W., Ruddle, F. H. e Kucherlapati, R. S., 1976. A new technique for mapping the human hemoglobin genes. In BALTIMORE CONFERENCE (1975): Third International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series, XII: 367-371. The National Foundation, Nova York.
- Atwood, K. C., Henderson, A. S., Kacian, D. e Eicher, E. M., 1975. On the feasibility of mapping low-multiplicity genes by in situ hybridization. In ROTTERDAM CONFERENCE (1974): Second International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series, XI:59-61. The National Foundation, Nova York
- Atwood, K. C., Yu, M. T., Eicher, E. e Henderson, A. S., 1976. Feasibility tests for mapping low-multiplicity genes by hybridization in situ. In BALTIMORE CONFERENCE (1975): Third International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series, XII:372-375. The National Foundation, Nova York.

- Atwater, J., Schwartz, I. R. e Tocantins, L. M., 1960. A variety of human hemoglobin with 4 distinct electrophoretic components. Blood, 15:901-908.
- Baglioni, C., 1962. The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 48:1880-1886.
- Barbosa, C. A. A., Koury, W. H. e Krieger, H., 1975. Linkage data on MN and the Hb β locus. Am. J. hum. Genet., 27:797-801.
- Bethlenfalvay, N. C., Motulsky, A. G., Ringelmann, B., Lehmann, H., Humbert, J. R. e Konotey-Ahulu, F. I. D., 1975. Hereditary persistence of fetal hemoglobin, β thalassemia and the hemoglobin δ - β -locus: further family data and genetic interpretations. Am. J. hum. Genet., 27:140-154.
- Bishop, J. O. e Jones, K. W., 1972. Chromosomal localization of human haemoglobin structural genes. Nature, 240:149-150.
- Bissbort, S., Kömpf, J. e Ritter, H., 1975. Evidence for linkage between the loci of PGM₃ and MNSs. Humangenetik, 28:245-247.
- Boyer, S. H., Rucknagel, D. L., Weatherall, D. J. e Watson-Williams, E. J., 1963. Further evidence for linkage between the β and δ loci governing human hemoglobin and the population dynamics of linked genes. Am. J. hum. Genet., 15:438-448.
- Bradley, T. B. e Conley, C. L., 1960. Studies of an inherited disorder manifested by persistence of foetal hemoglobin. Trans. Ass. Am. Phys., 73:72-79.
- Carvalho, R. E. S. e Azevêdo, E. S., 1976. Melhoria na separação eletroforética de proteínas através de substituição do amido importado por amido brasileiro comercial. Ciên. Cult., 28: 1507-1508.
- Ceppellini, R., 1959. Discussion. In BIOCHEMISTRY OF HUMAN GENETICS. Ciba Foundation Symposium, org. por G. E. W. Wolstenholme e C. M. O'Connor. Little, Brown and Co., Boston, pp. 133-138.
- Chautard-Freire-Maia, E. A., 1974. Linkage relationships between 22 autosomal markers. Ann. Hum. Genet., 38:191-198.
- Chen, T. R., Mc Morris, F. A., Creagan, R., Ricciuti, F., Tischfield, J. e Ruddle, F., 1973. Assignment of the genes for malate oxidoreductase decarboxylating to chromosome 6 and peptidase B and lactate dehydrogenase B to chromosome 12 in man. Am. J. hum. Genet., 25:200-207.

- Clegg, J. B., 1976. The molecular defect in thalassemia. In ASPECTS OF GENETICS IN PAEDIATRICS. Report of the Third Unigate Workshop. Ed. by Donald Barltrop. Fellowship of Postgraduate Medicine, Londres.
- Cohen, F., Zeulzer, W. W., Neel, J. V. e Robinson, A. R., 1959. Multiple inherited erythrocyte abnormalities in an American Negro family: hereditary spherocytosis, sickling and thalassemia. Blood, 14:816-827.
- Conley, C. L., Weatherall, D. J., Richardson, S. N., Shepard, M. K. e Charache, S., 1963. Hereditary persistence of fetal hemoglobin: a study of 79 affected persons in 15 negro families in Baltimore. Blood, 21:261-281.
- Deisseroth, A., Velez, R., Anderson, W. F., Nienhuis, A., Kucheralapati, R. e Ruddle, F., 1975a. Chromosomal localization of human globin genes. (Abstr.) J. Cell Biol., 67: 90a.
- Deisseroth, A., Velez, R. e Nienhuis, A. W., 1975b. Hemoglobin synthesis in somatic cell hybrids: independent segregation of the human alpha- and beta- globin genes. Science, 191:1262-1264.
- Deminatti, M., Delmas-Marsalet, Y., Mennecier, M., Marquet, S., Agache, P. e Huriez, Cl., 1968. Étude du linkage probable entre une g nodermatose   transmission autosomale dominante et le système de groupe sanguin MNSs. Ann. G n t., 11:217-224.
- Ferguson-Smith, M. A., 1975. Gene mapping by exclusion. In ROTTERDAM CONFERENCE (1974): Second International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series, XI :126-129. The National Foundation, Nova York.
- Ferguson-Smith, M. A., Newman, B. F., Ellis, P. M., Thompson, D. M. G. e Riley, I. D., 1973. Assignment by deletion of human red cell acid phosphatase gene locus to the short arm of chromosome 2. Nature new Biol., 243:271-274.
- Finney, D. J., 1940. The detection of linkage. Ann. Eugen., 10: 171-214.
- Gandini, E., Dallapiccola, B., Colette, L., Suerinc, E. F., Forabosco, A., Conconi, F. e Del Senno, L., 1977. Evidence for localization of genes for human α -globin on the long arm of chromosome 4. Nature, 265:65-66.

- Gedde-Dahl Jr., T., Grimstad, A. L., Gundersen, S. e Vogt, E., 1967. A probable crossing over or mutation in the MNSs blood group system. Acta Genet., 17:193-210.
- Gerald, P. S., Efron, M. L. e Diamond, L. K., 1961. A human mutation (the Lepore hemoglobinopathy) possibly involving two "cistrons". Am. J. Dis. Child., 102:514-515.
- Gerald, P. S., Efron, M. L., Pease, M. e Diamond, L. K., 1960. Identification of a chemical defect in the Lepore hemoglobin. Am. J. Dis. Child., 100:757-758.
- German, J. e Chaganti, S. K., 1973. Mapping human autosomes: assignment of the MN locus to a specific segment in the long arm of chromosome no. 2. Science, 182:1261-1262.
- German, J., Walker, M. E., Stiefel, F. H. e Allen Jr., F. H., 1968. MN blood group locus: data concerning the possible chromosomal location. Science, 162:1014-1015.
- German, J. L., Walker, M. E., Stiefel, F. H. e Allen Jr., F. H., 1969. Autoradiographic studies of human chromosomes. II. Data concerning the position of the MN locus. Vox Sang., 16:130-145.
- Giblett, E. R., 1969. GENETIC MARKERS IN HUMAN BLOOD. Blackwell, Oxford.
- Harris, H., 1975. THE PRINCIPLES OF HUMAN BIOCHEMICAL GENETICS. North-Holland and American Elsevier, Amsterdam e Nova York, 2^a ed.
- Heiberg, A. e Berg, K., 1975. Linkage data on the MNSs blood group-red cell acid phosphatase relationship. Hum. Hered., 25:93-94.
- Higgins, J. V., Wisniewski, L., Hassold, T., Hackel, E., Raeburn, R. A., Buckton, K. E., Noades, J. E. e Cook, P. J. L., 1976. Two informative translocations involving chromosome 2. In BALTIMORE CONFERENCE (1975). Third International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series, XII:314-316. The National Foundation, Nova York.
- Hollán, S. R., Szelenyi, J. B., Brimhall, B., Duerst, M., Jones, R. T., Koler, R. D. e Stocklen, Z., 1972. Multiple alpha chain loci for human haemoglobins: Hb J-Buda and Hb G-Pest. Nature, 235:47-50.
- Hopkinson, D. A., Coppock, J. S., Mühlemann, M. F. e Edwards, Y. H., 1974. The detection and differentiation of the products of the human carbonic anhydrase loci, CA_I and CA_{II}, using fluorogenic substrates. Ann. Hum. Genet., 38:155-162.

- Hopkinson, D. A., Mestriner, M. A., Cortner, J. e Harris, H., 1973. Esterase D: a new human polymorphism. Ann. Hum. Genet., 37: 119-137.
- Horton, B. F. e Huisman, T. H. J., 1963. Linkage of the β -chain and δ -chain structural genes of human hemoglobins. Am. J. hum. Genet., 15:394-397.
- Horton, B., Payne, R. A., Bridges, M. T. e Huisman, T. H. J., 1961. Studies on an abnormal minor hemoglobin component (Hb-B₂). Clin. Chim. Acta, 6:246-253.
- Hösli, P., Hassig, A. e Franceschetti, A., 1957. Detection of linkage between the genes for the blood group system MNSs and the gene for ptosis congenitalis hereditaria simplex. Acta Genet., 7:70.
- Hsia, D. Y. Y., 1966. INBORN ERRORS OF METABOLISM. (part 2). Year Book Medical Publishers Inc., Chicago.
- Huehns, E. R., 1968. Starch gel electrophoresis-haemoglobins. In CHROMATOGRAPHIC AND ELECTROPHORETIC TECHNIQUES. Vol. II: Zone electrophoresis. Ed. by I. Smith. William Heinemann, Londres, 2^a ed.
- Huisman, T. H. J., 1969. Human Hemoglobins. In BIOCHEMICAL METHODS IN RED CELL GENETICS. Ed. by J. J. Yunis. Academic Press, Nova York.
- Huisman, T. H. J., Punt, K. e Schaad, D. G., 1961. Thalassemia minor associated with hemoglobin B₂ heterozygosity. A family report. Blood, 17:747-757.
- Huisman, T. H. J., Schroeder, W. A., Dozy, A. M., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Boyd, E. M. e Apell, G., 1969. Evidence for multiple structural genes for the gamma-chain of human fetal hemoglobin in hereditary persistence of fetal hemoglobin. Ann. N. Y. Acad. Sci., 165:320-331.
- Huisman, T. H. J., Schroeder, W. A., Stamatoyannopoulos, G., Bouver, N., Shelton, J. R., Shelton, J. B. e Apell, G., 1970. Nature of fetal hemoglobin in the greek type of hereditary persistence of fetal hemoglobin with and without concurrent β -thalassemia. J. Clin. Invest., 49:1035-1040.
- Huisman, T. H. J., Wrightstone, R. N., Wilson, J. B., Schroeder, W. A. e Kendall, A. G., 1972. Hemoglobin Kenya, the product of fusion of γ and β polypeptide chains. Arch. Biochem. Biophys., 153:850-853.

- Ingram, V. M., 1957. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins. Nature, 180:326-328.
- Ingram, V. M., 1959. Abnormal human haemoglobins: III. The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins. Biochem. Biophys. Acta, 36:402.
- Ingram, V. M., 1961. Gene evolution and the haemoglobins. Nature, 189:704-708.
- Jongsma, A., van Someren, H., Westerveld, A., Hagemeyer, A. e Pearson, P., 1973. Localization of genes on human chromosomes by studies of human-chinese hamster somatic cell hybrids. Assignment of PGM₃ to chromosome C6 and regional mapping of the PGD, PGM₁ and PEP-C genes on chromosome A1. Humangenetik, 20:195-202.
- Kendall, A. G., Ojwang, P. J., Schroeder, W. A. e Huisman, T. H. J., 1973. Hemoglobin Kenya, the product of a gamma-beta fusion gene: studies of the family. Am. J. hum. Genet., 25:548-563.
- Lamm, L. U., Friedrich, U., Petersen, G. B., Jorgensen, J., Nielsen, J., Therkelsen, A. J. e Kissmeyer-Nielsen, F., 1974. Assignment of the major histocompatibility complex to chromosome n° 6 in a family with a pericentric inversion. Hum. Hered., 24:273-284.
- Lehmann, H. e Carrel, R. W., 1968. Differences between α - and β -chain mutants of human haemoglobin and between α - and β -thalassemia. Possible duplication of the α -chain gene. Br. Med. J., 4:748-750.
- Lewis, W. H. P. e Harris, H., 1967. Human red cell peptidases. Nature, 215:351.
- Lie-Injo, L. E., Ganesan, J., Clegg, J. B. e Weatherall, D. J., 1974. Homozygous state for Hb Constant Spring (slow moving X components). Blood, 43:251.
- Lorkin, P. A., 1973. Fetal and embryonic haemoglobins. J. Med. Genet., 10:50-64.
- Ludwin, I., Limentani, D., Dameshek, W., 1952. Linkage tests of mediterranean anemia with blood groups, blood types, Rh factors and eye color. Am. J. hum. Genet., 4:182-193.

