

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

WELLINGTON DOS SANTOS SILVA

**POLIMORFISMOS DE DNA NO COMPLEXO DE GENES DA BETA-
GLOBINA EM INDIVÍDUOS NORMAIS E PORTADORES DE
HEMOGLOBINOPATIAS DO RECÔNCAVO BAIANO**

**BRASÍLIA
2007**

WELLINGTON DOS SANTOS SILVA

**POLIMORFISMOS DE DNA NO COMPLEXO DE GENES DA BETA-
GLOBINA EM INDIVÍDUOS NORMAIS E PORTADORES DE
HEMOGLOBINOPATIAS DO RECÔNCAVO BAIANO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Patologia Molecular da
Universidade de Brasília, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor
em Patologia Molecular, área de
concentração: Genética.**

Orientador: Prof. Doutor Cesar Koppe Grisolia

**BRASÍLIA
2007**

WELLINGTON DOS SANTOS SILVA

**POLIMORFISMOS DE DNA NO COMPLEXO DE GENES DA BETA-
GLOBINA EM INDIVÍDUOS NORMAIS E PORTADORES DE
HEMOGLOBINOPATIAS DO RECÔNCAVO BAIANO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Patologia Molecular da
Universidade de Brasília, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor
em Patologia Molecular, área de
concentração: Genética.**

Aprovada em ___/___/___

Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia – Presidente
Departamento de Genética e Morfologia – IB/UnB

Profa. Dra. Andrea Barretto Motoyama
Faculdade de Ciências da Saúde – UnB

Profa. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira
Departamento de Genética e Morfologia – IB/UnB

Profa. Dra. Gilvania Coutinho Silva Feijó
Campos de Planaltina – UnB

Prof. Dr. Luzitano Brandão Ferreira
Centro de Ensino Unificado de Brasília - CEUB

Profa. Dra. Zulmira Marques Guerrero Lacava – suplente
Departamento de Genética e Morfologia – IB/UnB

S584p Silva, Wellington dos Santos
Poliformismos de DNA no complexo de genes da Beta Globina em
indivíduos normais e portadores de hemoglobinopatias do Recôncavo Baiano /
Wellington dos Santos Silva. – Brasília, 2007
134 f. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina -
Brasília, 2007

Orientação: Dr. Cesar Koppe Grisolia

1. Polimorfismos de DNA. 2. Haplótipos da Beta Globina. 3.
Hemoglobinopatias. 4. Genética de populações – Recôncavo baiano.
I. Orientador. II. Universidade. Dep. III. Título.

CDD 575.15

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por mais esta conquista;

Ao Prof. Cesar Grisolia e à Prof. Nazaré Klautau, pela inestimável ajuda e orientação;

À minha esposa, Liliane e minhas filhas, Isabelle e Danielle, pelo amor paciência e encorajamento;

Ao Dr. Ruy Vieira, senhora Jandira (*in memorian*) e senhora Vanda, pela hospitalidade e o carinho demonstrado durante a minha estada em Brasília;

À Universidade de Brasília e à Faculdade Adventista da Bahia, pelo apoio concedido para o desenvolvimento desta pesquisa;

Aos colegas da Faculdade Adventista da Bahia: Alex, Cristina, Sacha, Vânia Hirle e tantos outros, pela valiosa ajuda prestada em algum momento deste trabalho;

À Dra. Cláudia Bonini, ao Fabian e amigos do Laboratório de Hemoglobinopatias da UNESP de São José do Rio Preto (SP), pela inestimável colaboração.

Aos professores, funcionários e colegas do Laboratório de Genética da UnB, pela amizade e colaboração direta e indireta no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Dr. Angel Luiz Hernandez Lastra, médico hematologista, diretor do Hemocentro do Hospital de Santo Antônio de Jesus e médico no Hospital Pediátrico de Cruz das Almas, pelo acompanhamento dos pacientes;

À minha família sangüínea, pelo carinho e amor inigualáveis, e minha família espiritual, pelas orações em meu favor e que, por certo, foram atendidas;

Por fim, meus sinceros agradecimentos aos moradores do Recôncavo Baiano, gente humilde e batalhadora, que traz no seu genoma e na sua cultura uma história rica e bela.

...Deus decepção, Deus na cor que eu não queria,
Deus cara a cara, face a face, sem aquela
imponente classe. Deus simples! Deus negro!
Deus negro? Meu Deus você é negro, que
desilusão!... Deus pregaram você na cruz e você
me pregou uma peça. Eu me esforcei à beça em
tantas coisas, e cheguei até a pensar em amor, mas
nunca, nunca pensei em adivinhar sua cor.

Trechos do poema “Deus Negro” de Neimar de Barros.

RESUMO

Um complexo de genes localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5) conhecido como complexo de genes da β -globina apresenta um elevado número de polimorfismos. A combinação de determinado número de polimorfismos é denominada haplótipo. Seis polimorfismos de restrição no complexo de genes da β -globina (*HincII-5'* ϵ , *HindIII-G* γ , *HindIII-A* γ , *HincII- $\psi\beta$ 1*, *HincII-3' $\psi\beta$ 1* e *Hinfl 5'* β) foram analisados em três populações do Recôncavo Baiano, sendo duas da zona urbana nos municípios de Cachoeira e Maragojipe e um quilombo na zona rural do município de Cachoeira totalizando 114 indivíduos. O estudo baseou-se principalmente na distribuição de haplótipos constituídos por cinco sítios de restrição situados a 5' do gene δ . O número de haplótipos diferentes encontrados nas populações variou de dez a treze, apresentando valores da diversidade haplotípica maiores do que o observado nas populações parentais. Os haplótipos 2 (+ - - -), 3 (- - - +), 4 (- + - +) e 6 (- + + -) ligados aos cromossomos β^A foram os mais comuns, e dois haplótipos privados foram encontrados na população de Maragojipe, os haplótipos 9 (- + + +) e 14 (+ + - -). Os Outros haplótipos identificados (1, 5, 9, 11, 12, 13, 14 e 16) apresentaram freqüências menores. Tanto a análise dos sítios de restrição quanto dos haplótipos deles derivados demonstrou homogeneidade entre as populações. Os níveis de endogamia para os haplótipos foram superiores aos dos sítios de restrição. Um grupo de trinta e dois pacientes com hemoglobinopatias foi também analisado (17 Hb.SS, 12 Hb.SC e 03 Hb.CC). Os resultados clínicos do grupo revelaram crises algicas como a característica predominante, colelitíase, eosinofilia, asplenia funcional em adultos falcêmicos, trombose retiniana e úlcera cutânea de maléolo. Quarenta e cinco por cento dos pacientes Hb.SC apresentaram hepatomegalia e houve diferença significativa nos níveis de lactato sangüíneo entre os pacientes Hb.SC e Hb.SS, sendo maior no último grupo. A distribuição haplotípica entre as amostras e o grupo de pacientes revelou uma associação não aleatória entre os dois grupos. Os haplótipos β^S predominantes foram o BEN e o CAR com freqüências de 52,9 e 32,5%, respectivamente, nos pacientes Hb.SS. Nos cromossomos β^C foram observados os haplótipos tipos I e II com freqüências de 55,5 e 44,5%, respectivamente. A freqüência maior do haplótipo BEN está de acordo com os registros históricos para a população do estado da Bahia, mas difere da população de Salvador que apresentou freqüências semelhantes para os haplótipos CAR e BEN provavelmente devido a migrações internas de afro descendentes oriundos de outras regiões do País.

Palavras-chave: Haplótipos. Beta-globina. Hemoglobinopatias. Recôncavo Baiano.

ABSTRACT

A cluster of globin genes is located on chromosome 11 near the β -globin gene. This region is referred to β -globin cluster region. DNA markers in the β -globin cluster region are highly variable. The combination of DNA markers observed on a particular chromosome form what is called a haplotype. Six restriction site polymorphisms in the β -globin gene cluster (*HincII*-5' ϵ , *HindIII*- γ^G , *HindIII*- γ^A , *HincII*- $\psi\beta 1$, *HincII*-3' $\psi\beta 1$ e *HinfI* 5' β) were analyzed in three populations from the Recôncavo region of Bahia, totaling 114 individuals. Two populations were from urban zones in the cities of Cachoeira and Maragojipe and the third was an afro-descendent population from the rural zone of the city of Cachoeira. The investigation was primarily based on the analysis of haplotypes generated by five restriction sites located in the 5' region of the δ -globin gene. The number of different haplotypes found in the populations varied between ten and thirteen, which represented higher diversity values than that observed in the parental populations. The haplotypes 2 (+ - - -), 3 (- - - +), 4 (- +- - +) and 6 (- + + - +) on the chromosomes β^A were the most common and two exclusive haplotypes, 9 (- + + + +) e 14 (+ + - - +) were found in the Maragojipe's population. The other haplotypes (1, 5, 9, 11, 12, 13, 14 e 16) presented lower frequencies. Restriction site analyses and the haplotypes derived thereafter demonstrated homogeneity between populations. The endogamy levels for haplotypes were higher than restriction sites. Additionally, a group of thirty two patients with hemoglobinopathies (17 sickle cell disease, 12 Hb.SC disease and 03 Hb.CC disease) was also analyzed. Clinical assessment of these patients demonstrated that pain crisis was the predominant trait, followed by colelithiasis, eosinophily, dysfunctional spleen in adults with sickle cell disease, retinal thrombosis and cutaneous ulcer of ankle. Forty-five percent of the patients with Hb.SC disease presented hepatomegaly and statistically significant lower levels of sanguine lactate when compared with patients with sickle cell disease. Haplotype frequencies were significantly different between the samples and the group of patients. In the sickle cell subgroup, the predominant haplotypes were BEN and CAR with frequencies of 52,9 and 32,5%, respectively. From the anthropological viewpoint it is interesting to note that the high frequency of the BEN haplotype is in accordance with the historical record for the population of the state of the Bahia. However, it differs from the population of Salvador (capital of that state), where similar frequencies for the CAR and BEN haplotypes are found, probably as a consequence of domestic slave trade and subsequent internal migrations of other regions of the Country.

Key words: Haplotypes. Beta-globin. Hemoglobinopathies. Recôncavo region of Bahia.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos Haplótipos da β -globina em 14 populações dos continentes africano, europeu e asiático.....	19
Tabela 2. Sequências dos iniciadores usados na reação de amplificação para confirmação das hemoglobinas Hb.S e Hb.C	40
Tabela 3. Sequências dos iniciadores e temperaturas de pareamento usadas para a amplificação dos haplótipos da β -globina.....	42
Tabela 4. Sequências dos iniciadores utilizados na reação de amplificação para determinação da Talassemia $\alpha^2 - 3,7$	43
Tabela 5. Frequências dos seis sítios de restrição da β -globina e das moléculas de Hb.....	54
Tabela 6. Distribuições genótípicas observadas para os sete <i>loci</i> analisados nas populações de Maragogipe, Cachoeira e Iguape.	57
Tabela 7. Número de heterozigotos e heterozigose observada (<i>Ho</i>) para os sete <i>loci</i> analisados nas populações de Maragogipe, Cachoeira e Iguape.	61
Tabela 8. Probabilidade obtida pelo teste exato (Guo e Thompson, 1992) para verificação de equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	63
Tabela 9. Probabilidade obtida pelo teste sensível à deficiência de heterozigotos.	63
Tabela 10. Probabilidade obtida pelo teste sensível ao excesso de heterozigotos.	64
Tabela 11. Desequilíbrio de Ligação entre os <i>loci</i> analisados considerando as três populações isoladamente e depois agrupando-as numa só população.	65
Tabela 12. Diversidade genética por locus para cada sítio de restrição e da molécula de Hb. em cada população.....	68
Tabela 13. <i>Fis</i> por locus e por população.	69
Tabela 14. Valores de <i>Fis</i> , <i>Fit</i> e <i>Fst</i> e intervalo de confiança de 95% e 99% para os pares de amostras e para o conjunto formado pelas três amostras analisadas.	69
Tabela 15. Diferenciação genotípica por locus para todos os pares de populações analisados. ...	71
Tabela 16. Diferenciação genotípica por locus para as três populações analisados.....	72
Tabela 17. Diferenciação genotípica de todos os <i>loci</i> para cada par de populações analisados e para o conjunto formado pelas três populações.....	72
Tabela 18. Frequências dos haplótipos β^A do <i>cluster</i> 5' da β -globina nas populações de Maragogipe, Cachoeira e Iguape.	77
Tabela 19. Distribuição genotípica dos haplótipos β^A do <i>cluster</i> 5' da β -Globina.....	79
Tabela 20. Probabilidade obtida para verificação de equilíbrio de Hardy-Weinberg dos haplótipos do <i>cluster</i> 5' da β -Globina.....	80
Tabela 21. Diversidade gênica e coeficiente de endogamia em cada população.	80
Tabela 22. Valores de <i>Fis</i> , <i>Fit</i> e <i>Fst</i> dos haplótipos do <i>cluster</i> 5' da β -Globina para os pares de populações e para o conjunto formado pelas três populações.....	81
Tabela 23. Diferenciação gênica e genotípica para os haplótipos do <i>cluster</i> 5' da β -Globina entre os pares de populações e o conjunto formado pelas três populações analisadas.....	83
Tabela 24. Dados hematológicos dos pacientes com hemoglobinopatias do Recôncavo Baiano. 85	
Tabela 25. Distribuição dos haplótipos dos cromossomos β^S e β^C nos pacientes com hemoglobinopatias.	86
Tabela 26. Distribuição dos genótipos dos haplótipos nos pacientes.....	86
Tabela 27. Distribuição dos genótipos para a deleção 3.7 kb da α - globina nos pacientes com hemoglobinopatias.	87

Tabela 28. Índices hematimétricos do paciente com anemia falciforme associada à Talassemia $\alpha^2 - 3,7$, seus pais e dois irmãos.	89
Tabela 29. Resultado dos leucogramas da família e do paciente com anemia falciforme associada à Talassemia $\alpha^2 - 3,7$	89
Tabela 30. Valores obtidos nas dosagens de bilirrubinas e ferritina do paciente com anemia falciforme associada à Talassemia $\alpha^2 - 3,7$	90
Tabela 31. Frequências de sítios de restrição no complexo gênico da β -Globina nas amostras analisadas e nas populações parentais.	92
Tabela 32. Taxa de incerteza total para inferir a fase dos haplótipos em cada método.	97
Tabela 33. Frequências dos haplótipos ligados aos cromossomos β^A nas amostras estudadas e populações parentais.	99
Tabela 34. Diversidade haplotípica do <i>cluster</i> da β – Globina nas populações do Recôncavo e parentais.	100
Tabela 35. Origens dos escravos africanos libertados em Salvador (BA) entre 1808 e 1884. ...	105
Tabela 36. Distribuição das frequências dos haplótipos β^S no Recôncavo Baiano e em outras populações brasileiras.	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama dos produtos tetraméricos das globinas α no cromossomo 16 e do grupo não α , no cromossomo 11 (adaptado do livro Fundamentos de Genética Médica de GELEHRTER e COLLINS, 1992).	13
Figura 2. O mecanismo mais comum de α talassemia, que se deve a deleções de um dos dois genes de α -globina em um cromossomo.	15
Figura 3. Representação do <i>cluster</i> de genes da β -globina	16
Figura 4. Relações filogenéticas entre os 16 haplótipos observados da β -globina.	20
Figura 5. Histórias evolutivas possíveis observadas entre os haplótipos da β -globina.	21
Figura 6. Haplótipos atípicos e os mecanismos envolvidos na sua formação.	27
Figura 7. Haplótipos dos cromossomos β^C .	30
Figura 8. Mapa do Recôncavo Baiano.	37
Figura 9. Ilustração mostrando como o algoritmo baesiano usa haplótipos indeterminados mais semelhantes aos haplótipos conhecidos.	47
Figura 10. Gel de agarose 1,5% mostrando os resultados da digestão dos fragmentos amplificados para os <i>loci</i> <i>Hind III</i> IVS-2 ^G γ e <i>Hinc II</i> $\psi\beta 1$.	53
Figura 11. Frequências alélicas - Locus <i>Hinc II</i> 5' ϵ .	55
Figura 12. Frequências alélicas - Locus <i>Hind III</i> IVS-2 ^G γ .	55
Figura 13. Frequências alélicas - Locus <i>Hind III</i> IVS-2 ^A γ .	55
Figura 14. Frequências alélicas - Locus <i>Hinc II</i> $\psi\beta 1$.	56
Figura 15. Frequências alélicas - Locus <i>Hinc II</i> 3' $\psi\beta 11$.	56
Figura 16. Frequências alélicas - Locus <i>Hinf I</i> 5'- β .	56
Figura 17. Frequências alélicas da Hemoglobina.	57
Figura 18. Distribuições Genotípicas - Locus <i>Hinc II</i> 5' ϵ .	59
Figura 19. Distribuições Genotípicas - Locus <i>Hind III</i> IVS-2 ^G γ .	59
Figura 20. Distribuições Genotípicas - Locus <i>Hind III</i> IVS-2 ^A γ .	59
Figura 21. Distribuições Genotípicas - Locus <i>Hinc II</i> $\psi\beta 1$.	60
Figura 22. Distribuições Genotípicas - Locus <i>Hinc II</i> 3' $\psi\beta 11$.	60
Figura 23. Distribuições Genotípicas - Locus <i>Hinf I</i> 5'- β .	60
Figura 24. Distribuições Genotípicas das Hemoglobinas A, S e C.	61
Figura 25. Taxa de recombinação do <i>cluster</i> da β -Globina estimada pelo Phase 2.1.1 utilizando o método que detecta presença de <i>hotspot</i> em região desconhecida.	74
Figura 26. Representação dos haplótipos do <i>cluster</i> 5' da β -globina dos indivíduos das populações, pacientes com hemoglobinopatias e portadores Hb.AS.	76
Figura 27. Distribuição dos haplótipos do <i>cluster</i> 5' da β -globina nas populações estudadas.	78
Figura 28. Gel de agarose apresentando a deleção $-\alpha^{3,7}$ para o grupo de pacientes.	87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 POLIMORFISMOS DE DNA NOS GENES DA β -GLOBINA	15
1.2 ESTUDOS EVOLUTIVOS DE POLIMORFISMOS DE DNA NO COMPLEXO DE GENES DA β -GLOBINA	17
1.3 FILOGENIA DOS HAPLÓTIPOS DO COMPLEXO DE GENES DA β -GLOBINA	18
1.4 FLUXO GÊNICO DA HB.S DA ÁFRICA PARA AS AMÉRICAS.....	21
1.5 HAPLÓTIPOS ATÍPICOS β^S	26
1.6 ORIGEM E DISPERSÃO DOS HAPLÓTIPOS LIGADOS À GLOBINA β^C	28
1.7 ASPÉCTOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM HEMOGLOBINOPATIAS	30
2 OBJETIVOS.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO DE ONDE FORAM OBTIDAS AS AMOSTRAS	35
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	36
3.3 ASPECTOS ÉTICOS.....	38
3.4 COLETA DE AMOSTRA BIOLÓGICA E ANÁLISES LABORATORIAIS E MOLECULARES.....	38
3.5 PREPARO DO HEMOLISADO, DETERMINAÇÃO DO PADRÃO ELETROFORÉTICO E QUANTIFICAÇÃO DAS HEMOGLOBINAS	38
3.6 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	39
3.7 CONFIRMAÇÃO DAS HEMOGLOBINAS VARIANTES HB.S E HB.C	40
3.8 ESQUEMA DE DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR E ANÁLISES DOS FRAGMENTOS NO GEL	40
3.9 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS LIGADOS AO GRUPO DE GENES DA GLOBINA <i>b</i>	41
3.10 DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	42
3.11 DETERMINAÇÃO DE TALASSEMIA α^2 (DELEÇÃO 3,7 KB).....	43
3.12 EXAMES COMPLEMENTARES DOS PACIENTES	44
3.13 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS.....	44
3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
3.14.1 Frequências dos sítios de restrição e dos haplótipos	48
3.14.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	48
3.14.3 Teste de Desequilíbrio de Ligação Entre os Pares de <i>Loci</i>	49
3.14.4 Diversidade Intra-populacional.....	50
3.14.5 Estatísticas F e Diversidade Inter-populacional.....	51
3.14.6 Teste Exato de Diferenciação Populacional	51
3.14.7 Cálculo de mistura étnica.....	52
4 RESULTADOS	53
4.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS E HETEROZIGOSE DOS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO E MOLÉCULAS DE HB.....	53
4.2 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG	62
4.3 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	62

4.4 DIVERSIDADE INTRA-POPULACIONAL	68
4.5 ESTATÍSTICAS F E DIVERSIDADE INTER-POPULACIONAL.....	68
4.6 TESTE DE DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL	71
4.7 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS E INTENSIDADE DE RECOMBINAÇÃO PARA OS SETE LOCI ANALISADOS.....	72
4.8 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS HAPLÓTIPOS DO CLUSTER 5'DA β -GLOBINA.....	74
4.9. RESULTADOS DOS CÁLCULOS DE MISTURA ÉTNICA	84
4.10. RESULTADOS DOS PACIENTES COM HEMOGLOBINOPATIAS	84
4.10.1 Manifestações clínicas, laboratoriais e moleculares de um paciente com Anemia Falciforme associada à Talassemia α^+	88
5 DISCUSSÃO.....	91
5.1 DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO NO COMPLEXO GÊNICO DA β – GLOBINA EM POPULAÇÕES DO RECÔNCAVO BAIANO E EM OUTRAS POPULAÇÕES	91
5.1.1 Equilíbrio De Hardy-Weinberg.....	93
5.1.2 Desequilíbrio De Ligação	93
5.1.3 Diversidade Intrapopulacional	94
5.1.4 Coeficiente De Endogamia E Diversidade Interpopulacional	95
5.1.5 Teste De Diferenciação Populacional	95
5.2 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS PARA OS SETE LOCI ANALISADOS.....	95
5.2.1 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS HAPLÓTIPOS DO <i>CLUSTER</i> 5'DA B-GLOBINA LIGADOS AOS CROMOSSOMOS β^A	98
5.3 RESULTADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM HEMOGLOBINOPATIAS	101
5.4 COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO HAPLOTÍPICA NOS PACIENTES COM OUTRAS POPULAÇÕES DO BRASIL.....	103
6 CONCLUSÕES.....	108
REFERÊNCIAS	111
APÊNDICES	119
I Lista de Haplótipos inferidos pelos métodos sem e com recombinação.	119
II Frequências dos haplótipos da β -globina nas populações de Maragogipe, Cachoeira e Iguape e do grupo de portadores da Hb.S (AS) com seus respectivos desvios, calculadas pelo programa PHASE 2.1.1 através do modo sem recombinação.....	126
III Frequências dos haplótipos da β -globina nas populações de Maragogipe, Cachoeira e Iguape e do grupo de portadores da Hb.S com seus respectivos desvios, calculadas pelo programa PHASE 2.1.1 através do modo variação na taxa de recombinação.....	128
IV Frequências dos haplótipos da β -globina nas populações de Maragogipe, Cachoeira e Iguape e dos portadores da Hb.S com seus respectivos desvios, calculadas pelo programa PHASE 2.1.1 através do modo hotspot de recombinação em região desconhecida.....	132
V Frequências dos haplótipos da β -globina nas populações de Maragogipe, Cachoeira e Iguape e dos portadores da Hb.S com seus respectivos desvios, calculads pelo programa PHASE 2.1.1 através do modo hotspot em posição conhecida (entre o 5 ^o e 6 ^o marcadores).....	136

VI	Frequências dos haplótipos do cluster 5' da β -globina em cromossomos β^A , β^S e β^C nas populações de Maragojipe, Cachoeira e Iguape, indivíduos portadores da Hb.S e nos pacientes com hemoglobinopatias e seus respectivos desvios. As frequências foram calculadas pelo programa PHASE 2.1.1 através do modo sem recombinação.....	140
	ANEXOS	142
	Lista de artigos utilizados para obtenção das frequências dos sítios de restrição e dos haplótipos β^A nas populações africana, européia e indígena.....	142

1 INTRODUÇÃO

Os genes que codificam as cadeias globínicas estão organizados em complexos multigênicos denominados *clusters*, localizados em dois diferentes cromossomos: o *cluster* α encontra-se no braço curto do cromossomo 16 (16p13.3) e inclui, além dos genes α (α_2 e α_1), um gene embrionário ζ , três pseudogenes (ζ_1 , α_2 e α_1), e um gene de função indeterminada (θ_1). Os genes α são duplicados e, apesar de apresentarem diferenças nas regiões intrônicas e na região 3' não codificante, produzem cadeias protéicas idênticas (KATTAMIS et al, 1996).

O *cluster* β está localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5) e inclui os genes ϵ , γ , δ e β , que produzem cadeias de 146 aminoácidos. Os genes γ , também duplicados, codificam cadeias que diferem exclusivamente no resíduo 136, de glicina para alanina, e por isso são denominados genes $^G\gamma$ e $^A\gamma$, respectivamente (VOGEL e MOTULSKY, 2000). A representação esquemática dos genes de cadeias globínicas e seus respectivos produtos encontram-se na Figura 1.

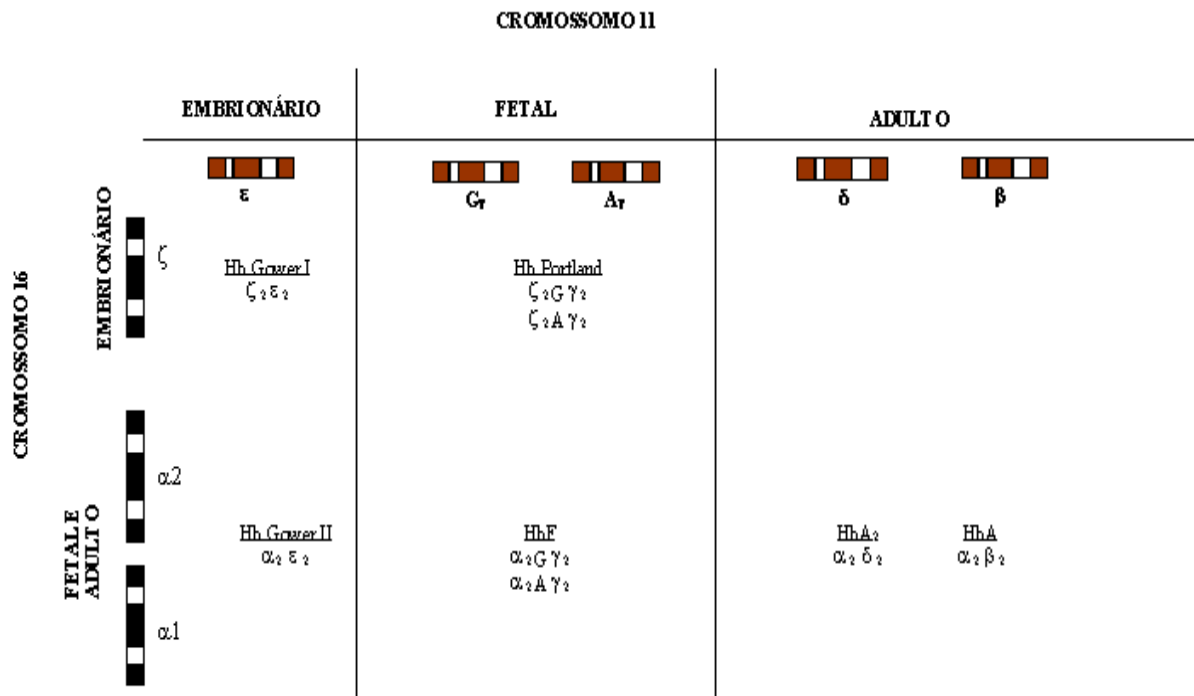


Figura 1. Diagrama dos produtos tetraméricos das globinas α no cromossomo 16 e do grupo não α , no cromossomo 11 (adaptado do livro Fundamentos de Genética Médica de GELEHRTER e COLLINS, 1992).

As hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças de natureza genética, onde existem alterações da porção globínica da molécula de Hemoglobina (Hb), classificadas em dois grupos: estruturais e de síntese. As estruturais são caracterizadas pela presença de alterações na seqüência de aminoácidos da cadeia da globina, resultando na presença de uma hemoglobina anormal. As hemoglobinopatias de síntese ou talassemias são decorrentes da redução ou ausência de síntese de uma ou várias cadeias de globina (STAMATOYANNOPOULOS et al, 1994).

Clinicamente, as hemoglobinopatias mais importantes são aquelas que envolvem anomalias dos genes α e β . A gravidade da doença dependerá da herança, definida pelos progenitores do indivíduo, existindo formas homozigóticas e heterozigóticas. Alterações envolvendo as cadeias γ , ϵ e ζ são letais já nas fases iniciais da vida (BUNN e FORGET, 1986).

Atualmente são conhecidas centenas de hemoglobinas mutantes derivadas, em sua maioria, de uma mutação pontual. Vamos nos estender sobre duas dessas variantes, a Hemoglobina S (Hb.S) e a Hemoglobina C (Hb.C) devido a sua alta prevalência nas populações brasileiras em função da grande contribuição de ancestrais africanos na formação das mesmas.

A Hb.S é responsável pela anemia falciforme (Hb.SS), primeira doença genética caracterizada molecularmente, decorrente da substituição do Ácido Glutâmico pela Valina na 6ª posição da cadeia β da globina. A Hb.C também é decorrente de uma mutação na mesma posição, ocorrendo uma troca do aminoácido Ácido Glutâmico pela Lisina. A Hb.C em homozigose (CC) é responsável por um quadro clínico mais brando, porém similar ao da anemia falciforme.

Outra hemoglobinopatia com ampla distribuição em afro-descendentes, é a α – talassemia, causada pela deficiência de síntese das cadeias α da hemoglobina. Uma variedade de mecanismos genéticos pode determinar a redução ou ausência da expressão desses genes, mas as deleções são as causas mais comuns da doença, afetando um ou ambos os genes no genoma haplóide e resultando nas talassemias α^+ e α^0 , respectivamente. A mutação responsável pela grande maioria dos casos de talassemia α^+ é a deleção de um fragmento de 3,7 Kb (deleção $-\alpha^{3,7}$), envolvendo a região 3' do gene α_2 e 5' do gene α_1 resultante de um crossing-over desigual (ORKIN, 1987) (Figura 2).

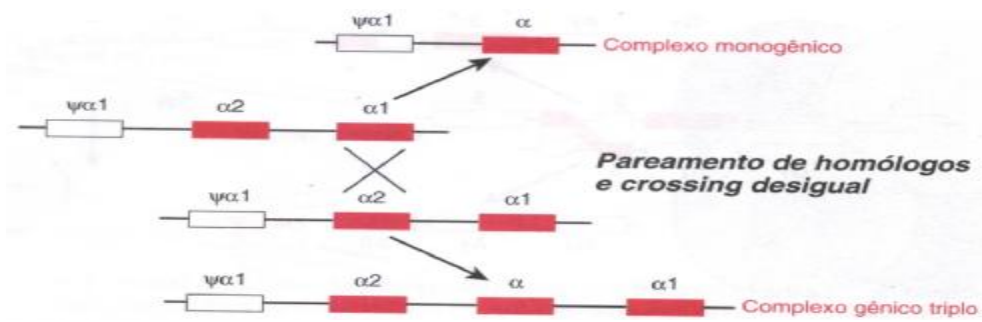


Figura 2. O mecanismo mais comum de α talassemia, que se deve a deleções de um dos dois genes de α -globina em um cromossomo. O desalinhamento, o pareamento homólogo e a recombinação entre o gene α^1 de um cromossomo e o gene α^2 no cromossomo homólogo resulta na deleção de um gene α . (modificado de ORKIN, 1987).

1.1 POLIMORFISMOS DE DNA NOS GENES DA β -GLOBINA

A utilização de endonucleases de restrição no estudo da molécula de DNA permitiu verificar a existência de variação no tamanho dos fragmentos resultantes da ação dessas enzimas. As endonucleases de restrição catalisam clivagens do DNA em seqüências nucleotídicas específicas, originando fragmentos de tamanhos definidos, que podem ser separados por eletroforese em gel de agarose ou poliácridamida, de acordo com seu peso molecular.

Uma série de eventos mutacionais podem promover alterações nos tamanhos dos fragmentos, abolindo ou introduzindo um sítio de restrição. Muitas dessas variações atingem freqüências polimórficas em algumas populações e foram designadas polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLPs – Restriction Fragments Length Polymorphisms). O mapeamento pela análise de enzimas de restrição do agrupamento gênico $\gamma\delta\beta$ da molécula de hemoglobina levou ao reconhecimento de uma considerável variação na seqüência de DNA entre indivíduos (ANTONARAKIS et al, 1985) (Figura 3).

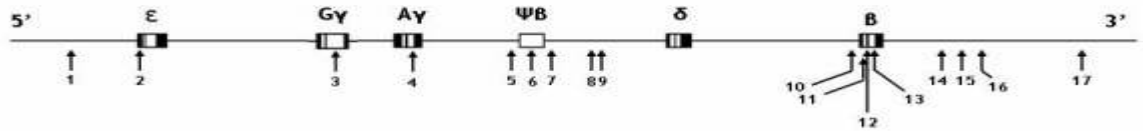


Figura 3. Representação do *cluster* de genes da β -globina com identificação dos polimorfismos descritos com base na utilização de enzimas de restrição. Os números representam a posição aproximada de restrição pelas enzimas: 1 e 9 - Taq I; 2, 6 e 7 - Hinc II; 3, 4, e 15 - Hind III; 5 - Pvu II; 8, 11 e 17 - Rsa I; 10 - Hinf I; 12 - Hgi A; 13 - Ava II; 14 - Hpa I e 16 - Bam HI (modificado de ANTONARAKIS et al, 1985).

As variantes de DNA do complexo gênico da β -globina reconhecidas como substituições únicas de nucleotídeos são representadas com o sinal “+” (presente) ou o sinal “-” (ausente). Um arranjo específico de polimorfismos em um *cluster* gênico é chamado de haplótipo (VOGEL e MOTULSKY, 2000). Por exemplo, uma determinada disposição de cinco polimorfismos pode ser representada por “+ - + - +” em um sentido de antecedente (5’) para posterior (3’).

Os haplótipos de DNA já foram usados para estudar diferentes questões: a) para determinar se um evento mutacional encontrado em um gene particular da β -globina ocorreu em um só local (unicêntrico) ou em mais de um local (multicêntrico); b) discriminar entre eventos epistáticos ligados aos genes que modulam a expressão fenotípica da mutação estrutural da β -globina e c) traçar o fluxo do gene anormal da β^S para outras populações. Quando há informação suficientemente disponível, como no caso do *cluster* gênico da β -globina, os haplótipos são úteis para estudar a origem e evolução das populações humanas (NAGEL e RANNEY, 1990).

Os trabalhos pioneiros para descrever os haplótipos do polimorfismo das endonucleases de restrição em torno dos genes da β -globina foram realizados por Orkin (1978) e Kan e Dozy (1978) abrindo o caminho para o estudo da análise da origem e fluxo gênico da mutação que originou a Hb.S.

A análise do polimorfismo dos sítios de restrição do complexo gênico da β -globina revelou que apenas uma pequena fração das combinações possíveis entre os sítios (haplótipos) tem sido encontrada, configurando um forte desequilíbrio de ligação. Um exemplo desse fato foi observado em gregos, italianos e asiáticos, onde a análise de oito sítios polimórficos representados na Figura 3 (sítios 2 a 9), situados em um segmento com cerca de 34 Kb na região

5', revelou a presença predominante de três haplótipos (+---+---+, -+---+---+ e -+---+---+), dentre os 256 esperados *a priori* (ANTONARAKIS et al, 1982).

O mesmo foi observado para seis sítios localizados em uma região de aproximadamente 18 Kb, incluindo o gene β e estendendo-se até a extremidade 3' (sítios 12 a 17 da Figura 3). Por outro lado, entre essas duas regiões (os oito sítios da região 5' e os seis da região 3') existe um segmento de DNA com 9 Kb, incluindo o gene δ , no qual a taxa de recombinação meiótica é cerca de 3 a 30 maior do que o esperado, sugerindo tratar-se de um *hotspot* recombinacional (CHAKRAVARTI et al, 1984).

Os primeiros trabalhos com enzimas de restrição feitos com a enzima Hpa I em várias populações africanas mostraram que a mutação que originou a Hb.S aconteceu independentemente mais de uma vez (KAN e DOZY, 1978). Posteriormente, analisando-se o polimorfismo de 11 sítios de restrição do cluster gênico da β -globina em quatro regiões distintas do continente africano, três haplótipos principais foram identificados: o haplótipo Benin (BEN), comumente encontrado na África Centro-Occidental; o CAR no Centro-Sul e Oriente Africano e o haplótipo Senegal (SEN) na África Atlântico-Occidental (PAGNIER, 1984).

Posteriormente, foi demonstrado que a mutação que originou a Hb.S está ligada a quatro haplótipos distintos no continente africano. Além dos três anteriormente citados, que predominam nas principais regiões geográficas da África, existe um haplótipo mais restrito, encontrado na Costa Oeste da África limitado ao grupo étnico Eton denominado haplótipo Camarões (CAM) (LAPOUMEROULIE et al, 1992). Análises moleculares mais recentes sobre o haplótipo Senegal, revelaram uma origem muito recente para este haplótipo, algo em torno de 2.000 anos (CURRAT et al, 2002).

1.2 ESTUDOS EVOLUTIVOS DE POLIMORFISMOS DE DNA NO COMPLEXO DE GENES DA β -GLOBINA

Estudos evolutivos envolvendo a análise de genes nucleares quando comparados com o DNA mitocondrial, oferecem desvantagem devido aos processos de recombinação e conversão gênica, que dificultam a interpretação dos padrões de variação no genoma nuclear. Por outro lado, o DNA mitocondrial representa apenas uma pequena fração comparado ao genoma nuclear e a quantidade de informação que ele contém é limitada. Embora o DNA mitocondrial tenha sido

a molécula mais extensivamente utilizada com a técnica de RFLP, as mudanças genéticas envolvidas nos principais processos adaptativos estão relacionadas ao genoma nuclear.

Os primeiros estudos sobre as relações evolutivas de populações humanas através de polimorfismos de DNA na região 5' do complexo de genes da β -globina normal (β^A), investigaram a distribuição de cinco sítios polimórficos para as enzimas Hinc II e Hind III em oito populações (ingleses, italianos, cipriotas, indianos, melanésios, polinésios, tailandeses e africanos) (WAINSCOAT, et al, 1986).

Nesse mesmo trabalho, foram observados três haplótipos mais comuns entre as populações não africanas (+----, -+--- e -+--+), embora o segundo haplótipo não tenha sido encontrado entre tailandeses. As duas populações africanas apresentaram um haplótipo (----+) que não foi encontrado nas populações não africanas, com exceção de dois indivíduos provenientes de Papua Nova Guiné, mas que puderam ser distinguidos dos africanos típicos pela presença de um sítio polimórfico para a enzima Taq I, entre os genes γ^G e γ^A . Dois outros haplótipos distintos foram encontrados em melanésios e polinésios (+---- e -++++), sendo sugerido que se originaram por recombinação.

Os resultados da análise de distância genética levaram os autores a sugerir que, na evolução humana, a divisão primária das populações originou um grupo africano e um grupo euro-asiático, corroborando a hipótese de uma origem africana para o homem moderno.

Outro estudo feito com os mesmos sítios de restrição em populações africanas, européias, asiáticas e das ilhas do Pacífico encontrou os mesmos padrões de afinidades observados por Wainscoat et al (1986). Em termos gerais, a distribuição dos haplótipos no *cluster* gênico da globina β^A tem revelado o seguinte padrão de afinidades entre as populações humanas: uma divisão primária entre africanos e não africanos (euro-asiáticos), seguido de uma divisão dos não africanos originando caucásios (europeus e caucásios não europeus) e asiáticos, incluindo as populações das ilhas do Pacífico (LONG et al, 1990; CHEN et al, 1990).

1.3 FILOGENIA DOS HAPLÓTIPOS DO COMPLEXO DE GENES DA β -GLOBINA

A filogenia dos haplótipos do complexo de genes da β -globina foi inicialmente proposta com base em 813 cromossomos de 14 populações representativas dos continentes africano, europeu e asiático (Tabela 1). Foram observados 16 haplótipos sendo que os mais antigos foram identificados e a partir deles os demais foram inferidos com base na premissa de que sob a

condição de neutralidade, os haplótipos mais comuns são possivelmente os mais antigos, e que os haplótipos raros foram originados por recombinação entre haplótipos mais comuns (LONG et al, 1990) (Figura 4).

Foram identificados haplótipos de primeira, segunda e terceira ordens. Os haplótipos de primeira ordem são: 1 (-----), 2 (+-----), 3 (----+), 4 (-+++), 5 (-++++) e 6 (-+++). Estes haplótipos foram originados diretamente do haplótipo ancestral, provavelmente o haplótipo 1 (-----), ou de outro haplótipo de primeira ordem, por mutação ou conversão gênica. Os haplótipos de segunda ordem são: 7 (-+---), 8 (+---+), 9 (-++++), 10 (++++), 11 (-----), 13 (+---+), 14 (++++), 15 (+++++) e 16 (-+---). O único haplótipo de terceira ordem observado foi o de número 12 (++++).

Tabela 1. Distribuição dos Haplótipos da β -globina em 14 populações dos continentes africano, europeu e asiático.

<i>Haplótipo</i>	<i>População</i>														
	Ni	Be	Se	Br	Gm	It	Gk	Cy	In	Th	Ch	MA	MB	Pó	Total
1. -----	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	1	4
2. +-----	3	1	1	16	7	58	17	59	79	63	26	44	73	43	490
3. ----+	21	17	4	0	1	0	1	0	0	0	0	2	0	0	46
4. -+++	6	4	2	0	0	0	1	0	1	2	0	4	0	4	24
5. -++++	4	0	7	15	5	20	6	14	31	9	2	10	19	6	148
6. ++++	0	2	0	5	1	5	10	8	17	4	1	3	0	0	56
7. +-+--	0	0	0	1	2	1	2	1	3	0	0	0	0	0	10
8. +---+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	8	0	11
9. -++++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	6
10. +++++	0	0	0	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0	0	5
11. ---++	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	3
12. +++--	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
13. +----	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
14. ++++	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
15. +++++	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3
16. -+---	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
Amostra	35	30	14	37	16	84	39	82	139	79	30	66	107	55	813

Um sítio de restrição polimórfico é identificado pela presença com um sinal (+) e pela ausência com um sinal (-). Ni, Nigéria; Be, Benin; Se, Senegal; Br, Grã-Bretanha; Gr, Alemanha; It, Itália; Gk, Grécia; Cy, Chipre; In, Índia; Th, Tailândia; Ch, China; MA, Melanésia A; MB, Melanésia B; Po, Polinésia. Dados extraídos de Long et al, 1990.

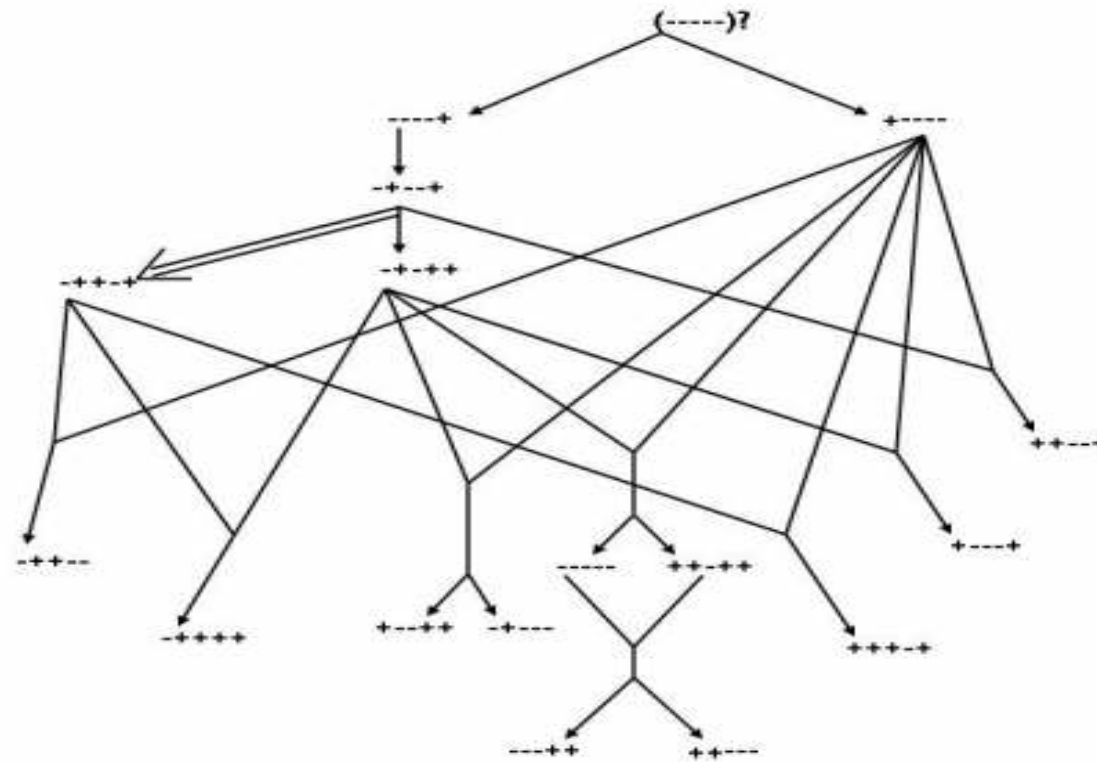


Figura 4. Relações filogenéticas entre os 16 haplótipos observados da β -globina. Os eventos de mutação são indicados por \rightarrow , uma conversão gênica por \Rightarrow , e crossing-over por $> - - - <$ (modificado de LONG et al, 1990).

É importante observar que no esquema proposto por Long et al (1990), o haplótipo 1, considerado como o possível ancestral, constitui o elo de ligação entre todos os haplótipos de primeira ordem, mas é raro em todas as populações já investigadas, e pode ser formado por recombinações entre os haplótipos de primeira ordem. Em outro estudo realizado, os haplótipos 1 (-----) ou 2 (+-----) foram considerados como ancestrais (Figura 5). Entretanto, outros esquemas podem ser considerados se não for levada em conta a importância relativa da recombinação, mutação e conversão gênica para a formação dos haplótipos de segunda ordem (CHEN et al, 1990).

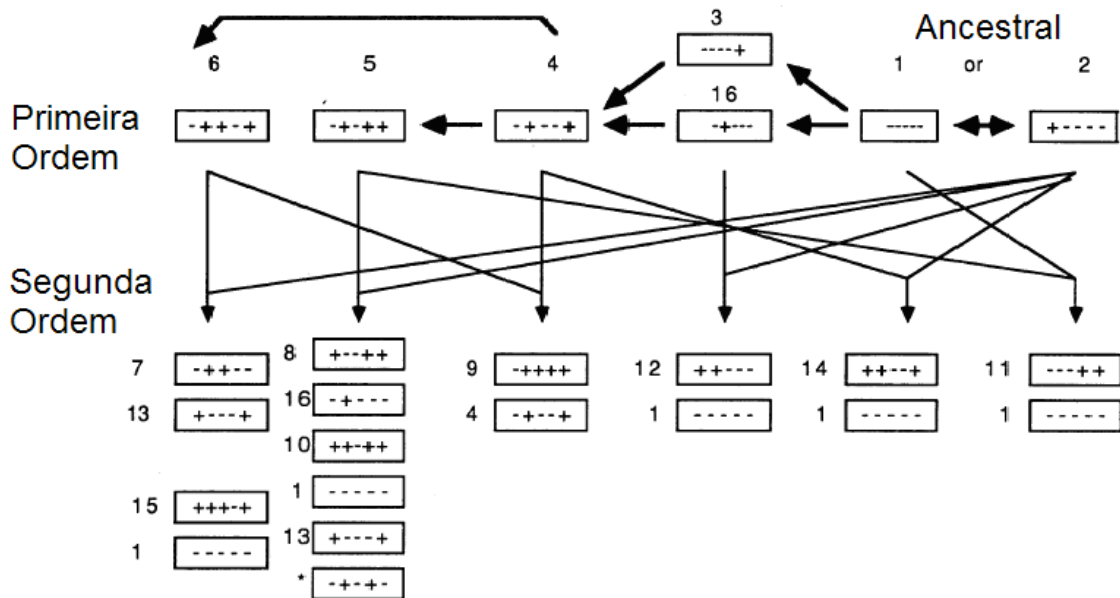


Figura 5. Histórias evolutivas possíveis observadas entre os haplótipos da β -globina. Os pontos de mutação são identificados por \leftarrow ; conversão gênica por \leftrightarrow e recombinação por \downarrow . O haplótipo precedido por um asterisco (*) não foi observado (Modificado de CHEN et al, 1990).

1.4 FLUXO GÊNICO DA Hb.S DA ÁFRICA PARA AS AMÉRICAS

A Hb.S foi introduzida no continente americano através do tráfico de escravos pelo Oceano Atlântico. Cerca de 10.000.000 de africanos subsaarianos foram forçados a emigrar para as Américas como escravos (CURTIN, 1969). Infelizmente, essa é uma pequena fração do total de africanos mortos em guerras interétnicas, tornando-se um atrativo para a captura de prisioneiros além de um número desconhecido que morreu durante o transporte por terra até os

portos de saída e um número incontável que morreu nas ilhas dominadas pelos europeus espalhadas pela costa africana. Se isso não bastasse, o total de mortos durante as viagens através do Oceano Atlântico até chegarem ao continente americano foi extraordinário. Muitos capturados se lançaram ao mar quando viam a sua terra desaparecendo no horizonte. Nós nunca conheceremos com exatidão a magnitude do genocídio africano (NAGEL, 2004).

Durante os séculos XVII e XVIII mais de 700.000 escravos desembarcaram no Caribe. Destes, cerca de 200.000 foram levados para outras colônias de domínio inglês. É surpreendente a concordância entre as porcentagens calculadas para os haplótipos na população atual e os registros de escravos importados no período colonial. Em decorrência do estado da Carolina do Sul ter recebido escravos da Baía de Biafra, a distribuição haplotípica deve partir das médias previstas para todos os escravos trazidos pelos ingleses no século XVIII. Uma alta porcentagem de indivíduos da Senegâmbia (e seus haplótipos correspondentes) e uma porcentagem menor de indivíduos da África Centro Ocidental (haplótipo BEN) deve ser esperada. As frequências dos haplótipos ligados à Hb.S podem variar nos EUA de acordo com a porcentagem de indivíduos que descendem de escravos da Carolina do Sul ou Virginia (NAGEL, 2004).

No México, a Hb.S é muito rara e os mexicanos de origem africana estão limitados à região costeira dos estados de Guerrero e Oaxaca. Para investigar a origem dos haplótipos ligados aos cromossomos β^A e β^S numa população mexicana com rotas africanas e que apresentavam frequências elevadas de Hb.S, foram analisados 467 indivíduos dos quais 288 não aparentados de diferentes cidades dos estados de Guerrero e Oaxaca na região de Costa Chica. A frequência de portadores do traço falciforme foi de 12,8%. Os haplótipos da β -globina foram determinados para 350 cromossomos de indivíduos não aparentados (313 β^A e 37 β^S). 15 haplótipos β^A diferentes foram encontrados, dos quais os mais comuns foram os haplótipos: 1 (-----) com 48,9%; 2 ((+-----) com 13,4% e o 3 (----+) com 13,4. Os cálculos das distribuições pareadas e distância genética de Nei usando 32 populações mundiais mostraram que os haplótipos β^A são fortemente relacionados aos mestiços mexicanos e norte africanos. Os haplótipos CAR, BEN e SEN que estão ligados aos cromossomos β^S apresentaram frequências de 78,8, 18,2 e 3,0%, respectivamente. A comparação destes haplótipos com os de outras 17 populações revelou forte semelhança com a população da região central da África. Estes dados sugerem origens distintas para os genes β^A e β^S em indivíduos mexicanos da região da Costa Chica (MAGANA et al, 2002).

Em Cuba, 91 pacientes com genótipo Hb.SS, 44 crianças e 47 adultos, foram analisados para os haplótipos da β -globina. Excluindo o haplótipo raro CAM e os haplótipos atípicos, a distribuição entre as crianças foi a seguinte: 43% BEN, 38% CAR e 3% SEN. Nos adultos, a distribuição foi de: 46% BEN, 30% CAR e 9% SEN. ($\chi^2_{(2)} = 13,511$; $p = 0,001$). Quando a amostra total de 198 cromossomos (Hb.SS, Hb.SC e S/ β – talassemia) foi considerada, os haplótipos β^S apresentavam a seguinte composição: 51% BEN, 41% CAR e 8% SEN. Após o ajuste para as diferentes frequências da Hb.S no continente africano, estes números devem prever sua origem como sendo: 16% da região Atlântico-Occidental (haplótipo SEN), 37,3% da costa Centro-Occidental (haplótipo BEN) e 46% da região onde predomina a língua Bantu (haplótipo CAR) (MUNIZ et al, 1995).

Esta é uma contradição direta com o registro histórico apresentado por Curtin (1969) que estabelece uma porcentagem maior de povos com língua Bantu (55%) e uma porcentagem menor de senegaleses (3,4%). Conclui-se que existe uma perda de haplótipos Bantu em pacientes com anemia falciforme em Cuba, particularmente em adultos, e que existe um excesso de haplótipo SEN também em adultos. Estas diferenças podem refletir sobrevivência diferencial e severidade da anemia falciforme ligada a estes haplótipos (MUNIZ et al, 1995).

Na ilha francesa de Guadeloupe, foram estudados os haplótipos da β -globina e a deleção $\alpha^{3.7}$ em 534 pacientes (255 adultos e 279 crianças, das quais 159 eram recém nascidas) com anemia falciforme e outras hemoglobinopatias: Hb.SS ($n = 298$), Hb.SC ($n = 170$), S/ β – talassemia ($n = 56$) e outras formas ($n = 10$). Os dados dos haplótipos demonstraram que BEN é o haplótipo predominante (75%) e a frequência da deleção $\alpha^{3.7}$ é bastante elevada, consequência do tráfico de escravos. Estes dados estão em desacordo com os registros históricos desta região e a composição de haplótipos é distinta daquela encontrada no Brasil e em Cuba, mas está mais relacionada à região da Jamaica (KÉCLARD et al, 1997).

Também na ilha de Guadeloupe, a diversidade de haplótipos atípicos foi estudada em um grupo formado por 37 pacientes não aparentados com anemia falciforme (27 Hb.SS, 9 Hb.SC e 1 S/ β – talassemia) onde o gene para Hb.S está ligado para 20 haplótipos atípicos diferentes. Estes cromossomos atípicos explicam cerca de 5% dos 477 estudados. 22 subhaplótipos 5' diferentes entre estes cromossomos. 15 dos 20 haplótipos atípicos são interpretados como produto de recombinação de um único crossing-over em torno da região de *hotspot* 5' do *cluster* da β -globina ou entre os principais haplótipos β^S presentes na população. Os casos remanescentes

requerem outros mecanismos genéticos, tais como conversão gênica ou substituições para gerar estes haplótipos atípicos (ROMANA et al, 2000).

Na Colômbia, foram analisados 46 pacientes falcêmicos não aparentados da região ocidental daquele país com grande população de negros. 23 crianças e o mesmo número de adultos foram estudados. A distribuição dos haplótipos entre as crianças foi de: 58% CAR, 38% BEN e 4% SEN e entre os pacientes adultos foi: 59,4% CAR, 35,1% BEN e 5,5% SEN ($p=0,920$). Estes resultados estão de acordo com os dados históricos mostrando que a maioria dos escravos trazidos para a Colômbia são oriundos de Angola (de língua Bantu) e São Tomé (na África Centro Ocidental) (CUELLAR-AMBROSI et al, 2000).

Na Venezuela, a anemia falciforme e α – talassemia têm distribuições heterogêneas com elevadas freqüências na costa ao nível do mar e poucos casos nas montanhas. A maioria da população venezuelana é composta da mistura entre europeus (espanhóis colonizadores), africanos (escravos) e ameríndios. 191 pacientes não aparentados (81 Hb.SS e 15 pacientes heterozigotos para Hb.S, Hb.C, Hb D e β – talassemia e 95 portadores do traço falciforme) foram analisados. Os cromossomos com haplótipos β^S apresentaram a seguinte composição: 51% BEN, 29,5% CAR, 12,5% SEN e 2,5% CAM. A deleção $\alpha^{3.7}$ da α – Globina foi achada com freqüência elevada. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição de haplótipos entre pacientes jovens e adultos com anemia falciforme e portadores do traço falciforme. Apenas 8,6% dos pacientes foram homozigotos para o haplótipo BEN. Estes resultados revelam uma taxa de mistura elevada na população africana venezuelana. Além disso, o tráfico de escravos para a Venezuela cobriu um longo período com todos os haplótipos representados (ARENDS e ALVAREZ, 2000).

Outro grupo de pesquisadores na Venezuela estudaram a origem da mutação da Hb.S nos estados de Sucre e Anzoategui na Costa Nordeste da Venezuela através dos haplótipos da *cluster* da β –globina. Eles acharam resultados semelhantes aos publicados para os pacientes dos estados centrais, mas diferentes de outras regiões do país. A amostra Sucre-Anzoategui demonstrou que o haplótipo CAR é predominante. Estes achados podem ser explicados por efeito fundador, deriva genética, isolamento e endogamia (VÍVENES DE LUGO et al, 2003).

No Brasil, o primeiro estudo para caracterizar os haplótipos da β –globina foi realizado em 74 cromossomos β^S de afrodescentes brasileiros. Foram encontrados os três haplótipos mais comuns ligados à mutação da β^S provenientes do continente africano em 67 cromossomos: 49

(66,2%) foram identificados como haplótipo CAR, 17 (23,0%) foram identificados como sendo haplótipo BEN e um (1,3%) com o haplótipo SEN. Sete cromossomos (9,5%) continham haplótipos atípicos. Esta distribuição é diferente daquela observada nos Estados Unidos e Jamaica, onde o haplótipo BEN predomina e resulta de diferentes padrões de transporte de escravos para as regiões Norte e Sul do continente americano (ZAGO et al, 1992).

Outro estudo com haplótipos do *cluster* β^S foi realizado em 74 pacientes com anemia falciforme de três cidades representativas das regiões que apresentam o maior número de negros do País: Ribeirão Preto (SP) na região Sudeste, Salvador (BA) na região Nordeste e Belém (PA) na região Norte. Em todos os 138 cromossomos foram encontrados os três haplótipos africanos mais comuns. O haplótipo CAR predominou nas três regiões (73,1% em São Paulo, 54,8% na Bahia e 65,9% no Pará) seguido do haplótipo BEN (25,4% em São Paulo, 45,2% na Bahia e 27,6% no Pará) e um pequeno número de casos com haplótipo SEN em São paulo (1,5%) e no Pará (6,9%). A média do haplótipo predominante CAR para as três regiões (65,9%) está de acordo com os dados históricos, os quais indicam que cerca de 70% dos escravos africanos transportados para o Brasil são provenientes de Angola, Congo e Moçambique (FIGUEIREDO et al, 1994).

Em três comunidades formadas por descendentes de escravos da região Norte do País, Curiaú, Pacoval e Trombetas, foram analisados os haplótipos da β -globina em cromossomos β^A , β^S e β^C . A distribuição haplotípica dos cromossomos β^A é consistente com a origem africana das populações com algum grau de diferenciação local e mistura com população caucasiana ancestral ou ameríndia. A distribuição dos haplótipos ligados aos cromossomos β^S (60% CAR, 30% SEN e 10% BEN) sugerem que os escravos africanos trazidos para a região Norte tem sido predominantemente de regiões onde o haplótipo CAR predomina. Apesar disso, existe também a evidência da presença de escravos provenientes da África Atlântico Ocidental (PANTE-DE-SOUZA et al, 1999).

No estado da Bahia, 80 pacientes com anemia falciforme foram analisados em Salvador, cidade brasileira com maior população africana resultante do tráfico de escravos. Os genótipos foram CAR/CAR em 17 pacientes (21,3%), BEN/BEN em 17 (21,3%), CAR/BEN em 37 (46,3%), BEN/SEN em 1 (1,25%), BEN/ATP em 1 (1,25%), CAR/ATP em 6 (7,5%) e ATP/ATP em 1 (1,25%). Um total de 77 cromossomos (48,1%) foram caracterizados como haplótipo CAR, 73 (45,6%) com BEN, 1 (0,63%) como SEN e 9 (5,63%) como atípico. O equilíbrio de Hardy-

Weinberg para os homozigotos CAR/CAR e BEN/BEN e uma elevada proporção de heterozigotos CAR/BEN não era esperado, considerando-se que a Bahia historicamente recebeu maior quantidade de escravos da África ocidental do que da África Central (GONÇALVES et al, 2003).

1.5 HAPLÓTIPOS ATÍPICOS β^S

Os haplótipos do *cluster* da β -globina têm aproximadamente 2000 anos. Por isso, não surpreende que eles possam ter sofrido mudanças nas seqüências próximas a eles. A maioria dos cromossomos β^S tem um dos cinco haplótipos mais comuns designados como Benin, Bantu, Senegal, Camarões e Arábico-Índico. Entretanto, 5 a 10% dos pacientes com anemia falciforme apresentam cromossomos incomuns, geralmente chamados de haplótipos atípicos.

Com o objetivo de explorar os mecanismos genéticos que geram estes haplótipos atípicos, outros marcadores polimórficos menos estudados no *cluster* de genes da globina β^S foram analisados em 40 cromossomos com haplótipos atípicos do Brasil e Camarões (ZAGO et al, 2000). Os seguintes polimorfismos foram examinados: sete polimorfismos do *cluster* $\epsilon\gamma\delta\beta$, um padrão de inserção/deleção de uma seqüência de 6 pb anterior ao gene $G\gamma$, HS-2 LCR (AT)xR(AT)y e uma repetição principal (AT)xTy anterior ao gene β , o polimorfismo GC/TT localizado a -1105-1106 do gene $G\gamma$, o polimorfismo C/T a -551 do gene β e uma estrutura dentro do gene β (Figura 6).

Entre os sujeitos brasileiros, a estrutura atípica mais comum (7 de 16) foi um subhaplótipo Bantu 3' associado com diferentes seqüências 3', enquanto em dois cromossomos um subhaplótipo Benin 3' estava associado com dois subhaplótipos 5' diferentes. Uma configuração híbrida Benin/Bantu foi também observada. Em três cromossomos, o haplótipo atípico diferiu pela mudança de um único sítio de restrição. Em dois dos 134 cromossomos identificados como haplótipos tipicamente Bantu foi observada uma seqüência repetitiva discrepante na Região Controladora do Locus (LCR), provavelmente devido a um crossig-over na região 5' do gene ϵ (ZAGO et al, 2000).

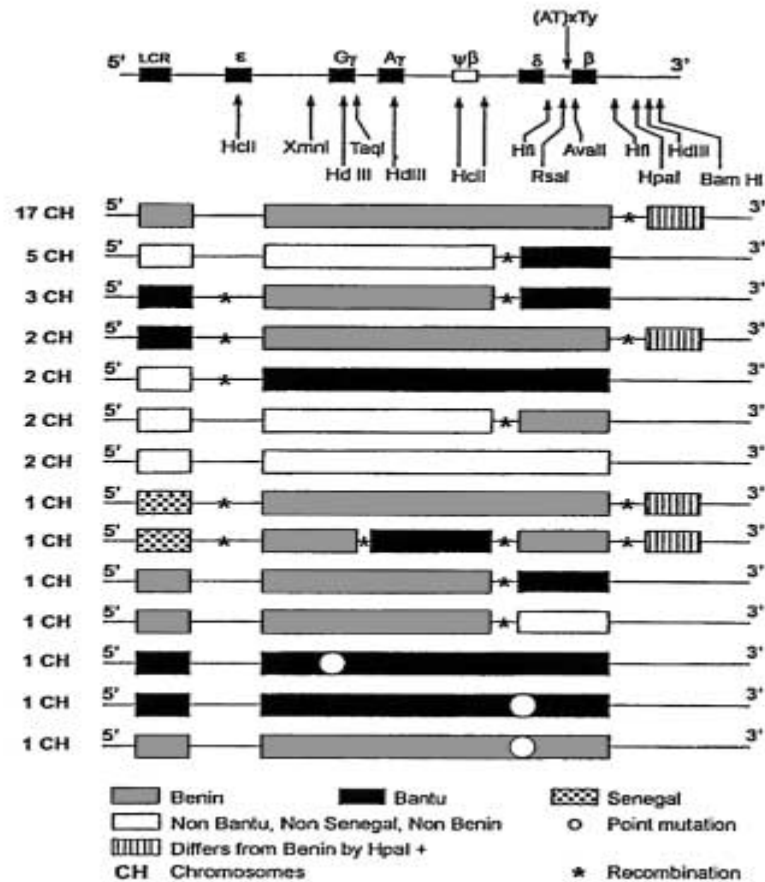


Figura 6. Haplótipos atípicos e os mecanismos envolvidos na sua formação em pacientes com anemia falciforme do Brasil e Camarões. (modificado de ZAGO et al, 2000).

Entre os 80 cromossomos β^S de Camarões, 22 estavam associados com um haplótipo atípico. A estrutura mais comum foi representada por um haplótipo Benin (da LCR ao gene β) com um segmento 3' ao gene β não pertencente ao haplótipo Benin. Em dois casos, a LCR do haplótipo Bantu estava associada com um haplótipo Benin e um segmento 3' ao gene β não pertencente ao haplótipo Benin. Em três outros casos foi observada uma estrutura mais complexa: um híbrido Benin-Bantu-Senegal ou outros tipos de haplótipos. Estes dados sugerem que os haplótipos atípicos da β^S não são incomuns na América e na África. Estes haplótipos são gerados provavelmente por uma variedade de mecanismos genéticos incluindo: a) mudanças isoladas de nucleotídeos em um dos sítios polimórficos de restrição; b) crossing-overs simples e duplos entre dois haplótipos β^S típicos ou mais frequentemente entre um haplótipo β^S típico e um haplótipo associado a um cromossomo β^A diferente e c) conversão gênica (ZAGO et al, 2000).