- Mace, M. A., Cook, P. J. L. e Robson, E. B., 1975a. Linkage data on red cell acid phosphatase from family studies. Ann. Hum. Genet., 38:471-478.
- Mace, M. A., Noades, J., Robson, E. B., Hultén, M., Lindsten, J., Polani, P. E., Jacobs, P. A. e Buckton, K. E., 1975b. Segregation of AcP₁ and MNSs in families with structural rearrangements involving chromosome 2. Ann. Hum. Genet., 38:479-484.
- Mace, M. e Robson, E. B., 1974. Linkage data on AcP₁ and MNSs. In NEW HAVEN CONFERENCE (1973): First International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series, X:123-125. The National Foundation, Nova York.
- Maynard-Smith, S., Penrose, L. S. e Smith, C. A. B., 1961. MATHEMATICAL TABLES FOR RESEARCH WORKERS IN HUMAN GENETICS. Churchill, Londres.
- Mayr, W. R., 1976. No close linkage between MNSs and the red cell acid phosphatase. Hum. Hered., 26:1-3.
- Mayr, W. R. e Mayr, D., 1974. Analyse der Koppelung zwischen dem HL-A-System und anderen Loci. Humangenetik, 24:129-133.
- McKusick, V. A. (org.), 1977. THE HUMAN GENE MAP (documento mimeografado).
- Mishu, M. K. e Nance, W. E., 1969. Further evidence for close linkage of the Hb^β and Hb^δ loci in man. J. Med. Genet., 6:190-192.
- Mohr, J., 1951a. A search for linkage between the Lutheran blood group and other hereditary characters. Acta Path. Microbiol. Scand., 28:207-210.
- Mohr, J., 1951b. Estimation of linkage between the Lutheran and the Lewis blood groups. Acta Path. Microbiol. Scand., 29:339-344.
- Mollison, P. L., 1972. BLOOD TRANSFUSION IN CLINICAL MEDICINE. Blackwell, Oxford, 5a. ed.
- Morton, N. E., 1955. Sequential tests for the detection of linkage. Am. J. hum. Genet., 7:277-318.
- Morton, N. E., 1956. The detection and estimation of linkage between the genes for elliptocytosis and the Rh blood type. Am. J. hum. Genet., 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. Am. J. hum. Genet., 9:55-75.
- Morton, N. E., Krieger, H. e Mi, M. P., 1966. Natural selection on polymorphisms in northeastern Brazil. Am. J. hum. Genet., 18:153-171.
- Motulsky, A. G., 1964. Current concepts of the genetics of the thalassemia. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 29: 399-413.
- Nance, W. E., Conneally, M., Kang, K. W., Reed, T., Schroder, J. e Rose, S., 1970. Genetic linkage analysis of human hemoglobin variants. Am. J. hum. Genet., 22:453-459.
- Neel, J. V., 1961. The hemoglobin genes: A remarkable example of the clustering of related genetic functions on a single mammalian chromosome. Blood, 18:769-777.
- Neel, J. V., Schull, W. J. e Shapiro, H. S., 1952. Absence of linkage between the genes responsible for the sickling phenomenon, the MN blood types, and the S-agglutinogen. Am. J. hum. Genet., 4:204-208.
- Ohta, Y., Yamaoka, K., Sumida, I. e Yanase, T., 1971. Haemoglobin Miyada, a β - δ fusion peptide (anti-Lepore) type discovered in a Japanese family. Nature new Biol., 234:218.
- Ottolenghi, S., Lañyon, W. G., Williamson, R., Paul, J., Weatherall, D. J., Clegg, J. B., Pritchard, J., Pootrakul, S. e Wong Hock Boon, 1974. The severe form of α -thalassemia is caused by a haemoglobin gene deletion. Nature, 251:389.
- Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. J. e Wells, I. C., 1949. Sick cell anaemia, a molecular disease. Science, 110:543-548.
- Pearson, H. A. e Moore, M. M., 1965. Human hemoglobin gene linkage: report of a family with hemoglobin B₂, hemoglobin S, and β -thalassemia, including a probable crossover between thalassemia and delta loci. Am. J. hum. Genet., 17:125-132.
- Poulik, M. D., 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. Nature, 180:1477-1479.
- Povey, S., Swallow, D. M., Bobrow, M., Craig, I. e van Heyningen, V., 1974. Probable assignment of the locus determining human red cell acid phosphatase AcP₁ to chromosome 2 using somatic cell hybrids. Ann. Hum. Genet., 38:1-5.

- Prensky, W. e Holmquist, G., 1973. Chromosomal localization of human haemoglobin structural genes: techniques queried. Nature, 241:44-45.
- Price, P. M., Conover, J. H. e Hirschhorn, K., 1972. Chromosomal localization of human haemoglobin structural genes. Nature, 237:340-342.
- Price, P. M. e Hirschhorn, K., 1975. In situ hybridization for gene mapping. In ROTTERDAM CONFERENCE (1974): Second International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series, XI:225-231. The National Foundation, Nova York.
- Race, R. R. e Sanger, R., 1975. BLOOD GROUPS IN MAN. Blackwell, Oxford, 6a. ed.
- Raney, H. M., Jacobs, A. S., Bradley, T. B. Cordova, F. A., 1963. A "new" variant of haemoglobin A₂ and its segregation in a family with haemoglobin S. Nature, 197:164-166.
- Raper, A. B., Gammack, D. B., Huehns, E. R. e Shooter, E. M., 1960. Four haemoglobins in one individual. A study of the genetic interaction of Hb-G and Hb-C. Brit. Med. J., 2:1257-1261.
- Renwick, J. H., 1969. Progress in mapping human autosomes. Brit. Med. Bull., 25:65-73.
- Schroeder, W. A., Huisman, T. H. J., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Kleihauer, E. F., Dozy, A. M. e Robberson, B., 1968. Evidence for multiple structural genes for the γ chain of human fetal hemoglobin. Proc. Nat. Acad. Sci, U.S.A., 60:537-544.
- Schwartz, E., Smith, D. e Nathan, D. G., 1967. Loci of human haemoglobin genes. Lancet, ii:1422-1423.
- Schwartz, H. C., Spaet, T. H., Zuelzer, W. W., Neel, J. V., Robinson, A. R. e Kaufmann, S. F., 1957. Combinations of hemoglobin G, hemoglobin S and thalassemia occurring in one family. Blood, 12:238-250.
- Shine, I. e Lal, S., 1977. A strategy to detect β -thalassemia minor. Lancet, i:692-694.
- Smith, D. H., Clegg, J. B., Weatherall, D. J. e Gilles, H. M., 1973. Hereditary persistence of foetal haemoglobin associated with a $\gamma\beta$ fusion variant, haemoglobin Kenya. Nature new Biol., 246:184-186.

- Smith, E. W. e Torbert, J. V., 1958. Study of two abnormal hemoglobins with evidence for a new genetic locus for hemoglobin formation. Bull. Johns Hopk. Hosp., 102:38-45.
- Snyder, L. H., Clarke, H. e Moore, C. V., 1949. Studies in human inheritance. XXXIV. Further data on the linkage of the genes for sickle cells and the M-N blood types. Ohio J. Sci., 49:32-33.
- Snyder, L. H., Russel, H. e Graham, E. B., 1947. Linkage between the genes for sickle cells and the M-N blood types. Science, 106:347-348.
- Steinberg, A. G. e Morton, N. E., 1956. Sequential tests for linkage between cystic fibrosis of the pancreas and the MNS locus. Am. J. hum. Genet., 8:177-189.
- Taylor, G. L. e Prior, A. M., 1939. Blood groups in England. III. Discussion of the family material. Ann. Eugen., 9:18-44.
- Taylor, J. M., Dozy, A., Kan, Y. W., Varmus, H. E., Lie-Injo, L. E., Ganesan, J. e Todd, D., 1974. Genetic lesion in homozygous α -thalassemia (hydrops fetalis). Nature, 251:392.
- Thompson, M. W., Falk, C. T., Worton, R. G., Stevens, L. J., Allen Jr., F. H. e Surana, R. B., 1976. A report on a family with a (1;2) translocation: cytologic and linkage analysis. In BALTIMORE CONFERENCE (1975): Third International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series, XII:355-358. The National Foundation, Nova York.
- Thompson, R. B., Odom, J. e Bell, W. N., 1965. Hb-S, beta thalassemia and Hb-A₂¹ (B₂) in a family with evidence of a crossover between beta and delta loci. Acta Genet., 15:371-377.
- Tippett, P., 1967. Genetics of the Dombrock blood system. J. Med. Genet., 4:7-11.
- Tippett, P., Gavin, J. e Sanger, R., 1972. The Dombrock system: linkage relations with other blood group loci. J. Med. Genet., 9:392.
- Tuchinda, S., Rucknagel, D. L., Minnich, V., Boonyaparakob, V., Balankura, K. e Suvatee, V., 1964. The coexistence of genes of hemoglobin E and α -thalassemia in Thais, with resultant supression of hemoglobin E synthesis. Am. J. hum. Genet., 16:311-335.
- Wasi, P., 1973. Is the human α -globin- locus duplicated? Brit. J. Haematol., 24:267-273.

- Weatherall, D. J., 1964. Biochemical phenotypes of thalassemia in the American Negro population. Problems of Cooley's anemia. Ann. N. Y. Acad. Sci., 119:450-462.
- Weatherall, D. J., Clegg, J. B., Milner, P. F., Marsh, G. W., Bolton, F. G. e Serjeant, G. R., 1976. Linkage relations between β - and δ - structural loci and African forms of β thalassemia. J. Med. Genet., 13:20-26.
- Weitkamp, L., 1969. Chromosomal location of MN blood group locus. Science, 164:1187-1188.
- Weitkamp, L. R., Adams, M. S. e Rowley, P. T., 1972a. Genetic linkage between the Hb β and MN loci? Am. J. Hum. Genet., 24 (Abstr. Amer. Soc. Hum. Genet. Meet.):41a.
- Weitkamp, L. R., Adams, M. S. e Rowley, P. T., 1972b. Linkage between the MN- and Hb β - loci? Hum. Hered., 22:566-572.
- Weitkamp, L. R., Janzen, M. K., Guttormsen, S. A. e Gershowitz, H., 1969. Inherited pericentric inversion of chromosome number two: a linkage study. Ann. Hum. Genet., 33:53-59.
- Weitkamp, L. R., Lovrien, E. W., Olaisen, B., Fenger, K., Gedde-Dahl Jr., T., Sørensen, S.A., Conneally, P. M., Bias, W. B. e Ott, J., 1975. Linkage relations of the loci for the MN blood group and red cell acid phosphatase. In ROTTERDAM CONFERENCE (1974): Second International Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series, XI:276-280. The National Foundation, Nova York.
- Wiener, A. S., 1951. Heredity of the M-N types. Analysis of twenty years' work. Am. J. hum. Genet., 3:179-183.
- Wiener, A. S., Di Diego, N. e Sokol, S., 1953. Studies of the heredity of the human blood groups. I. The M-N types. Acta Genet. Med. Gemellol., 2:391-397.
- Wikramanayake, E., Renwick, J. H. e Ferguson-Smith, M. A., 1971. Chromosomal heteromorphisms in the assignment of loci to particular autosomes: a study of four pedigrees. Ann. Génét., 14:245-256.
- Wong, S. C. e Huisman, T. H. J., 1972. Further evidence for non-linkage of the Hb α and Hb β structural loci in man. Clin. Chim. Acta, 38:473-474.
- Yasuda, N., 1969. The inbreeding coefficient in Northeastern Brazil. Hum. Hered., 19:444-456.

APÊNDICE 1

GENEALOGIAS

Todas as genealogias averiguadas, com exceção da Hb 27, estão incluídas neste Apêndice.

Os genótipos para hemoglobina estão representados de acordo com os símbolos abaixo. A relação dos genótipos ou fenótipos para os demais sistemas caracterizados pode ser encontrada no Apêndice 2.