Uma questão interessante é se os haplótipos atípicos têm propriedades bioquímicas ou clínicas diferentes dos haplótipos típicos onde eles se originaram. Em um estudo feito com afro-americanos que tinham um cromossomo com haplótipo atípico ou Camarão associado a um haplótipo típico β^S , vinte haplótipos atípicos foram encontrados. A distribuição dos subhaplótipos 5' dos cromossomos atípicos refletiam a distribuição dos haplótipos comuns em afro-americanos com anemia falciforme. Nem os subhaplótipos 5', nem os subhaplótipos 3' dos cromossomos atípicos afetaram os níveis de Hb Fetal e volume corpuscular médio nos indivíduos com o haplótipo Benin. Aqueles subhaplótipos 5' não afetados podem ser uma consequência: do pequeno número de subhaplótipos 5' Senegal na amostra estudada, da necessidade de ligação dos subhaplótipos 5' e 3' de qualquer haplótipo para ter um efeito sobre os níveis da Hb Fetal, ou então a probabilidade de que um gene β normal tenha contribuído para os subhaplótipos 5' de algum haplótipo atípico (STEINBERG et al, 1998).

1.6 ORIGEM E DISPERSÃO DOS HAPLÓTIPOS LIGADOS À GLOBINA β^C

A Hb.C tem o epicentro da sua frequência em Burkina Faso e ela decresce concentricamente na África Centro-Ocidental, mas restrita à região ocidental do Rio Níger. Um estudo feito com 1059 indivíduos em Burkina Faso, encontrou frequências elevadas para a Hb.S (10%) e Hb.C (5%) na região mais árida. Porém, nas savanas daquele país foi encontrado o inverso: 3% para a Hb.S e 14% para a Hb.C. Nenhum homocigoto Hb.SS foi encontrado com idade acima de 1 ano e os genótipos Hb.SC e Hb.CC foram encontrados com frequência abaixo do esperado. As condições médicas e ambientais impedem a sobrevivência dos indivíduos Hb.SS e diminui a sobrevivência dos indivíduos com genótipos Hb.SC e Hb.CC (Labie et al, 1984).

Por outro lado, a Hb.C impede que os seus portadores morram de malária. Este poder seletivo da Hb.C foi demonstrado *in vitro* (OLSON e NAGEL, 1986) e em estudos populacionais (MODIANO et al, 2001) mostrando que os indivíduos homocigotos Hb.CC são mais protegidos dos efeitos da malária que os homocigotos Hb.SS. Os estudos *in vitro* demonstraram que as hemácias de indivíduos Hb.CC embora tenham permitido o desenvolvimento do parasita, diminui a liberação dos merozóitos (OLSON e NAGEL, 1986).

Foi sugerido que apenas uma parcela de hemácias de indivíduos Hb.CC suportam a replicação normal do parasita e que os componentes de proteção à malária associados ao genótipo

Hb.CC podem afetar a capacidade de replicação e envolver a formação de proteínas aberrantes da superfície de membrana das hemácias (FAIRHURST et al, 2003).

Os dados epidemiológicos demonstraram que a Hb.C está associada com 29% de redução dos riscos clínicos da malária em heterozigotos HbAC ($p = 0.0008$) e de 93% nos homozigotos Hb.CC ($p = 0.0011$) em Burkina Faso. Estes achados juntos com a patologia limitada da hemoglobinopatia C comparada aos genótipos Hb.SS e Hb.SC e a baixas frequências da Hb.S junto ao epicentro geográfico da Hb.C sustentam a hipótese de que, a longo prazo e na ausência de controle da malária, a Hb.C deve substituir a Hb.S na África Centro-Occidental (MODIANO et al, 2001 e HEDRICK, 2004).

Num estudo feito com 25 cromossomos β^C e os seus haplótipos ligados, 22 cromossomos foram idênticos para todos os sítios e possuíam um haplótipo que apresentou-se raro para os cromossomos β^A de negros americanos (Figura 7). Foram observados 2 haplótipos diferentes entre os 3 cromossomos restantes. Estes haplótipos foram idênticos na maioria dos alelos β^C na extremidade 3' do *cluster* da β -globina, mas diferentes na região 5'. A análise adicional de 14 alelos β^C demonstraram completa associação com os polimorfismos típicos da β^C na região 3' do *cluster*. Estes podem facilmente ser explicados através de uma única origem da mutação seguido por uma difusão desta mutação para outros haplótipos através de recombinação meiótica na região 5' do gene da β -globina (BOEHM et al, 1985).

Entretanto, mais pesquisas demonstraram que o quadro é mais complexo. Na Tailândia, a história é diferente. Em 12 heterozigotos AC e três heterozigotos compostos para Hb.C e Hb E, todos os cromossomos β^C foram associados com o haplótipo (+-----+), indicando uma origem não africana para a Hb.C na Tailândia (SANCHAISURIYA et al, 2001).

Na Sicília (Itália), em 12 famílias e um indivíduo não aparentado de origem siciliana, foram encontrados dois haplótipos diferentes associados com a Hb.C, correspondentes aos haplótipos I e II descritos anteriormente em afro americanos. Na Sicília, o haplótipo I foi o mais freqüente ligado a um sítio polimórfico para a enzima HpaI na região 3' do *cluster* da β -globina (um fragmento de 13 Kb), semelhante ao haplótipo I encontrado em afro americanos, enquanto o haplótipo II, menos freqüente, estava ligado a um fragmento de 7 Kb para a enzima HpaI que nunca tinha sido atribuído ao cromossomo β^C . Na Itália, estes dois haplótipos foram encontrados em raros casos em associação com os cromossomos β^A . Estes achados sugerem que: a) a mutação β^C na Sicília é derivada de um gene africano e não representa uma nova mutação e b) o segundo

haplótipo pode ter se originado ou por eventos mutacionais múltiplos em cromossomos separados ou por mutação no sítio HpaI na região 3' em um cromossomo β^C preexistente (TRAVI et al, 1992).

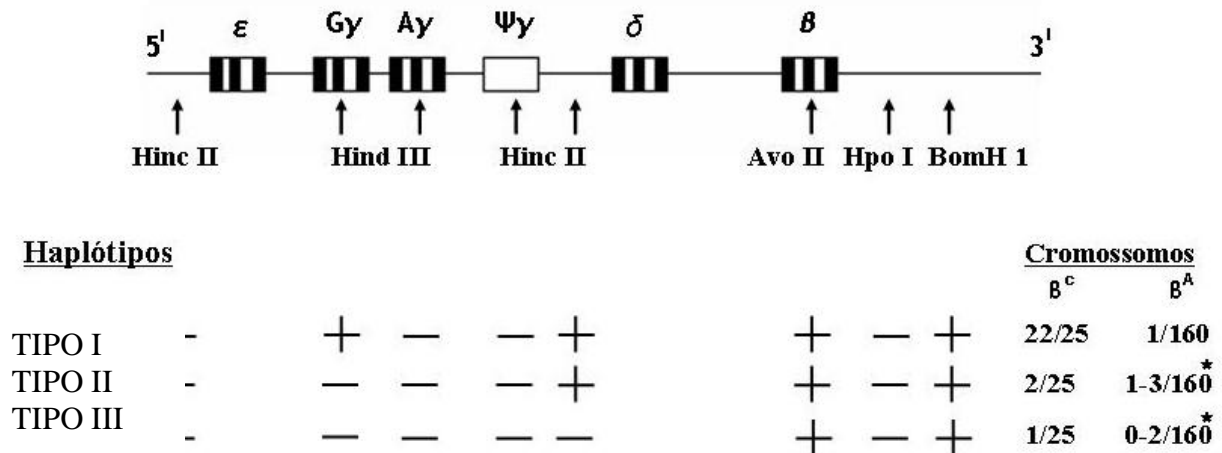


Figura 7. Haplótipos dos cromossomos β^C . O *cluster* da β -globina é mostrado na parte superior com polimorfismos indicados para cada sítio de restrição (\uparrow). Os sítios polimórficos da região 5' para 3' são os seguintes: Hinc II 5' para o gene ϵ , Hind III para $G\gamma$ e $A\gamma$ em IVS-II, Hinc II para $\psi\beta$ e 3' da mesma região, Ava II para β -IVS-II, Hpa I e Bam H1 para a região 3' do gene β . A presença (+) ou ausência (-) da clivagem para sítio polimórfico define os três haplótipos encontrados nos cromossomos β^C analisados com a adição do sítio Hinc II da região 5' do gene β (modificado de BOEHM et al, 1985).

1.7 ASPÉCTOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM HEMOGLOBINOPATIAS

Quando as hemácias de uma paciente falcêmica passam pela microcirculação, a Hb.S se polimeriza levando as células do seu estado bicôncavo normal assumir a forma de foice. Quando isto ocorre, as hemácias têm a propensão de aderirem-se ao endotélio dos vasos sanguíneos dificultando a passagem do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, a diminuição do fornecimento de oxigênio para os tecidos. As hemácias falcêmicas são extremamente susceptíveis à hemólise causando anemia crônica (ASHLEY-KOCH et al, 2000).

A anemia crônica é geralmente moderada e não é a principal fonte de morbidade para indivíduos falcêmicos. Entretanto, a presença de infecções virais, tais como *Parvovirus*, pode

levar à redução temporária da produção de células sangüíneas. Este quadro é chamado de aplasia medular. Primariamente, a morbidade na anemia falciforme aparece com eventos de vaso-oclusão ou danos teciduais resultantes da obstrução dos vasos sangüíneos. Alguns dos sintomas mais comuns incluem crises dolorosas, síndrome aguda torácica, acidente vascular cerebral e disfunções renais e esplênicas. As crises dolorosas são episódios de dores músculo-esqueléticas excruciantes (PLATT et al, 1991) e a síndrome torácica aguda requer o mesmo tratamento dispensado aos pacientes com pneumonia (CASTRO et al, 1994).

As complicações cerebrovasculares incluem ataques de isquemia transiente e infartos isquêmico e hemorrágico. Seqüestro esplênico é o resultado do represamento do sangue no baço que leva à anemia severa e ao choque hipovolêmico. Após a primeira infância, os pacientes falcêmicos se tornam mais susceptíveis às infecções bacterianas devido à asplenia funcional e às alterações imunológicas (ASHLEY-KOCH et al, 2000).

Os sintomas normalmente aparecem dentro dos seis primeiros meses de vida, mas existe uma variabilidade clínica considerável. O genótipo é o fator de risco mais importante para a severidade clínica. Os indivíduos homocigotos para a Hb.S exibem manifestações clínicas mais severas, seguidos pelos indivíduos com genótipo Hb.S/ β^0 – Talassemia. Indivíduos com hemoglobinopatia Hb.SC e Hb.S/ β^+ – Talassemia exibem um quadro clínico mais benigno da doença (GILL et al, 1995). Entretanto, indivíduos com hemoglobinopatia Hb.SC apresentam maior risco para complicações tromboembólicas, retinopatia e necrose papilar renal quando comparados com pacientes Hb.SS (BALLAS et al, 1982). Indivíduos Hb.SS e Hb.S/ β^0 – Talassemia apresentam maior incidência de síndrome torácica aguda e crises dolorosas do que os indivíduos com hemoglobinopatia Hb.SC e Hb.S/ β^+ – Talassemia (PLATT et al, 1991 e CASTRO et al, 1994).

A taxa de complicações cerebrovasculares é maior entre indivíduos com genótipo Hb.SS comparado com os outros três genótipos (OHENE-FREMPONG et al, 1998). Quanto à expectativa de vida, indivíduos Hb.SS têm em média vinte anos a menos do que os indivíduos Hb.SC, provavelmente devido às diferenças observadas quanto à severidade clínica para estes dois genótipos (PLATT et al, 1994). No Brasil, a taxa de mortalidade infantil por anemia falciforme é de 25% e 80% dos pacientes vão a óbito até os trinta anos de idade (ALVES, 1996).

Outros fatores que estão relacionados à variabilidade clínica da anemia falciforme são os haplótipos da β -globina, a interação com a α -talassemia e os níveis de Hb. Fetal. Os haplótipos do

complexo de genes da β -globina estão associados a diferentes níveis da Hb. Fetal e correlacionados com a severidade da anemia falciforme (PLATT et al, 1994 e THOMAS et al, 1997). Entre os três haplótipos mais comuns encontrados na anemia falciforme, o haplótipo SEN está associado com a forma mais benigna da anemia falciforme, seguido do haplótipo BEN. O haplótipo CAR está associado com a forma mais severa da doença. Na África, pacientes falcêmicos que têm o haplótipo CAR, apresentam o dobro do risco de terem complicações e morrem mais precocemente do que os pacientes que apresentam outros haplótipos (THOMAS et al, 1997).

Uma questão levantada é se os diferentes haplótipos ligados ao *cluster* de genes da globina β^S estão associados a diferentes características hematológicas em pacientes com hemoglobinopatia SC. Em um estudo com 73 pacientes adultos com hemoglobinopatia SC, os haplótipos BEN, CAR, SEN e ATP (atípicos) estavam presentes em 56%, 25%, 6% e 12%, respectivamente. Não houve diferenças estatísticas significantes para os parâmetros hematológicos e níveis de Hb Fetal entre os pacientes com as combinações BEN/C, CAR/C, SEN/C e ATP/C. Dos haplótipos ligados aos cromossomos β^C , foram encontrados 71% C I, 18% C II e 11% outros haplótipos β^C . Os níveis de Hb Fetal foram mais baixos em pacientes com hemoglobinopatia SC do que em pacientes com anemia falciforme, possivelmente porque os haplótipos não têm efeito discernível sobre os níveis de Hb Fetal e não modulam os aspectos hematológicos (STEINBERG et al, 1996).

A Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (PHHF) é outro fator associado com um quadro clínico mais brando da anemia falciforme. Isto ocorre devido a uma superexpressão dos genes das cadeias γ -globina (THOMAS et al, 1997). Entretanto, esta é uma condição rara, pois é encontrada em média um a cada 188.000 pacientes falcêmicos (LOREY et al, 1996). Entre a maioria dos pacientes com anemia falciforme, os níveis de Hb. Fetal variam consideravelmente. Aproximadamente 40% desta variação é devido ao aumento na produção do locus FCP (F-cell production) no cromossomo X e apenas 14% devido aos haplótipos do complexo de genes da β -globina (CHANG et al, 1997).

A interação entre a Hb.S e α -talassemia tem sido descrita como um dos fatores responsáveis pela melhora no quadro clínico de pacientes com anemia falciforme. Estudos demonstraram que a α -talassemia está associada com um baixo risco de acidente vascular nestes pacientes. Possíveis efeitos protetores da α -talassemia são desconhecidos, mas pode ser relatada a

diminuição de hemólise e propriedades mais favoráveis das células vermelhas do sangue (ADAMS et al, 1994). Outros estudos revelaram que a α -talassemia é favorável à sobrevivência de indivíduos com anemia falciforme, fato comprovado com a observação do aumento da frequência do genótipo “- α ” encontrado nos pacientes falcêmicos, com o aumento progressivo da idade (MEARS et al, 1983). Os valores dos índices hematimétricos, VCM (volume corpuscular médio) e HCM (hemoglobina corpuscular média) nos portadores de anemia falciforme associado à α -talassemia, mostraram-se dentro da normalidade, parecendo estar associado com função esplênica normal nesses pacientes (ADEKILE et al, 1996). Entretanto, a interação entre as duas doenças aumenta a susceptibilidade a outras complicações, tais como crises dolorosas (GILL et al, 1995).

Nesta introdução, procuramos passar de forma sucinta um quadro geral da origem e dispersão dos haplótipos ligados à β -globina no continente americano com destaque para o Brasil. A utilização das informações relativas aos polimorfismos de DNA no complexo de genes da β -globina, nos últimos 30 anos, aumentou significativamente a nossa compreensão sobre os aspectos genéticos envolvidos na modulação da anemia falciforme e outras hemoglobinopatias bem como, a história natural destas doenças, saindo do continente africano para outros continentes, impulsionada principalmente pelo tráfico de escravos.

O Brasil foi o país que recebeu o maior contingente de escravos oriundos das principais áreas geográficas do continente africano. Apesar de vários estudos com polimorfismos de DNA no complexo de genes da β -globina terem sido realizados em populações brasileiras, as informações referentes ao estado da Bahia ainda são escassas. A grande maioria dos estudos realizados no estado foram feitos na capital Salvador e informações sobre a sua dinâmica em populações do Recôncavo Baiano ainda são desconhecidas.

A região agropecuária e de armações de pesca do Recôncavo Baiano sempre esteve ligada à cidade do Salvador por uma linha histórica contínua. Nesta região, quatro comunidades estão em processo de titulação nos municípios de Cachoeira e Maragojipe, mas cerca de 300 a 500 comunidades quilombolas no estado cuja maioria encontra-se no Recôncavo Baiano já foram listadas por militantes de entidades não governamentais. Por isso, temos o interesse em investigar as frequências dos polimorfismos de DNA da β -globina nestas populações para compreender melhor a variabilidade genética bem como a incidência das hemoglobinopatias entre elas.

2 OBJETIVOS

1. Descrever e quantificar a variabilidade genética dos municípios de Cachoeira e Maragogipe, localizados no Recôncavo Baiano, em relação aos polimorfismos de DNA no complexo de genes da β -globina e dos haplótipos deles derivados.
2. Caracterizar molecularmente os haplótipos da região 5' ligados ao grupo de genes da β -globina com a finalidade de se estabelecer a origem geográfica das mutações presentes nos genes das moléculas de hemoglobinas Hb.S e Hb.C, contribuindo para a obtenção de dados relativos à história natural da doença nas populações em estudo.
3. Estimar a taxa de recombinação entre os sítios analisados para a região do complexo de genes da β -globina e investigar a associação da distribuição haplotípica com as populações analisadas e os pacientes com hemoglobinopatias.
4. Quantificar o grau de mistura étnica nestas populações, através das frequências dos sítios de restrição e dos haplótipos do complexo de genes da β -globina.
5. Identificar as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com hemoglobinopatias e determinar a frequência da deleção $\alpha^{3.7}$ e suas possíveis relações com a manifestação clínica da anemia falciforme e outras hemoglobinopatias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO DE ONDE FORAM OBTIDAS AS AMOSTRAS

O Recôncavo baiano, é a area localizada em torno da Baía de Todos os Santos, tendo no seu limite norte a cidade de Salvador, capital do estado da Bahia (figura 8). Recôncavo significa cavidade, fundo de baía, terra circunvizinha de uma cidade ou porto. Formado por cidades como cachoeira, São Félix, Santo Amaro, Nazaré e Maragojipe, o Recôncavo foi, desde seus primórdios, uma região de base agrícola, que durante muito tempo teve sua produção exportada para a Capital pelas águas da Baía de Todos os Santos, com destaque para o açúcar, durante o período colonial, e para o fumo, na virada do século XX, sobretudo Maragojipe, cuja produção começou a declinar na década de 1950, até a extinção total no início da última década. Atualmente, a região busca novas alternativas para a revitalização de sua economia, vislumbrando como uma delas o turismo.

O município de Cachoeira localiza-se na microrregião de Santo Antônio de Jesus. Já foi conhecido pelo apelido de "Meca da Bahia", pela forte influência malê na cidade. De acordo com o IBGE, no ano de 2003 sua população era estimada em 31.071 habitantes. Sua área territorial compreende 398 km². Suas coordenadas geográficas são 12° 37' 04" de latitude sul e 38° 57' 21" de longitude oeste de Greenwich. Inicialmente era uma região habitada por índios e foi a iniciativa de duas famílias portuguesas, os Dias Adorno e os Rodrigues Martins, que possibilitou sua elevação à Freguesia de Nossa Senhora do Rosário. Em 1698, tornou-se Vila de Nossa Senhora do Rosário do Porto da Cachoeira do Paraguaçu - o nome se dá por se situar próxima às quedas d'água presentes na cabeceira do Rio Paraguaçu. Já em inícios de 1800, a sociedade cachoeirense detém grande influência política e participa ativamente das guerras pela Independência da Bahia, em 1821. A vila foi elevada à categoria de cidade por decreto imperial de 13 de março de 1873 (Lei Provincial n° 43). Cachoeira é considerada Monumento Nacional pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN).

Santiago do Iguape é uma pequena vila de pescadores e pequenos agricultores quilombolas, pertencente ao município de Cachoeira, localizada na margem esquerda da Baía do Iguape, fundada pelos padres jesuítas em 1561 na então Capitânia de Mem de Sá. Esta baía é formada pelo alargamento do Rio Paraguaçu já perto da sua foz, (sofrendo inclusive influencia das marés), logo após o rio passar pelas cidades de Cachoeira e São Félix. O nome Iguape é

originário da língua dos índios e quer dizer, "lugar existente no seio d'água". As coordenadas geográficas são 12° 41' 05'' de latitude sul e 38° 51' 35'' de longitude oeste de Greenwich.

O município de Maragojipe está localizado na Reserva Extrativista Marinha da Baía do Iguaçu – RESEX e na APA – Área de Proteção Ambiental da Baía de Todos os Santos, ocupando um espaço territorial de 450 Km², entre os paralelos, de 12° 47' de latitude sul e 38° 56' de longitude oeste de Greenwich. Maragojipe conta com uma população de cerca de 42.000 habitantes e por situar-se numa região de estuário, há muitas colônias de pescadores e comunidades ribeirinhas que dependem da pesca.

A amostra deste estudo foi formada por indivíduos não aparentados dos municípios de Cachoeira e Maragojipe em programas comunitários de saúde, realizados pela Faculdade Adventista da Bahia em parceria com a Quarta Divisão Regional de Saúde do Estado da Bahia e as secretarias municipais de saúde. Nestes programas foram oferecidos vários serviços à população tais como: vacinação, orientação para gestantes, educação sexual, tratamento odontológico, aferição da pressão sanguínea, dosagem da glicemia, dentre outros.

No município de Cachoeira foram formados dois grupos: o primeiro com 34 alunos de uma escola pública da zona urbana e o outro grupo com 44 indivíduos do quilombo de Santiago do Iguaçu. No município de Maragojipe o grupo foi formado por 48 indivíduos da zona urbana.

Também foram selecionados 32 pacientes não aparentados com hemoglobinopatias e 22 portadores do traço falcêmico (Hb.AS) diagnosticados no Laboratório de Genética da Faculdade Adventista de Fisioterapia provenientes dos municípios de Santo Antônio de Jesus, Cachoeira, Sapeaçu e Cruz das Almas. Os pacientes foram atendidos no ambulatório do Hospital Luis Argolo no município de Santo Antônio de Jesus e no Hospital Pediátrico de Cruz das Almas (HIPER). Estes hospitais dispõem de um serviço de atendimento para os pacientes com hemoglobinopatias atendendo aos outros municípios da região.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos os participantes dos programas comunitários de saúde e pacientes cujos pais e avós são provenientes da região do Recôncavo Baiano além da participação voluntária mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).



Figura 8. Mapa do Recôncavo Baiano em destaque.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

Após receberem as orientações sobre a participação na pesquisa, os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de acordo com a Resolução CNS 196/1996 contendo as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos e a Resolução CNS 340/2004 contendo as Diretrizes Para Análise Ética e Tramitação dos Projetos de Pesquisa da Área Temática Especial de Genética Humana. Quando os voluntários eram menores de 18 anos, seus pais ou responsáveis assinavam o TCLE. Esta pesquisa foi registrada e aprovada no CEP da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e na CONEP com o número do CAAE 0021.0.000.012-04.

3.4 COLETA DE AMOSTRA BIOLÓGICA E ANÁLISES LABORATORIAIS E MOLECULARES

Foram coletadas amostras de 5 ml de sangue por via parenteral em tubo com anticoagulante EDTA (0,03%) dos voluntários para realização das análises eletroforéticas e moleculares nos laboratórios de genética da Faculdade Adventista da Bahia e da Universidade de Brasília.

3.5 PREPARO DO HEMOLISADO, DETERMINAÇÃO DO PADRÃO ELETROFORÉTICO E QUANTIFICAÇÃO DAS HEMOGLOBINAS

Preparo do Hemolisado. As hemácias foram lavadas três vezes em solução salina isotônica e lisadas em 1,5 volume de água e 0,4 volume de clorofórmio (CHCl_3) à temperatura ambiente por 15 minutos, após agitação vigorosa. O estroma foi removido por centrifugação a 2.500 rpm (rotações por minuto) por 30 minutos e a solução de hemoglobina obtida foi utilizada para as análises qualitativa e quantitativa.

Análise qualitativa das hemoglobinas. Foi realizada a eletroforese do hemolisado em fitas de acetato de celulose em tampão Tris - Borato - EDTA pH 8,9, por 50 minutos, a 220Volts de acordo com Weatherall & Clegg (1981). As alterações hematológicas verificadas em pH alcalino foram confirmadas em eletroforese em gel de ágar a 1% em tampão Citrato – Ácido Cítrico pH 6,0, corrido por 8H a 60mA, corado com benzidina. A comparação entre os dois resultados, forneceu o padrão eletroforético.

Quantificação das Hemoglobinas. A hemoglobina A₂ foi quantificada após eletroforese de 10µl do hemolisado em fitas de acetato de celulose em tampão Tris- Borato - EDTA pH 8.9. A banda correspondente a HbA₂ foi eluída em 3ml do tampão ou água destilada, enquanto as demais hemoglobinas presentes (Hb.S, HbA₁, etc.) foram eluídas juntamente, em 15ml do tampão ou água. Após eluição, o valor das absorvâncias das duas frações foram aferidas a 415nm e calculada a percentagem correspondente à Hb A₂, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de HbA}_2 = (\text{DO HbA}_2 / \text{Hb.S} \times 5 + \text{HbA}_2) \times 100.$$

A HbF foi quantificada pelo método de desnaturação alcalina, baseado na sua maior resistência frente às outras hemoglobinas (cerca de um minuto). A técnica consiste na adição de 0,2 mL de hemolisado a 3,2 mL de solução de hidróxido de sódio (0,083 N). Após 1 minuto, foram acrescentados 6,8 mL de solução de sulfato de amônio saturada (S.A.S.) a 50% e, após incubação a 10 min a temperatura ambiente, o conteúdo foi filtrado em papel Watman - #42. O padrão é constituído de 0,1 mL do hemolisado e 5,0 mL de hidróxido de amônio (0,04 M), que após homogeneização, 0,05 mL desta solução foi transferido para 5,0 mL de hidróxido de amônio à mesma concentração. A percentagem de HbF foi calculada após a leitura espectrofotométrica em comprimento de onda 415nm, utilizando-se a fórmula: $\% \text{ HbF} = \text{DO do filtrado} / \text{DO do padrão}$ (RAMALHO, 1986).

3.6 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA foi isolado de leucócitos a partir de 100 µL de sangue venoso, utilizando-se o método *GFXTM Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech)*. Em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) foram colocados 500 µL de Solução de Extração (Solução Tampão contendo substância caotrópica e detergente) e 100 µL de sangue total, agitados em vortex e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente.

A mistura de extração foi transferida para a coluna GFX e centrifugada (5.000 g) por 1 minuto. Em seguida foi adicionada à coluna 500 µL da solução de extração e centrifugada a 5.000g por 1 min e acrescentado 500 µL da solução de lavagem, novamente centrifugado a 12.000 – 16.000 rpm por 3 min. Após este processo, adiciona-se 100 µL de tampão de eluição (água deionizada estéril), pré-aquecido (70⁰ C), incubando à temperatura ambiente por 1 min e em seguida centrifugado a 5000g (8.000 rpm) para recuperar o DNA purificado.

3.7 CONFIRMAÇÃO DAS HEMOGLOBINAS VARIANTES Hb.S E Hb.C

As hemoglobinas variantes Hb.S e Hb.C que foram detectadas por eletroforese de hemoglobina em meio alcalino tiveram sua confirmação pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de digestão com as enzimas de restrição apropriadas.

O protocolo de reação é uma modificação da técnica de ARMS (Amplification Refractory Mutation System) apresentada em Attila et al (2004); utiliza 25 pM de cada iniciador (ver seqüências na tabela 2), tampão Tris-HCl (pH 8,3) a 10 mM, cloreto de potássio (KCl) a 50 mM, cloreto de magnésio (MgCl₂) a 1,5 mM, desoxinucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) da *Pharmacia* a 200 µM de cada dNTP, Taq polimerase a 1,0 U (*Perkin Elmer Cetus Corporation*) e 100 ng do DNA genômico para um volume final de reação de 25 µL.

Tabela 2. Seqüências dos iniciadores pra Hb.S e Hb.C

<i>Nome</i>	<i>Seqüências</i>
P277	gCCAgAgCCATCTATTgCTTA
P278	ACCTTAaggTTgCCCATAAC

As condições de amplificação correspondem a uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 95°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 30 seg. a 94°C para desnaturação, 30 seg. a 55°C para pareamento dos iniciadores e 1 min a 72°C para polimerização e uma etapa final de 10 min a 72°C.

3.8 ESQUEMA DE DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR E ANÁLISES DOS FRAGMENTOS NO GEL

Cada reação de digestão utilizou 10 µL da reação de PCR, 1,0 unidade da enzima *Dde I* para a detecção da Hb.S, 1 unidade da enzima *BseR I* para detecção da Hb.C, o tampão de cada enzima e água milliQ para completar um volume final de 25 µL. As reações foram colocadas em banho-maria a 37° C durante a noite ou por três horas. A análise da digestão foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, 85-90 Volts, 20-30 minutos e corado com Brometo de

Etídio (0,5 µg/mL). A visualização se deu em Transiluminador UV tendo como marcador de peso molecular o ΦX174 digerido com HaeIII.

A mutação no códon 6 (GAG>AAG) elimina um sítio de restrição da Enzima *BseR I* (gaggag) na globina β^C. Assim, após a digestão, o alelo normal gera um fragmento de 83 pb e outro de 293 pb e o alelo mutante só gera um fragmento com 382 pb. Outra mutação no mesmo códon (GAG>ATG) elimina um sítio de restrição da Enzima *Dde I* (c/tnag). Assim, após a digestão, o alelo normal gera três fragmentos: um de 78 pb, um de 201 pb e outro de 87 pb. O alelo mutante gera um fragmento de 288 pb e outro de 87 pb.

3.9 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS LIGADOS AO GRUPO DE GENES DA GLOBINA β

A análise dos polimorfismos de DNA foi feita a partir da modificação da técnica apresentada em Sutton et al (1989). Inicialmente, os segmentos de DNA contendo cada um dos sítios polimórficos analisados: 1) Hinc II, na região 5' do gene ε; 2) Hind III no IVS-2 do gene ^Gγ; 3) Hind III no IVS-2 do gene ^Aγ; 4) Hinc II no gene ψβ; 5) Hinc II na região 3' do ψβ e 6) Hinf I na região 5' do gene β foram amplificados através da técnica de PCR.

A reação de cada amplificação foi feita com 25 pM de cada oligonucleotídeo, tampão Tris-HCl (pH 8,3) a 10 mM, cloreto de potássio (KCl) a 50 mM, cloreto de magnésio (MgCl₂) a 1,5 mM, desoxinucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Pharmacia*) a 200 µM de cada (dNTP), Taq polimerase a 1,0 U (*Perkin Elmer Cetus Corporation*) e 100 ng do DNA genômico para um volume final de reação de 25 µL.

As condições de amplificação correspondem a uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 95°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 1 min a 94°C para desnaturação, 1 min a 54 a 57°C para pareamento dos iniciadores e 2 min a 72°C para polimerização e uma etapa final de 7 min a 72°C. As seqüências e a temperatura específica de pareamento dos iniciadores são apresentadas na tabela 3. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5 % corados com Brometo de Etídio (0,5 µg/mL) tendo como marcador de peso molecular o Ladder 1 Kb da Gibco.

Tabela 3. Sequências dos iniciadores e temperaturas de pareamento usadas na amplificação para as diferentes regiões.

<i>Sequência de Iniciadores (5'→3')</i>	<i>Região do cluster da β-Globina</i>	<i>Temperatura de pareamento (°C)</i>	<i>Tamanho dos produtos amplificados (pb)</i>	<i>Enzima de Restrição</i>
1.TAgTCCCAGTgTggACTACTT				
2.CCTgAgAgCTTgCTAgTgATT	5' ϵ	57	619	Hinc II
3.AAgTgTggAgTgTgCACATgA	γ^G	56	770	Hind III
4.TgCTgCTAATgCTTCATTACAA ¹	γ^G, γ^A	56, 57		
5.TAAATgAggAgCATgCACACAC	γ^A	57	760	Hind III
6.gAACAgAAgTTgAgATAgAgA				
7.ACTCAGTggTCTTgTgggCT	$\Psi\beta$	55	700	Hinc II
8.TCTgCATTTgACTCTgTTAgC				
9.ggACCCTAACTgATATAACTA	3' $\psi\beta$	54	590	Hinc II
10.CTACgCTgACCTCATAAATg				
11.CTAATCTgCAAgAgTgTCT	5' β	55	380	Hinf I

¹ A sequência n. 4 amplifica ambas as regiões γ^G, γ^A à temperaturas de 56°C e 57°C respectivamente. Os iniciadores 1 e 2 foram descritos por Guerreiro *et al.* (1992) e os demais por Sutton *et al.* (1989).

3.10 DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Os seis sítios de restrição polimórficos considerados neste estudo, foram detectados usando as enzimas de restrição HincII (três polimorfismos), HindIII (dois polimorfismos) e Hinf I. Estes sítios estão distribuídos ao longo de uma região de 40 Kb a 5' do gene da globina β no braço *p* do cromossomo 11.