□ ○ HbA HbA

◻ ⊗ não testado

◼ ⊙ HbA HbS

◻[†] ○[†] falecido

◼ ⊙ HbS HbS

◻[†] ○[†] fenótipo incompatível com o de um dos progenitores

◼ ⊙ HbA HbC

◻ | ○ natimorto

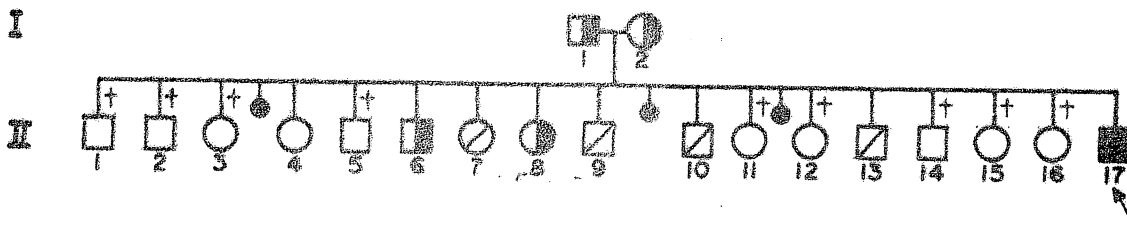
◼ ⊙ HbS HbC

● aborto

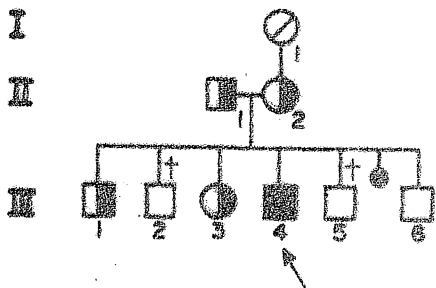
◼ ⊙ HbA HbA e HbA₂ HbB₂ ◻ ○ probando

◼ ⊙ HbA HbS e HbA₂ HbB₂

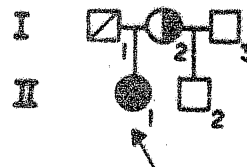
Hb 1



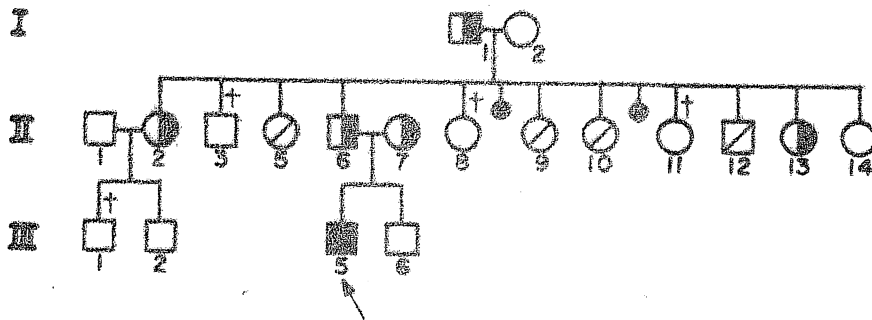
Hb 2



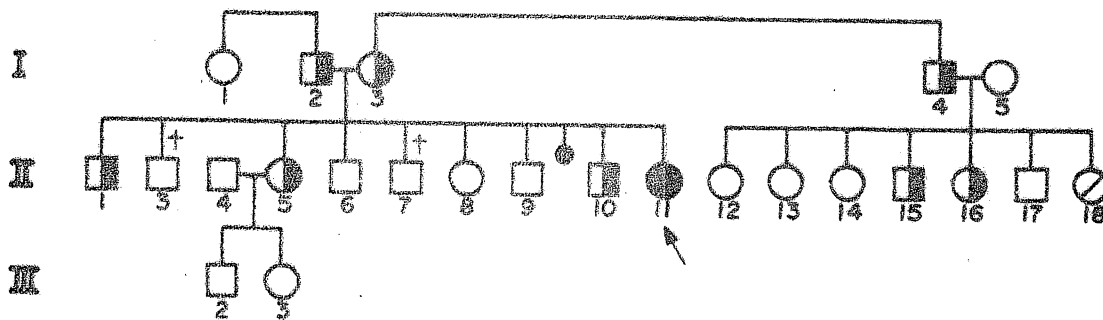
Hb 3



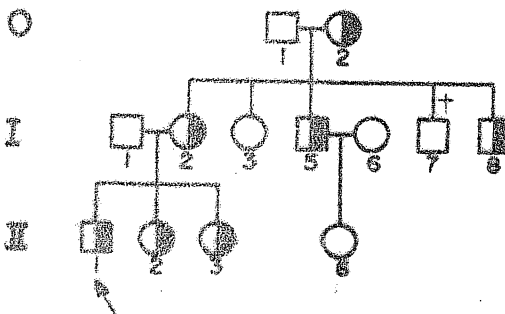
Hb 4

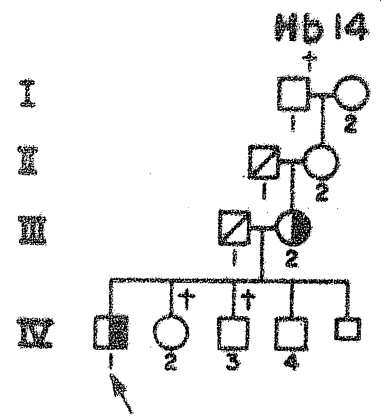
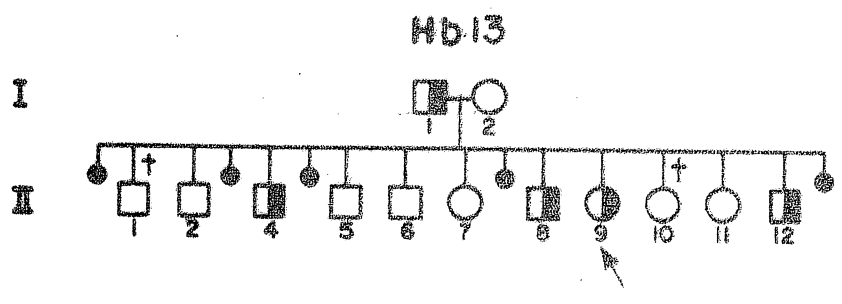
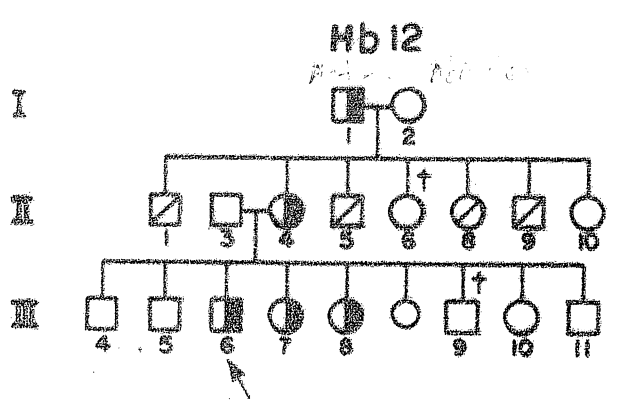
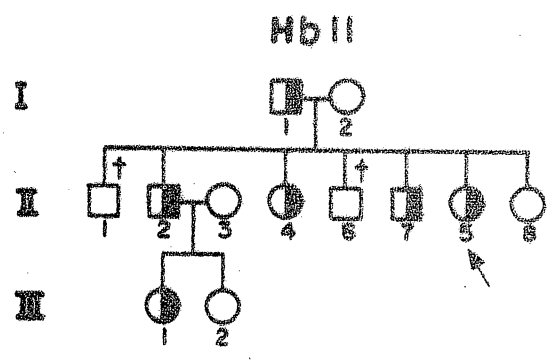
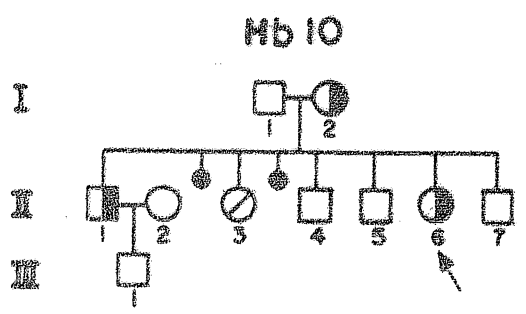
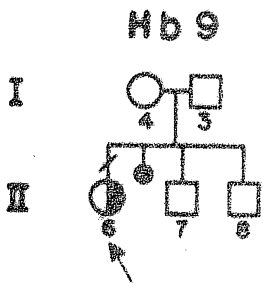
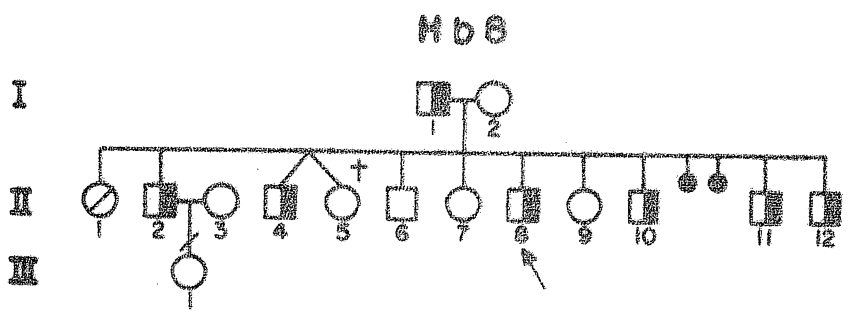
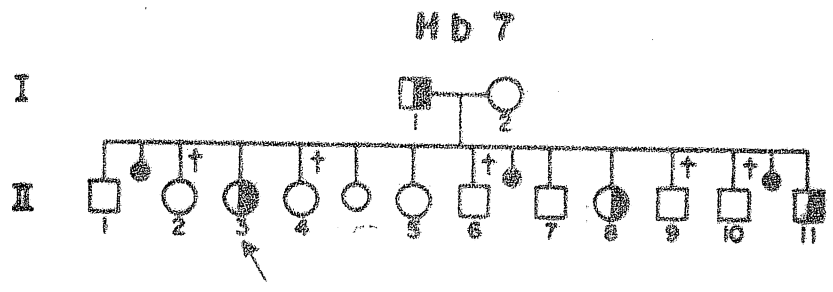


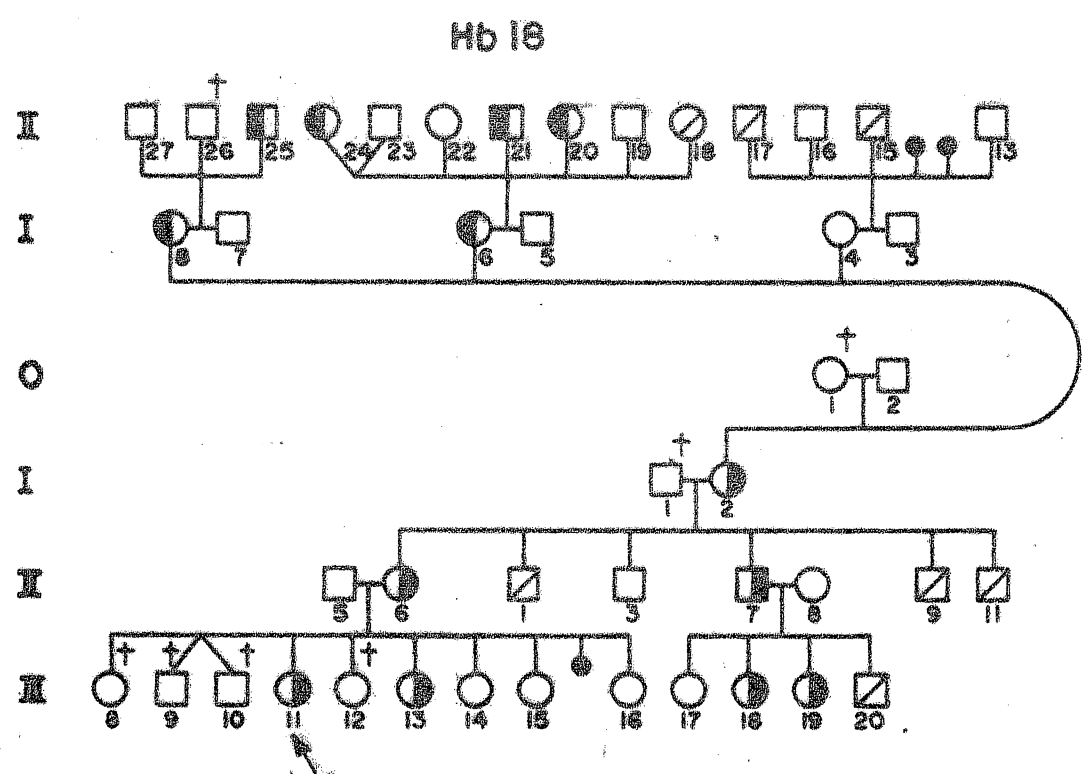
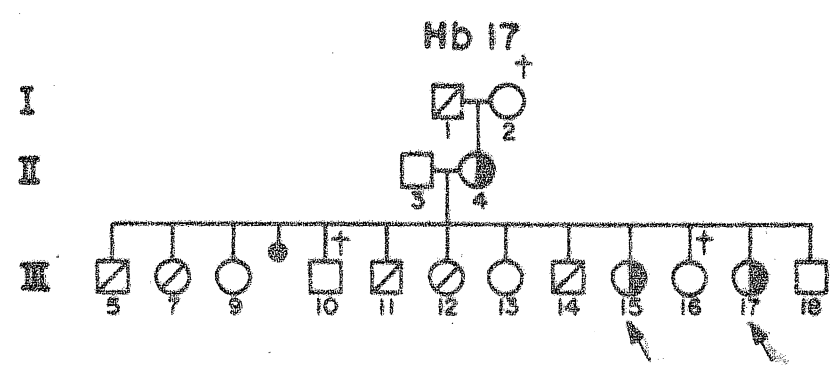
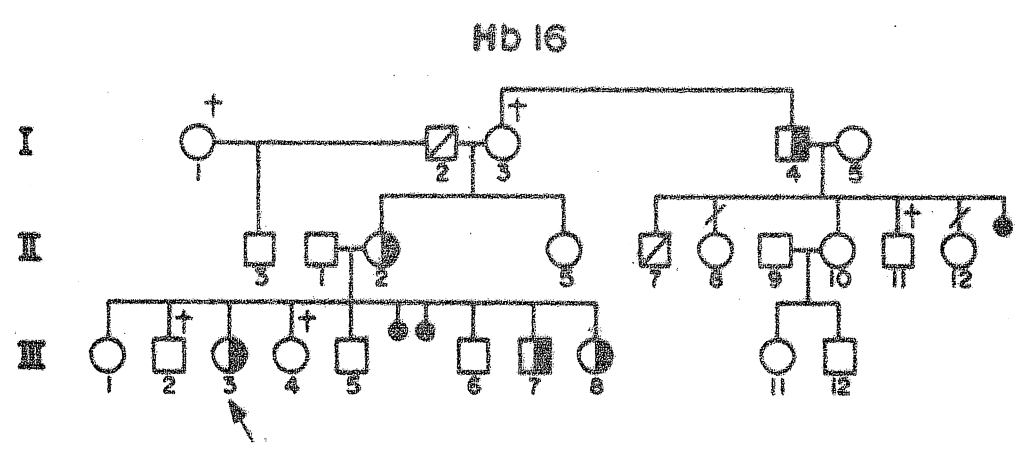
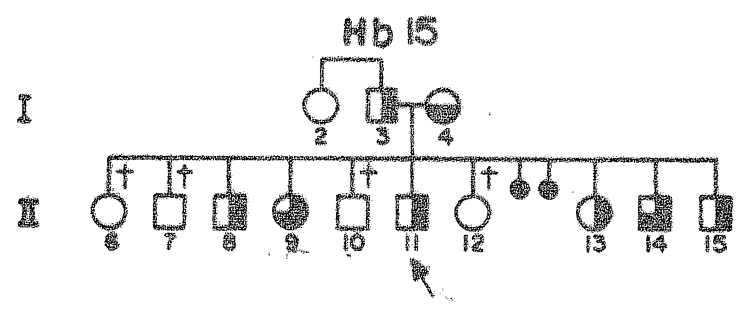
Hb 5

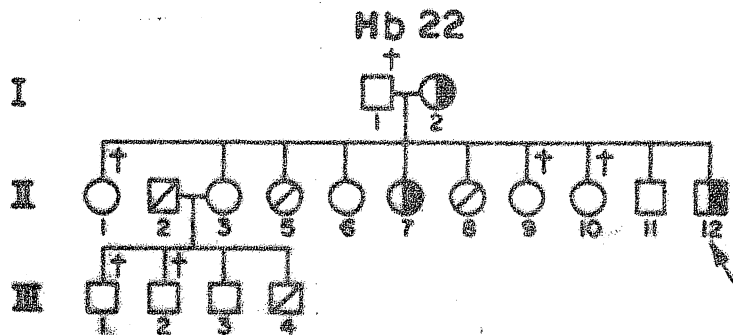
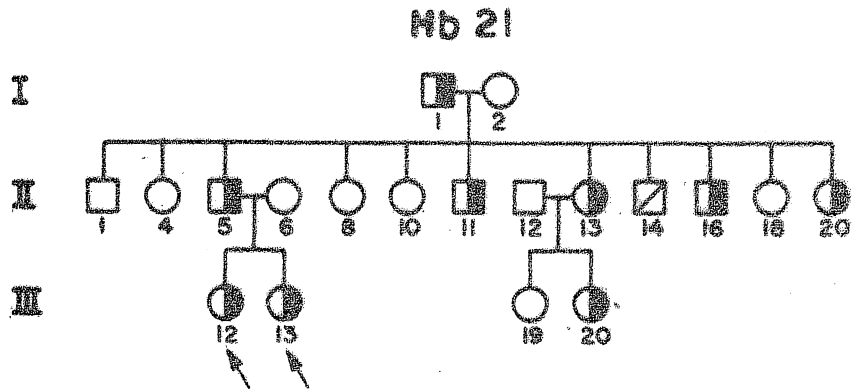
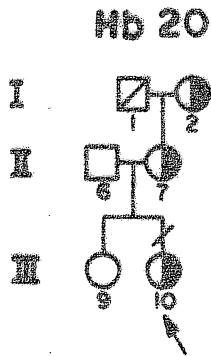
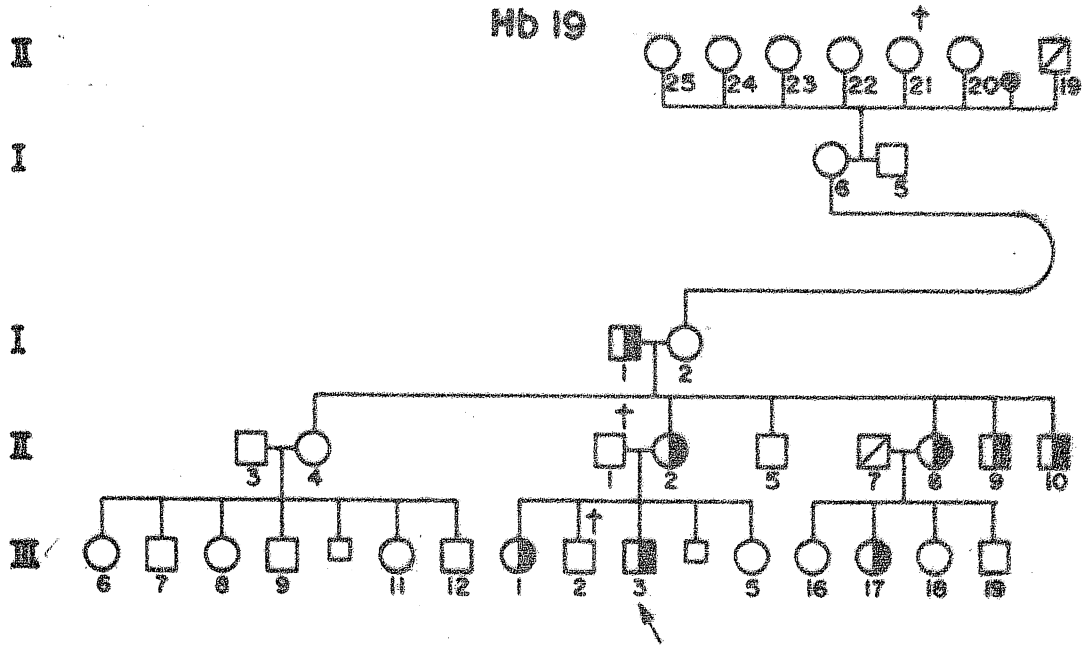


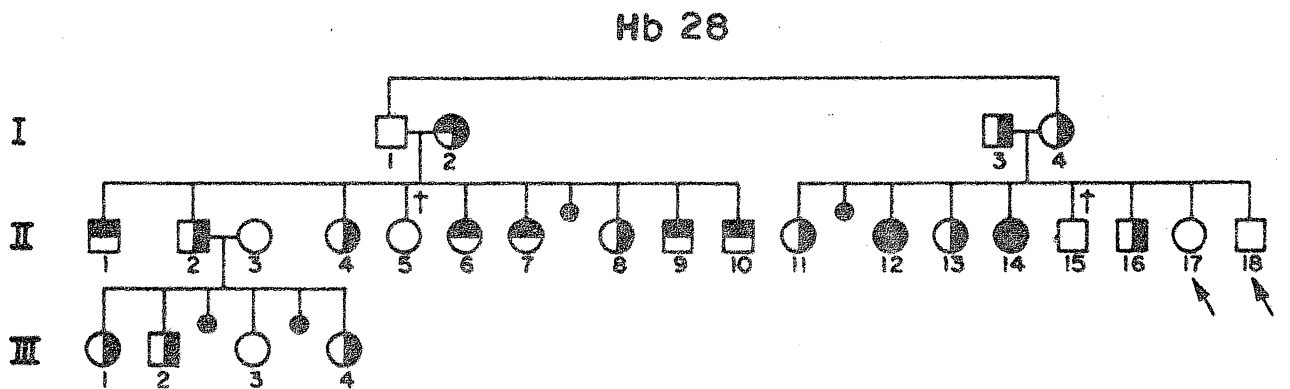
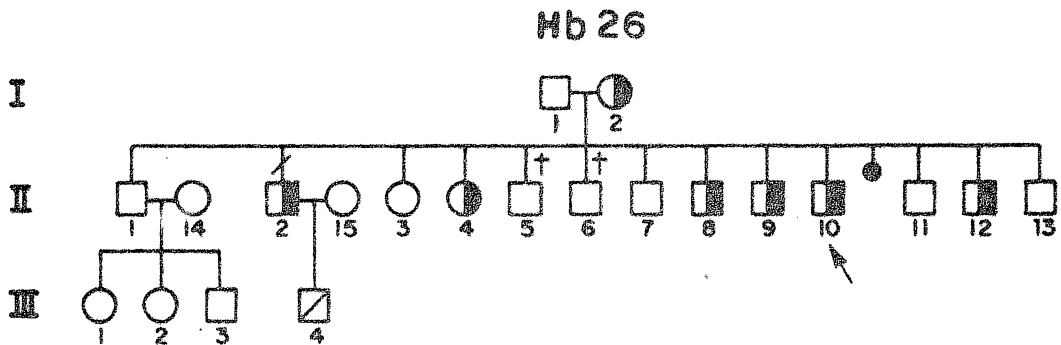
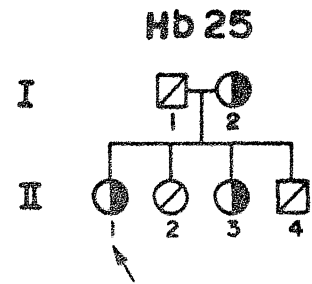
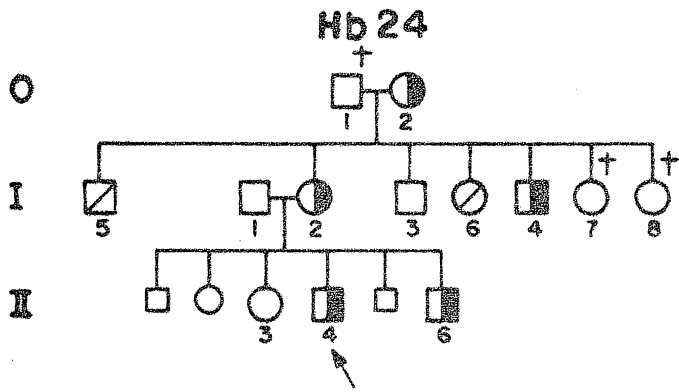
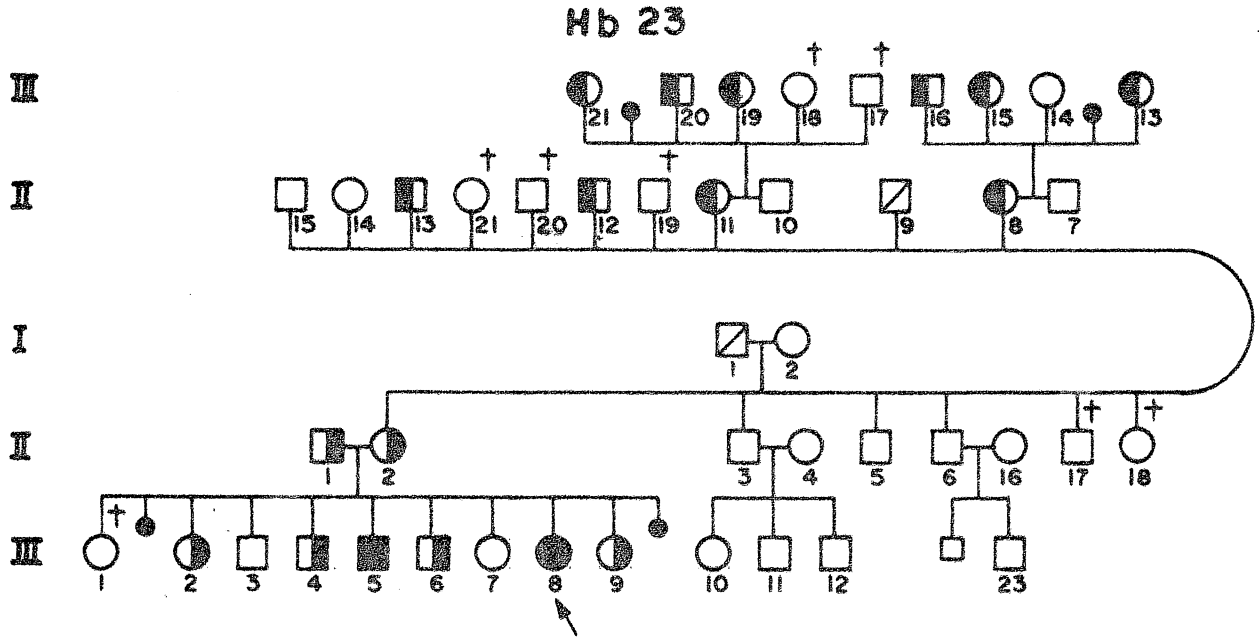
Hb 6











A P Ê N D I C E 2

Informações sobre os indivíduos tipados, pertencentes às genealogias apresentadas no Apêndice 1.