Cada reação de digestão utilizou 5 μ L da reação de PCR, 1,0 unidade da enzima apropriada (tabela 3), o tampão de cada enzima e água milliQ para completar um volume final de 25 μ L. As amostras foram colocadas em banho-maria a 37° C durante duas horas e os produtos da digestão, foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídio (0,5 μ g/mL) em Transiluminador UV tendo como marcador de peso molecular o Φ X174 digerido com HaeIII.

3.11 DETERMINAÇÃO DE TALASSEMIA α^2 (DELEÇÃO 3,7 KB)

A técnica de PCR utilizou três seqüências de iniciadores simultaneamente (multiplex-PCR) para detecção da deleção 3,7 Kb em um dos genes da globina α localizado no braço *q* do cromossomo 16. A tabela 4 mostra a seqüência dos iniciadores utilizados. A reação de cada amplificação foi feita com 0,67 μ M dos iniciadores α_2 R e 3.7R e 1,3 μ M do oligonucleotídeo $\alpha_2/3.7$ F (tabela 4), tampão Tris-HCl (pH 8,3) a 10 mM, cloreto de potássio (KCl) a 50 mM, cloreto de magnésio ($MgCl_2$) a 3,0 mM, desoxinucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) da *Pharmacia* a 200 μ M de cada dNTP, β – Mercaptoetanol (10,0 mM), DMSO (7,5%), Taq polimerase a 1,25 U (*Perkin Elmer Cetus Corporation*) e 100 ng do DNA genômico para um volume final de reação de 25 μ L. Estas condições de reação foram obtidas a partir da modificação da técnica apresentada em Chong et al. (2000).

Tabela 4. *Iniciadores* utilizados para determinação da Talassemia $\alpha^2 - 3,7$

<i>Nome</i>	<i>Seqüências Talassemia α^2 3.7</i>
$A_2/3.7$ F	CTggCCAAACCATCACTTTT
3.7 R	CTCCACTTTCCCTCCTCCAT
A_2 R	gTgCAAaggAggggAggAg

As condições de amplificação correspondem a uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 95° C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 45 seg. a 94° C para desnaturação, 1 min a 63° C para pareamento dos iniciadores e 2 min a 72° C para polimerização e uma etapa final de 5 min a 72° C.

Os produtos amplificados foram confirmados através da corrida eletroforética em tampão TBE 1X (Tris–Borato 0,09M, EDTA 0,001M) em gel de agarose a 1,0%, usando o azul de bromofenol/xilenocianol/sacarose (0,25%/0,25%/40%) e os fragmentos obtidos foram visualizados, utilizando o brometo de etídio 0,002% sob iluminação ultravioleta. Para controle do fragmento encontrado foi utilizado como marcador, o DNA do Fago Lambda (λ) digerido com a enzima de restrição Hind III.

3.12 EXAMES COMPLEMENTARES DOS PACIENTES

Os pacientes também foram submetidos a exames complementares tais como hemograma e leucograma para avaliarmos os índices hematológicos e hematimétricos. Um paciente composto para anemia falciforme e α -talassemia realizou além do hemograma e leucograma, exames de imagem como ultrassonografia abdominal e radiografia do tórax e dosagens bioquímicas tais como bilirrubina, ferritina e desidrogenase láctica. Estes exames foram realizados por um laboratório de análises clínicas.

3.13 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS

Quando caracterizamos os genótipos de um indivíduo para vários polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) fortemente ligados, dois haplótipos são construídos, um proveniente do pai e outro da mãe. Os métodos atuais de genotipagem não provêm informação haplotípica, a qual é essencial para análises de escala-fina (fine-scale) de dados de genética molecular. Os haplótipos podem ser obtidos a um custo experimental considerável ou (parcialmente) através da genotipagem de membros adicionais das famílias. Felizmente, existem métodos estatísticos que podem ser usados para inferir os haplótipos e suas frequências a partir dos genótipos de indivíduos não aparentados.

Estes métodos estatísticos e programas computacionais que os utilizam, repousam sobre o fato de que, em regiões de baixa recombinação, um número relativamente pequeno de haplótipos será observado em qualquer população. Para identificar os haplótipos e calcular as suas frequências nas populações analisadas, nós utilizamos o programa PHASE 2.1.1 que utiliza o algoritmo baesiano e apresenta melhor desempenho que os outros algoritmos (STEPHENS et al, 2001; STEPHENS e DONNELLY, 2000 e STEPHENS e SCHEET, 2005). O programa Phase 2.1.1 foi cedido gratuitamente pelo Departamento de Estatística da Universidade de Washington após a solicitação via Internet (<http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>).

O método de identificação adotado pelo PHASE assume os haplótipos desconhecidos como quantidades aleatórias não observadas e parte para avaliar sua distribuição condicional a partir do conjunto de dados genotípicos. Para isto, o programa usa o Teste de Gibbs (Gibbs Sampling), um algoritmo que combina o método da cadeia de Markov com o método de Monte Carlo (MCMC) para obter uma amostra aproximada da distribuição posterior de H

(correspondente aos pares de haplótipos desconhecidos) dado G (genótipos para os indivíduos conhecidos), $Pr(H/G)$. O algoritmo inicia espontaneamente com um suposto haplótipo $H^{(0)}$ para H , repetidamente escolhe um indivíduo ao acaso, e estima a probabilidade dos haplótipos de cada indivíduo sob a suposição de que todos os outros haplótipos estão reconstruídos corretamente. Repetindo este processo diversas vezes resulta em uma amostra aproximada de $Pr(H/G)$.

Este método envolve a construção de uma cadeia de Markov $H^{(0)}, H^{(1)}, H^{(2)}, \dots$, com distribuição estacionária $Pr(H/G)$, sobre o espaço de possíveis reconstruções de haplótipos usando um algoritmo que começa com a reconstrução de um haplótipo inicial $H^{(0)}$ para $t = 0, 1, 2, \dots$, obtém $H^{(t+1)}$ de $H^{(t)}$ usando os passos seguintes:

1. Escolha de um indivíduo i ao acaso de todos os indivíduos ambíguos (isto é, indivíduos com mais de um haplótipo possível).
2. Calcular $H^{(t+1)}$ a partir de $Pr(H_i | G, H_{-i}^{(t)})$, onde H_{-i} é o conjunto de haplótipos menos o indivíduo i .
3. Transpor $H_j^{(t+1)} = H_j^{(t)}$ para $j = 1, \dots, n, j \neq i$.

Desta forma se produz uma cadeia de Markov com distribuição estacionária requerida. A dificuldade na implementação deste algoritmo acima reside no passo 2. Para fazer a distribuição condicional $Pr(H_i | G, H_{-i})$ que nós desejamos calcular, dependemos de algumas informações prévias sobre modelos genéticos e demográficos importantes para calcular as frequências dos haplótipos na população, mas que são desconhecidas para a maioria dos modelos de interesse. Apesar disso, para auxiliar na elaboração desta distribuição condicional, Stephens e Donnelly (2000) assumiram a seguinte condição: para um par de haplótipos $H_i = (h_{i1}, h_{i2})$ consistente com o genótipo G_i , nós temos:

$$\begin{aligned} Pr(H_i | G, H_{-i}) &\propto Pr(H_i | H_{-i}) \\ &\propto \pi(h_{i1} | H_{-i})\pi(h_{i2} | H_{-i}, h_{i1}), \end{aligned} \quad (1)$$

onde $p(.|H)$ é a distribuição condicional de um haplótipo futuramente sorteado, dado um conjunto de haplótipos previamente sorteado (H). Esta distribuição condicional em geral não é conhecida. Entretanto, é conhecida no caso particular de *mutação independente dos pais*, no qual o tipo de prole mutante é independente do tipo parental.

Embora este modelo não seja próprio para os tipos de sistemas que nós estamos interessados (por exemplo, seqüências de DNA, microssatélites multilocus e SNPs) ele tem a vantagem de ser um algoritmo simples cuja performance é muito melhor e apresenta pelo menos duas vantagens quando comparados com os algoritmos de maximização da expectativa. Ele pode ser aplicado a um número muito grande de *loci* e captura naturalmente a incerteza associada com a reconstrução dos haplótipos (STEPHENS et al, 2001).

O algoritmo implementado pelo PHASE resulta de pressuposições mais realísticas sobre a forma de distribuição condicional $\pi (\cdot | H)$. Embora na maioria dos modelos mutacionais ou demográficos ela não seja conhecida, Stephens e Donnelly (2000) fizeram uma aproximação formal para a definição expressa na equação (1). Para um modelo geral com vários tipos de mutação em um conjunto E , e uma matriz de mutações P , a aproximação é a seguinte:

$$\pi(h | H) = \sum_{\alpha \in E} \sum_{s=0}^{\infty} \frac{r_{\alpha}}{r} \left(\frac{\theta}{r + \theta} \right)^s \frac{r}{r + \theta} (P^s)_{\alpha b} , \quad (2)$$

onde r_{α} é o número de haplótipos do tipo α no conjunto H , r é o número total de haplótipos em H , e θ é a taxa de mutação balanceada. Informalmente, isto corresponde ao próximo haplótipo h da amostra, sendo obtido aplicando-se um número aleatório de mutações s para um haplótipo α existente escolhido aleatoriamente, enquanto s é sorteado de uma distribuição geométrica.

A equação (2) surgiu a partir da consideração da distribuição das genealogias de indivíduos sorteados e ligados aleatoriamente pelo método de coalescência, como descrito em Hudson (1991) e a partir da qual esta distribuição prevê a similaridade entre um cromossomo sorteado posteriormente e outro cromossomo sorteado previamente. Os cromossomos que serão sorteados posteriormente tendem a ser mais similares aos cromossomos sorteados previamente à medida que o tamanho da amostra r aumenta e a taxa de mutação θ decai (STEPHENS e DONNELLY, 2000).

A equação (2) captura a idéia de que o próximo haplótipo sorteado é visto como idêntico ou similar a qualquer outro haplótipo que já tenha sido observado aumentando assim a precisão do algoritmo (Figura 9). O método estatístico PHASE aplicado para a reconstrução de haplótipos, portanto, está baseado na substituição da equação (1) pela equação (2) para implementar o passo número 2 do algoritmo apresentado por Gibbs (STEPHENS et al, 2001).

O programa PHASE 2.1.1 também executa um teste para avaliar a significância da distribuição haplotípica entre o grupo de pacientes e o grupo de indivíduos normais a fim de realizar estudos de associação. Para isto o programa utiliza um teste estatístico denominado *PAC-likelihood* (LI e STEPHENS, 2003). Este procedimento é essencialmente uma taxa de probabilidades usando o *PAC-likelihood* como probabilidade. A diferença entre este método e os mais convencionais os quais são baseados no equilíbrio de Hardy-Weinberg e nas frequências de haplótipos desconhecidos, é que o *PAC-likelihood* leva em consideração a similaridade dos haplótipos e o decaimento do desequilíbrio de ligação com a distância. O resultado é um aumento no poder de detectar uma situação em que os casos são mais similares em um determinado grupo do que se fosse esperado por acaso.

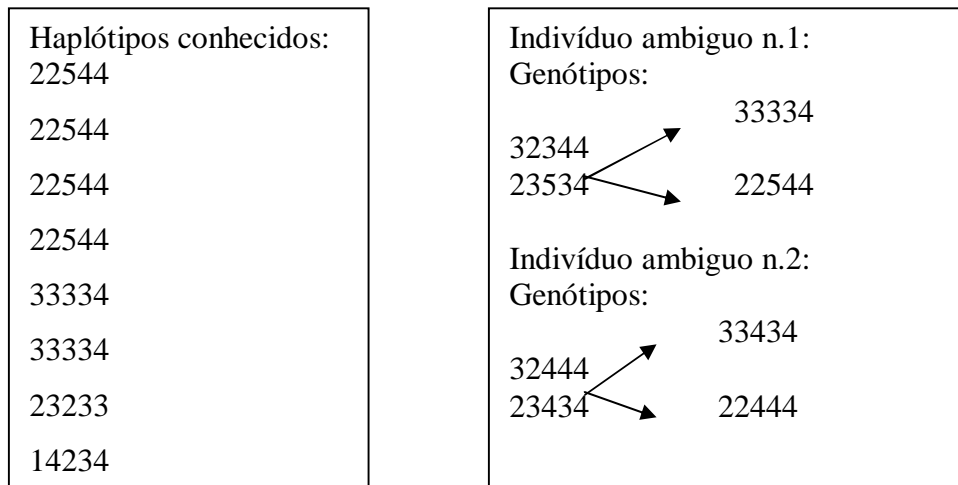


Figura 9. Ilustração mostrando como o algoritmo baesiano usa haplótipos indeterminados mais semelhantes aos haplótipos conhecidos. Suponha uma lista de haplótipos, como mostrado no lado esquerdo da figura que são conhecidos sem erro (de dados familiares ou porque alguns indivíduos são homozigotos). Então, intuitivamente, o par de haplótipos atribuídos ao indivíduo ambíguo n.1 consiste em dois haplótipos que têm frequência elevada na população como evidenciado. Todos os métodos irão identificar corretamente como sendo a identificação mais comum. Entretanto, o indivíduo ambíguo n.2 não possui nenhum da lista dos haplótipos mais conhecidos e a identificação mais plausível para este indivíduo consiste em dois haplótipos que são similares, mas não idênticos aos haplótipos com frequências mais elevadas na população. Dos métodos existentes, apenas o algoritmo baesiano leva em conta este último tipo de informação aperfeiçoando assim a identificação dos haplótipos (modificado de STEPHENS et al, 2001).

3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

3.14.1 Frequências dos sítios de restrição e dos haplótipos

As análises foram feitas considerando cada sítio de restrição como um locus individual com dois alelos, um alelo indicando a presença do sítio (+) e o outro indicando a ausência (-). Em seguida consideramos a combinação de alelos para os sítios analisados formando os haplótipos.

As frequências alélicas dos sítios de restrição em cada população foram estimadas por contagem direta utilizando-se o programa GDA (Genetic Data Analysis – LEWIS e ZAYKIN, 1997). Representando-se a frequência do genótipo A_iA_j por X_{ij} , a frequência do alelo “ i ” é dada por:

$$X_i = X_{ij} + \frac{1}{2} \sum_{j \neq i} X_{ij}$$

Onde $\sum_{j \neq i}$, indica a somatória de X_{ij} (frequência de todos os genótipos que apresentam o alelo “ i ”), exceto quando $i = j$. O número médio de alelos por locus em cada população foi obtido pelo mesmo programa, fazendo-se a somatória do número de alelos observados em cada um dos *loci* analisados em uma dada população e dividindo o valor encontrado pelo número total de *loci*.

A heterozigose observada (H_o) foi calculada a partir da seguinte equação:

$$H_o = \sum_{j \neq i} X_{ij}$$

3.14.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Foram realizados três tipos de testes para verificar a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. O teste exato de Guo e Thompson (1992), utilizado para verificar se as frequências genotípicas se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi escolhido por ser indicado em situações que a amostra utilizada e/ou algumas frequências alélicas são pequenas. Ao invés de calcular a probabilidade exata de uma dada distribuição multinomial, este teste usa de procedimentos aleatórios para obter uma aproximação da probabilidade exata real. O teste exato foi feito pelo método convencional de Monte Carlo realizando um total de 100.000 permutações (100 *batches* de 1000 permutações) utilizando-se o programa Genepop (RAYMOND e

ROUSSET, 1995), obtendo-se desta maneira um erro padrão médio de 0,0095. A hipótese nula é a de que a união dos gametas ocorre de maneira aleatória.

Testes globais complementares foram realizados pelo teste exato de Fisher, assumindo-se a independência entre os *loci* utilizados: o teste multilocus (que analisa a frequências genotípicas de todos os *loci* em uma única população) e o teste multipopulacional (que analisa as frequências genotípicas de um único locus, em todas as populações). Para isto foi utilizado o programa Genepop (RAYMOND e ROUSSET, 1995), e novamente a hipótese nula é a de união aleatória dos gametas.

Foram também aplicados testes estatísticos mais poderosos, com uma maior sensibilidade ao excesso ou à deficiência de heterozigotos, conhecidos como “score (U) test (HE)”, aqui chamado de teste sensível ao excesso de heterozigotos e “score (U) test (HD)”, aqui chamado de teste sensível à deficiência de heterozigotos (RAYMOND e ROUSSET, 1995; DESTRO-BISOL et al, 2000). Nestes dois casos, a hipótese nula é a união aleatória dos gametas e a hipótese alternativa (H_1) é excesso e deficiência de heterozigotos, respectivamente. Estas análises foram feitas utilizando-se o programa Genepop (RAYMOND e ROUSSET, 1995). Os testes foram feitos para cada população e também nas versões multilocus e multipopulacional, com um total de 100.000 permutações (100 *batches* de 1000 permutações) utilizando-se 1000 passos de desmemorização.

3.14.3 Teste de Desequilíbrio de Ligação Entre os Pares de *Loci*

O desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci* foi analisado utilizando o programa Genepop (RAYMOND e ROUSSET, 1995). Para isso, foram criadas tabelas de contingência de distribuição genotípica para todos os pares de *loci* dentro de cada população (inicialmente considerando cada população isoladamente e finalmente em uma única população) e depois realizado o teste de probabilidade (ou teste exato de Fisher) para cada tabela usando o método da cadeia de Markov.

Os cálculos foram feitos com um total de 100.000 permutações (100 *batches* de 1000 permutações), utilizando-se 1000 como número de desmemorização. A hipótese nula é a de que a distribuição genotípica em um locus é independente da distribuição em outro locus.

3.14.4 Diversidade Intra-populacional

A diversidade genética intra-populacional foi estimada pela heterozigose média (H) em cada população de acordo com a equação apresentada por Nei (1987):

$$H = \sum_{j=1}^r \frac{h_j}{r}$$

Onde “ r ” é o número de *loci* utilizados e h_j , de acordo com a equação 8.1 de Nei (1987), é a heterozigose esperada para cada *locus* na j -ésima população que é estimada por:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

Onde m é o número de alelos. Esta medida de heterozigose média é equivalente à proporção média de heterozigotos por *locus* em uma população com padrão de acasalamento aleatório e também é igual à proporção de *loci* heterozigotos em um indivíduo escolhido aleatoriamente. O erro padrão desta estimativa é descrito pela seguinte equação adaptada (NEI, 1987).

$$S.E.(H) = \left[\sum_{j=1}^r (h_j - H)^2 / (r-1)r \right]^{1/2}$$

A estimativa não-viesada da diversidade genética por *locus* por população, foi obtida de acordo com a equação 7.39 proposta por Nei (1987), utilizando-se o programa Fstat – versão 2.8 (GOUDET, 1995):

$$H_{sk} = \frac{n_k}{n_k - 1} \left(1 - \sum p_{ik}^2 - H_{ok} / 2n_k \right)$$

Onde n_k é o tamanho da k -ésima amostra, p_{ik} é a frequência do alelo “ i ” na amostra k e H_{ok} é a proporção de heterozigotos observada na amostra k .

O H_s total, também calculado pelo programa Fstat, foi obtido por variação da equação acima:

$$H_s = \frac{\tilde{n}}{\tilde{n} - 1} \left(1 - \sum \overline{p_i^2} - H_o / 2\tilde{n} \right)$$

Onde \tilde{n} é a média harmônica de n_k [$\tilde{n} = \frac{np}{\sum k1/n_k}$], $\overline{p_i^2} = \sum_k p_{ik}^2 / np$ (np = número de amostras).

3.14.5 Estatísticas F e Diversidade Inter-populacional

O uso das estatísticas F, introduzidas por Wright (WRIGHT, 1951), permite a partição da deficiência de heterozigotos em seus componentes intra-populacional e inter-populacional. Assim são definidos três parâmetros: F_{IS} , que mede o déficit de heterozigotos dentro de populações, F_{ST} , que mede o déficit de heterozigotos entre populações e F_{IT} o déficit global de heterozigotos.

O F_{IT} (coeficiente de endogamia total) é a correlação de genes dentro dos indivíduos. O F_{IS} (coeficiente de endogamia de uma população) é a correlação de genes em indivíduos dentro de populações. O F_{ST} (coeficiente de coancestralidade) é a correlação de genes de diferentes indivíduos em uma mesma população, sendo uma estimativa da diversidade genética inter-populacional. Estes três parâmetros estão relacionados da seguinte maneira:

$$F_{IS} = (F_{IT} - F_{ST}) / (1 - F_{ST})$$

Os valores de F_{ST} foram calculados para os pares de populações e a partir destes valores foi obtida uma matriz de distâncias. O programa emprega o procedimento de *bootstrap* para estimar a significância dos valores de Estatísticas F obtidos; para isso realiza um total de 30.000 replicações sobre o banco de dados original, e a partir destas 30.000 réplicas, calcula os valores de Estatísticas F e estabelece intervalos de confiança de 95% e 99%, obtendo-se valores de significância aos níveis de 0,05 e 0,01, respectivamente. Os valores de Estatísticas F foram considerados significativamente diferentes de zero se o intervalo de confiança não inclui o valor em questão (zero). Na análise dos haplótipos não foi empregado o procedimento de *bootstrap*. As análises foram realizadas segundo Weir e Cockerham (1984), utilizando-se o programa GDA (LEWIS e ZAYKIN, 1997).

A diversidade genética inter-populacional também foi estimada pelo cálculo de G_{ST} , utilizando-se o programa Fstat que segue a equação 8.27 de Nei (1987). Esta estimativa foi obtida para fins de comparação com dados da literatura, visto que boa parte dos trabalhos existentes utiliza o G_{ST} nas análises de diversidade inter-populacional.

3.14.6 Teste Exato de Diferenciação Populacional

Com o objetivo de analisar se existem diferenças nas frequências alélicas para cada locus nas três populações, nós testamos a hipótese de uma distribuição aleatória de k diferentes

haplótipos ou genótipos entre r populações (RAYMOND e ROUSSET, 1995). Este teste é análogo ao teste exato de Fisher com tabelas de contingência 2×2 aplicado a uma tabela de contingência $r \times k$. Todo o potencial das tabelas de contingência é explorado com uma cadeia de Markov similar ao teste de desequilíbrio de ligação.

Entre as tabelas que foram construídas pela cadeia de Markov, nós estimamos a probabilidade de observar uma tabela igual à tabela das amostras sob a condição delas estarem em panmixia (ou seja, as distribuições alélicas e haplotípicas são idênticas nas três populações). Utilizamos o programa Genepop (RAYMOND e ROUSSET, 1995) para realizar este teste quando consideramos cada locus individualmente, com cálculos feitos com um total de 500.000 permutações (100 batches de 5000 permutações).

Para que a estimativa seja não-viesada, o ideal é começar com uma cadeia escolhida aleatoriamente a partir de uma determinada distribuição de tabelas. Se a cadeia é iniciada a partir de um estado arbitrário como por exemplo, um estado observado, então a estimativa será viesada, especialmente se o estado inicial corresponde a uma região de baixa probabilidade. Uma solução é começar a cadeia a partir de um estado inicial e correr por um longo tempo e então aquele estado inicial é “esquecido”. Este processo é conhecido como desmemorização (GUO e THOMPSON, 1992). Para esta análise, utilizamos 10.000 como número de desmemorização.

3.14.7 Cálculo de mistura étnica

As proporções étnicas foram calculadas pelo método de identidade gênica (CHAKRABORTY, 1985) através do programa ADMIX95 (adquirido pelo sítio: <http://www.genetica.fmed.edu.uy/software.htm>) para uma população tri-híbrida. As frequências alélicas representativas das populações africana, européia e indígena foram a média das frequências encontradas na literatura. Os artigos consultados encontram-se na sessão de anexos.

4 RESULTADOS

4.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS E HETEROZIGOSE DOS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO E MOLÉCULAS DE HB

As frequências de cada sítio e dos alelos para a molécula de Hb e a distribuição dos genótipos estão demonstradas nas tabelas 5 e 6, respectivamente. As frequências para a ausência dos sítios de restrição nos *loci* *Hinc II 5'ε*, *Hind III – IVS-2^{Gγ}*, *Hind III – IVS-2^{Aγ}* e *Hinc II ψβ1* foram superiores à presença desses sítios enquanto que nos *loci* *Hinc II 3'ψβ1* e *Hinf I 5'β* ocorreu o inverso. As frequências do alelo da Hb. A variaram de 0,8977 na população de Iguape a 0,9583 na população de Maragogipe. As frequências mais elevadas dos alelos Hb. C e Hb. S foram encontradas em Iguape sendo de 0,0227 e 0,0795 respectivamente.

O menor valor de heterozigose observada (*Ho*) por contagem direta para os sítios de restrição foi de 0,0357 na população de Iguape para o locus *Hinc II ψβ1*, enquanto que o maior valor observado foi de 0,60 no locus *Hinc II 5'ε*, na população de Maragogipe (Tabela 7). Já os níveis de heterozigose para a mutação no locus da molécula da Hb. variaram de 0,0833 a 0,1591. A heterozigose observada em cada população variou desde 0,3199 na população de Iguape até 0,3827 na população de Maragogipe (Tabela 7).

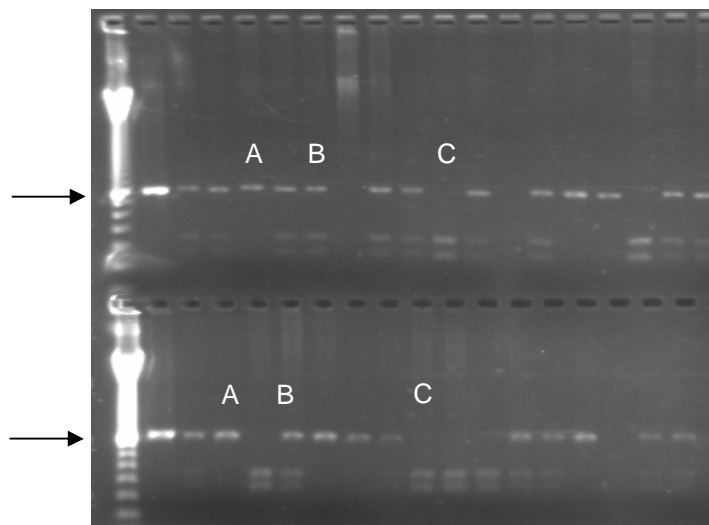


Figura 10. Gel de agarose 1,5% mostrando os resultados da digestão dos fragmentos amplificados para os *loci* *Hind III IVS-2^{Gγ}* e *Hinc II ψβ1*. O marcador de peso molecular 1 Kb. A seta assinala uma banda de 500 pb. A, B e C correspondem aos indivíduos homozigoto para ausência do sítio do sítio de restrição, heterozigoto e homozigoto para presença do sítio.

Tabela 5. Frequências dos seis sítios de restrição da β -globina e das moléculas de Hb. nas populações de Maragojipe, Cachoeira e Iguape por contagem direta através do programa Convert. Para os alelos dos sítios de restrição os números 1 e 2 indicam, respectivamente a ausência e presença do reconhecimento para a clivagem pela enzima apropriada.

<i>Locus</i>	<i>Alelo</i>	<i>Populações</i>			<i>Total</i>
		Maragojipe	Cachoeira	Iguape	
<i>Hinc II 5' C</i>	1	0,6750	0,6833	0,7833	0,7100
	2	0,3250	0,3167	0,2167	0,2900
<i>Amostra</i>	-	40	30	30	100
<i>Hind III – IVS-2 Gγ</i>	1	0,5638	0,6765	0,5469	0,5929
	2	0,4362	0,3235	0,4531	0,4071
<i>Amostra</i>	-	47	34	32	113
<i>Hind III – IVS-2 Aγ</i>	1	0,7396	0,9118	0,8036	0,8091
	2	0,2604	0,0882	0,1964	0,1909
<i>Amostra</i>	-	48	34	28	110
<i>Hinc II $\psi\beta 1$</i>	1	0,8438	0,9000	0,9821	0,8962
	2	0,1562	0,1000	0,0179	0,1038
<i>Amostra</i>	-	48	30	28	106
<i>Hinc II 3' $\psi\beta 1$</i>	1	0,3404	0,3667	0,3281	0,3440
	2	0,6596	0,6333	0,6719	0,6560
<i>Amostra</i>	-	47	30	32	109
<i>Hinf I 5' β</i>	1	0,2556	0,2647	0,2656	0,2613
	2	0,7444	0,7353	0,7344	0,7387
<i>Amostra</i>	-	45	34	32	111
<i>Hemoglobina</i>	A	0,9583	0,9412	0,8977	0,9325
	S	0,0312	0,0441	0,0795	0,0516
	C	0,0104	0,0147	0,0227	0,0159
<i>Amostra</i>	-	48	34	44	126

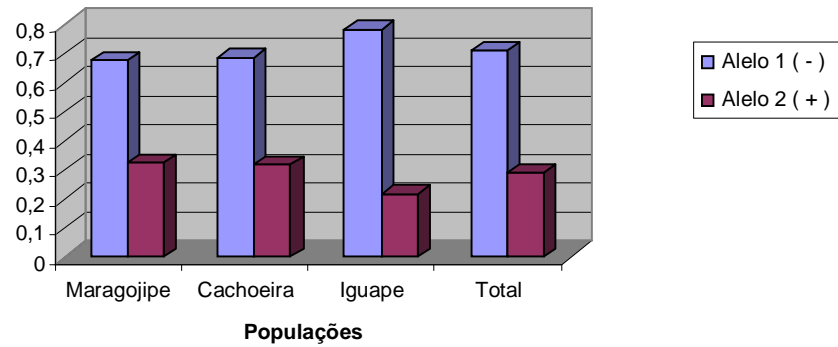


Figura 11. Frequências alélicas - Locus Hinc II 5' ϵ

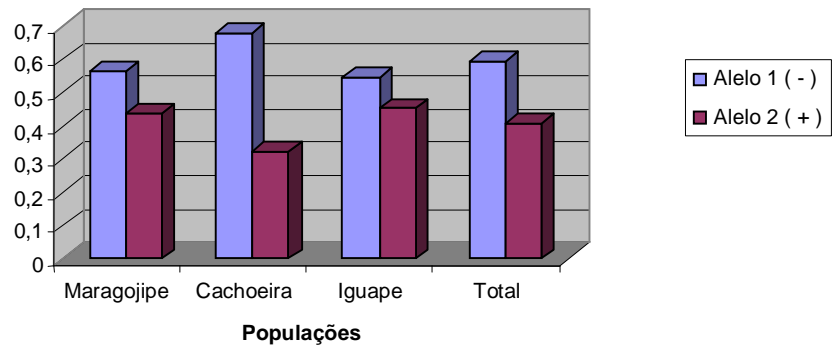


Figura 12. Frequências alélicas - Locus Hind III IVS-2 $G\gamma$

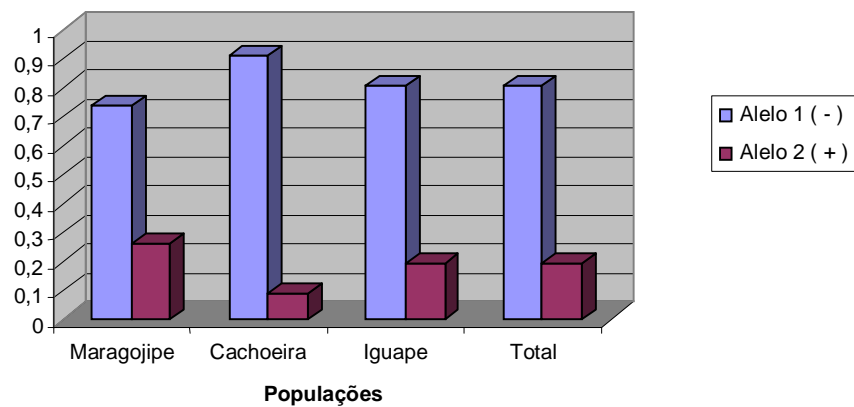


Figura 13. Frequências alélicas - Locus Hind III IVS-2 $A\gamma$

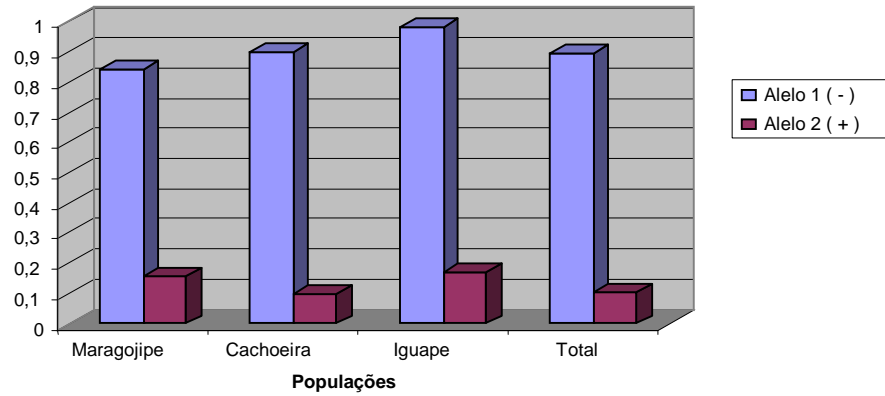


Figura 14. Frequências alélicas - Locus Hinc II $\psi\beta 1$

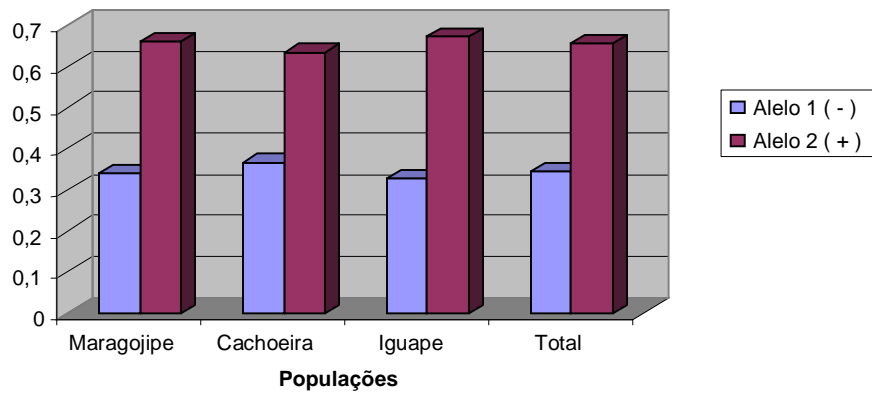


Figura 15. Frequências alélicas - Locus Hinc II 3' $\psi\beta 11$

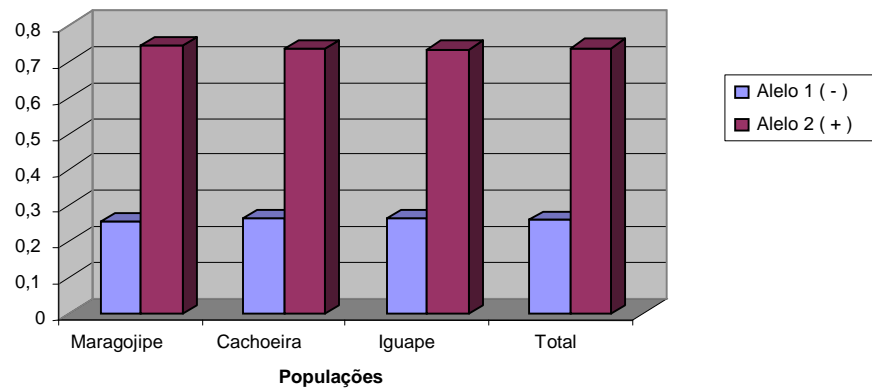


Figura 16. Frequências alélicas - Locus Hinf I 5'- β

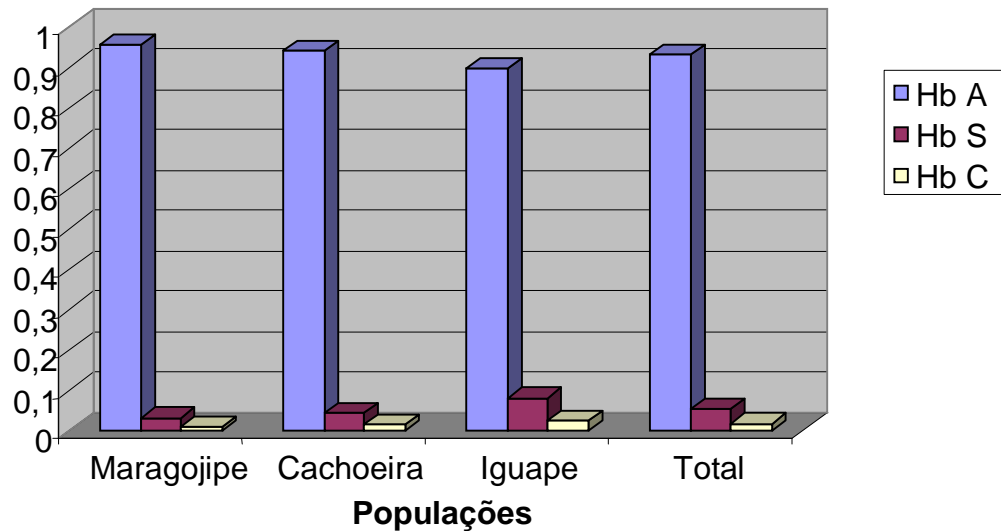


Figura 17. Frequências alélicas da Hemoglobina

Tabela 6. Distribuições genótípicas observadas para os sete *loci* analisados nas três populações. Entre parêntesis, os genótipos para cada *locus*, o sinal “-” significa a ausência e o sinal “+” a presença do sítio reconhecido pela enzima de restrição.