- Todos os indivíduos tipados para pelo menos um sistema estão aqui relacionados.
- Indivíduos não tipados para certos sistemas ou antígenos específicos possuem a quadrícula em questão em branco.
- Como "pai" e "mãe", são citados apenas indivíduos tipados.
- A idade (Id.) é, quase sempre, dada em anos. Um m ao lado do número indica que a idade é dada em meses.
- Sempre que possível, inferiu-se a fase dos tipos MN em relação aos tipos Ss, do sistema MNSs, com base nos ascendentes e/ou descendentes de cada indivíduo.
- Para os sistemas ABO, Rh e Fy, apenas os fenótipos estão indicados.
- Os resultados das tipagens com anti-AB não estão registrados aqui, já que não se observou resultado contraditório em relação aos obtidos com anti-A e anti-B.
- Um sinal negativo (-) em haptoglobina indica anhaptoglobinemia.
- Indivíduos com fenótipo incompatível com o de um dos pais estão assinalados com um asterisco.
- O indivíduo Hb 17-III-17 teve seu genótipo quarto à Hb determinado com base no resultado do teste de fal-cização e no genótipo de seus pais.
- O indivíduo Hb 23-III-5 recebeu transfusão sangüínea cerca de um mês antes da caracterização de seu sistema MNSs, não se podendo, por isto, determinar o seu respectivo genótipo.

Geneal.	Indivíduo	Pai	Mãe	Sexo	Id.	Hb	MNSs			ABO		Rh			Fy ^a	Hp	Es D	CA II			
							M	N	S s	Genótipo	A	B	D	C					c	E	e
Hb 1																					
	I-1	-	-	M	71	AS	+	-	+	+	MS/Ms	-	+	+	+	-	-	2-1	1-1	1-1	
	I-2	-	-	F	61	AS	+	-	+	+	MS/Ms	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	II-4	I-1	I-2	F	36	AA	+	-	+	+	MS/Ms	+	+	+	-	+	-	-	2-1	1-1	1-1
	II-6	I-1	I-2	M	34	AS	+	-	+	+	MS/Ms	+	-	+	+	+	+	-	1-1	1-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

<u>Geneal.</u>	<u>Indivíduo</u>	<u>Pai</u>	<u>Mãe</u>	<u>Sexo</u>	<u>Id.</u>	<u>Hb</u>
Hb 1						
	II-8	I-1	I-2	F	31	AS
	II-17	I-1	I-2	M	19	SS
Hb 2						
	II-1	-	-	M	42	AS
	II-2	-	-	F	43	AS
	III-1	II-1	II-2	M	22	AS
	III-3	II-1	II-2	F	17	AS
	III-4	II-1	II-2	M	14	SS
	III-6	II-1	II-2	M	8	AA
Hb 3						
	I-2	-	-	F	33	AS
	I-3	-	-	M	31	AA
	II-1	-	I-2	F	12	SS
	II-2	I-3	I-2	M	6	AA
Hb 4						
	I-1	-	-	M	48	AS
	I-2	-	-	F	47	AA
	II-1	-	-	M	26	AA

MNSs					ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II
M	N	S	s	Genótipo	A	B	D	C	c	E	e				
+	-	+	+	MS/Ms	+	-	+	-	+	-	-	+	1-1	1-1	1-1
+	-	+	-	MS/MS	+	-	+	-	+	-	-	-	-	1-1	1-1
+	+			MN	-	-	+	+	-	-	-	-	2-1	2-1	1-1
+	-			MM	-	-	-	-	+	-	-	-	1-1	1-1	1-1
+	+			MN	-	-	+	+	+	-	-	-	1-1	2-1	1-1
+	+			MN	-	-	+	+	+	-	-	-	2-1	2-1	1-1
+	-			MM	-	-	+	+	+	-	-	-	-	2-1	1-1
+	-			MM	-	-	+	+	+	-	-	-	1-1	1-1	1-1
+	-			MM	+	-	+	-	+	-	-	-	2-1	1-1	1-1
+	-			MM	-	-	+	-	+	+	-	+	1-1	1-1	1-1
+	+			MN	-	-	+	+	+	+	-	-	-	1-1	1-1
+	-			MM	-	-	+	-	+	+	-	-	1-1	1-1	1-1
+	-	-	+	Ms/Ms	-	-	+	+	+	-	-	+	1-1	1-1	1-1
-	+	-	+	Ns/Ns	+	-	+	+	+	+	-	+	2-2	1-1	1-1
-	+			NN	-	-	+	+	+	+	-	-	2-2	2-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

Geneal.	Indivíduo	Pai	Mãe	Sexo	Id.	Hb	M	N
Hb 4								
	II-2	I-1	I-2	F	25	AS	+	+
	II-6	I-1	I-2	M	22	AS	+	+
	II-7	-	-	F	18	AS	-	+
	II-13	I-1	I-2	F	8	AS	+	+
	II-14	I-1	I-2	F	6	AA	+	+
	III-2	II-1	II-2	M	4	AA	+	+
	III-5	II-6	II-7	M	2	SS	+	+
	III-6	II-6	II-7	M	5m	AA	+	+
Hb 5								
	I-1	-	-	F	55	AA	-	+
	I-2	-	-	M	52	AS	-	+
	I-3	-	-	F	49	AS	+	+
	I-4	-	-	M	42	AS	+	+
	I-5	-	-	F	38	AA	-	+
	II-1	I-2	I-3	M	31	AS	+	+
	II-4	-	-	M	30	AA	-	+
	II-5	I-2	I-3	F	29	AS	+	+
	II-6	I-2	I-3	M	27	AA	-	+
	II-8	I-2	I-3	F	24	AA	+	+

MNSs		ABO		Rh			Fy ^a	Hp	Es D	CA II			
S	s	A	B	D	C	c					E	e	
		MN	+ -	+ + + +									
		MN	+ -	+ + + +									
- +		Ns/Ns	+ -	+ + + -									
- +		Ms/Ns	+ -	+ + - -									
- +		Ms/Ns	- -	+ - + +									
		MN	+ -	+ + + +									
		MN	- -	+ + + +									
		MN	+ -	+ + + +									
		NN	+ -	+ + - +									
		NN	+ -	+ + + +									
		MN	- -	+ + + -									
		MN	+ -	+ + - -									
		NN	- -	+ + - - +									
		MN	+ -	+ + - -									
		NN	+ -	+ + + - +									
		MN	- -	+ + + -									
		NN	- -	+ + + -									
		MN	- -	+ + + -									

continua

Continuação do Apêndice 2.

Geneal.	Indivíduo	Pai	Mãe	Sexo	Id.	Hb
Hb 5						
	II-9	I-2	I-3	M	22	AA
	II-10	I-2	I-3	M	20	AS
	II-11	I-2	I-3	F	12	SS
	II-12	I-4	I-5	F	17	AA
	II-13	I-4	I-5	M	15	AA
	II-14	I-4	I-5	F	13	AA
	II-15	I-4	I-5	M	11	AS
	II-16	I-4	I-5	F	10	AS
	II-17	I-4	I-5	M	7	AA
	III-2	II-4	II-5	M	7	AA
	III-3	II-4	II-5	F	4	AA
Hb 6						
	O-1	-	-	M	52	AA
	O-2	-	-	F	43	AS
	I-1	-	-	M	37	AA
	I-2	O-1	O-2	F	27	AS
	I-3	O-1	O-2	F	26	AA
	I-5	O-1	O-2	M	23	AS

MNSs					ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II
M	N	S	s	Genótipo	A	B	D	C	c	E	e				
-	+			NN	+	-	+	+	+	-	-	2-1	1-1	1-1	
+	+			MN	+	-	+	+	-	-	-	2-2	1-1	1-1	
+	+			MN	-	-	+	-	+	+	-	-	1-1	1-1	
+	+			MN	+	-	+	+	-	-	+	2-1	1-1	1-1	
+	+			MN	+	-	+	+	-	-	+	2-1	1-1	1-1	
+	+			MN	-	-	+	+	+	-	+	2-1	1-1	1-1	
+	+			MN	-	-	+	+	-	-	+	2-1	1-1	1-1	
+	+			MN	-	-	+	+	-	-	+	2-1	1-1	1-1	
-	+			NN	+	-	+	+	-	-	+	2-1	1-1	1-1	
-	+			MN	+	-	+	+	-	-	+	-	1-1	1-1	
-	+			NN	+	-	-	-	+	-	+	2-2	1-1	1-1	
+	-	+	+	MS/Ms	-	-	+	+	+	+	+	-	1-1	1-1	1-1
-	+	-	+	Ns/Ns	-	-	+	+	-	-	+	+	2-1	1-1	1-1
+	-			MM	-	+	+	+	-	-	+	2-2	1-1	1-1	
+	+			MN	-	-	+	+	+	+	-	2-1	1-1	1-1	
+	+	+	+	MS/Ns	+	-	+	+	+	-	+	2-1	1-1	1-1	
+	+	-	+	Ms/Ns	-	-	+	+	+	-	+	1-1	1-1	1-1	

continua

Continuação do Apêndice 2.

Geneal.	Indivíduo	Pai	Mãe	Sexo	Id.	Hb
Hb 6						
	I-6	-	-	F	20	AA
	I-8	0-1	0-2	M	19	AS
	II-1	I-1	I-2	M	8	AS
	II-2	I-1	I-2	F	6	AS
	II-3	I-1	I-2	F	3	AS
	II-6	I-5	I-6	F	5m	AA
Hb 7						
	I-1	-	-	M	32	AS
	I-2	-	-	F	31	AA
	II-1	I-1	I-2	M	13	AA
	II-3	I-1	I-2	F	9	AS
	II-5	I-1	I-2	F	7	AA
	II-7	I-1	I-2	M	5	AA
	II-8	I-1	I-2	F	4	AS
	II-11	I-1	I-2	M	1	AS
Hb 8						
	I-1	-	-	M	52	AS

MNSs					ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II
M	N	S	s	Genótipo	A	B	D	C	c	E	e				
-	+			NN	+	-	+	-	+	+	-	+	1-1	1-1	1-1
+	+	+	+	MS/Ns	-	-	+	+	+	-	+	-	1-1	1-1	1-1
+	-			MM	-	+	+	+	-	-		-	2-2	1-1	1-1
+	+			MN	-	+	+	+	-	-		+	2-1	1-1	1-1
+	+			MN	-	+	+	+	-	-		-	2-2	1-1	1-1
-	+			NN	+	-	+	+	+	+	+	+	1-1	1-1	1-1
-	+	-	+	Ns/Ns	+	-	+	-	+	+	+	+	2-1	1-1	1-1
+	+			MN	+	-	+	+	-	-	+	-	2-2	1-1	1-1
-	+			NN	+	-	+	+	+	+	+	+	2-1	1-1	1-1
-	+			NN	-	-	+	+	+	-	+	+	2-2	1-1	1-1
-	+			NN	+	-	+	+	+	-	+	+	2-2	1-1	1-1
+	+			MN	+	-	+	+	+	-	+	+	2-2	1-1	1-1
+	+			MN	+	-	+	+	+	-	+	-	2-2	1-1	1-1
-	+			NN	+	-	+	+	+	+	+	-	2-1	1-1	1-1
-	+	+	+	NS/Ns	-	-	+	-	+	-	+	-	2-1	1-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

Geneal.	Indivíduo	Pai	Mãe	Sexo	Id.	Hb
Hb 8						
	I-2	-	-	F	45	AA
	II-2	I-1	I-2	M	24	AS
	II-3	-	-	F	26	AA
	II-4	I-1	I-2	M	21	AS
	II-6	I-1	I-2	M	15	AA
	II-7	I-1	I-2	F	14	AA
	II-8	I-1	I-2	M	13	AS
	II-9	I-1	I-2	F	10	AA
	II-10	I-1	I-2	M	8	AS
	II-11	I-1	I-2	M	4	AS
	II-12	I-1	I-2	M	2	AS
	III-1*	II-2	II-3	F	3	AA
Hb 9						
	I-3	-	-	M	46	AA
	I-4	-	-	F	38	AA
	II-6*	I-3	I-4	F	9	AS
	II-7	I-3	I-4	M	4	AA
	II-8	I-3	I-4	M	3	AA