<i>Locus (genótipos)</i>	<i>Populações</i>			<i>Total</i>
	Marajojipe	Cachoeira	Iguape	
<i>Hinc II 5' C (-/-)</i>	15	13	17	45
<i>Hinc II 5' C (+/-)</i>	24	15	13	52
<i>Hinc II 5' C (+/+)</i>	1	2	0	3
<i>Amostra</i>	40	30	30	100
<i>Hind III Gγ (-/-)</i>	15	15	12	42
<i>Hind III Gγ (+/-)</i>	23	16	11	50
<i>Hind III Gγ (+/+)</i>	9	3	9	21
<i>Amostra</i>	47	34	32	113

<i>Hind III</i> ^A γ (-/-)	25	29	17	71
<i>Hind III</i> ^A γ (+/-)	21	4	11	36
<i>Hind III</i> ^A γ (+/+)	2	1	0	3
<i>Amostra</i>	48	34	28	110
<i>Hinc II</i> $\psi\beta 1$ (-/-)	34	24	27	85
<i>Hinc II</i> $\psi\beta 1$ (+/-)	13	6	1	20
<i>Hinc II</i> $\psi\beta 1$ (+/+)	1	0	0	1
<i>Amostra</i>	48	30	28	106
<i>Hinc II</i> 3' $\psi\beta 1$ (-/-)	5	5	3	13
<i>Hinc II</i> 3' $\psi\beta 1$ (+/-)	22	12	15	49
<i>Hinc II</i> 3' $\psi\beta 1$ (+/+)	20	13	14	47
<i>Amostra</i>	47	30	32	109
<i>Hinf I</i> 5' β (-/-)	4	1	2	7
<i>Hinf I</i> 5' β (+/-)	15	16	13	44
<i>Hinf I</i> 5' β (+/+)	26	17	17	60
<i>Amostra</i>	45	34	32	111
<i>Hb AA</i>	44	30	36	110
<i>Hb AS</i>	3	3	5	11
<i>Hb SS</i>	0	0	1	1
<i>Hb AC</i>	1	1	2	4
<i>Amostra</i>	48	34	44	126

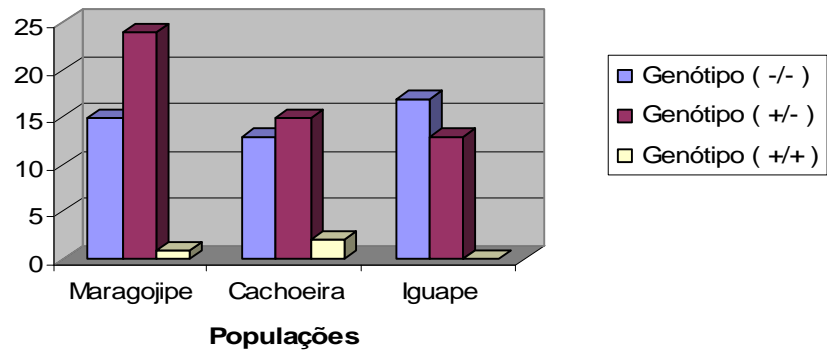


Figura 18. Distribuições Genotípicas - Locus Hinc II 5' ϵ

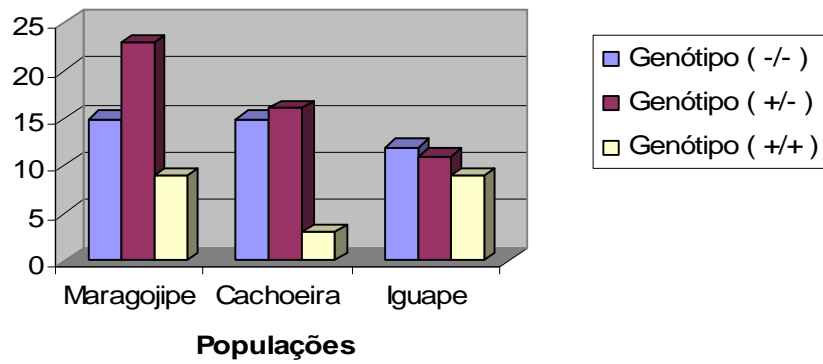


Figura 19. Distribuições Genotípicas - Locus Hind III IVS-2 $G\gamma$

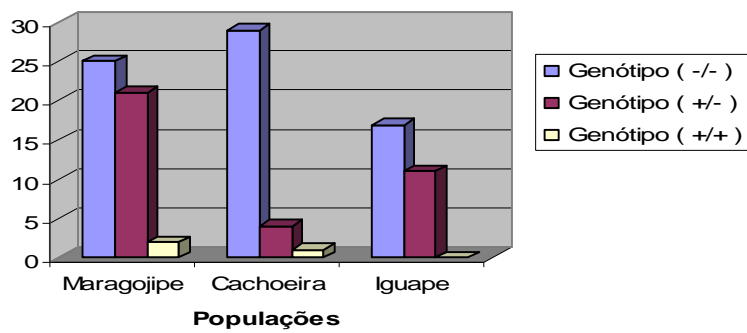


Figura 20. Distribuições Genotípicas - Locus Hind III IVS-2 $A\gamma$

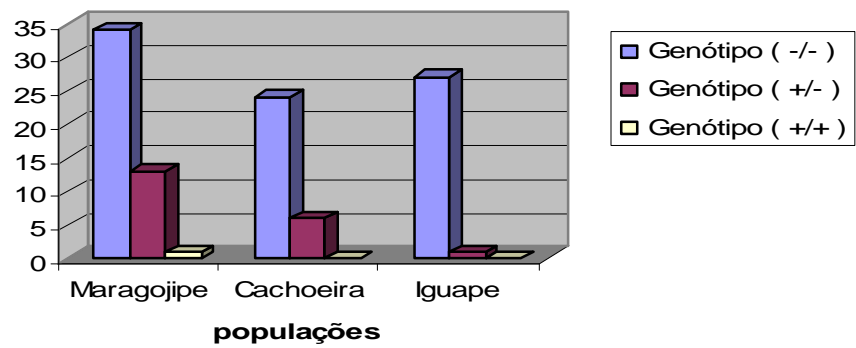


Figura 21. Distribuições Genotípicas - Locus Hinc II $\psi\beta 1$

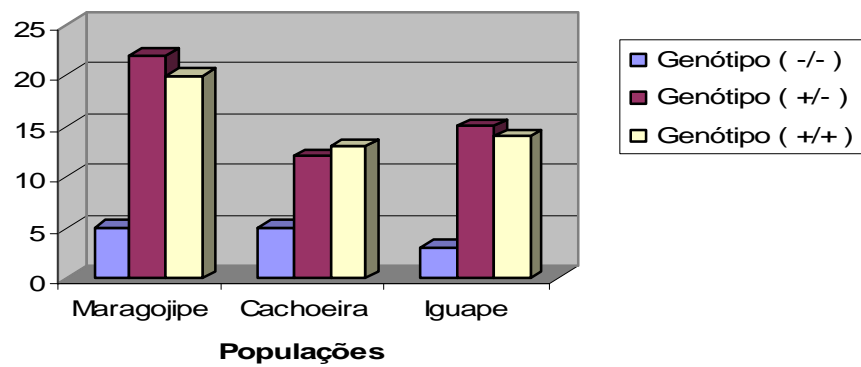


Figura 22. Distribuições Genotípicas - Locus Hinc II 3' $\psi\beta 11$

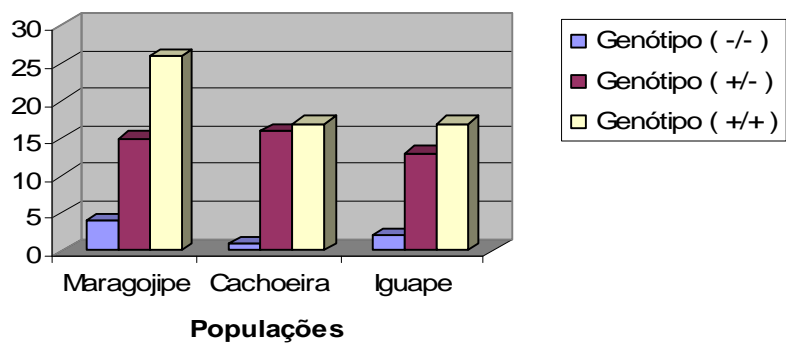


Figura 23. Distribuições Genotípicas - Locus Hinf I 5'- β

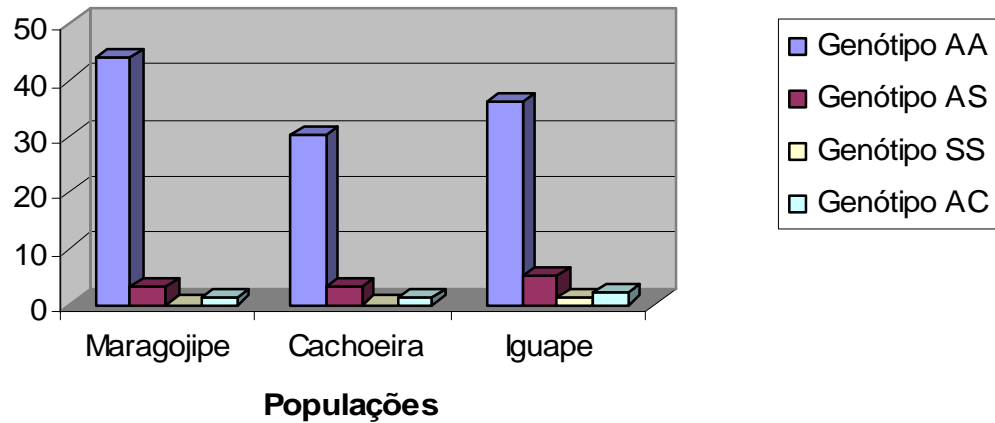


Figura 24. Distribuições Genotípicas das Hemoglobinas A, S e C

Tabela 7. Número de heterozigotos e heterozigose observada (H_o) por contagem direta para os sete *loci* analisados nas três populações.

<i>Locus</i>	<i>Maragojipe</i>	<i>Cachoeira</i>	<i>Iguape</i>	<i>Total</i>
<i>Hinc II 5' C (+/-)</i>	24 (0,60)	15 (0,5)	13 (0,4333)	52 (0,5200)
<i>Hinc III Gγ (+/-)</i>	23 (0,4893)	16 (0,4706)	11 (0,3437)	50 (0,4425)
<i>Hinc III Aγ (+/-)</i>	21 (0,4375)	4 (0,1176)	11 (0,3929)	36 (0,3273)
<i>Hinc II ψβ1 (+/-)</i>	13 (0,2708)	6 (0,2)	1 (0,0357)	20 (0,1887)
<i>Hinc II 3'ψβ1 (+/-)</i>	22 (0,4680)	12 (0,4)	15 (0,4687)	49 (0,4495)
<i>Hinf I 5'β (+/-)</i>	15 (0,33)	16 (0,4705)	13 (0,4063)	44 (0,3964)
<i>Hb</i>	4 (0,0833)	4 (0,1176)	7 (0,1591)	15 (0,1190)
Todos	0,3827	0,3252	0,3199	0,349

4.2 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

O teste exato foi aplicado utilizando-se as frequências genótípicas dos sete *loci*. Apenas uma análise apresentou desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 8). O desvio foi apresentado na população de Maragojipe para o locus *Hinc II 5' ε*.

Os valores de probabilidade estimados pelo teste sensível à deficiência de heterozigotos não indicou nenhuma deficiência significativa de heterozigotos (Tabela 9). A deficiência de heterozigotos indica se há aumento de endogamia em uma população. Endogamia é sinônimo de população subestruturada. Os valores de probabilidade estimados pelo teste sensível ao excesso de heterozigotos indicaram um excesso significativo apenas na população de Maragojipe no locus *Hinc II 5' ε* ($p = 0,0310$; $D.P. = 0,0059$). O teste multi-populacional indicou um excesso significativo quanto ao mesmo locus (Tabela 10).

4.3 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

Foram observados cinco desvios significativos em 63 análises nas três populações (Tabela 11). Na população de Maragojipe foi observado um desequilíbrio entre os *loci Hinc II 5' ε* e *Hinc II 3' Ψβ* ($p = 0,0000$). Na população de Cachoeira, desequilíbrios foram detectados entre os *loci Hinc II 5' ε – Hind III IVS-2^Gγ* ($p = 0,0039$) e *Hind III IVS-2^Gγ – Hind III IVS-2^Aγ* ($p = 0,0261$). E na população de Iguape, mais dois desequilíbrios, um entre os *loci Hinc II 5' ε – Hinc II 3' Ψβ* ($p = 0,0007$) e o outro entre os *loci Hinf I 5' β – Hb* ($p = 0,0017$).

Por fim, quando se considera as três populações como sendo uma única amostra, são observados seis desvios significativos em 21 análises (Tabela 11).

Tabela 8. Probabilidade e desvio padrão associado (em parênteses) obtidos com teste exato (Guo e Thompson, 1992) para verificação de equilíbrio de Hardy-Weinberg. O valor destacado com asterisco representa o desvio significativo ($p < 0,05$).

<i>População</i>	<i>Hinc II 5' C</i>	<i>Hind III Gγ</i>	<i>Hind III Aγ</i>	<i>Hinc II $\psi\beta 1$</i>	<i>Hinc II 3' $\psi\beta 1$</i>	<i>Hinf I 5' β</i>	<i>Hemoglobina</i>	<i>Multi-locus</i>
Maragojipe	0,0310*	1,0000	0,4756	1,0000	1,0000	0,4364	1,0000	0,7560
	(0,0059)	(0,0000)	(0,0175)	(0,0000)	(0,0000)	(0,0118)	(0,0000)	
Cachoeira	0,6797	1,0000	0,2808	1,0000	0,4361	0,3979	1,0000	0,9194
	(0,0173)	(0,0000)	(0,0095)	(0,0000)	(0,0117)	(0,0133)	(0,0000)	
Iguape	0,2930	0,1634	0,5608	1,0000	1,0000	1,0000	0,3686	0,5625
	(0,0092)	(0,0130)	(0,0074)	(0,0000)	(0,0000)	(0,0000)	(0,3686)	
Multi- populacional	0,1171	0,5536	0,4477	1,0000	0,9523	0,7368	0,9181	0,1734

Tabela 9. Probabilidade e desvio padrão associado (em parênteses) obtidos pelo teste sensível à deficiência de heterozigotos.

<i>População</i>	<i>Hinc II 5' C</i>	<i>Hind III Gγ</i>	<i>Hind III Aγ</i>	<i>Hinc II $\psi\beta 1$</i>	<i>Hinc II 3' $\psi\beta 1$</i>	<i>Hinf I 5' β</i>	<i>Hemoglobina</i>	<i>Multi-locus</i>
Maragojipe	0,9981	0,5747	0,8985	0,7269	0,7049	0,2913	1,0000	0,8311
	(0,0001)	(0,0022)	(0,0009)	(0,0010)	(0,0020)	(0,0015)	(0,0000)	(0,0033)
Cachoeira	0,8877	0,7733	0,2138	1,0000	0,3210	0,9542	1,0000	0,5480
	(0,0009)	(0,0014)	(0,0009)	(0,0000)	(0,0015)	(0,0006)	(0,0000)	(0,0040)
Iguape	1,0000	0,0691	1,0000	1,0000	0,7481	0,7181	0,2347	0,3774
	(0,0000)	(0,0009)	(0,0000)	(0,0000)	(0,0014)	(0,0013)	(0,0024)	(0,0051)
Multi- populacional	0,9960	0,2275	0,5593	0,7943	0,4851	0,4904	0,2865	0,7101
	(0,0004)	(0,0038)	(0,0043)	(0,0028)	(0,0039)	(0,0038)	(0,0057)	(0,0037)

Tabela 10. Probabilidade e desvio padrão associado (em parênteses) obtidos pelo teste sensível ao excesso de heterozigotos. Os valores destacados com asterisco representam os desvios significativos ($p < 0,05$).

<i>População</i>	<i>Hinc II 5'ε</i>	<i>Hind III Gγ</i>	<i>Hind III Aγ</i>	<i>Hinc II ψβ1</i>	<i>Hinc II 3'ψβ1</i>	<i>Hinf I 5'β</i>	<i>Hemoglobina</i>	<i>Multi-locus</i>
Maragojipe	0,0240*	0,6601	0,3172	0,6960	0,5479	0,9017	0,9339	0,1614
	(0,0005)	(0,0021)	(0,0016)	(0,0012)	(0,0020)	(0,0010)	(0,0015)	(0,0026)
Cachoeira	0,3742	0,5230	0,9899	0,7594	0,8942	0,2490	0,9090	0,4606
	(0,0015)	(0,0017)	(0,0003)	(0,0010)	(0,0009)	(0,0013)	(0,0020)	(0,0039)
Iguape	0,1893	0,9868	0,2946	1,0000	0,5606	0,6331	0,9495	0,6262
	(0,0009)	(0,0003)	(0,0009)	(0,0000)	(0,0018)	(0,0015)	(0,0013)	(0,0045)
Multi- populacional	0,0047*	0,7689	0,4525	0,5292	0,5349	0,5210	0,8677	0,2894
	(0,0003)	(0,0042)	(0,0038)	(0,0030)	(0,0048)	(0,0046)	(0,0046)	(0,0036)

Tabela 11. Desequilíbrio de Ligação entre os *loci* analisados considerando as três populações isoladamente e depois agrupando as três numa só população (total). Os valores estatisticamente significativos estão marcados com asterisco.

<i>População</i>	<i>Par de Loci</i>	<i>Probabilidade</i>	<i>Desvio Padrão</i>
Maragojipe	5' ε – IVS-2 Gγ	0,0748	0,0017
	5' ε – IVS-2 Aγ	0,9337	0,0008
	IVS-2 Gγ – IVS-2 Aγ	0,5749	0,0027
	5' ε – Ψβ	0,6713	0,0022
	IVS-2 Gγ – Ψβ	0,1340	0,0021
	IVS-2 Aγ – Ψβ	0,9311	0,0001
	5' ε - 3' Ψβ	0,0000*	0,0000
	IVS-2 Gγ – 3' Ψβ	0,0504	0,0011
	IVS-2 Aγ – 3' Ψβ	0,1676	0,0027
	Ψβ - 3' Ψβ	0,2093	0,0026
	5' ε – 5'β	0,8111	0,0017
	IVS-2 Gγ - 5'β	0,3027	0,0028
	IVS-2 Aγ - 5'β	0,3419	0,0024
	Ψβ - 5'β	0,1025	0,0020
	3' Ψβ - 5'β	0,8479	0,0015
	5' ε – Hb	0,7479	0,0024
	IVS-2 Gγ – Hb	0,5776	0,0012
	IVS-2 Aγ – Hb	0,2961	0,0025
	Ψβ – Hb	1,0000	0,0000
	3' Ψβ – Hb	0,8714	0,0014
5'β – Hb	0,1312	0,0016	
Cachoeira	5' ε – IVS-2 Gγ	0,0039*	0,0003
	5' ε – IVS-2 Aγ	0,8496	0,0015
	IVS-2 Gγ – IVS-2 Aγ	0,0261*	0,0006
	5' ε – Ψβ	1,0000	0,0000
	IVS-2 Gγ – Ψβ	0,8323	0,0009
	IVS-2 Aγ – Ψβ	1,0000	0,0000

	5' ε - 3' Ψβ	0,1123	0,0017
	IVS-2 Gγ - 3' Ψβ	0,7511	0,0020
	IVS-2 Aγ - 3' Ψβ	0,1989	0,0013
	Ψβ - 3' Ψβ	0,6691	0,0011
	5' ε - 5' β	0,6056	0,0025
	IVS-2 Gγ - 5' β	1,0000	0,0000
	IVS-2 Aγ - 5' β	0,8235	0,0015
	Ψβ - 5' β	0,5100	0,0019
	3' Ψβ - 5' β	0,7498	0,0019
	5' ε - Hb	0,7740	0,0017
	IVS-2 Gγ - Hb	0,0694	0,0012
	IVS-2 Aγ - Hb	1,0000	0,0000
	Ψβ - Hb	0,2808	0,0016
	3' Ψβ - Hb	1,0000	0,0000
	5' β - Hb	0,2567	0,0022
Iguape	5' ε - IVS-2 Gγ	0,8100	0,0009
	5' ε - IVS-2 Aγ	0,7005	0,0008
	IVS-2 Gγ - IVS-2 Aγ	0,0930	0,0010
	5' ε - Ψβ	1,0000	0,0000
	IVS-2 Gγ - Ψβ	1,0000	0,0000
	IVS-2 Aγ - Ψβ	0,3199	0,0008
	5' ε - 3' Ψβ	0,0007*	0,0001
	IVS-2 Gγ - 3' Ψβ	0,7788	0,0016
	IVS-2 Aγ - 3' Ψβ	1,0000	0,0000
	Ψβ - 3' Ψβ	0,4653	0,0015
	5' ε - 5' β	0,0883	0,0012
	IVS-2 Gγ - 5' β	0,2316	0,0023
	IVS-2 Aγ - 5' β	0,6118	0,0014
	Ψβ - 5' β	1,0000	0,0000
	3' Ψβ - 5' β	0,2191	0,0022
	5' ε - Hb	0,8763	0,0010

	IVS-2 G γ – Hb	1,0000	0,0000
	IVS-2 A γ – Hb	0,3719	0,0021
	$\Psi\beta$ – Hb	1,0000	0,0000
	3' $\Psi\beta$ – Hb	0,5557	0,0034
	5' β – Hb	0,0018*	0,0002
As três populações	5' ϵ – IVS-2 G γ	0,0094*	0,0006
	5' ϵ – IVS-2 A γ	0,6171	0,0027
	IVS-2 G γ – IVS-2 A γ	0,0335*	0,0014
	5' ϵ – $\Psi\beta$	0,7758	0,0021
	IVS-2 G γ – $\Psi\beta$	0,1707	0,0024
	IVS-2 A γ – $\Psi\beta$	0,3726	0,0031
	5' ϵ - 3' $\Psi\beta$	0,0000*	0,0000
	IVS-2 G γ – 3' $\Psi\beta$	0,8548	0,0017
	IVS-2 A γ – 3' $\Psi\beta$	0,6166	0,0030
	$\Psi\beta$ - 3' $\Psi\beta$	0,0465*	0,0016
	5' ϵ – 5' β	0,7281	0,0028
	IVS-2 G γ - 5' β	0,3266	0,0034
	IVS-2 A γ - 5' β	0,4052	0,0033
	$\Psi\beta$ - 5' β	0,0323*	0,0012
	3' $\Psi\beta$ - 5' β	0,6084	0,0033
	5' ϵ – Hb	0,8586	0,0021
	IVS-2 G γ – Hb	0,4090	0,0035
	IVS-2 A γ – Hb	1,0000	0,0000
	$\Psi\beta$ – Hb	0,6945	0,0037
	3' $\Psi\beta$ – Hb	0,8828	0,0017
	5' β – Hb	0,0001*	0,0000

4.4 DIVERSIDADE INTRA-POPULACIONAL

A diversidade genética (H_s) por locus e por população (Tabela 12) variou de 0,03571 em Iguape ($Hinc\ II\ \psi\beta 1$) até 0,50347 na mesma população ($Hind\ III\ IVS-G\ \gamma$). O valor médio e total de H_s por locus em cada população também se encontra na Tabela 12. O valor total de H_s obtido nas três populações foi de 0,33787.

Tabela 12. Diversidade genética por locus e por população.

<i>Locus</i>	<i>Maragogipe</i>	<i>Cachoeira</i>	<i>Iguape</i>	<i>Média</i>	<i>s.d.</i>	<i>Heter. Total</i>
<i>Hinc II 5'ε</i>	0,4443	0,4401	0,3452	0,4098	0,0457	0,4138
<i>Hind III Gγ</i>	0,4971	0,4442	0,5034	0,4816	0,0265	0,4848
<i>Hind III Aγ</i>	0,3892	0,1633	0,3214	0,2913	0,0946	0,3103
<i>Hinc II ψβ1</i>	0,2664	0,1830	0,0357	0,1617	0,0953	0,1868
<i>Hinc II 3'ψβ1</i>	0,4539	0,4723	0,4479	0,4580	0,0103	0,4534
<i>Hinf I 5'β</i>	0,3847	0,3950	0,3963	0,3920	0,0051	0,3877
<i>Hb</i>	0,0813	0,1137	0,1893	0,1281	0,0452	0,1279
<i>Média</i>	0,3596	0,3159	0,3199	0,3318	0,0197	0,3378
<i>s.d.</i>	0,1323	0,1436	0,1485	0,1415	0,0067	0,1258

4.5 ESTATÍSTICAS F E DIVERSIDADE INTER-POPULACIONAL

Os valores de Fis por locus em cada população estão apresentados na Tabela 13. Houve uma variação de -0.357 para o locus $Hinc\ II\ 5'\epsilon$ na população de Maragogipe até 0.320717 para o locus $Hind\ III\ G\ \gamma$ na população de Iguape. Os valores totais de Fis por população foram de -0.000314 em Iguape, -0.066531 em Maragogipe e -0.029695 em Cachoeira.

A diversidade inter-populacional (Fst) para cada par de amostras analisadas bem como o conjunto formado pelas amostras com os intervalos de confiança para cada valor calculado podem ser observados na Tabela 14. Os valores tanto dos pares de amostras como do conjunto total para os intervalos de confiança não foram significativamente diferentes de zero.

Tabela 13. *Fis* por locus e por população.

<i>Loci</i>	<i>Maragojipe</i>	<i>Cachoeira</i>	<i>Iguape</i>
<i>Hinc II 5'ε</i>	-0.3565	-0.1387	-0.2608
<i>Hind III G_γ</i>	0.0158	-0.0602	0.3207
<i>Hind III A_γ</i>	-0.1254	0.2826	-0.2272
<i>Hinc II ψβ1</i>	-0.0166	-0.0943	0.0000
<i>Hinc II 3'ψβ1</i>	-0.0316	0.1553	-0.0472
<i>Hinf I 5'β</i>	0.1349	-0.1945	-0.0254
<i>Hb</i>	-0.0245	-0.0352	0.1615
<i>Total</i>	-0.0665	-0.0296	-0.0003

Tabela 14. Valores de *Fis*, *Fit* e *Fst* e intervalo de confiança de 95% e 99% para os pares de amostras e para o conjunto formado pelas três amostras analisadas.

Maragojipe-Cachoeira				
<i>Loci</i>	<i>Fis</i>	<i>Fit</i>	<i>Fst</i>	
<i>Hinc II 5'ε</i>	-0,2638	-0,2773	-0,0106	
<i>Hind III G_γ</i>	-0,0138	0,0003	0,0140	
<i>Hind III A_γ</i>	-0,0310	0,0524	0,0809	
<i>Hinc II ψβ1</i>	-0,0393	-0,0387	0,0004	
<i>Hinc II 3'ψβ1</i>	0,0428	0,0304	-0,0129	
<i>Hinf I 5'β</i>	-0,0083	-0,0211	-0,0127	
<i>Hb</i>	-0,0302	-0,0402	-0,0097	
<i>Total</i>	-0,0533	-0,0461	0,0068	
<i>I.C. = 95%</i>	0,0111/-0,1534	0,0193/-0,1526	0,0342/-0,0111	
<i>I.C. = 99%</i>	0,0203/-0,1732	0,0296/-0,1742	0,0440/-0,0121	
Maragojipe-Iguape				
<i>Hinc II 5'ε</i>	-0,3211	0,0190	0,0190	
<i>Hind III G_γ</i>	0,1402	0,1277	-0,0146	
<i>Hind III A_γ</i>	-0,1579	-0,1586	-0,0006	

<i>Hinc II</i> $\psi\beta 1$	-0,0131	0,0716	0,0837
<i>Hinc II</i> 3' $\psi\beta 1$	-0,0378	-0,0507	-0,0124
<i>Hinf I</i> 5' β	0,0673	0,0541	-0,0142
<i>Hb</i>	0,1020	0,1119	0,0109
<i>Total</i>	-0,0393	-0,0362	0,0030
<i>I.C. = 95%</i>	0,0836/-0,1787	0,0880/-0,1590	0,0276/-0,0110
<i>I.C. = 99%</i>	0,1057/-0,2078	0,1073/-0,1930	0,0371/-0,0131

Cachoeira-Iguape

<i>Hinc II</i> 5' ϵ	-0,1923	-0,1781	0,0119
<i>Hind III</i> $^G\gamma$	0,1368	0,1522	0,0178
<i>Hind III</i> $^A\gamma$	-0,0318	0,0022	0,0330
<i>Hinc II</i> $\psi\beta 1$	-0,0794	-0,0334	0,0425
<i>Hinc II</i> 3' $\psi\beta 1$	0,0535	0,0403	-0,0139
<i>Hinf I</i> 5' β	-0,1123	-0,1275	-0,0136
<i>Hb</i>	0,0998	0,0961	-0,0041
<i>Total</i>	-0,0138	-0,0075	0,0062
<i>I.C. = 95%</i>	0,0863/-0,1131	0,0967/-0,1025	0,0209/-0,0063
<i>I.C. = 99%</i>	0,1062/-0,1418	0,1190/-0,1307	0,0252/-0,0094

Maragojipe-Cachoeira-Iguape

<i>Hinc II</i> 5' ϵ	-0,2630	-0,2556	0,0058
<i>Hind III</i> $^G\gamma$	0,0850	0,0892	0,0045
<i>Hind III</i> $^A\gamma$	-0,0838	-0,0401	0,0403
<i>Hinc II</i> $\psi\beta 1$	-0,0361	0,0040	0,0388
<i>Hinc II</i> 3' $\psi\beta 1$	0,0169	0,0042	-0,0129
<i>Hinf I</i> 5' β	-0,0133	-0,0270	-0,0135
<i>Hb</i>	0,0693	0,0702	0,0010
<i>Total</i>	-0,0372	-0,0311	0,0058
<i>I.C. = 95%</i>	0,0469/-0,1471	0,0525/-0,1356	0,0232/-0,0063
<i>I.C. = 99%</i>	0,0606/-0,1716	0,0644/-0,1521	0,0287/-0,0082

4.6 TESTE DE DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL

Quando analisamos cada locus individualmente (Tabela 15), detectamos um valor de probabilidade significativo ($p < 0,05$) para os pares de amostras Marajojipe – Cachoeira para o locus *Hind III* $A\gamma$ (0,00760) e Marajojipe – Iguape para o locus *Hinc II* $\psi\beta$ (0,00533). As três amostras juntas também revelaram valores de probabilidade significativos para os mesmos loci (Tabela 16).

Tabela 15. Diferenciação genotípica por locus para todos os pares de populações analisados. Os valores significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco.

<i>Locus</i>	<i>Pares de população</i>	<i>Probabilidade</i>	<i>S.E.</i>
<i>Hinc II</i> 5ϵ	Marajojipe-Cachoeira	1,0000	0,0000
	Marajojipe-Iguape	0,1844	0,0020
	Cachoeira-Iguape	0,3031	0,0020
<i>Hind III</i> $G\gamma$	Marajojipe-Cachoeira	0,1878	0,0022
	Marajojipe-Iguape	0,8695	0,0009
	Cachoeira-Iguape	0,1577	0,0017
<i>Hind III</i> $A\gamma$	Marajojipe-Cachoeira	0,0076*	0,0003
	Marajojipe-Iguape	0,43400	0,0021
	Cachoeira-Iguape	0,1148	0,0013
<i>Hinc II</i> $\psi\beta 1$	Marajojipe-Cachoeira	0,3476	0,0019
	Marajojipe-Iguape	0,0053*	0,0002
	Cachoeira-Iguape	0,1131	0,0009
<i>Hinc II</i> $3\psi\beta 1$	Marajojipe-Cachoeira	0,8615	0,0009
	Marajojipe-Iguape	1,0000	0,0000
	Cachoeira-Iguape	0,7072	0,0013
<i>Hinf I</i> 5β	Marajojipe-Cachoeira	1,0000	0,0000
	Marajojipe-Iguape	1,0000	0,0000
	Cachoeira-Iguape	1,0000	0,0000
<i>Hemoglobina</i>	Marajojipe-Cachoeira	0,8499	0,0008
	Marajojipe-Iguape	0,3245	0,0020
	Cachoeira-Iguape	0,7139	0,0016

Tabela 16. Diferenciação genotípica por locus para as três populações analisados. Os valores significativos ($p < 0,05$) estão marcados com asterisco.

<i>Locus</i>	<i>Probabilidade</i>	<i>Desvio Padrão</i>
<i>Hinc II 5'ε</i>	0,2438	0,0064
<i>Hind III^Gγ</i>	0,2681	0,0062
<i>Hind III^Aγ</i>	0,0149*	0,0017
<i>Hinc II ψβ1</i>	0,0146*	0,0015
<i>Hinc II 3'ψβ1</i>	0,9199	0,0019
<i>Hinf I 5'β</i>	1,0000	0,0000
<i>Hemoglobina</i>	0,7291	0,0048

E quando analisamos todos os *loci* simultaneamente para cada par de amostras, pelo teste exato de Fisher, não encontramos nenhum valor significativo. Na análise das três amostras, o valor da probabilidade ficou na zona limítrofe de rejeição (0,0584) com um valor de $X^2 = 23,119$ e 14 graus de liberdade (Tabela 17).

Tabela 17. Diferenciação genotípica de todos os *loci* para cada par de populações analisados e para o conjunto formado pelas três populações pelo teste exato de Fisher.

<i>Pares de população</i>	X^2	<i>G.L.</i>	<i>Probabilidade</i>
Maragogipe-Cachoeira	16,758	14	0,2693
Maragogipe-Iguape	18,678	14	0,1776
Cachoeira-Iguape	16,521	14	0,2825
Total (3 amostras)	23,119	14	0,0584

4.7 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS E INTENSIDADE DE RECOMBINAÇÃO PARA OS SETE LOCI ANALISADOS.

Dados da análise de seis sítios de restrição de 272 cromossomos β^A , β^S e β^C foram utilizados para obter a reconstrução haplotípica de 48 indivíduos de Maragogipe, 34 de Cachoeira, 32 de Iguape e 22 indivíduos portadores do traço AS provenientes de outros municípios do Recôncavo Baiano que foram diagnosticados no Laboratório de genética da Faculdade Adventista

de Fisioterapia. Desta forma, nós podemos identificar quais os haplótipos mais freqüentes encontrados nos cromossomos β^A , β^S e β^C .

A reconstrução haplotípica feita através do método sem recombinação e dos métodos de recombinação com variação entre os marcadores, presença de *hotspot* em região desconhecida e com presença de *hotspot* entre os sítios *Hinc II 3' $\psi\beta 1$* e *Hinf I 5' β* , bem como as freqüências dos haplótipos em cada grupo, encontram-se na sessão I de apêndices.

A taxa de variação de recombinação utilizada foi de $\mu = 0,0004$. Este valor é baseado no parâmetro de recombinação $\bar{r} = 4N_e c$, onde N_e (tamanho efetivo da população) é de aproximadamente 10.000 e c (a probabilidade de recombinação para cada par de bases) é de aproximadamente 10^{-8} (1 cM/Mb) em seres humanos. A identificação dos haplótipos feita através dos métodos “presença de hotspot em região desconhecida” e “presença de hotspot em região conhecida” (entre os loci *Hinc II 3' $\psi\beta 1$* e *Hinf I 5' β*) foram feitas com taxa $\mu = 0,0004$ estabelecida pelo *Default* do programa. As freqüências dos haplótipos em cada grupo para método empregado encontram-se nas sessões II a V de apêndices.

Sabendo que existe forte associação não aleatória dentro dos *clusteres* 5' e 3' da β -Globina e que, 75% das recombinações ocorrem entre estes dois *clusteres* (CHAKRAVARTI et al, 1984), nós utilizamos o método de recombinação implementado no Phase 2.1.1 a fim de detectar a presença e avaliar a intensidade de *hotspot* recombinacional na região genômica analisada. Desta forma, encontramos uma intensidade de recombinação entre os sítios *Hinc II 3' $\psi\beta 1$* e *Hinf I 5' β* cerca de 34 vezes superior à intensidade detectada entre os outros sítios (figura 25).

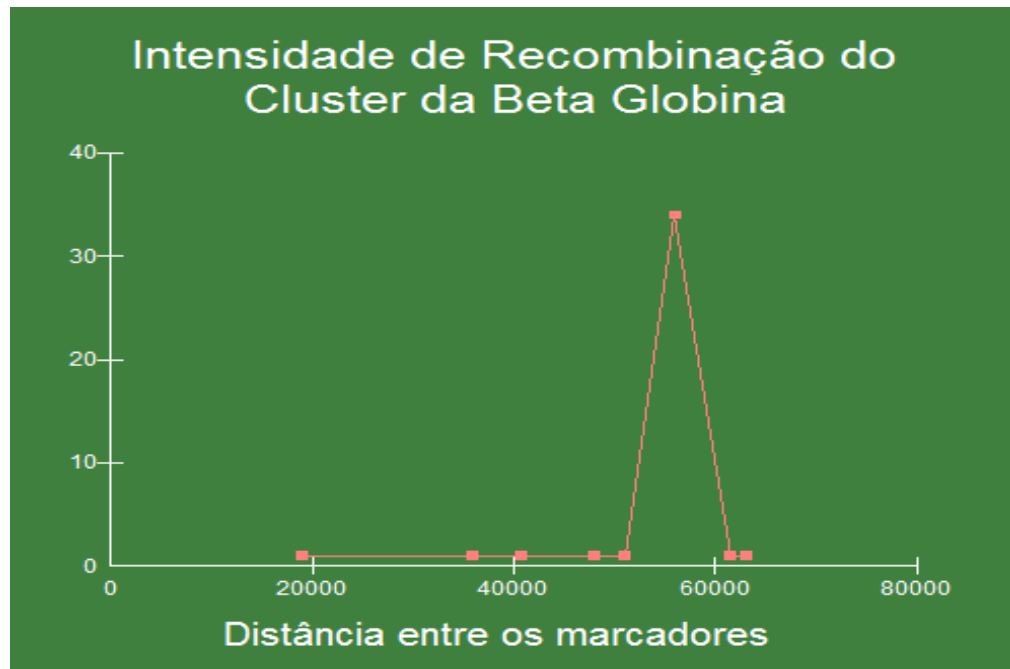


Figura 25. Taxa de recombinação do *cluster* da β -Globina estimada pelo Phase 2.1.1 utilizando o método que detecta presença de *hotspot* em região desconhecida com taxa de recombinação fixada em 0,0004. A análise revelou a presença de um *hotspot* recombinacional entre os sítios *Hinc II* 3' $\psi\beta 1$ e *Hinf I* 5' β com intensidade de 34,5 vezes a taxa de recombinação fixada. Nos outros intervalos, o valor da intensidade de recombinação foi igual à taxa estabelecida pelo programa.

4.8 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS HAPLÓTIPOS DO CLUSTER 5'DA β -GLOBINA.

Os sítios de restrição detectados pelas endonucleases *Hinc II* e *Hind III* na região 5'da β -Globina (sítios 2, 3, 4, 6 e 7 da Figura 3) foram selecionados para determinarmos os haplótipos mais comuns através do programa Phase 2.1.1. Nós optamos por esta estratégia porque o *cluster* 5'da β -Globina já foi muito estudado em várias populações (CHAKRAVARTI et al, 1984; SMITH et al, 1998; SCHNEIDER et al, 2002; WALL et al, 2003; FEARNHEAD et al, 2004) possibilitando uma comparação com os dados aqui encontrados. Desta forma, nós excluimos o sítio, *Hinf I* 5' β e analisamos, além das três populações estudadas, 32 pacientes com hemoglobinopatias (17 pacientes Hb SS, 12 Hb SC e 3 Hb CC) e 22 portadores Hb AS. A figura 26 apresenta a seqüência dos indivíduos que reflete a organização por haplótipos entre os grupos de pacientes e portadores do traço, evidenciando assim um forte desequilíbrio de ligação entre os haplótipos e o grupo de pacientes ($p < 0,05$).

22 haplótipos com frequência igual ou superior a 1% foram inferidos através do método sem recombinação, sendo quatorze ligados ao cromossomo β^A , seis ligados ao cromossomo β^S e dois ligados ao cromossomo β^C . As frequências dos haplótipos em cada população e em cada grupo de pacientes encontram-se na tabela VI da sessão de apêndices.

Os haplótipos ligados aos cromossomos β^A mais comuns nas amostras de Maragojipe, Cachoeira e Iguape (tabela 18) foram: 2 (+ - - -), 3 (- - - +), 4 (- +- - +) e 6 (- + + - +) e dois haplótipos privados foram encontrados na população de Maragojipe, os haplótipos 9 (- + + + +) e o 14 (+ + - - +).

Para analisar a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, a diversidade haplotípica intra e inter-populacional do *cluster* 5' da β -Globina nos cromossomos β^A , nas amostras de Maragojipe, Cachoeira e Iguape, nós atribuímos para cada haplótipo um número que corresponde à mesma numeração utilizada por Long et al (1990). Desta forma, cada haplótipo foi considerado como um único alelo e todos os alelos como pertencendo ao mesmo locus.

A tabela 19 apresenta os genótipos encontrados nas três populações e os testes para verificar os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg estão na tabela 20. A população de Cachoeira apresentou um desvio significativo para o teste de sensibilidade ao déficit de heterozigotos (0,0324) e para o teste global, apenas a população de Iguape não apresentou desvio significativo (tabela 20).

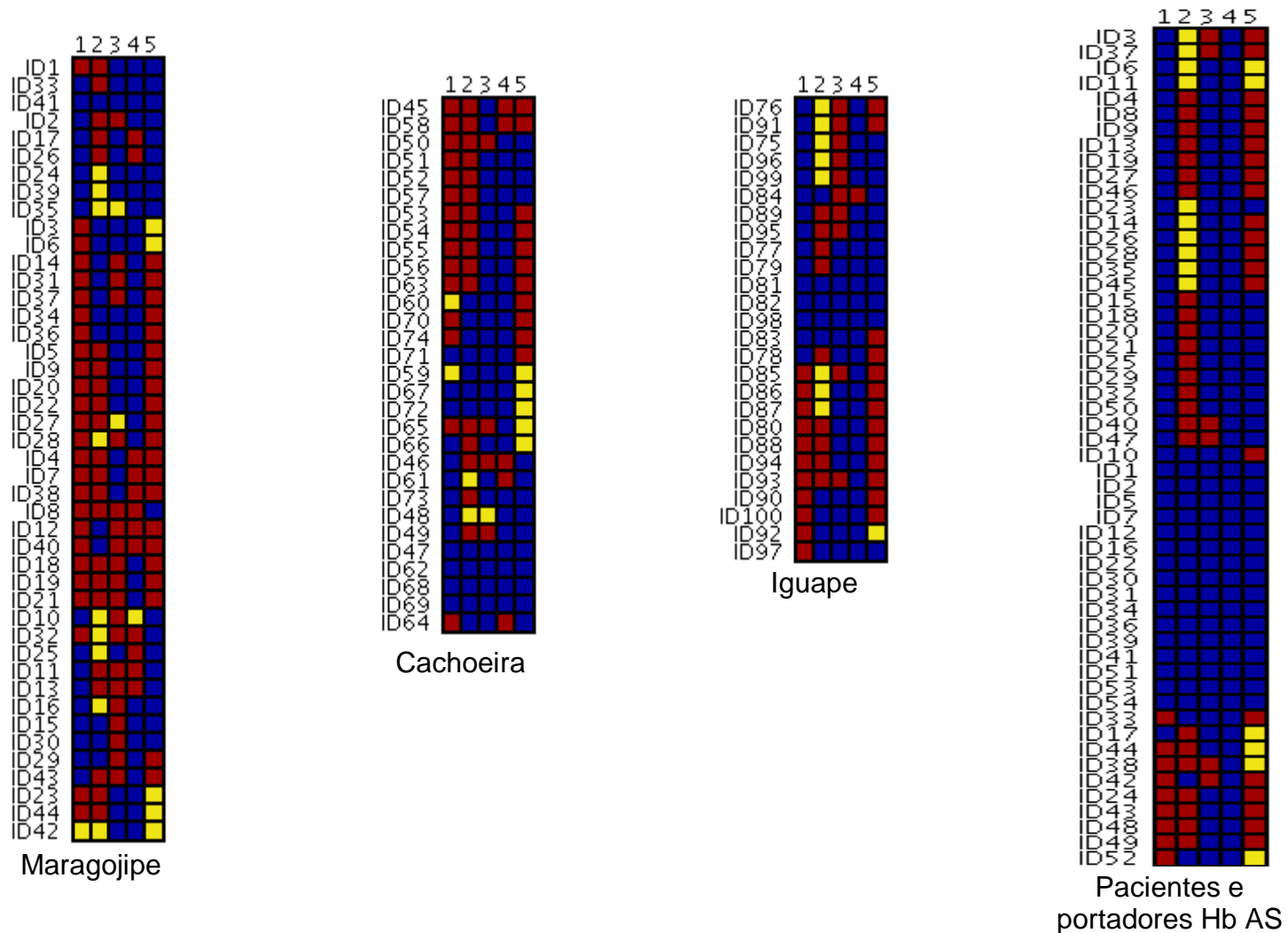


Figura 26. Representação dos haplótipos do *cluster* 5' da β -globina dos indivíduos das populações, pacientes com hemoglobinopatias e portadores Hb.AS feita pelo programa Visual Haptype VH1 (<http://egp.gs.washington.edu/VH1.html>). Cada sítio é representado por uma coluna e cada linha representa um indivíduo. Os quadrados de cor azul representam homocigose para o alelo mais comum, os de cor amarela, homocigose para o alelo raro e os quadrados vermelhos são os heterocigotos para cada sítio. A seqüência dos indivíduos reflete a organização por haplótipos mais comuns. Desta forma, é possível identificar quais os haplótipos mais comuns, evidenciando assim um desequilíbrio de ligação no grupo de pacientes.

Tabela 18. Frequências dos haplótipos β^A do *cluster 5'* da β -globina nas populações de Maragojipe, Cachoeira e Iguape.

Haplótipos ¹	Sítios de Restrição					Maragojipe		Cachoeira		Iguape		Total		Haplótipos Privados
	E	γ^G	γ^A	$\Psi\beta$	$3'\psi\beta$	N ²	Freq.	N ²	Freq.	N ²	Freq.	N ²	Freq.	
1	-	-	-	-	-	07	0,0795	06	0,1000	03	0,0577	16	0,0800	
2	+	-	-	-	-	14	0,1591	12	0,2000	07	0,1346	33	0,1650	
3	-	-	-	-	+	13	0,1477	13	0,2167	14	0,2692	40	0,2000	
4	-	+	-	-	+	12	0,1364	10	0,1667	12	0,2308	34	0,1700	
5	-	+	-	+	+	07	0,0795	03	0,0500	00	0,0000	10	0,0500	
6	-	+	+	-	+	12	0,1364	05	0,0833	07	0,1346	24	0,1200	
9	-	+	+	+	+	03	0,0341	00	0,0000	00	0,0000	03	0,0150	Maragojipe
11	-	-	-	+	+	04	0,0455	02	0,0333	01	0,0192	07	0,0350	
12	+	+	-	-	-	04	0,0455	00	0,0000	03	0,0577	07	0,0350	
13	+	-	-	-	+	02	0,0227	06	0,1000	01	0,0192	09	0,0450	
14	+	+	-	-	+	01	0,0114	00	0,0000	00	0,0000	01	0,0050	Maragojipe
16	-	+	-	-	-	00	0,0000	02	0,0333	03	0,0577	05	0,0250	
18	+	-	+	-	-	06	0,0682	01	0,0167	00	0,0000	07	0,0350	
19	-	-	+	-	+	03	0,0341	00	0,0000	01	0,0192	04	0,0200	
Total						88	1,0000	60	1,0000	52	1,0000	200	1,0000	

¹Numeração dos haplótipos 1 a 16 de acordo com Long et al. (1990); os haplótipos 18 e 19 foram descritos por Shimizu et al (1992 e 2001) e Villalobos-Arambula et al (1997) ²Número de cromossomos β^A .

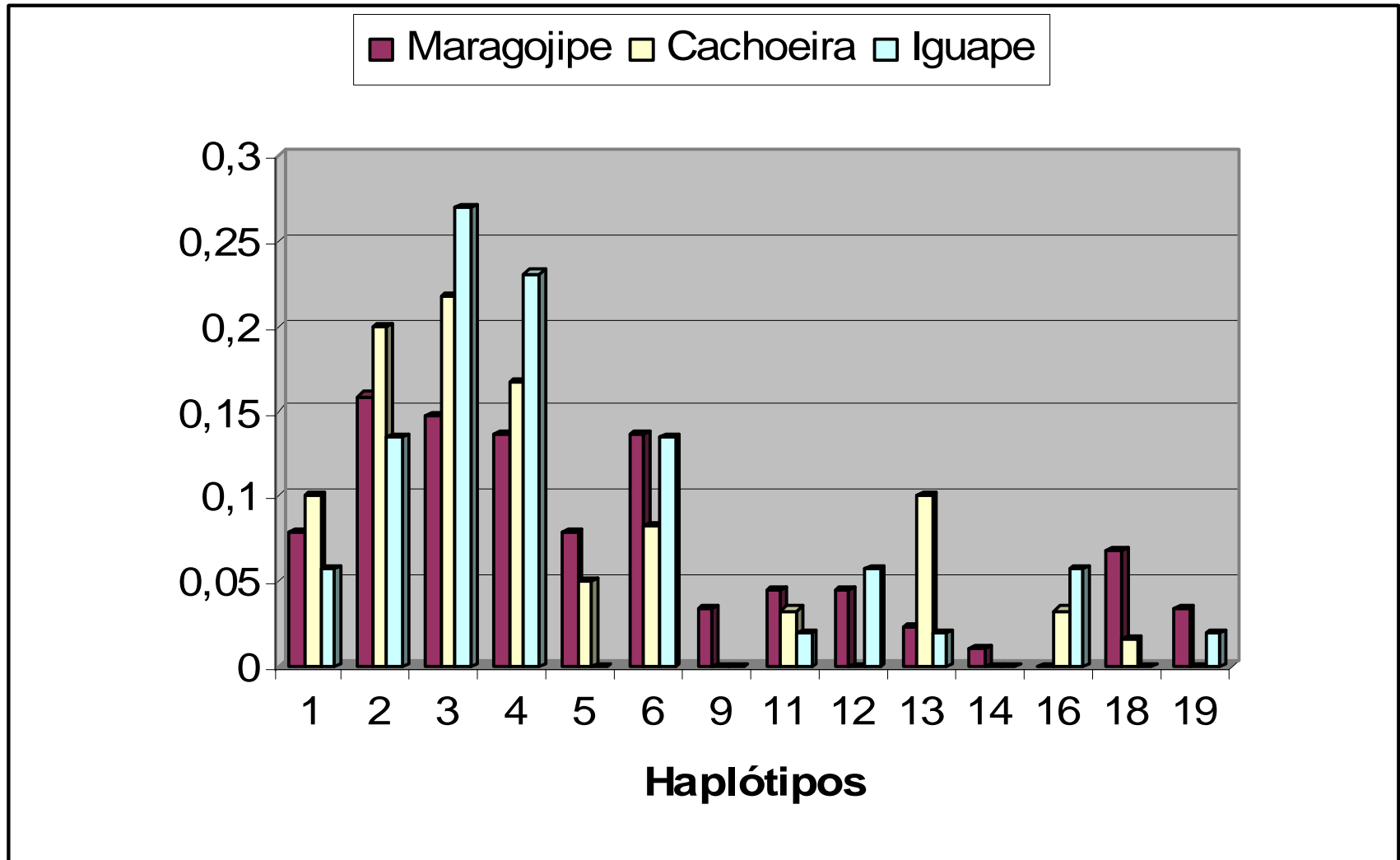


Figura 27. Distribuição dos haplótipos nas populações estudadas.

Tabela 19. Distribuição genotípica dos haplótipos β^A do cluster 5' da β -Globina. O total corresponde ao número de indivíduos.

População	Genótipos																				
	1	1	2	1	2	3	1	2	3	4	2	3	4	1	2	3	4	6	5	6	1
	1	2	2	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	6	6	6	6	6	7	11	12
Maragojipe	0	2	0	0	2	1	0	4	1	2	3	2	1	1	3	1	1	1	1	2	2
Cachoeira	2	0	1	1	2	4	0	5	1	0	2	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
Iguape	0	1	0	1	2	3	1	3	3	0	0	0	0	0	1	1	3	0	0	0	0
Total	2	3	1	2	6	8	1	12	5	2	5	2	2	1	4	3	4	2	1	3	2

População	Genótipos																				Total
	4	6	12	2	3	4	6	7	11	7	1	4	6	6	11	16	1	2	3	11	
	12	12	12	13	13	13	13	13	13	14	16	16	16	18	18	18	19	19	19	19	
Maragojipe	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	2	0	1	3	2	0	44
Cachoeira	0	0	0	1	0	3	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	30
Iguape	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	26
Total	2	2	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	3	2	1	100

Tabela 20. Probabilidade e desvio padrão associado (em parênteses) obtidos com os três testes para verificação de equilíbrio de Hardy-Weinberg dos haplótipos do *cluster 5'* da β -Globina. Os valores marcados com asterisco representam os desvios significativos ($p < 0,05$).

<i>Amostra</i>	<i>Déficit de Heterozigotos</i>	<i>Excesso de Heterozigotos</i>	<i>Teste Global</i>
Maragogipe	0.0896 (0.0061)	0.9008 (0.0080)	0.0337*
Cachoeira	0.0324* (0.0029)	0.9651 (0.0035)	0.0010*
Iguape	0.8614 (0.0072)	0.1568 (0.0090)	0.6895 (0.0090)
As três amostras	0.0570 (0.0037)	0.9517 (0.0030)	0.0016

Os valores da diversidade intra-populacional (H_s) nas amostras de Cachoeira e Iguape estão abaixo do valor de H_s para o conjunto das três amostras (0,871). Já a amostra de Maragogipe apresentou maior diversidade intra-populacional (0,901). Os níveis de endogamia (F_{is}) foram considerados elevados nas amostras de Maragogipe e Cachoeira e em Iguape, o valor observado foi abaixo de zero (tabela 21).

Tabela 21. Diversidade gênica (H_s) e coeficiente de endogamia (F_{is}) em cada amostra.

<i>População</i>	<i>Tamanho</i>	<i>Nº de Alelos</i>	H_s	H_o	F_{is}
Maragogipe	44	13.00	0.9015	0.8636	0.0424
Cachoeira	30	10.00	0.8677	0.7333	0.1571
Iguape	26	10.00	0.8431	0.8846	-0.0502
Média	33	11.00	0.8708	0.8271	0.0509

A diversidade inter-populacional (F_{st}) foi de 0,002105, somente inferior a 0,008021 obtido quando compararam-se as amostras Maragojipe e Iguape (tabela 22). Os totais observados para cada par de amostras e para o conjunto formado pelas três amostras não revelaram subestruturação entre as populações.

Tabela 22. Valores de F_{is} , F_{it} e F_{st} para dos haplótipos do cluster 5 da β -Globina para os pares de amostras e para o conjunto formado pelas três amostras analisadas.

<i>Maragojipe-Cachoeira</i>			
<i>Haplótipos</i>	<i>F_{is}</i>	<i>F_{it}</i>	<i>F_{st}</i>
1	0.4202	0.4100	-0.0176
2	-0.1094	-0.1169	-0.0068
3	0.2603	0.2592	-0.0014
4	0.0509	0.0402	-0.0112
5	-0.0624	-0.0691	-0.0063
6	0.1437	0.1417	-0.0023
9	-0.0216	-0.0059	0.0153
11	-0.0295	-0.0417	-0.0118
12	0.4867	0.4959	0.0180
13	-0.0741	-0.0265	0.0442
14	0.0022	-0.0023	-0.0045
16	-0.0207	0.0072	0.0274
18	-0.0511	-0.0343	0.0159
19	-0.0216	-0.0059	0.0153
Total	0.0879	0.0872	-0.0007
<i>Maragojipe-Iguape</i>			
<i>Haplótipos</i>	<i>F_{is}</i>	<i>F_{it}</i>	<i>F_{st}</i>
1	0.1512	0.1390	-0.0142
2	-0.1636	-0.1760	-0.0105
3	0.1227	0.1487	0.0296
4	-0.0062	0.0098	0.0159
5	-0.0720	-0.0174	0.0509

6	-0.0207	-0.0362	-0.0151
9	-0.0208	-0.0080	0.0125
11	-0.0274	-0.0325	-0.0050
12	0.2611	0.2477	-0.0180
13	-0.0075	-0.0227	-0.0151
14	0.0029	-0.0033	-0.0063
16	-0.0467	0.0186	0.0625
18	-0.0587	-0.0150	0.0412
19	-0.0168	-0.0282	-0.0112
Total	0.0098	0.0177	0.0080

Cachoeira-Iguape

<i>Haplótipos</i>	<i>Fis</i>	<i>Fit</i>	<i>Fst</i>
1	0.4075	0.3994	-0.0135
2	-0.0676	-0.0694	-0.0017
3	0.3788	0.3678	-0.0176
4	-0.2354	-0.2364	-0.0008
5	-0.0344	-0.0034	0.0300
6	0.0783	0.0729	-0.0058
9	***	***	***
11	-0.0113	-0.0256	-0.0141
12	-0.0430	0.0043	0.0454
13	-0.0790	-0.0377	0.0382
14	***	***	***
16	-0.0322	-0.0431	-0.0106
18	0.0012	-0.0012	-0.0024
19	-0.0014	0.0013	0.0028
Total	0.0627	0.0608	-0.0019

Maragojipe-Cachoeira-Iguape

<i>Haplótipos</i>	<i>Fis</i>	<i>Fit</i>	<i>Fst</i>
1	0.3319	0.3215	-0.01563
2	-0.1151	-0.1226	-0.0067

3	0.2522	0.2559	0.0049
4	-0.0590	-0.0575	0.0013
5	-0.0609	-0.0407	0.0189
6	0.0630	0.0554	-0.0081
9	-0.0200	-0.0050	0.0146
11	-0.0245	-0.0348	-0.0100
12	0.2618	0.2658	0.0055
13	-0.0645	-0.0306	0.0318
14	0.0037	-0.0019	-0.0057
16	-0.0351	-0.0131	0.0212
18	-0.0495	-0.0218	0.0264
19	-0.0161	-0.0150	0.0010
Total	0.0536	0.0556	0.0021

Os resultados do teste de diferenciação gênica e genotípica entre os pares de amostras e para o conjunto formado pelas três amostras estão descritos na tabela 23. Observa-se um desvio significativo quando se compara as frequências genotípicas entre as amostras Maragojipe e Iguape (0,02766) e também quando as três amostras são comparadas (0,0218).

Tabela 23. Diferenciação gênica e genotípica para os haplótipos do *cluster 5'* da β -Globina entre os pares de populações e o conjunto formado pelas três populações analisadas. Os valores marcados com asterisco representam os desvios significativos ($p < 0,05$).

<i>Amostras</i>	<i>Diferenciação Gênica</i>		<i>Diferenciação Genotípica</i>	
	Probab.	S.E.	Probab.	S.E.
Maragojipe-Cachoeira	0.1333	0.0010	0.0844	0.0016
Maragojipe-Iguape	0.0675	0.0007	0.0276*	0.0008
Cachoeira-Iguape	0.2121	0.0012	0.1727	0.0022
As três amostras	0.0694	0.0039	0.0218*	0.0026

4.9. RESULTADOS DOS CÁLCULOS DE MISTURA ÉTNICA

As amostras foram reunidas em uma só e utilizando o modelo de uma população tri-híbrida para calcular as porcentagens de cada população parental, nós encontramos os seguintes resultados: 80,4% africana, 10,8% europeu e 8,8% indígena com um bom coeficiente de correlação múltipla ($R^2 = 0,99$).

4.10. RESULTADOS DOS PACIENTES COM HEMOGLOBINOPATIAS

Entre os pacientes com hemoglobinopatias que foram analisados, 17 apresentaram o genótipo Hb. SS, 12 Hb. SC e 03 o genótipo Hb. CC totalizando 32 pacientes. Nenhum dos pacientes apresentou síndrome torácica aguda, nem seqüestro esplênico. As crianças Hb.SS apresentaram o baço normal ou ligeiramente aumentado à apalpação feita pelo médico. Já os pacientes adultos não revelaram a presença do baço indicando asplenia. 45% dos pacientes Hb SC tinham esplenomegalia e os outros 55% evidenciaram o tamanho normal deste órgão.

Uma criança do sexo masculino (Hb.SS) apresentou úlcera cutânea do maléolo esquerdo. Outro paciente Hb.SS, do sexo feminino, apresentou trombose retiniana do olho direito levando-a a perda desta visão.

As crises álgicas, principal característica destes pacientes, aconteciam numa frequência média de quatro crises por ano em cada paciente. Os pacientes Hb.SS apresentaram maior predisposição às crises álgicas, porém os pacientes Hb.SC tinham crises mais intensas e severas. Uma paciente grávida apresentando genótipo Hb.CC teve que ser submetida a uma exsangüíneo-transfusão para fazer cesariana. 80% destes pacientes tinham colelitíase, uma das complicações mais comuns cuja indicação terapêutica, mais cedo ou mais tarde, é cirúrgica. Durante o período desta pesquisa, Uma paciente com genótipo Hb SS com 18 anos foi submetida à cirurgia vindo a falecer em decorrência de acidente vascular cerebral isquêmico intraoperatório devido à hipóxia causada pelo uso do anestésico alotano. Os índices hematológicos dos grupos de pacientes Hb.SS e Hb.SC estão na tabela 24. Sabendo que a média do hematócrito nos grupos de pacientes Hb.SS e Hb.SC, foi de $\pm 24,0$ e $31,0$, respectivamente, e o desvio padrão de $\pm 4,0$, verificamos que o grupo Hb.SS em relação ao grupo Hb.SC, apresenta uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). A média da concentração da hemoglobina nos pacientes

Hb.SS ($7,2 \pm 1,47$) apresentou redução significativa em relação ao grupo de pacientes Hb.SC ($9,44 \pm 1,3$) ($p < 0,001$).

Tabela 24. Dados hematológicos dos pacientes com hemoglobinopatias do Recôncavo Baiano.