MNSs					ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II
M	N	S	s	Genótipo	A	B	D	C	c	E	e				
-	+	-	+	Ns/Ns	-	-	+	+	+	-	+	-	2-1	2-1	1-1
		+	+	Ss	-	-	+	+	+	-	+	-	2-2	1-1	1-1
+	-	-	+	Ms/Ms	-	-	+	-	+	+	-	-	2-1	1-1	1-1
		-	+	ss	-	-	+	+	+	-	+	-	-	2-1	1-1
		+	+	Ss	-	-	+	+	+	-	+	-	1-1	2-1	1-1
		+	+	Ss	-	-	+	+	+	-	+	-	1-1	1-1	1-1
		+	+	Ss	-	-	+	-	+	-	+	-	-	1-1	1-1
		-	+	ss	-	-	+	-	+	-	+	-	2-1	1-1	1-1
		-	+	ss	-	-	+	-	+	-	+	-	2-1	1-1	1-1
		-	+	ss	-	-	+	+	+	-	+	-	2-1	1-1	1-1
		+	+	Ss	-	-	+	-	+	-	+	-	1-1	2-1	1-1
+	-	-	+	Ms/Ms	-	-	+	+	+	-	+	-	2-1	1-1	1-1
-	+			NN	-	-	+	-	+	-	+	-	2-1	1-1	1-1
+	+			MN	-	+	+	-	+	-	+	+	2-2	1-1	1-1
+	+			MN	+	+	+	-	+	-	+	+			
													2-1	1-1	1-1
													2-2	1-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

<u>Geneal.</u>	<u>Indivíduo</u>	<u>Pai</u>	<u>Mãe</u>	<u>Sexo</u>	<u>Id.</u>	<u>Hb</u>
Hb 10						
	I-1	-	-	M	50	AA
	I-2	-	-	F	46	AS
	II-1	I-1	I-2	M	27	AS
	II-2	-	-	F	29	AA
	II-4	I-1	I-2	M	19	AA
	II-5	I-1	I-2	M	13	AA
	II-6	I-1	I-2	F	12	AS
	II-7	I-1	I-2	M	8	AA
	III-1	II-1	II-2	M	2	AA
Hb 11.						
	I-1	-	-	M	46	AS
	I-2	-	-	F	46	AA
	II-2	I-1	I-2	M	22	AS
	II-3	-	-	F	20	AA
	II-4	I-1	I-2	F	20	AS
	II-7	I-1	I-2	M	17	AS
	II-5	I-1	I-2	F	14	AS
	II-8	I-1	I-2	F	7	AA

MNSs					ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II
M	N	S	s	Genótipo	A	B	D	C	c	E	e				
													2-1	1-1	1-1
+	-	+	-	MS/MS	-	-	+	+					2-1	1-1	1-1
+	+			MN	-	-	+	+	+	-	+	+	2-1	1-1	1-1
-	+			NN	+	-	+	+	-	+	+	-	2-2	1-1	1-1
													2-1	1-1	1-1
													2-1	1-1	1-1
													2-2	1-1	1-1
													2-1	1-1	1-1
-	+			NN	+	-	+	+	-	+	+	+			
+	-	-	+	Ms/Ms									2-1	1-1	1-1
													2-2	2-1	1-1
+	-	+	+	MS/Ms	+	-	+	-	+	-	+	-	2-2	2-1	1-1
		-	+	ss	+	-	+	+	-	-		+	2-1	1-1	1-1
													2-2	1-1	1-1
													2-1		
+	-			MM	+	-	+	-	+	-	+	+	2-1	2-1	1-1
													2-1	1-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

<u>Geneal.</u>	<u>Indivíduo</u>	<u>Pai</u>	<u>Mãe</u>	<u>Sexo</u>	<u>Id.</u>	<u>Hb</u>
Hb 11						
	III-1	II-2	II-3	F	1	AS
	III-2	II-2	II-3	F	2m	AF
Hb 12						
	I-1	-	-	M	51	AS
	I-2	-	-	F	49	AA
	II-3	-	-	M	33	AA
	II-4	I-1	I-2	F	29	AS
	II-10	I-1	I-2	F	18	AA
	III-4	II-3	II-4	M	13	AA
	III-5	II-3	II-4	M	11	AA
	III-6	II-3	II-4	M	10	AS
	III-7	II-3	II-4	F	8	AS
	III-8	II-3	II-4	F	7	AS
	III-10	II-3	II-4	F	5	AA
	III-11	II-3	II-4	M	3	AA
Hb 13						
	I-1	-	-	M	52	AS
	I-2	-	-	F	47	AA

MNSs				Genótipo	ABO		Rh				Fy ^a	Hp	Es D	CA II	
M	N	S	s		A	B	D	C	c	E					e
		-	+	SS	+	-	+	+	+	-	+	+			
		+	+	Ss	+	-	+	+	+	-		-			
+	-	+	+	MS/Ms	-	-	+	-	+	-	+	-	2-1	2-1	1-1
		-	+	SS	-	+	+	+	-	-	+	+	2-1	2-1	1-1
		+	-	SS	+	-	+	+	+	-	+	-	2-2	2-1	1-1
+	-	+	+	MS/Ms	-	-	+	+	+	-	+	+	-	2-1	1-1
		-	+	SS	-	-	+	+	+	-	+	+	2-1	2-1	1-1
		+	+	Ss	+	-	+	+	+	-	+	+	2-1	2-1	1-1
		+	-	SS	+	-	+	+	+	-	+	-	2-1	1-1	1-1
		+	-	SS	+	-	+	-	+	-	+	-	2-1	1-1	1-1
		+	-	SS	+	-	+	+	+	-	+	-	-	1-1	1-1
		+	+	Ss	+	-	+	+	+	-	+	+		2-1	1-1
		+	-	SS	+	-	+	+	+	-	+	-	2-1	2-1	1-1
		+	+	Ss	+	-	+	+	+	-	+	-	2-1	2-1	1-1
+	+			MN	-	-	+	+	-	-	+	-	1-1	1-1	1-1
-	+			NN	+	-	+	+	+	-	+	-	1-1	2-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

Geneal.	Indivíduo	Pai	Mãe	Sexo	Id.	Hb	M	N
Hb 13								
	II-2	I-1	I-2	M	26	AA	-	+
	II-4	I-1	I-2	M	25	AS	-	+
	II-5	I-1	I-2	M	22	AA	+	+
	II-6	I-1	I-2	M	20	AA	+	+
	II-7	I-1	I-2	F	17	AA	+	+
	II-8	I-1	I-2	M	15	AS	+	+
	II-9	I-1	I-2	F	11	AS	-	+
	II-11	I-1	I-2	F	9	AA	-	+
	II-12	I-1	I-2	M	7	AS	+	+
Hb 14								
	I-2	-	-	F	?	AA		
	II-2	-	I-2	F	?	AA	+	+
	III-2	-	II-2	F	28	AS	-	+
	IV-1	-	III-2	M	10	AS		
	IV-4	-	III-2	M	5	AA		
Hb 15								
	I-2	-	-	F	?	AA		
	I-3	-	-	M	43	AS	+	+

MNSs		ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II
S	s	A	B	D	C	c	E	e				
	NN	+	-	+	+	+	-	+	-	1-1	2-1	1-1
	NN	-	-	+	+	-	-	+	-	1-1	1-1	1-1
	MN	-	-	+	+	+	-	+	-	1-1	2-1	1-1
	MN	+	-	+	+	+	-	+	-	1-1	2-1	1-1
	MN	-	-	+	+	-	-	+	-	1-1	2-1	1-1
	MN	+	-	+	+	-	-	+	-	1-1	1-1	1-1
	NN	+	-	+	+	-	-	+	-	1-1	1-1	1-1
	NN	-	-	+	+	-	-	+	-	1-1	2-1	1-1
	MN	-	-	+	+	+	-	+	-	1-1	2-1	1-1
										2-2	1-1	1-1
-	+	Ms/Ns								2-1	1-1	1-1
-	+	Ns/Ns								1-1	1-1	2-1
-	+	SS								2-1	1-1	1-1
-	+	SS								2-1	1-1	1-1
										2-1	1-1	1-1
	MN	+	-	+	-	+	+	+	-	2-1	1-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

Geneal.	Indivíduo	Pai	Mãe	Sexo	Id.	Hb	M	N
Hb 15								
	I-4	-	-	F	37	AC	-	+
	II-8	I-3	I-4	M	16	AS	+	+
	II-9	I-3	I-4	F	13	SC	-	+
	II-11	I-3	I-4	M	10	AS	-	+
	II-13	I-3	I-4	F	5	AS	+	+
	II-14	I-3	I-4	M	3	SC	-	+
	II-15	I-3	I-4	M	1	AS	+	+
Hb 16								
	I-4	-	-	M	52	AS	+	+
	I-5	-	-	F	41	AA	+	+
	II-3	-	-	M	?	AA		
	II-1	-	-	M	35	AA	+	+
	II-2	-	-	F	34	AS	+	+
	II-5	-	-	F	?	AA		
	II-8*	I-4	I-5	F	22	AA	-	+
	II-9	-	-	M	26	AA		
	II-10	I-4	I-5	F	20	AA	+	-
	II-12*	I-4	I-5	F	17	AA	+	+

MNSs		ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II	
S	s	A	B	D	C	c	E	e					
-	+	Ns/Ns	-	-	+	-	+	-	+	+	2-1	1-1	1-1
		MN	-	-	+	-	+	+	+	+	2-1	1-1	1-1
		NN	-	-	+	-	+	-	+	-	-	1-1	1-1
		NN	+	-	+	-	+	+	+	+	2-2	1-1	1-1
		MN	-	-	+	-	+	+	+	-	2-1	1-1	1-1
		NN	-	-	-	-	+	-	+	+	2-1	1-1	1-1
		MN	-	-	+	-	+	+	+	+			
-	+	Ms/Ns	-	-	+	+	+	+	+	+	2-2	1-1	1-1
-	+	Ms/Ns	-	-	+	+	-	-		-	1-1	2-1	1-1
											1-1	1-1	1-1
-	+	Ms/Ns	-	-	+	-	+	+	-	+	2-1	1-1	1-1
		MN	+	-	+	+	-	-	+	-			
											2-2	1-1	1-1
		NN	-	-	+	+	+	+	+	-	2-1	2-2	1-1
											1-1	1-1	1-1
		MM	-	-	+	+	-	-		-	2-1	1-1	1-1
		MN	-	-	+	+	-	-		-	1-1	1-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

<u>Geneal.</u>	<u>Indivíduo</u>	<u>Pai</u>	<u>Mãe</u>	<u>Sexo</u>	<u>Id.</u>	<u>Hb</u>
Hb 16						
	III-1	II-1	II-2	F	14	AA
	III-3	II-1	II-2	F	12	AS
	III-5	II-1	II-2	M	10	AA
	III-6	II-1	II-2	M	8	AA
	III-7	II-1	II-2	M	4	AS
	III-8	II-1	II-2	F	3	AS
	III-11	II-9	II-10	F	2	AA
	III-12	II-9	II-10	M	1	AA
Hb 17.						
	II-3	-	-	M	43	AA
	II-4	-	-	F	40	AS
	III-9	II-3	II-4	F	20	AA
	III-13	II-3	II-4	F	13	AA
	III-15	II-3	II-4	F	11	AS
	III-17	II-3	II-4	F	9	AS
	III-18	II-3	II-4	M	4	AA

MNSs					ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II
M	N	S	s	Genótipo	A	B	D	C	c	E	e				
+	+	-		Ms/Ns	+	-	+	+	+	+	+	+	1-1	1-1	1-1
+	+	-		Ms/Ns	+	-	+	+	+	+	+	-	1-1	1-1	1-1
+	-	+	+	MS/Ms	-	-	+	+	+	+	+	+	2-2	1-1	1-1
-	+	-	+	Ns/Ns	-	-	+	+	+	+	+	+	2-1	1-1	1-1
+	+	-		Ms/Ns	-	-	+	+	+	+	+	-	2-2	1-1	1-1
-	+	-		Ns/Ns	+	-	+	+	+	+	+	+	1-1	1-1	1-1
														1-1	1-1
+	-	+	+	MS/Ms									1-1	1-1	1-1
+	-	+	-	MS/MS									1-1	1-1	1-1
													1-1	1-1	1-1
													1-1	1-1	1-1
													1-1	1-1	1-1
													-	1-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

<u>Geneal.</u>	<u>Indivíduo</u>	<u>Pai</u>	<u>Mãe</u>	<u>Sexo</u>	<u>Id.</u>	<u>Hb</u>
Hb 18						
	0-2	-	-	F	?	AA
	I-2	-	0-2	F	52	AS
	I-3	-	-	M	44	AA
	I-4	-	0-2	F	48	AA
	I-5	-	-	M	42	AA
	I-6	-	0-2	F	37	AS
	I-7	-	-	M	33	AA
	I-8	-	0-2	F	30	AS
	II-5	-	-	M	36	AA
	II-6	-	I-2	F	34	AS
	II-3	-	I-2	M	30	AA
	II-7	-	I-2	M	28	AS
	II-8	-	-	F	29	AA
	II-13	I-3	I-4	M	24	AA
	II-16	I-3	I-4	M	17	AA
	II-19	I-5	I-6	M	15	AA
	II-20	I-5	I-6	F	14	AS
	II-21	I-5	I-6	M	9	AS

MNSs					ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II
M	N	S	s	Genótipo	A	B	D	C	c	E	e				
+	-	+	+	MS/Ms									2-1	1-1	1-1
+	+	-	+	Ms/Ns									2-1	1-1	1-1
													2-1	1-1	1-1
+	+	-	+	Ms/Ns									2-2	1-1	1-1
+	-	+	+	MS/Ms	-	-	+	+	+	-		+	2-2	1-1	1-1
+	+	+	+	Ms/NS	-	-	+	+	+	-		+	2-2	1-1	1-1
+	+	-	+	Ms/Ns	+	-	+	+	-	-			2-2	1-1	1-1
+	+	+	+	Ms/NS	-	-	+	+	+	-		+	2-2	1-1	1-1
+	-			MM	-	-	+	+	+	-		+	2-2	1-1	1-1
+	+	+	+	MS/Ns	-	-	+	+	-	-		+	2-1	1-1	1-1
+	+	-	+	Ms/Ns									2-2	1-1	1-1
+	-	+	+	MS/Ms	-	-	+	+	-	-		-	2-1	1-1	1-1
+	-	+	+	MS/Ms	-	-	+	+	+	-		-	2-2	2-1	1-1
													2-2	1-1	1-1
													2-1	1-1	1-1
+	-	-	+	Ms/Ms	-	-	+	-	+	-		+	2-2	1-1	1-1
+	+			MN	-	-	+	-	+	-		+	2-2	1-1	1-1
+	-			MM	-	-	+	+	+	-		+	2-2	1-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

<u>Geneal.</u>	<u>Indivíduo</u>	<u>Pai</u>	<u>Mãe</u>	<u>Sexo</u>	<u>Id.</u>	<u>Hb</u>
Hb 18						
	II-22	I-5	I-6	F	7	AA
	II-23	I-5	I-6	M	5	AA
	II-24	I-5	I-6	F	5	AS
	II-25	I-7	I-8	M	5	AS
	II-27	I-7	I-8	M	3	AA
	III-11	II-5	II-6	F	14	AS
	III-13	II-5	II-6	F	11	AS
	III-14	II-5	II-6	F	9	AA
	III-15	II-5	II-6	F	6	AA
	III-16	II-5	II-6	F	2m	AF
	III-17	II-7	II-8	F	5	AA
	III-18	II-7	II-8	F	3	AS
	III-19	II-7	II-8	F	2	AS
Hb 19						
	I-1	-	-	M	59	AS
	I-2	-	-	F	51	AA
	I-5	-	-	M	36	AA
	I-6	-	-	F	37	AA

MNSs					ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II
M	N	S	s	Genótipo	A	B	D	C	c	E	e				
+	+			MN	-	-	+	-	+	-	+	2-2	1-1	1-1	
+	+			MN	-	-	+	+	-	-	+	2-2			
+	+			MN	-	-	+	-	+	-	+	2-2	1-1	1-1	
+	+	-	+	Ms/Ns	-	-	+	+	-	-	+	-	1-1	1-1	
-	+	+	+	NS/Ns	+	-	+	+	-	-	+	-	1-1	1-1	
+	+			MN	-	-	+	+	+	-	+	2-2	1-1	1-1	
+	+			MN	-	-	+	+	-	-	+	2-2	1-1	1-1	
+	-			MM	-	-	+	+	-	-	+	2-2	1-1	1-1	
+	+			MN	-	-	+	+	+	-	+	2-1	1-1	1-1	
+	-			MM	-	-	+	+	+	-	+				
+	-	-	+	Ms/Ms	-	-	+	+	+	-	-	2-2	1-1	1-1	
+	-	+	+	MS/Ms	-	-	+	+	-	-	-	2-2	2-1	1-1	
+	-	+	+	MS/Ms	-	-	+	+	+	-	-	2-1	1-1	1-1	
+	+	-	+	Ms/Ns	+	-	+	+	+	-	-	2-1	2-1	1-1	
+	+	+	+	MS/Ns	-	-	+	-	+	-	-	2-2	1-1	1-1	
												2-2	1-1	2-1	
												2-2	1-1	1-1	

continua

Continuação do Apêndice 2.

<u>Geneal.</u>	<u>Indivíduo</u>	<u>Pai</u>	<u>Mãe</u>	<u>Sexo</u>	<u>Id.</u>	<u>Hb</u>
Hb 19						
	II-3	-	-	M	47	AA
	II-4	I-1	I-2	F	34	AA
	II-2	I-1	I-2	F	32	AS
	II-5	I-1	I-2	M	29	AA
	II-8	I-1	I-2	F	26	AS
	II-9	I-1	I-2	M	16	AS
	II-10	I-1	I-2	M	14	AS
	II-20	I-5	I-6	F	13	AA
	II-22	I-5	I-6	F	12	AA
	II-23	I-5	I-6	F	10	AA
	II-24	I-5	I-6	F	8	AA
	II-25	I-5	I-6	F	6	AA
	III-6	II-3	II-4	F	13	AA
	III-7	II-3	II-4	M	12	AA
	III-8	II-3	II-4	F	10	AA
	III-9	II-3	II-4	M	8	AA
	III-11	II-3	II-4	F	5	AA
	III-12	II-3	II-4	M	2	AA

MNSs					ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II
M	N	S	s	Genótipo	A	B	D	C	c	E	e				
													2-1	1-1	1-1
+	-			MM	+	-	+	-	+	-		-	2-2	1-1	1-1
+	-	+	+	MS/Ms	-	-	+	+	+	-		-	2-1	2-1	1-1
-	+			NN	+	-	+	-	+	-		-	2-1	1-1	1-1
+	-	+	+	MS/Ms	+	-	+	+	+	-		-	2-1	1-1	1-1
-	+			NN	+	-	+	+	+	-		-	2-1	1-1	1-1
+	-			MM	-	-	+	+	+	-		-	2-1	1-1	1-1
													2-2	1-1	2-1
													2-2	1-1	1-1
													2-2	1-1	2-1
													2-2	1-1	2-1
													2-2	1-1	1-1
													2-1	1-1	1-1
													2-2	1-1	1-1
													2-2	1-1	1-1
													2-1	1-1	1-1
													2-1	1-1	1-1
													2-2	1-1	1-1
													2-2	1-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

<u>Geneal.</u>	<u>Indivíduo</u>	<u>Pai</u>	<u>Mãe</u>	<u>Sexo</u>	<u>Id.</u>	<u>Hb</u>
Hb 19						
	III-1	-	II-2	F	15	AS
	III-3	-	II-2	M	12	AS
	III-5	-	II-2	F	8	AA
	III-16	-	II-8	F	7	AA
	III-17	-	II-8	F	5	AS
	III-18	-	II-8	F	3	AA
	III-19	-	II-8	M	2	AA
Hb 20						
	I-2	-	-	F	?	AS
	II-6	-	-	M	39	AA
	II-7	-	I-2	F	33	AS
	III-9	II-6	II-7	F	16	AA
	III-10*	II-6	II-7	F	8	AS
Hb 21						
	I-1	-	-	M	72	AS
	I-2	-	-	F	60	AA
	II-1	I-1	I-2	M	45	AA
	II-4	I-1	I-2	F	42	AA

MNSs					ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II
M	N	S	s	Genótipo	A	B	D	C	c	E	e				
+	-	+	+	MS/Ms	-	-	+	-	+	-	-	2-1	2-1	1-1	
+	+	-	+	Ms/Ns	-	+	+	+	+	-	-	2-1	2-1	1-1	
+	-	+	+	MS/Ms	-	-	+	+	+	-	-	2-2	1-1	1-1	
+	-	-	+	Ms/Ms	-	-	+	+	-	-	-	1-1	1-1	1-1	
+	-	-	+	Ms/Ms	+	-	+	+	-	-	+	2-1	1-1	1-1	
		-	+	ss	+	-	+	+	-	-	+	2-1			
		-	+	ss	+	-	+	+	-	-	-				
+	+	+	+	MN;Ss								2-1	1-1	2-1	
+	-	-	+	Ms/Ms	+	-	-	-	+	-	+	2-2	2-1	1-1	
-	+	+	+	NS/Ns	-	-	+	+	+	-	-	2-1	1-1	1-1	
+	+	-	+	Ms/Ns	+	-	+	-	+	-	+	2-1	1-1	1-1	
+	+	+	-	MS/NS	+	-	+	-	+	-	+	2-2	1-1	1-1	
+	+	-	+	Ms/Ns	-	+	-	-	+	-	+	2-1	1-1	1-1	
+	+	+	+	MS/Ns	-	-	+	+	-	-	+	2-1	1-1	1-1	
-	+	-	+	Ns/Ns	-	+	+	+	+	-	+	2-1	1-1	1-1	
+	-			MM	-	+	+	+	+	-	+	1-1	1-1	1-1	

continua

Continuação do Apêndice 2.

<u>Geneal.</u>	<u>Indivíduo</u>	<u>Pai</u>	<u>Mãe</u>	<u>Sexo</u>	<u>Id.</u>	<u>Hb</u>
Hb 21						
	II-5	I-1	I-2	M	39	AS
	II-6	-	-	F	27	AA
	II-8	I-1	I-2	F	37	AA
	II-10	I-1	I-2	F	35	AA
	II-11	I-1	I-2	M	33	AS
	II-12	-	-	M	?	AA
	II-13	I-1	I-2	F	29	AS
	II-16	I-1	I-2	M	24	AS
	II-18	I-1	I-2	F	21	AA
	II-20	I-1	I-2	F	19	AS
	III-12	II-5	II-6	F	7	AS
	III-13	II-5	II-6	F	5	AS
	III-19	II-12	II-13	F	5	AA
	III-20	II-12	II-13	F	3	AS
Hb 22						
	I-2	-	-	F	55	AS
	II-3	-	I-2	F	27	AA
	II-6	-	I-2	F	23	AA

MNSs					ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II
M	N	S	s	Genótipo	A	B	D	C	c	E	e				
+	+	+	+	MS/Ns	-	-	+	+	+	-	+	+	2-1	1-1	1-1
+	+	+	+	Ms/NS	-	-	+	+	+	+	+	-	1-1	1-1	1-1
+	+	-	+	Ms/Ns	-	-	+	+	+	-		+	2-2	1-1	1-1
-	+			NN	-	+	+	+	+	-		+	2-1	1-1	1-1
-	+			NN	-	+	+	+	+	-	+	+	2-2	1-1	1-1
+	-			MM	-	-	-	-	+	-		+	2-1	2-1	1-1
+	+	-	+	Ms/Ns	-	+	+	+	+	-		+	1-1	1-1	1-1
+	-			MM	-	-	+	+	+	-		+	2-1	1-1	1-1
-	+			NN	-	-	+	+	+	-		+	2-1	1-1	1-1
+	+	-	+	Ms/Ns	-	+	+	+	+	-		+	2-2	1-1	1-1
+	+	+	-	MS/NS	-	-	+	+	+	-		+	2-1	1-1	1-1
-	+	+	+	NS/Ns	-	-	+	+	-	-		+	1-1	1-1	1-1
+	-			MM	-	-	-	-	+	-		+	1-1	2-1	1-1
+	+			MN	-	-	+	+	+	-		+	2-1	1-1	1-1
+	+			MN									2-1	1-1	1-1
-	+			NN									2-1	1-1	1-1
-	+			NN									2-2	1-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

<u>Geneal.</u>	<u>Indivíduo</u>	<u>Pai</u>	<u>Mãe</u>	<u>Sexo</u>	<u>Id.</u>	<u>Hb</u>
Hb 22						
	II-7	-	I-2	F	20	AS
	II-11	-	I-2	M	12	AA
	II-12	-	I-2	M	9	AS
	III-3	-	II-3	M	5	AA
Hb 23						
	I-2	-	-	F	58	AA
	II-1	-	-	M	40	AS
	II-2	-	I-2	F	40	AS
	II-3	-	I-2	M	39	AA
	II-4	-	-	F	26	AA
	II-5	-	I-2	M	36	AA
	II-6	-	I-2	M	35	AA
	II-16	-	-	F	25	AA
	II-7	-	-	M	34	AA
	II-8	-	I-2	F	29	AS
	II-10	-	-	M	39	AA
	II-11	-	I-2	F	26	AS
	II-12	-	I-2	M	24	AS

MNSs				ABO	Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II	
M	N	S	s	Genótipo	A	B	D	C	c					E
+	+			MN								2-1	1-1	1-1
+	-			MM								2-2	1-1	1-1
+	-			MM								2-2	1-1	1-1
												2-1	1-1	1-1
-	+	+	+	NS/Ns								2-1	2-1	2-1
+	+			MN	-	+	+	+	+	-	+	2-1	1-1	1-1
-	+	-	+	Ns/Ns	-	-	+	-	+	+	+	2-1	1-1	2-1
		+	-	SS								1-1	1-1	2-1
												1-1	1-1	1-1
-	+	-		Ns/Ns								2-2	2-1	2-1
-	+	-	+	Ns/Ns	-	-	+	-	+	+	+	2-1	2-1	1-1
+	+			MN	+	-	+	+	+	-		2-1	1-1	1-1
		+	+	Ss	-	+	+	-	+	+	+	2-1	2-1	1-1
-	+	+	+	NS/Ns	-	-	+	-	+	+	+	1-1	1-1	1-1
		-	+	ss	-	-	+	-	+	-	+	2-2	1-1	1-1
-	+	+	+	NS/Ns	-	-	+	-	+	+	+	1-1	2-1	2-1
-	+	-	+	Ns/Ns								-	2-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