<i>Dados Hematológicos</i>	<i>Pacientes Hb SS</i>	<i>Pacientes Hb SC</i>	<i>Valores de Referências</i>
	Média \pm D.P. (mediana)		
Ht (%)	23,9 \pm 4,4 (26)	31,27 \pm 4,36 (32,0)	40 – 54
Hb (g/dl)	7,2 \pm 1,47 (7,25)	9,44 \pm 1,3 (9,4)	13 – 18
V.C.M. (fl)	77,15 \pm 8,0 (77,82)	82,65 \pm 4,57 (83,93)	80 – 96
H.C.M. (pg)	23,25 \pm 3,3 (21,94)	24,74 \pm 2,36 (25,19)	27 – 31
C.H.C.M. (g/dl)	29,99 \pm 1,94 (29,88)	29,88 \pm 1,35 (29,88)	31 – 36
L.D.H. (UI/L)	486,33 \pm 233,7 (453,5)	330 \pm 100,5 (324)	80 – 220
Hb.F (%)	5,9 \pm 5,6 (3,25)	2,5 \pm 2,3 (1,55)	0 – 2
Hb.A2 (%)	2,8 \pm 1,8 (2,75)	-	1,5 – 3,5
Hb.S (%)	91,0 \pm 6,66 (93,7)	56,8 \pm 5,8 (56,7)	-
Hb.C(%)	-	41,3 \pm 4,9 (41,6)	-

Hb = hemoglobina; HbF, Hb.S e Hb.C = hemoglobinas fetal, S e C, respectivamente; Ht = hematócrito; VCM = volume corpuscular médio das hemácias; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração da hemoglobina corpuscular média; LDH = lactato desidrogenase.

Os níveis da lactato desidrogenase (LDH) indivíduos falcêmicos Hb.SS é em torno de 4X maior do que os valores normais. Verificamos ainda, uma diferença significativa com $p < 0,05$ entre o ponto de corte do lactato sangüíneo em repouso do grupo Hb.SS em relação ao grupo Hb.SC, sendo Hb.SS maior do que o Hb.SC. A média da concentração de Hb.F apesar de ter sido maior nos pacientes Hb.SS do que nos pacientes Hb.SC, não foi detectado desvio significativo entre esta diferença ($p > 0,05$).

Nós encontramos uma diferença significativa para a distribuição haplotípica entre o grupo de pacientes e os indivíduos normais ($p < 0,05$). Três haplótipos africanos (CAR, BEN e CAM) foram identificados entre os dezessete pacientes com anemia falciforme. Os mais comuns foram: os haplótipos BEN (- - - +) com 52,9% e o CAR (- + - -) com 32,5%. Dois haplótipos atípicos em quatro cromossomos β^S (dois “- - - -” e dois “- + - -”) e um haplótipo CAM, considerado raro nesta população, também foram encontrados. Os resultados obtidos para os haplótipos da β -Globina nos pacientes estão descritos na tabela 25.

Tabela 25. Distribuição dos haplótipos dos cromossomos β^S e β^C nos três grupos de pacientes com hemoglobinopatias.

<i>Haplótipos</i>	<i>Pacientes</i>			<i>Total</i>
	<i>Hb. SS</i>	<i>Hb. SC</i>	<i>Hb. CC</i>	
<i>Cromossomos β^S</i>				
BENIN	18	6	-	24
CAR	11	4	-	15
CAM	1	0	-	1
Atípicos	4	2	-	6
<i>Cromossomos β^C</i>				
<i>Tipo I</i>	-	9	1	10
<i>Tipo II</i>	-	3	5	8

Entre os pacientes com hemoglobinopatia SC, os haplótipos CAR e BEN combinaram-se com os haplótipos dos cromossomos β^C tipo I (- + - - +) e tipo II (- - - - +). Dos três pacientes com hemoglobinopatia CC, dois eram homocigotos para o haplótipo tipo I e um heterocigoto para os haplótipos tipos I e II. As combinações dos haplótipos e suas frequências estão descritas na tabela 26. Devido ao tamanho reduzido da amostra, não foi possível investigar a influência dos haplótipos β^S e β^C , sobre a variabilidade clínica dos pacientes com hemoglobinopatias tornando-se necessário a realização de mais estudos para avaliar esta questão.

Tabela 26. Distribuição dos genótipos dos haplótipos nos pacientes.

<i>Pacientes Hb.SS</i>	<i>Freq. (%)</i>	<i>Pacientes Hb.SC e CC</i>	<i>Freq. (%)</i>
CAR/CAR	2 (11,7)	BEN/TIPO I	3 (21,4)
BEM/BEN	6 (35,2)	BEN/TIPO II	2 (14,3)
BEM/CAR	4 (23,5)	CAR/TIPO I	3 (21,4)
CAR/CAM	1 (6,0)	CAR/TIPO II	2 (14,3)
CAR/ATP	2 (11,7)	TIPO I/TIPO II	1 (7,0)
BEM/ATP	2 (11,7)	TIPO II/TIPO II	2 (14,3)
		TIPO II/ATP	1 (7,0)

Dos 32 pacientes analisados, a reação de amplificação para detectar a deleção 3.7 kb da α -globina foi bem sucedida em 29 (figura 28). Vinte e um pacientes apresentaram genótipo normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), sete tinham a deleção em um dos cromossomos ($\alpha\alpha/\alpha-$) e um paciente Hb.SS apresentou a Talassemia α^+ ($\alpha-/\alpha-$) (tabela 27).

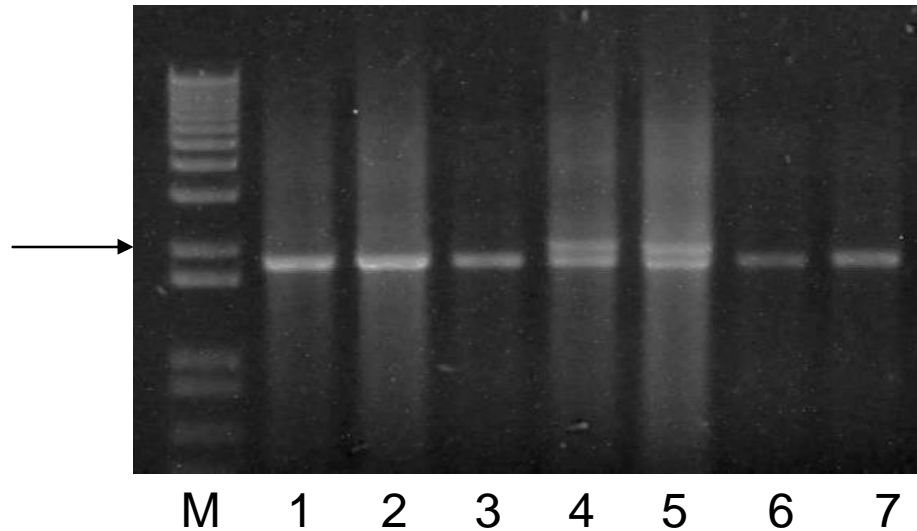


Figura 28. Gel de agarose 1%. M: marcador de peso molecular (1 Kb); indivíduos 1, 2, 3, 6 e 7 não apresentam a deleção ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$); indivíduos 4 e 5 heterozigotos para a deleção $-\alpha^{3,7}$. A seta aponta para uma banda de 2 Kb. Os indivíduos sem a deleção apresentam uma banda de 1,8 Kb e os heterozigotos apresentam duas bandas, uma de superior de 2,1 Kb e outra inferior de 1,8Kb.

Tabela 27. Distribuição dos genótipos para a deleção 3.7 kb da α – globina nos três grupos de pacientes com hemoglobinopatias.

Genótipos	Pacientes			Total
	Hb. SS	Hb. SC	Hb. CC	
A $\alpha/\alpha\alpha$	10	9	2	21
A $\alpha/\alpha-$	4	2	1	7
A $-/\alpha-$	1	0	0	1
Total	15	11	3	29

4.10.1 Manifestações clínicas, laboratoriais e moleculares de um paciente com Anemia Falciforme associada à Talassemia α^+

A partir da identificação de um paciente que apresentava dois tipos de hemoglobinopatias, a Talassemia α^+ e anemia falciforme, resolvemos submetê-lo a outros exames a fim de estudá-lo mais detalhadamente para compreender um pouco mais a interação destas duas patologias. O paciente foi submetido a uma consulta médica observando os seguintes aspectos clínicos:

Ectoscopia: criança consciente, hidratada, hipocorada (++) / 4+), acianótica, anictérico e afebril ao toque.

Sinais Vitais: TA: 100 X 70; Pulso: 92 bpm; frequência cardíaca: 141 bpm; demais sinais não anotados.

Cabeça e Pescoço: Dentes em bom estado; amígdalas normotróficas; gânglios da região cervical anterior, posterior, retroauriculares, supraclaviculares e infraclaviculares não palpáveis.

Aparelho respiratório: Murmúrios vesiculares bem distribuídos, sem ruídos adventícios.

Aparelho cardiovascular: Bulbos normofonéticos, rítmicos, com desdobramento de B2, sem sopros sistólicos.

Abdome: Flácido, plano, ruídos hidroáureos presentes, espaço de Troube timpânico, fígado palpável a mais ou menos 5cm do Rebordo costal direito (RCD), indolor à palpação superficial e profunda; baço não palpável.

Extremidades: Bem perfundidas e sem edemas.

Neurológico: Reflexos superficiais e profundos presentes e simétricos; sem alterações ao exame dos pares cranianos.

4.9.1.1 Exames Laboratoriais

O hemograma do paciente revelou índices hematimétricos alterados: uma taxa de hemoglobina baixa (8g/dl), hematócrito e número de hemácias reduzidos (Ht = 25% e Hemácias = 3.000.000 m^3). O volume corpuscular médio (VCM) determinado foi de 83 μ 3; a hemoglobina corpuscular média (HCM) de 26pg e a concentração hemoglobínica corpuscular média de 32% (tabela 28) . O esfregaço sanguíneo revelou ao microscópio óptico comum presença de hemácias em alvo, algumas hemácias nucleadas e hemácias falcizadas. Observou-se também uma anisocitose acentuada com presença de hemácias microcíticas, além de hipocromia.

Tabela 28. Índices hematimétricos do paciente, seus pais e dois irmãos.

<i>Nome</i>	<i>Hemácias</i> (milhões/mm ³)	<i>Ht</i> (%)	<i>Hb</i> (g/dl)	<i>V.C.M.</i> (fl)	<i>H.C.M.</i> (pg)	<i>C.H.C.M.</i> (g/dl)
ACS	4,6	41	13,3	89	28	32
RCS	4,9	44	14	89	28	31
ADCS	4,8	43	13,8	89	28	32
ASCS	4,9	44	14	89	28	31
PYCS	3	25	8	83	26	32
Referências	4,5 a 5,5	40-54	13-18	80-96	27-31	31-36

ACS: pai, RCS: mãe, ADCS: irmão, ASCS: irmão, PYCS: paciente. Ht: hematócrito; Hb: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração hemoglobínica corpuscular média.

A contagem global de leucócitos apresentou-se elevada: 18.500 por mm³ de sangue; e a contagem relativa revelou uma quantidade elevada de granulócitos (neutrófilos, 67% e eosinófilos, 8%) em relação aos linfócitos (16%), monócitos (7%) e bastonetes (1%) (tabela 29). A dosagem bioquímica das substâncias orgânicas mostrou alterações com taxas elevadas na bilirrubina total e frações (BT= 2,20 mg/dl, BD= 1,80 mg/dl) e na ferritina (341ng/ml) (tabela 30), enquanto que as outras substâncias, para avaliação do estado geral do paciente (glicose, uréia e creatinina) apresentaram níveis plasmáticos normais.

Tabela 29. Resultado dos leucogramas da família e do paciente.

<i>Nome</i>	<i>Leucócitos totais mm³</i>	<i>Bast</i> (%)	<i>Seg</i> (%)	<i>Eos</i> (%)	<i>Bas</i> (%)	<i>Linf</i> (%)	<i>Mono %</i>
ACS	6.000	0	54	6	0	33	7
RCS	7.300	0	63	8	0	27	2
ADCS	7.700	0	47	8	0	39	6
ASCS	7.000	0	43	9	0	44	4
PYCS	18.500	1	67	8	1	16	7
Referências	5.000 a 10.000	1 a 6	48 a 63	1 a 4	0 a 1	20 a 35	2 a 8

Foram feitos também os exames dos pais e irmãos do paciente, todos portadores do traço falciforme, detectados eletroforeticamente. Todos eles apresentaram resultados normais nos índices hematimétricos, leucograma e nas dosagens bioquímicas de glicose, uréia e creatinina.

Tabela 30. Valores obtidos nas dosagens de bilirrubinas e ferritina do paciente.

<i>Dosagem</i>	<i>BT (mg/dl)</i>	<i>BD (mg/dl)</i>	<i>BI (mg/dl)</i>	<i>Ferritina (ng/ml)</i>
Valores obtidos	2,2	1,8	0,4	341,9
Referência	0,20 a 1,00	0,10 a 0,40	0,10 a 0,60	20 a 200
Método	Sims-Horn	Sims-Horn	Sims-Horn	Eletroquimiluminescência

4.9.1.2 Exames De Imagem

A USG (ultra-sonografia) do abdome total revelou fígado aumentado de volume, contornos regulares, bordas rombas e textura homogênea; As vias biliares intra e extra hepáticas sem dilatações (o hepato-colédoco medindo 3mm (normal até 6mm); vesícula biliar distendida fisiologicamente sem cálculos em seu interior e com parede de espessura normal; pâncreas de contornos regulares e textura homogênea; retroperitônio sem adenomegalias; aorta abdominal, veia cava inferior e principais ramos de morfologia e calibre normais; baço de volume normal, contornos regulares e textura homogênea; rins de dimensões, ecogenicidade parenquimal e relação córtico medular mantidas; seio e pelve normais; ausência de líquido livre em recessos peritoneiais; bexiga normodistendida, paredes lisas e conteúdo anecóico. A única alteração significativa foi a hepatomegalia .

A radiografia do tórax evidenciou: Campos pulmonares com boa transparência; Seios costo-frênicos livres; Área cardíaca normal; vasos de base sem alterações. As radiografias dos punhos, ombros, quadris, joelhos e tornozelos evidenciaram: morfologia, densidade e estruturas ósseas inalteradas; superfícies e espaços articulares mantidos; partes moles sem alterações.

5 DISCUSSÃO

Apesar de vários trabalhos terem sido publicados sobre o estudo de polimorfismos de DNA no *cluster* da hemoglobina em populações do estado da Bahia (FIGUEIREDO et al, 1994; GONÇALVES et al, 2003; ADORNO et al, 2004; LYRA et al, 2005), a maioria dos trabalhos conduzidos até agora se concentraram na cidade de Salvador. Sabe-se pouco sobre a variabilidade genética em populações do Recôncavo Baiano.

Os elevados custos dos métodos, as restrições de tempo para condução dos estudos e as dificuldades de coleta limitaram este estudo a um complexo gênico e a três amostras, provenientes de dois municípios do Recôncavo Baiano, Cachoeira e Maragogipe, onde há predominância da cultura africana. Uma destas amostras representa um remanescente de Quilombo (Santiago do Iguape) localizado a 40 km da zona urbana no município de Cachoeira. O presente trabalho permitiu inferir conclusões de interesse antropológico e de genética populacional concernentes à história natural destas populações.

Um grupo formado por 32 pacientes com hemoglobinopatias, sendo 17 mulheres e 15 homens com idades variando de dois a quarenta e um anos e um grupo de 22 portadores Hb.AS também fizeram parte deste trabalho. O perfil eletroforético de cada paciente foi determinado no Laboratório da Faculdade Adventista de Fisioterapia. A confirmação das hemoglobinas variantes Hb.S e Hb.C e a detecção da deleção $\alpha^{3.7}$ da α -globina foram realizadas no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus São José do Rio Preto (SP). Isto nos permitiu estudar a associação de alguns haplótipos com a anemia falciforme na região, identificar as características clínicas mais comuns nestes pacientes e investigar a interação entre a anemia falciforme e a α -Talassemia num paciente diagnosticado para estas duas patologias.

5.1 DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO NO COMPLEXO GÊNICO DA β – GLOBINA EM POPULAÇÕES DO RECÔNCAVO BAIANO E EM OUTRAS POPULAÇÕES

De um total de 48 indivíduos na amostra de Maragogipe, oito não amplificaram para o sítio *Hinc II 5'ε*, um para o sítio *Hind III – IVS-2^Gγ*, um para o sítio *Hinc II 3'ψβ* e dois para o sítio *Hinf I 5'β*. Nos sítios *Hinc II 5'ε*, *Hinc II ψβ1e* *Hinc II 3'ψβ*, quatro indivíduos não amplificaram para cada um destes sítios na amostra de Cachoeira que totalizou 34 indivíduos. Na

amostra de Iguape, 44 indivíduos tiveram o perfil eletroforético determinado e destes, 34 foram utilizados para a amplificação dos seis sítios de restrição, dos quais dois não conseguimos amplificar para o sítio *Hinc II* 5'ε e quatro para os sítios *Hind III* – *IVS-2*^Aγ e *Hinc II* ψβ1.

Na tabela 31, as frequências dos sítios de restrição obtidas para as três amostras estudadas são comparadas com as populações parentais. Em relação ao sítio *Hinc II* 5'ε, as frequências das amostras estudadas (0,217 a 0,325) são intermediárias entre a população africana (0,108) e as populações européia (0,618) e indígena (0,795).

Para o sítio *Hind III* *IVS2*^Gγ, as frequências das amostras de Maragojipe (0,436) e Iguape (0,453) estão bem próximas à da população africana (0,463), enquanto que a amostra de Cachoeira apresentou frequência menor (0,323). Já para o sítio *Hind III* *IVS2*^Aγ, as frequências das amostras de Maragojipe (0,26) e Iguape (0,196) situaram-se entre as mais elevadas. A frequência da amostra de Cachoeira (0,088) ficou próxima à da população africana (0,079).

Para o sítio *Hinc II* ψβ1, a frequência da amostra de Iguape (0,018) ficou próxima à frequência da população indígena (0,03). Este número é bem inferior às frequências de Maragojipe (0,156) e Cachoeira (0,1) que ficaram próximas à frequência da população africana (0,158).

O sítio *Hinc II* 3'ψβ1 apresentou menor variabilidade entre as frequências observadas nas três amostras (0,633 a 0,672), situando-as entre as populações européia (0,359) e africana (0,931). Já as frequências observadas para o sítio *Hinf I* 5'β nas três amostras (0,734 a 0,744) são próximas à frequência da população africana (0,821).

Tabela 31. Frequências de sítios de restrição no complexo gênico da β-Globina nas amostras analisadas e nas populações parentais.

População	<i>HincII</i> 5'ε	<i>HindIII</i> <i>IVS2</i> ^G γ	<i>HindIII</i> <i>IVS2</i> ^A γ	<i>HincII</i> ψβ1	<i>HincII</i> 3'ψβ1	<i>HinfI</i> 5'β
África (centro-sul)	0,108	0,463	0,079	0,158	0,931	0,821
Europa	0,618	0,379	0,15	0,222	0,359	0,95
Indígenas	0,795	0,2	0,165	0,03	0,195	1,0
Maragojipe	0,325	0,436	0,26	0,156	0,66	0,744
Cachoeira	0,317	0,323	0,088	0,1	0,633	0,735
Iguape	0,217	0,453	0,196	0,018	0,672	0,734

5.1.1 Equilíbrio De Hardy-Weinberg

O teste exato foi aplicado com um número de permutações suficiente para estimar a probabilidade de desvio casual com desvios padrão inferiores a 0,02. O único desvio observado foi para o locus *Hinc II 5'ε* na população de Maragogipe (0,0310) apresentado na tabela 8. Considerando o número de testes realizados (21) e o nível de significância de 5%, o único desvio observado é inferior a esta porcentagem podendo ser atribuído ao acaso.

Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg podem ser causados por diversos fatores: subestrutura populacional, tamanho amostral, acasalamento não aleatório, mistura étnica, deriva genética, seleção ou endogamia (TOURRET et al, 1999). Por outro lado, o fato de uma população se encontrar em equilíbrio de Hardy-Weinberg não significa que a mesma satisfaz todas as premissas da lei. Muitas das premissas do equilíbrio podem estar sendo violadas simultaneamente, de maneira que seus efeitos estejam cancelando uns aos outros (GUO e THOMPSON, 1992).

Todos os resultados apresentados pelos testes sensíveis ao excesso ou à deficiência de heterozigotos apresentaram apenas um resultado significativo, o locus *Hinc II 5'ε* na população de Maragogipe (0,0240), obtido pelo teste sensível ao excesso de heterozigotos (tabela 10). Embora nas outras duas populações não tenha sido observado nenhum valor significativo, o teste multipopulacional apresentou um desvio elevado (0,0047) para este mesmo locus. Uma possível explicação para este achado é a ocorrência de fluxo gênico. Nenhum desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi detectado em qualquer análise nas duas amostras do município de Cachoeira.

5.1.2 Desequilíbrio De Ligação

A subestrutura de uma população pode ser detectada tanto por desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg quanto por desequilíbrio de ligação. Visto que os *loci* analisados no presente estudo estão proximamente ligados (não são independentes), espera-se que alguns destes não estejam associados aleatoriamente.

Em 63 análises, nós identificamos cinco desvios entre os pares de *loci* analisados nas três populações (tabela 11). Nas populações de Maragogipe e Iguape, o par de *loci* $5'ε - 3'ψβ$ apresentou desvios altamente significativos (0,00001 e 0,00073, respectivamente). A

probabilidade para este par de *loci* na população de Cachoeira foi de 0,1123. Estes dois *loci* estão separados um do outro cerca de 30 Kb.

Na população de Cachoeira, o locus $IVS-2^G\gamma$ encontra-se em desequilíbrio com os *loci* $5'\epsilon$ (0,0039) e $IVS-2^A\gamma$ (0,0261). Considerando o par de *loci* $IVS-2^G\gamma - IVS-2^A\gamma$, a probabilidade observada na população de Maragogipe foi de 0,0748, um valor pequeno, apesar de não ser significativo. Surpreendentemente, no quilombo de Iguape, a probabilidade observada para este mesmo par de *loci* (0,8099) foi muito superior ao observado nas outras duas populações.

O locus $5'\beta$ também revelou estar em desequilíbrio com o sítio de mutação da β -hemoglobina na população de Iguape (0,0017), enquanto que na população de Maragogipe, a probabilidade foi de 0,1311 e na população de Cachoeira 0,2566.

Quando consideramos as três populações juntas, seis pares de *loci* revelaram estar em desequilíbrio. Além dos quatro anteriormente assinalados para as populações isoladamente, os pares de *loci* $\psi\beta - 3' \psi\beta$ e $\psi\beta - 5' \beta$, apresentaram desvios significativos de 0,0464 e 0,0322 respectivamente (tabela 11).

Estes achados demonstram certa heterogeneidade entre as populações, apesar da ausência de desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto para o sítio $5'\epsilon$, e os valores reduzidos de *Fst* que indicam homogeneidade entre elas.

5.1.3 Diversidade Intrapopulacional

O valor médio da diversidade intrapopulacional (*Hs*) nas populações de Cachoeira e Iguape foram próximos (0,31597 e 0,31992 respectivamente), enquanto que na população de Maragogipe foi de 0,3596. Os valores da diversidade média e total foram 0,33183 e 0,33787 respectivamente.

Os baixos valores da diversidade intrapopulacional encontrados nestas populações podem ser decorrentes de um menor tamanho populacional e ou amostral, como também indica uma maior semelhança entre elas. Além disso, o número reduzido de alelos por locus diminui a diversidade intrapopulacional.

5.1.4 Coeficiente de Endogamia e Diversidade Interpopulacional

O coeficiente de endogamia (Fis) indica se existe endogamia dentro de cada subpopulação pela comparação da heterozigosidade esperada (Hs) e heterozigosidade observada (Ho). Ele avalia, portanto, se existe, em média, deficiência de heterozigotos dentro das subpopulações.

Quando consideramos os *loci* individualmente em cada população, apenas três casos apresentaram valores elevados. Os valores dos *loci* *Hind III IVS-2*^A γ e *Hinc II 3'* $\psi\beta 1$ na população de Cachoeira foram, 0,2826 e 0,1553, respectivamente. Na população de Iguape, os valores de Fis encontrados para os *loci* *Hind III IVS-2*^G γ e a mutação da β -hemoglobina foram, respectivamente, 0,3207 e 0,1615. Os níveis de endogamia foram negativos para as três populações quando todos os *loci* foram analisados. Nas populações de Maragogipe e Cachoeira, os valores de -0,0665 e -0,0297, respectivamente, indicam uma exogamia, enquanto que na população de Iguape, o valor foi praticamente zero.

A análise da diversidade inter-populacional indicou valores muito baixos para os pares de populações bem como para o conjunto total. Como os valores de *Bootstrapping* não foram estatisticamente significantes, nós podemos concluir que estas populações não estão estruturadas geneticamente com identidade praticamente total.

5.1.5 Teste De Diferenciação Populacional

Somente os *loci* *Hind III IVS-2*^A γ e *Hinc II* $\psi\beta 1$ para os pares de populações Maragogipe – Cachoeira e Maragogipe – Iguape, respectivamente, evidenciaram alguma diferenciação (tabelas 15 e 16), mas ao analisarmos a tabela 17, podemos concluir que as distribuições genotípicas entre as populações para todos os *loci*, revelam que elas são homogêneas.

5.2 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS PARA OS SETE LOCI ANALISADOS

Os haplótipos são considerados matéria-prima para inúmeras análises genéticas, mas o aumento das técnicas de genotipagem implica num custo elevado para determinar a fase haplotípica de marcadores diplóides. Para superar esta dificuldade, nós utilizamos um método estatístico para a identificação haplotípica implementado no programa Phase 2.1.1. Este método

nos oferece pelo menos três vantagens: aumento da precisão, grande aplicabilidade e a facilidade para acessar a incerteza associada à fase haplotípica de cada indivíduo (Stephens et al, 2001).

Foram feitos quatro tipos de simulações diferentes para a identificação dos haplótipos a partir dos dados obtidos para as três amostras e um grupo de portadores do traço falciforme, totalizando 136 indivíduos. A tabela com os resultados das reconstruções para cada indivíduo em cada simulação, encontra-se na seção de apêndices.

Nós corremos todos os dados de uma só vez executando o teste de permutação caso-controle (-c) para ver se existem diferenças significativas entre as frequências dos haplótipos em cada grupo. O Phase 2.1.1 nos permite atribuir um valor unitário para cada amostra (0, 1, 2, 3...), mas faz a simulação da corrida com todas as amostras juntas, pois aumenta a probabilidade de acerto na inferência da identificação mais plausível para cada indivíduo do que simular uma corrida para cada amostra separadamente (STEPHENS e SCHEET, 2005).

A primeira simulação foi feita no modo sem recombinação utilizando um computador com plataforma Windows, processador 1,6 GHz e memória Ram de 256 MHz, e o tempo de duração foi de alguns minutos. As outras três simulações envolvendo diferentes parâmetros de recombinação tiveram a duração de aproximadamente duas horas cada uma.

Em geral, as reconstruções haplotípicas feitas através do método de recombinação (-MR) são menos confiáveis do que o método sem recombinação (-MS). Isto não é um defeito do método, mas um reflexo das pressuposições que são feitas para a inferência dos haplótipos em cada simulação. Por isso nós resolvemos utilizar os dois métodos e compará-los.

Ao utilizar o método de recombinação, nós utilizamos três parâmetros diferentes: um com variação na taxa de recombinação utilizada pelo *default* do programa ($\mu = 0,0004$), outro com a mesma taxa de recombinação para pesquisar a presença de *hotspot* recombinacional em qualquer intervalo entre os marcadores e, finalmente, outro com esta mesma taxa de recombinação, mas definindo a presença de *hotspot* recombinacional entre o 5^o e 6^o marcadores onde, de acordo com a literatura, ocorrem 75% das recombinações para o *cluster* da β – Globina (CHAKRAVARTI et al, 1984).

Dos 136 indivíduos cujos dados foram utilizados para inferir a fase haplotípica, 22 (16,1%) apresentaram diferenças na reconstrução dos haplótipos ao compararmos os métodos com e sem recombinação. Destes 22, 19 tinham os haplótipos ligados aos cromossomos β^A e três,

ligados aos cromossomos β^S e β^C . 11 dos 19 indivíduos β^A , apresentaram os mesmos haplótipos na reconstrução feita nos três métodos com recombinação (ver apêndice).

O programa Phase 2.1.1 permite acessar a taxa de incerteza na reconstrução dos haplótipos de cada indivíduo. Na tabela 32 está apresentada a taxa de incerteza global para todos os indivíduos em cada simulação. Observe que o método sem recombinação apresenta uma taxa de incerteza menor (0,025) do que os métodos com recombinação.

Tabela 32. Taxa de incerteza total para inferir a fase dos haplótipos em cada método. O número entre parênteses ao lado de cada locus, representa o número de indivíduos cuja probabilidade de inferir acertadamente foi inferior ao estipulado pelo programa ($p = q = 0,9$).

<i>Locus</i>	<i>-MS</i>	<i>-MR0</i>	<i>MR1</i>	<i>MR2 1</i>
<i>Hinc II 5'ε</i> (59)	0,02	0,20	0,21	0,23
<i>Hind III IVS^Gγ</i> (59)	0,13	0,27	0,25	0,23
<i>Hind III IVS^Aγ</i> (41)	0,0	0,15	0,15	0,18
<i>Hinc II ψβ1</i> (20)	0,0	0,05	0,05	0,04
<i>Hinc II 3'ψβ1</i> (57)	0,0	0,11	0,11	0,08
<i>Hinf I 5'β</i> (62)	0,0	0,01	0,01	0,0
Total	0,025	0,129	0,130	0,126

-MS (método sem recombinação); MR0 (Variação na taxa de recombinação); MR1 (Presença de hotspot em posição desconhecida); MR2 1 (Presença de hotspot entre os loci *Hinc II 3'ψβ1* e *Hinf I 5'β*)

O resultado da intensidade de recombinação encontrado é consistente com os estudos que revelaram taxas de recombinação 3 a 30 vezes maiores para uma região de 9 Kb que fica entre o *cluster 5'* e o *cluster 3'* da β -Globina humana (CHAKRAVARTI et al, 1984) Esta região é a mesma que fica entre os sítios *Hinc II 3'ψβ1* e *Hinf I 5'β*.

Os *Hotspots* recombinacionais tendem a diminuir o desequilíbrio de ligação entre regiões do genoma que estão muito próximas. Por isso, o conhecimento sobre a localização e a força de tais *hotspots* é extremamente importante para estudos de associação genética (SCHNEIDER et al, 2002).

Recentemente, um estudo sobre a influência que um *hotspot* recombinacional exerce sobre *loci* ligados e selecionados positivamente analisou um *hotspot* de cerca de 1 Kb localizado na região 5' próxima à mutação β^C e revelou que a recombinação através de *crossing-over* ou conversão gênica reduz o efeito da seleção natural sobre a Hb.C que confere resistência à malária (WOOD et al, 2005).

5.2.1 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS HAPLÓTIPOS DO *CLUSTER 5*'DA B-GLOBINA LIGADOS AOS CROMOSSOMOS β^A

O número de haplótipos diferentes identificados nas três populações (14) representa 43,7% do número de haplótipos possíveis (32). Quando se analisa a distribuição dos haplótipos por população, a proporção de haplótipos observados em relação ao esperado é ainda menor: Maragogipe, 40,6%; Cachoeira e Iguape, 31,2%. A explicação mais plausível para esse desequilíbrio de ligação é a proximidade entre os sítios de restrição situados em uma região com aproximadamente 32 Kb, na qual a taxa de recombinação total foi estimada em 0,0017% (CHAKRAVARTI et al, 1984).

Na tabela 33 as freqüências dos haplótipos obtidas para as três amostras estudadas são comparadas com as populações parentais. Os haplótipos mais comuns identificados nas amostras foram: o 2 (+----), o 3 (----+), o 4 (-+++) e o 6.(-+++). O haplótipo 2 apresentou freqüências maiores para as três amostras do que na população africana (0.063). Porém, foram bem menores que as freqüências encontradas nas populações européia e indígena (0.609 e 0.843, respectivamente). O haplótipo 3 apresentou freqüências inferiores à metade da freqüência encontrada para a população africana (0.532). Já as freqüências do haplótipo 4, nas populações de Maragogipe (0.1364) e Cachoeira (0.1667), se aproximaram da freqüência da população africana (0.152), enquanto que na população de Iguape observou-se a maior freqüência para este haplótipo (0.2308).

Dos 14 haplótipos identificados nas três populações estudadas, sete deles (haplótipos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 16) são considerados haplótipos de primeira ordem, separados entre si por eventos de mutação de ponto ou conversão gênica, sendo o haplótipo 2 o provável ancestral. Os haplótipos 9, 11, 12, 13 e 14 são considerados de segunda ordem, e teriam origem a partir de recombinações entre os haplótipos de primeira ordem de acordo com os modelos propostos por Long et al (1990) e Chen et al (1990).