<u>Geneal.</u>	<u>Indivíduo</u>	<u>Pai</u>	<u>Mãe</u>	<u>Sexo</u>	<u>Id.</u>	<u>Hb</u>
Hb 23						
	II-13	-	I-2	M	19	AS
	II-14	-	I-2	F	18	AA
	II-15	-	I-2	M	16	AA
	III-2	II-1	II-2	F	15	AS
	III-3	II-1	II-2	M	11	AA
	III-4	II-1	II-2	M	9	AS
	III-5	II-1	II-2	M	8	SS
	III-6	II-1	II-2	M	7	AS
	III-7	II-1	II-2	F	6	AA
	III-8	II-1	II-2	F	3	SS
	III-9	II-1	II-2	F	2	AS
	III-10	II-3	II-4	F	9	AA
	III-11	II-3	II-4	M	8	AA
	III-12	II-3	II-4	M	5	AA
	III-23	II-6	II-16	M	6	AA
	III-13	II-7	II-8	F	7	AS
	III-14	II-7	II-8	F	6	AA
	III-15	II-7	II-8	F	1	AS

MNSs					ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II
M	N	S	s	Genótipo	A	B	D	C	c	E	e				
-	+	+	+	NS/Ns									1-1	2-1	1-1
-	+	+	-	NS/NS									2-2	2-1	1-1
-	+	-	+	Ns/Ns									2-1	2-1	2-1
-	+			NN	-	-	+	+	+	+	+	+	1-1	1-1	1-1
-	+			NN	-	+	+	+	+	+	+	+	2-1	1-1	1-1
+	+			MN	-	-	+	+	+	+	+	+	1-1	1-1	1-1
+	+				-	+	+								
-	+			NN	-	-	+	+	+	-		+	2-1	1-1	1-1
+	+			MN	-	-	+	+	+	+	+	+	2-1	1-1	2-1
+	+	-	+	Ms/Ns	-	+	+	+	+	-		+	-	1-1	2-1
+	+			MN	-	-	+	+	+	+	+	+	2-1	1-1	2-1
													1-1	1-1	2-1
													1-1	1-1	1-1
+	+			MN	+	-	+	+	+	+			2-1	1-1	1-1
		-	+	SS	-	+	+	-	+	+	+	-	2-1	2-1	1-1
		-	+	SS	-	+	+	-	+	+	-	-	2-1	1-1	1-1
		-	+	SS	-	-	+	-	+	+	+	-	2-1	1-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

<u>Geneal.</u>	<u>Indivíduo</u>	<u>Pai</u>	<u>Mãe</u>	<u>Sexo</u>	<u>Id.</u>	<u>Hb</u>
Hb 23						
	III-16	II-7	II-8	M	4m	AS
	III-19	II-10	II-11	F	5	AS
	III-20	II-10	II-11	M	3	AS
	III-21	II-10	II-11	F	3m	AS
Hb 24						
	0-2	-	-	F	63	AS
	I-1	-	-	M	36	AA
	I-2	-	0-2	F	36	AS
	I-3	-	0-2	M	33	AA
	I-4	-	0-2	M	28	AS
	II-3	I-1	I-2	F	13	AA
	II-4	I-1	I-2	M	12	AS
	II-6	I-1	I-2	M	7	AS
Hb 25						
	I-2	-	-	F	32	AS
	II-1	-	I-2	F	15	AS
	II-3	-	I-2	F	10	AS

MNSs				Genótipo	ABO		Rh				Fy ^a	Hp	Es D	CA II	
M	N	S	s		A	B	D	C	c	E					e
		+	-	SS	-	+	+	-	+	+	-	-	1-1		
		-	+	ss	-	-	+	-	+	+		+	2-1	1-1	1-1
		-	+	ss	-	-	+	-	+	+		+	2-1		
		-	+	ss	-	-	+	-	+	+		+	2-1		
+	-	-	+	Ms/Ms									2-1	1-1	1-1
-	+	+	+	NS/Ns	-	-	+	+	-	-		-	2-1	1-1	2-1
+	-	+	+	MS/Ms	-	-	+	+	+	-		-	2-2	1-1	1-1
+	-	-	+	Ms/Ms									1-1	1-1	1-1
		-	+	ss									2-2	1-1	1-1
+	+	+	+	MN, Ss	-	-	+	+	+	-		-	2-2	1-1	2-1
+	+	+	+	MN, Ss	-	-	+	+	+	-		-	2-1	1-1	1-1
+	+	+	-	MS/NS	-	-	+	+	-	-		-	2-1	1-1	1-1
+	-	-	+	Ms/Ms									2-1	1-1	1-1
													2-1	1-1	1-1
													2-1	1-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

Geneal.	Indivíduo	Pai	Mãe	Sexo	Id.	Hb
Hb 26						
	I-1	-	-	M	50	AA
	I-2	-	-	F	46	AS
	II-1	I-1	I-2	M	28	AA
	II-14	-	-	F	22	AA
	II-2*	I-1	I-2	M	27	AS
	II-15	-	-	F	23	AA
	II-3	I-1	I-2	F	24	AA
	II-4	I-1	I-2	F	20	AS
	II-7	I-1	I-2	M	17	AA
	II-8	I-1	I-2	M	16	AS
	II-9	I-1	I-2	M	14	AS
	II-10	I-1	I-2	M	12	AS
	II-11	I-1	I-2	M	8	AA
	II-12	I-1	I-2	M	7	AS
	II-13	I-1	I-2	M	5	AA
	III-1	II-1	II-14	F	5	AA
	III-2	II-1	II-14	F	4	AA
	III-3	II-1	II-14	M	3	AA

MNSs					ABO	Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II
M	N	S	s	Genótipo	A	B	D	C	c	E				
+	-	+	-	MS/MS	-	+	+	-	+	-	-	2-1	1-1	1-1
+	+	+	+	MS/Ns	-	+	-	-	+	-	+	2-2	1-1	1-1
+	-			MM	-	+	+	-	+	-	-	2-2	1-1	1-1
-	+			NN	-	-	+	+	+	-		2-1	1-1	1-1
+	+	+	+	MS/Ns	-	+	+	+	+	-	-	-	2-1	1-1
+	+	-	+	Ms/Ns	+	-	+	+	+	+	+	2-2	2-1	1-1
+	-			MM	-	-	-	-	+	-	+	2-1	1-1	1-1
+	+			MN	-	+	-	-	+	-	-	2-1	1-1	1-1
+	+			MN	-	+	+	-	+	-	+	2-2	1-1	1-1
+	+			MN	-	+	-	-	+	-	+	2-1	1-1	1-1
+	+			MN	-	+	-	-	+	-	-	2-1	1-1	1-1
+	-	+	-	MS/MS	-	-	-	-	+	-	+	2-1	1-1	1-1
+	+	+	+	MS/Ns	-	+	-	-	+	-	+	2-2	1-1	1-1
+	-	+	-	MS/MS	-	+	+	-	+	-	-	-	1-1	1-1
+	+	+	+	MS/Ns	-	+	+	-	+	-	+	2-1	1-1	1-1
+	+			MN	-	+	+	+	+	-		2-2	1-1	1-1
+	+			MN	-	-	+	+	+	-		2-1	1-1	1-1
+	+			MN	-	+	+	+	+	-		2-2	1-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

Geneal.	Indivíduo	Pai	Mãe	Sexo	Id.	Hb
Hb 28						
	I-1	-	-	M	61	AA A ₂ A ₂
	I-2	-	-	F	65	AS A ₂ B ₂
	I-3	-	-	M	35	AS
	I-4	-	-	F	38	AS
	II-1	I-1	I-2	M	41	AA A ₂ B ₂
	II-2	I-1	I-2	M	39	AS A ₂ A ₂
	II-3	-	-	F	36	AA
	II-4	I-1	I-2	F	36	AS A ₂ A ₂
	II-6	I-1	I-2	F	30	AA A ₂ B ₂
	II-7	I-1	I-2	F	27	AA A ₂ B ₂
	II-8	I-1	I-2	F	25	AS A ₂ A ₂

MNSs					ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II
M	N	S	s	Genótipo	A	B	D	C	c	E	e				
+	+	-	+	Ms/Ns	+	-	+	+	+	+			1-1	1-1	2-1
+	+	-	+	Ms/Ns	-	-	+	-	+	-			2-1	1-1	1-1
-	+	-	+	Ns/Ns	-	-	+	+	+	-			2-2	1-1	1-1
+	+			MN	+	-	+	-	+	-			2-1	1-1	1-1
+	+			MN	+	-	+	-	+	+			1-1	1-1	2-1
-	+	-	+	Ns/Ns	-	-	+	+	+	-			1-1	1-1	2-1
+	-			MM	-	-	+	-	+	-			1-1	2-1	1-1
-	+			NN	-	-	+	-	+	+			2-1	1-1	1-1
+	+			MN	-	-	+	+	+	-			2-1	1-1	2-1
+	+			MN	-	-	+	-	+	-			2-1	1-1	2-1
+	-			MM	+	-	+	+	+	-			2-1	1-1	1-1

continua

Continuação do Apêndice 2.

<u>Geneal.</u>	<u>Indivíduo</u>	<u>Pai</u>	<u>Mãe</u>	<u>Sexo</u>	<u>Id.</u>	<u>Hb</u>
Hb 28						
	II-9	I-1	I-2	M	23	AA A ₂ B ₂
	II-10	I-1	I-2	M	21	AA A ₂ B ₂
	II-11	I-3	I-4	F	13	AS
	II-12	I-3	I-4	F	11	SS
	II-13	I-3	I-4	F	10	AS
	II-14	I-3	I-4	F	9	SS
	II-16	I-3	I-4	M	5	AS
	II-17	I-3	I-4	F	3	SS
	II-18	I-3	I-4	M	1	AS
	III-1	II-2	II-3	F	14	AS
	III-2	II-2	II-3	M	12	AS
	III-3	II-2	II-3	F	10	AA
	III-4	II-2	II-3	F	7	AS

MNSs				ABO		Rh					Fy ^a	Hp	Es D	CA II	
M	N	S	s	Genótipo		A	B	D	C	c					E
-	+			NN		+	-	+	+	+	-		2-1	1-1	1-1
+	+			MN		+	-	+	-	+	-		1-1	1-1	2-1
+	+			MN		-	-	+	-	+	-		2-2	1-1	1-1
-	+			NN		-	-	+	-	+	-		-	1-1	1-1
+	+			MN		-	-	+	-	+	-		2-2	1-1	1-1
+	+			MN		+	-	+	+	+	-		-	1-1	1-1
+	+			MN		+	-	+	-	+	-		2-1	1-1	1-1
+	+			MN		-	-	+	+	+	-		-	1-1	1-1
+	+			MN		+	-	+	+	+	-		2-2	1-1	1-1
+	+			MN		-	-	+	-	+	-		1-1	1-1	1-1
+	+			MN		-	-	+	-	+	-		1-1	1-1	2-1
+	+			MN		-	-	-	+	+	-		1-1	1-1	2-1
+	+			MN		-	-	-	+	+	-		1-1	2-1	1-1

FICHA PARA AVERIGUAÇÃO DE DADOS FAMILIARES

Projeto Hb:MN

Endereço: _____ Informante: _____ F: _____ Nº _____

Família: _____ Marido: _____ Esposa: _____

Local em que se casaram: _____ Estado: _____ Data: _____

Quantas vezes a esposa casou: _____ O marido: _____ Cohabit.: _____ Separ.: _____

	CÔR	DATA NASC.	PROF.	INSTR.	LOCAL/EST. NASC.	NATURAL. PAI/MÃE	IDADE CASAM.	IDADE FALEC.	IDADE ATUAL	F
ESPOSA										
MARIDO										

Quantos filhos nasceram vivos: _____ Vivos agora: _____ Mortos: _____ Total: _____

Nº	SEXO	NOME	IDADE ATUAL	LOCAL NASC.	LOCAL RESID.	IDADE MORTE	CAUSA	EST. CIVIL	F
01									
02									
03									
04									
05									
06									
07									
08									
09									
10									

	Nº	ENTRE OS FILHOS	IDADE	SEXO	CAUSA
ABORTOS					
NATIMORTOS					

Outras anomalias e filhos em que ocorreram: _____

Defeitos iguais ou diferentes nos parentes: _____

Gêmeos: (sexo): _____ Prematuros (idade): _____

Parentesco entre marido e mulher: _____ Parentesco entre pai e mãe da esposa: _____ Parentesco entre pai e mãe do marido: _____

Algum filho ou filha se casou com parente: _____ Parentesco: _____

Número de pessoas que vivem na casa: _____ Nº de cômodos da casa: _____

DATA: _____ AVER.: _____ CONF.: _____ NSE: _____