Os haplótipos 18 (+ - + - -) e 19 (- - + - +) foram primeiramente descritos em japoneses por Shimizu et al (1992). Posteriormente, um estudo feito com mestiços mexicanos (VILLALOBOS-ARAMBULA et al, 1997), e outro com ameríndios colombianos (SHIMIZU et al, 2001), detectaram a presença do haplótipo 18 nestas populações. Este haplótipo apresentou freqüências de 0.0682 e 0.0167 nas populações de Maragogipe e Cachoeira, respectivamente, e não foi detectado na população de Iguape. O haplótipo 19 foi encontrado nas populações de

Maragojipe (0.0341) e Iguape (0.0192). Entretanto, não há registro na literatura destes dois haplótipos em populações africanas, européias e indígenas brasileiros.

Tabela 33. Frequências dos haplótipos ligados aos cromossomos β^A nas amostras estudadas e populações parentais.

Haplótipos*	Maragojipe	Cachoeira	Iguape	África [†]	Europa [†]	Indígenas [§]
1. ----	0.0795	0.1000	0.0577	0.0000	0.0000	0.0060
2. +----	0.1591	0.2000	0.1346	0.063	0.609	0.843
3. ----+	0.1477	0.2167	0.2692	0.532	0.019	0.0000
4. -+++	0.1364	0.1667	0.2308	0.152	0.0000	0.0060
5. -++++	0.0795	0.0500	0.0000	0.139	0.377	0.0060
6. -+++	0.1364	0.0833	0.1346	0.025	0.113	0.122
7. -+--	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.027	0.0060
8. ++++	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
9. -++++	0.0341	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0120
10. ++++	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
11. ---++	0.0455	0.0333	0.0192	0.0000	0.0000	0.0000
12. ++---	0.0455	0.0000	0.0577	0.0000	0.0000	0.0000
13. +----	0.0227	0.1000	0.0192	0.038	0.0000	0.0000
14. +-+-	0.0114	0.0000	0.0000	0.013	0.0000	0.0000
15. ++++	0.0000	0.0000	0.0000	0.025	0.0000	0.0000
16. -+---	0.0000	0.0333	0.0577	0.013	0.0000	0.0000

*Numeração de acordo com Long et al (1990).

† Dados extraídos de Long et al (1990) e Chen et al (1990).

§Dados extraídos de Guerreiro (1992).

A existência destes dois últimos haplótipos pode ser explicada através de recombinação entre os haplótipos de primeira ordem 2 (+ - - -) e 6 (- + + -) para originar o haplótipo 18 (+ - + -), e entre os haplótipos 3 (- - - +) e 6 (- + + -) para originar o haplótipo 19 (- - + -). Os haplótipos 2, 3 e 6 são também os mais frequentes nas três populações. O tamanho reduzido das amostras das populações de Cachoeira e Iguape pode explicar a ausência dos haplótipos 9 (- + + +) e 14 (+ + - -) encontrados na população de Maragojipe. É importante destacar que esta reconstrução de haplótipos foi a mais parcimoniosa obtida nas simulações feitas pelo Phase 2.1.1 através do método sem recombinação. Quando realizamos outras simulações com diferentes

parâmetros de recombinação, obtínhamos uma reconstrução com haplótipos mais raros e menos freqüentes nas populações parentais.

O teste global para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg revelou um desvio significativo para as populações de Maragogipe (0.0337) e Cachoeira (0.0010). Entretanto, o teste exato não revelou valores significativos nem para o déficit nem para o excesso de heterozigotos na população de Maragogipe. Já na população de Cachoeira, houve um desvio significativo para o déficit de heterozigotos (0.0324).

A variabilidade intrapopulacional ou diversidade haplotípica encontrada nas populações de Maragogipe, Cachoeira e Iguape foram 0.899, 0.870 e 0.835, respectivamente. A variabilidade medida pela diversidade haplotípica (H_s e H_t) e o coeficiente de diferenciação gênica (G_{st} e G_{st}') nas populações do Recôncavo e em outros grupos étnicos estão na tabela 34. A diversidade total (H_t) e a variabilidade intrapopulacional (H_s) observada nas populações do Recôncavo é superior ao estimado para as populações parentais.

Tabela 34. Diversidade haplotípica do *cluster* da β – Globina nas populações do Recôncavo e parentais.

<i>População</i>	<i>Nº de subpopulações</i>	<i>H_s</i>	<i>H_t</i>	<i>D_{st}</i>	<i>G_{st}</i>	<i>G_{st}'</i>
Recôncavo	3	0.868	0.872	0.004	0.004	0.006
Africanos	6	0.650	0.710	0.060	0.085	0.100
Europeus	5	0.590	0.820	0.030	0.280	0.060
Indígenas	18	0.290	0.305	0.015	0.012	0.018

Um *pool* de haplótipos ancestrais restrito pode explicar a menor variabilidade observada em indígenas brasileiros (MOUSINHO-RIBEIRO et al, 2003), enquanto que a mistura interétnica pode ser o fator mais importante para a maior variabilidade encontrada nas populações do Recôncavo.

O coeficiente de endogamia (F_{is}) para os haplótipos nas populações foi superior ao dos sítios de restrição. Como o F_{is} avalia o desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg nas sub-populações, este coeficiente foi superior em que os pares de populações analisados incluía a população de Cachoeira. No par de amostras Maragogipe-Iguape, o F_{is} foi igual à zero. O F_{it} também foi elevado nos pares de populações, exceto quando a população de Iguape era incluída.

Portanto, esses valores indicam deficiência de heterozigotos nas subpopulações em relação ao esperado de Hardy-Weinberg e não em relação à diferenciação genética entre as subpopulações, pois o valor de *Gst* foi praticamente zero.

Os resultados encontrados da análise de mistura étnica revelaram cerca de 80% de composição africana para estas populações, corroborando com os resultados encontrados na literatura para dados morfológicos (AZEVEDO, 1980) e microssatélites autossômicos na comunidade quilombola de Bananal próxima ao município de Jequié, Bahia (BARBOSA et al, 2006). Portanto, trata-se de uma população que recebeu grande contribuição de africanos, mas que ao longo da sua história tiveram contato interétnico com outras populações.

5.3 RESULTADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM HEMOGLOBINOPATIAS

A queda acentuada nos níveis de hemoglobina caracteriza uma insuficiência transitória da eritropoese. Além disso, a crise de seqüestro esplênico é definida pela queda nos níveis basais de hemoglobina, hiperplasia compensatória da medula óssea e aumento rápido do baço. Essa complicação ocorre em geral após os dois anos de idade, entretanto, pode ocorrer mesmo em adultos portadores de esplenomegalia (PASQUINI et al, 2005).

A diferença entre o ponto de corte do lactato sangüíneo em repouso do grupo Hb.SS em relação ao grupo Hb.SC, sendo Hb.SS maior do que o Hb.SC, justifica possivelmente maior predisposição dos indivíduos Hb.SS em relação aos indivíduos Hb.SC às crises algicas. Podemos identificar na literatura que os indivíduos com hemoglobinopatia SC sofrem fenômenos vasoclusivos, porém os sintomas de hábito são mais suaves (SODEMAN et al, 2000). Entretanto, como foi assinalado anteriormente pelo hematologista que acompanhou estes pacientes por um período de cinco anos, os pacientes com hemoglobinopatias SC e CC demoravam mais para sair dos períodos de crise do que os pacientes Hb.SS, embora estes últimos tivessem maior predisposição às crises. Nós observamos também que o número elevado de crises vasoclusivas nos pacientes está relacionado à presença dos haplótipos BEN e CAR.

Os índices hematológicos obtidos do paciente para o composto genético anemia falciforme e talassemia α^+ , revelaram valores mais ou menos esperados para um portador da doença falciforme, entretanto alguns resultados puderam confirmar um melhor prognóstico para o portador do composto genético. A taxa de hemoglobina de 8g/dl parece ser adequada, diante de

taxas ainda menores nos portadores da anemia falciforme isolada. O volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) mostraram-se dentro dos valores de referência, parecendo realmente ter alguma associação com função esplênica normal (ADEKILE et al, 1996), fato confirmado com os exames de imagens revelando um baço com contornos e volume normais.

Foi observada no esfregaço sanguíneo uma hipocromia acompanhada de uma anisocitose típicas de um caso de alfa talassemia. Já a morfologia das hemácias revelou um número razoável de hemácias em alvo e uma quantidade de hemácias falcizadas relativamente pequena, talvez devido à associação da anemia falciforme com a alfa talassemia, mas deve-se levar em consideração que as condições de anóxia não foram adequadas para o processo de falcização.

O exame clínico revelou o fígado aumentado de tamanho, confirmado depois com a imagem ultra sonográfica. Foi detectado também um desdobramento de B2 como alteração cardiovascular, sem, no entanto, ter sido investigada a severidade de tal alteração. O leucograma revelou uma neutrofilia acompanhada de uma eosinofilia, podendo estar relacionada a danos teciduais (BOXER, 1980), haja visto que o probando havia sofrido crises dolorosas, dias antes da realização dos exames, segundo relato dos pais.

O aumento da bilirrubina deve-se provavelmente à intensa hemólise que ocorre na anemia falciforme, haja vista que a bilirrubina é o produto final da degradação da hemoglobina sendo liberadas para a circulação. A ferritina, uma das principais proteínas de reserva de ferro no organismo, também se mostrou elevada, fato que pode ser explicado também com a lise das hemácias. A radiografia das extremidades não revelou nenhuma alteração significativa, como cabeça de fêmur, etc.

Pode-se concluir com base nos valores hematológicos e na preservação do baço, como evidenciado na ultra-sonografia de abdome, que a associação da anemia falciforme com alfa talassemia melhora o quadro clínico do paciente portador do composto genético, possivelmente aumentando a sua sobrevivência (MEARS et al, 1983 e ADAMS et al, 1994), ressaltando que a mãe do paciente declarou que o mesmo apresenta crises dolorosas constantes. Com isto, acredita-se que o composto genético requer estudos mais minuciosos para esclarecer melhor os resultados obtidos.

Tanto a anemia falciforme quanto a α -talassemia ocorrem em frequências elevadas na África subsaariana porque protegem contra a malária severa causada pelo *Plasmodium*

falciparum (ALLEN et al, 1997; AIDOO et al, 2002 e WILLIAMS et al, 2005a). Entretanto, quando as duas hemoglobinopatias estão associadas, a proteção oferecida por cada uma isoladamente fica comprometida devido ao aumento de complicações que surgem em decorrência da malária. Este fenômeno foi observado em uma população da costa do Kênia demonstrando que a epistasia negativa possa explicar o fracasso da α -talassemia em se espalhar para as populações da África subsaariana da mesma forma que a Hb.S (WILLIAMS et al, 2005b).

5.4 COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO HAPLOTÍPICA NOS PACIENTES COM OUTRAS POPULAÇÕES DO BRASIL

A distribuição haplotípica entre os indivíduos normais e o grupo de pacientes, revelou uma associação não aleatória entre os dois grupos. A figura 26 mostra poucos haplótipos presentes nos pacientes caracterizando desequilíbrio de ligação já bem descrito na literatura (ANTONARAKIS et al, 1984; Pagnier et al, 1984). Os haplótipos predominantes foram o BEN e o CAR com frequências de 52,17 e 32,6%, respectivamente, nos cromossomos β^S , e os tipos I e II com frequências de 55,5 e 44,5%, respectivamente, nos cromossomos β^C .

Quando comparamos estes resultados com os últimos achados na população de Salvador (GONÇALVES et al, 2003 e LYRA et al, 2005), nós observamos que a frequência do haplótipo BEN no Recôncavo Baiano é superior ao observado na capital baiana que apresentou frequências mais semelhantes para os haplótipos CAR e BEN.

Dois estudos foram feitos com pacientes Hb.SS de Salvador, em um foram encontrados 17 com o genótipo CAR/CAR (21,25%) num grupo de 80 pacientes (GONÇALVES et al, 2003) e em outro, oito indivíduos (20,0%) num grupo de 40 pacientes foram encontrados com este mesmo genótipo (LYRA et al, 2005), enquanto que nos pacientes do Recôncavo Baiano, a frequência não ultrapassou 12,0%. Isto pode ser explicado por migrações internas de afro-descendentes oriundos de outras regiões do Brasil para a cidade de Salvador. Este fato também foi observado por Cardoso e Guerreiro ao estudarem a distribuição haplotípica nos pacientes Hb.SS da cidade de Belém na região norte do País, quando constataram uma frequência maior para o haplótipo CAR do que aquela encontrada nos registros históricos (CARDOSO e GUERREIRO, 2006).

O historiador Verger descreveu a influência Nagô-Ioruba no estado da Bahia graças aos africanos trazidos da região do Golfo do Benin em contraste com o resto do país que recebeu um

número maior de escravos do Congo e Angola onde o haplótipo CAR predomina (VERGER,1968). No século XVI e início do XVII, houve um fluxo intenso de migração entre os portos de embarque da Baía de Benin na região de Gana/Nigéria e os portos de desembarque de Salvador e Recife de tal modo que muitos cultos afro-brasileiros são baseados nas religiões daquela região da África Ocidental, onde se destaca o grupo ioruba (KLEIN, 2002).

A maioria dos escravos no estado da Bahia veio da Costa Ocidental da África. Como se pode ver, a partir da abolição da escravatura, registrada no século XIX, na cidade de Salvador, os africanos que obtiveram a liberdade eram, na sua maioria, de regiões da África Ocidental (Tabela 35). Os portos da Baía de Benin, juntamente com a região de Angola/Congo, foram a fonte mais importante de escravos trazidos para o Brasil, especialmente no início do século XVIII, e entre 1770 e 1790 (KLEIN, 2002). Angola e Congo foram as únicas e mais importantes fontes de escravos do início até o final do tráfico. Na tabela 36 encontram-se as frequências dos haplótipos β^S em algumas populações brasileiras comparadas com a população do Recôncavo Baiano.

O haplótipo Camarões aqui identificado é oriundo também da Costa Ocidental da África, principalmente na Nigéria (KULOZIK et al, 1986; ÖNER et al, 1992). Este haplótipo foi descrito em uma população brasileira na cidade de Belém por Cardoso e Guerreiro e, como estes autores assinalaram, a sua presença na região Norte pode ser devido à imigração interna de escravos oriundos da região Nordeste (CARDOSO e GUERREIRO, 2006).

Tabela 35. Origens dos escravos africanos libertados em Salvador (BA) entre 1808 e 1884 (modificado da tabela 5 de NISHIDA, 1993).

	1808-1842			1851-1884		
	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total
ÁFRICA OCIDENTAL						
Mina	39	75	114	2	6	8
Guiné	3		3			0
Dahomey	1	1	2			0
Kotocoli		2	2	1		1
Benin	2	2	4	1	1	2
Nagô (Ioruba)	114	93	207	133	170	303
Calabar	5	4	9	2	1	3
Camarões		1	1			0
Gêge (Ewe)	58	104	162	9	37	46
Hausa	34	16	50	4	1	5
Bornu	6	1	7			0
Tapa (Nupe)	11	6	17	3		3
Subtotal	273	305	578	155	216	371
ÁFRICA CENTRO-OCIDENTAL						
Cabinda	4	4	8	5	4	9
Congo	5	4	9	2	3	5
Gabão		1	1			0
São Tomé	1	1	2			0
Angola	25	25	50	5	15	20
Benguela	8	3	11		1	1
Subtotal	43	38	81	12	23	35
SUDESTE AFRICANO						
Moçambique	2	1	3		1	1
TOTAL	318	344	662	167	240	407

Tabela 36. Distribuição das frequências (%) dos haplótipos β^S no Recôncavo Baiano e em outras populações brasileiras.

População	N	Haplótipos				
		CAR	BEN	SEN	CAM	Atípicos
Recôncavo Baiano	34	32,3	53		2,9	11,8
Salvador (BA) ¹	160	48,2	45,6	0,6	0	5,6
Ceará ²	44	31,8	43,2	2,3	0	22,7
Belém (PA) ³	260	66	21,8	10,9	1,3	0
São Paulo/Campinas (SP) ⁴	142	64,8	35,2	0	0	0
Ribeirão Preto (SP) ⁵	67	73,1	25,4	1,5	0	0
Porto Alegre (RS) ⁶	49	79,6	18,4	2	0	0

N = número de cromossomos; 1, Gonçalves et al (2003); 2, Galiza Neto et al (2005); 3, Cardoso e Guerreiro (2006); 4, Gonçalves et al (1994); 5, Figueiredo et al (1994); 6, Wagner et al (1996).

A presença do haplótipo tipo I (- + - - +) nos cromossomos β^C está de acordo com a origem preconizada para este haplótipo na região Centro-Occidental da África, de onde vieram muitos escravos para o Brasil, especialmente a região Nordeste. A frequência de 45,5% encontrada para o haplótipo tipo II (- - - - +) foi superior à frequência encontrada no continente africano que variou de 8 a 23% (BOEHM et al, 1985 e TALACKI et al, 1990). Uma possível explicação para o aumento deste haplótipo seria através do “efeito fundador”. Os indivíduos que formaram a população que colonizou o Recôncavo Baiano provavelmente continham diferenças nas frequências para os dois haplótipos β^C em relação à população parental, ocasionando um aumento na frequência do haplótipo tipo II.

Os resultados acima demonstram uma heterogeneidade na distribuição de haplótipos entre a cidade de Salvador e o Recôncavo Baiano, indicando possivelmente um fluxo gênico maior na capital baiana. Além disso, os nossos resultados apontam para uma prevalência elevada das Hemoglobinas Hb.S e Hb. C no Recôncavo Baiano em relação à população geral do estado da Bahia cuja frequência estimada de portadores do traço falcêmico foi 5,5%, chegando a 6,3% na população de afrodescendentes (ÁLVARES FILHO et al, 1995).

Um estudo anterior a este, realizado com 1200 crianças de uma escola pública de Salvador, revelou frequências de 7,4 a 14% para portadores Hb.AS em crianças mulatas escuras e negras (Azevedo et al, 1980). Nas cidades de Maragogipe e Cachoeira nós encontramos frequências de 10,5% e 2,5% para os portadores Hb.AS e Hb.AC, respectivamente sendo que no

quilombo de Santiago do Iguape, as frequências foram de 11,4% para Hb.AS e 2,5% para Hb.AC e dois pacientes foram diagnosticados numa coleta de 44 indivíduos (Silva et al, 2006). Os resultados aqui descritos, portanto, estão entre os mais elevados comparados até mesmo com os remanescentes de quilombos descritos por Oliveira et al (2002).

Ao finalizar, ressaltamos o fato de que o baixo nível sócio-econômico e educacional dos municípios do Recôncavo Baiano se reflete no acesso à informação e aos serviços públicos de saúde. Loureiro e Rozenfeld demonstraram que, apesar de a Bahia possuir o maior número absoluto de negros do País, as taxas de internações por anemia falciforme estão bem abaixo dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Os resultados confirmaram a alta morbidade na população jovem e evidenciaram predominância de óbitos entre adultos jovens (LOUREIRO e ROZENFELD, 2005). A subnotificação dos óbitos por anemia falciforme no País (ALVES, 1996) também revela o desconhecimento não só da população geral como também dos profissionais de saúde sobre esta patologia.

6 CONCLUSÕES

Foram analisados seis sítios de restrição do *cluster* da β -globina em 114 indivíduos de dois municípios do Recôncavo Baiano. Duas amostras do município de Cachoeira sendo uma da zona urbana e outra de um remanescente de quilombo (Santiago do Iguape), e uma amostra da zona urbana do município de Maragogipe.

Para verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg, os valores de probabilidade estimados pelo teste exato e pelo teste multipopulacional revelaram um desvio significativo apenas na população de Maragogipe para o locus *Hinc II 5'ε*.

Desequilíbrios de ligação foram observados nas três amostras sendo um em Maragogipe (entre os loci *Hinc II 5'ε* e *Hinc II 3'Ψβ*), dois em Cachoeira (um entre os loci *Hinc II 5'ε* – *Hind III IVS-2^Gγ* e outro entre os loci *Hind III IVS-2^Gγ* – *Hind III IVS-2^Aγ*) e dois em Iguape (um entre os loci *Hinc II 5'ε* – *Hinc II 3'Ψβ* e o outro entre os loci *Hinf I 5'β* – Hb). Seis desequilíbrios foram observados quando as três amostras foram consideradas uma só.

O valor da diversidade intrapopulacional para cada locus variou de 0,128 a 0,481. A diversidade intrapopulacional média nas três populações foi de 0,331. Os níveis de endogamia foram negativos para as três populações quando todos os loci foram analisados revelando uma exogamia. A análise da diversidade inter-populacional indicou valores muito baixos para os pares de populações bem como para o conjunto total indicando não haver diferenciação genética entre elas.

O teste de diferenciação populacional revelou um desvio entre as populações de Maragogipe e Cachoeira para o locus *Hind III^Aγ* e entre as populações de Maragogipe e Iguape para o locus *Hinc II ψβ1*. Quando as três amostras foram consideradas juntas, houve desvios significativos para os loci *Hind III^Aγ* e *Hinc II ψβ1*.

Para os seis sítios de restrição, foram identificados vinte e um haplótipos ligados aos cromossomos β^A , três ligados aos cromossomos β^S e um ligado aos cromossomos β^C . Não foi observado desvio significativo para a distribuição dos haplótipos nas três amostras. O método de recombinação empregado pelo Programa Phase 2.1.1 confirmou a presença de um *hotspot* recombinacional entre os loci *Hinc II 3'ψβ1* e *Hinf I 5'β* com intensidade trinta e quatro vezes superior à taxa de recombinação estabelecida pelo *Default* do programa.

Dados dos cinco sítios de restrição do *cluster 5'* da β -globina foram utilizados para a determinação dos haplótipos nas amostras de Maragojipe, Cachoeira, Iguape, o grupo de pacientes com hemoglobinopatias (17 Hb.SS, 12 Hb.SC e 03 Hb.CC) e 22 indivíduos portadores do traço falcêmico (Hb.AS) totalizando 167 indivíduos. Quatorze haplótipos ligados aos cromossomos β^A , seis ligados aos cromossomos β^S e dois ligados aos cromossomos β^C foram identificados para este *cluster*.

Os haplótipos 2 (+ - - -), 3 (- - - - +), 4 (- +- - +) e 6 (- + + - +) ligados aos cromossomos β^A foram os mais comuns, e dois haplótipos privados foram encontrados na população de Maragojipe, os haplótipos 9 (- + + + +) e 14 (+ + - - +).

Para verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg, O teste exato revelou um desvio para o déficit de heterozigotos na população de Cachoeira e o teste global revelou um desvio para as populações de Maragojipe e Cachoeira.

Os valores de diversidade haplotípica do *cluster* da β -Globina calculados para as populações analisadas são maiores do que os observados em populações parentais (africano, europeu e indígena), reflexo do número de alelos encontrados em cada população. Isto revela grande mistura entre as populações parentais para a formação do *pool* gênico entre afro-descendentes brasileiros.

Os resultados de diferenciação genotípica revelaram um desvio significativo entre as amostras de Maragojipe e Iguape e também quando as três amostras foram comparadas juntas.

Os níveis de endogamia (*Fis*) foram elevados nas amostras de Maragojipe e Cachoeira, e em Iguape o valor observado foi abaixo de zero. Além disso, os níveis de endogamia para os haplótipos foram superiores aos dos sítios de restrição.

Os resultados clínicos revelaram que as crises álgicas são a principal característica da anemia falciforme com média de quatro ocorrências por ano nos pacientes. Os pacientes Hb.SS apresentaram maior predisposição às crises, porém os pacientes Hb.SC tinham crises mais intensas e severas.

Oitenta por cento dos pacientes apresentaram colelitíase e uma paciente Hb.SS veio a falecer no ano de 2006 devido a acidente vascular cerebral isquêmico intra-operatório. Quatro dos pacientes Hb.SS (23,5%) foram submetidos à hemotransfusão nos últimos dois anos devido aos baixos níveis de hemoglobina. O ponto de corte do lactato sanguíneo em repouso do grupo

Hb.SS foi maior do que o grupo Hb.SC. Isto justifica possivelmente maior intensidade do quadro clínico dos pacientes Hb.SS.

Os índices hematológicos obtidos do paciente para o composto genético anemia falciforme e talassemia α^+ , revelaram valores mais ou menos esperados para um portador da doença falciforme, entretanto alguns resultados puderam confirmar um melhor prognóstico para o portador do composto genético. Uma hipocromia, acompanhada de uma anisocitose, típicas de um caso de alfa talassemia foi observada. A morfologia das hemácias revelou um número razoável de hemácias em alvo, e uma quantidade de hemácias falcizadas relativamente pequena, talvez devido à associação da anemia falciforme com a alfa talassemia.

O leucograma revelou uma neutrofilia acompanhada de uma eosinofilia, podendo estar relacionada a danos teciduais. A única alteração significativa que os exames de imagem revelaram foi a hepatomegalia.

A distribuição haplotípica entre as amostras e o grupo de pacientes, revelou uma associação não aleatória entre os dois grupos. Os haplótipos β^S predominantes foram o BEN e o CAR com frequências de 52,9 e 32,5%, respectivamente nos pacientes Hb.SS e dois haplótipos atípicos (“- - - -” e “- + - -”) foram encontrados em quatro cromossomos. E nos cromossomos β^C foram observados os haplótipos tipos I e II com frequências de 55,5 e 44,5%, respectivamente.

A frequência maior do haplótipo BEN está de acordo com os registros históricos para a população do estado da Bahia, mas difere da população de Salvador que apresentou frequências semelhantes para os haplótipos CAR e BEN. Isto se deve provavelmente, por migrações internas de afro descendentes oriundos de outras regiões do País para a cidade de Salvador.

O haplótipo Camarões (CAM) também foi identificado nesta população. Ele é proveniente também da Costa Ocidental da África, principalmente na Nigéria e também já foi identificado na população de Belém, na região Norte do Brasil. Porém, existe a possibilidade de ter ocorrido recombinação com outros cromossomos β^A .

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. A., et al. Alpha Thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. **Am. J. Hematol.** Vol. 45, p. 279-282, 1994.
- ADEKILE A. D., et al. Influence of α -Thalassemia Trait on Spleen Function in Sickle Cell Anemia Patients With High HbF. **Am. J. Hematol** Vol. 53, p. 1-5, 1996.
- ADORNO E. V., et al The β -Globin Gene Cluster Haplotypes in Sickle Cell Anemia Patients from Northeast Brazil: A Clinical and Molecular View. **Hemoglobin.** Vol. 28, p. 267-271, 2005.
- AIDOO, M., et al. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. **The Lancet.** Vol. 359, p. 1311-1312, 2002.
- ALLEN, S. J., et al Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** Vol. 94, p. 14736-14741, 1997.
- ALVARES FILHO, F., et al. Distribución geográfica etaria y racial de la hemoglobina S en Brasil. **Sangre** Vol. 40, p. 97-102, 1995.
- ALVES, A. L. Estudo da mortalidade por anemia falciforme. **Inf Epidemiol SUS.** Vol. 4, p. 45-53, 1996.
- ANTONARAKIS, S. E., et al. Nonrandom association of polymorphic restriction sites in the β -globin gene cluster. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** Vol. 79, p. 137-141, 1982.
- ANTONARAKIS, S.E., et al. Origin of the beta S-globin gene in blacks: The contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** Vol. 81, p. 853-856, 1984.
- ANTONARAKIS, S.E; KAZAZIAN, H.H Jr; ORKIN, S.H. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. **Human Genetics.** Vol. 69, p. 1-14, 1985.
- ARENDS, A., ALVAREZ, M. Determination of beta-globin gene cluster haplotypes and prevalence of alpha-thalassemia in sickle cell anemia patients in Venezuela. **Am. J. Hematol.**, Vol. 64, p. 87-89, 2000.
- ASHLEY-KOCH, A. Sickle Hemoglobin (Hb S) Allele and Sickle Cell Disease: A HuGE Review. **Am J Epidemiol** Vol. 151, No. 9, p. 839-845, 2000.
- ATTILA, G., et al. Prenatal diagnosis of sickle cell anemia in twin pregnancies and identification by VNTRs. **Clinica Chimica Acta.** Vol. 350, p. 137-142, 2004.

- AZEVEDO E.S., et al. Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil. **Am J Phys Anthropol**; Vol.53, p. 509-12, 1980.
- BALLAS, S. K., et al. Clinical, hematological, and biochemical features of *Hb SC* disease. **Am J Hematol** Vol. 13, p. 37–51, 1982.
- BARBOSA, A.A.L., et al. Microsatellite studies on an isolated population of african descent in the brazilian state of Bahia. **Genet. Mol. Biol.** Vol. 29, p. 23-30, 2006.
- BOEHM, C.D., et al. Evidence supporting a single origin of the beta(C)-globin gene in blacks. **Am. J. Hum. Genet.**, Vol. 37, p. 771-777, 1985.
- BOXER, L. A., ALLEN, J. M., BAEHNER, R. L. Diminished polymorphonuclear leukocyte adherence. Function dependent on release of cyclic AMP by endothelial cells after stimulation of B-receptors by epinephrine. **J. Clin. Invest.**, Vol. 66, p. 268, 1980.
- BUNN H. F.; FORGET B. G. Hemoglobin. In: **Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia, P.A: Saunders, 1986.
- CARDOSO, G. L., GUERREIRO, J. F. African gene flow to North Brazil as revealed by HBB S gene haplotype analysis. **Am. J. Hum. Biol.** Vol. 18, p. 93-98, 2006.
- CASTRO O, et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood** Vol. 84, p. 643–9, 1994.
- CHAKRABORTY, R. Gene identity in racial hybrids and estimation of admixture rates. In: NEEL, J. V., AHUJA, Y (eds) Genetic Microdiferentiation in Man and other animals. Indian Anthropological Association, Delhi University, Delhi, p. 171-181, 1985.
- CHAKRAVATI A.B., et al. Nonuniform recombination within the human β -globin gene cluster. **Am. J. Hum. Gen.** Vol. 36, p. 1239-1258, 1984.
- CHANG, Y.P., et al. The relative importance of the X-linked FCP locus and beta-globin haplotypes in determining haemoglobin F levels: a study of *SS* patients homozygous for beta *S* haplotypes. **Br. J. Haematol.** Vol. 96, p. 806–14, 1996.
- CHEN, L. et al. Evolution of beta-globin haplotypes in human populations. **Mol Biol Evol** Vol. 7, p.423–437, 1990.
- CHONG, S., et al . Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α thalassemia. **Blood**. Vol. 95, p. 360-362, 2000.
- CRAWFORD, D. C., NICKERSON, D. A. Definition and clinical importance of haplotypes. **Annu. Rev. Med.** Vol. 56, p. 303-320, 2005.
- CUELLAR-AMBROSI., et al. Determination of beta-globin cluster haplotypes in Colombia. **Hemoglobin**. Vol. 24, p. 221-225, 2000.

CURRAT, M., et al. Molecular analysis of the β -globin gene cluster in the Niokholo Mandenka population reveals a recent origin of the β^S Senegal mutation. **Am. J. Hum. Genet.** Vol. 70, p. 207-223, 2002.

CURTIN, P.D. **The Atlantic Slave Trade: A Census.** University of Wisconsin Press. Milwaukee, 1969.

DESTRO-BISOL, G., et al. Microsatellite variation in Central África: an analysis of intrapopulation and interpopulation genetic diversity. **Am J Phys Anthropol.** Vol. 112, p. 319-337, 2000.

FAIRHURST, R.M., et al. Aberrant development of *Plasmodium falciparum* in hemoglobin CC red cells: Implications for the malaria protective effect of the homozygous state. **Blood.** Vol. 101, p. 3309-3315, 2003.

FEARNHEAD, P., et al. Application of coalescent methods to reveal fine-scale rate variation and recombination hotspots. **Genetics.** Vol. 167, p. 2067-2081, 2004.

FIGUEIREDO, M.S., et al. The heterogeneity of the β^S cluster haplotypes in Brazil. **Gene Geography.** Vol. 8, p. 7-12, 1994.

GALIZA NETO, G., et al. Analysis of β^S globin gene haplotypes in Ceará, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** Vol. 41, n. 5, p. 315-321, 2005.

GELEHRTER, T. D.; COLLINS, F. S. **Fundamentos de Genética Médica.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1992.

GILL, F.M., et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease: Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood.** Vol. 86, p. 776-83, 1995.

GONÇALVES, M., et al. β^S haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Braz J Med Biol Res.** Vol. 36, p.1283-1288, 2003.

GONÇALVES, M. S., et al. Sickle cell disease in a Brazilian population from São Paulo: a study of the β^S haplotypes. **Hum Hered** Vol. 44, p. 322-327, 1994.

GOUDET, J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate *F*-statistics. **J. Hered.** Vol. 86, p. 485-486, 1995.

GUERREIRO, J. F., et al. β -globin gene cluster haplotypes in Yanomama Indians from the Amazon region of Brazil. **Hum. Genet.** Vol. 89, p. 629-631, 1992.

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics.** Vol. 48, p. 361-372, 1992.

HEDRICK, P. Estimation of relative fitnesses from relative risk data and the predicted future of haemoglobin alleles S and C. **J. Evol. Biol.** Vol. 17, p. 221-224, 2004.

- HUDSON R. R. Gene genealogies and the coalescent process. In: Futuyma D, Antonovics J (eds) **Oxford surveys in evolutionary biology**. Oxford University Press, Oxford, Vol 7, p. 1–44, 1991.
- KAN, Y.W.; DOZY, A.M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: Relationship to sickle mutation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 75, P. 5631-5635, 1978.
- KATTAMIS, A C., et al.. Human α – thalassemia Syndromes: Detection of Molecular Defects. **Am. J. Hematol.** Vol. 53, p. 81-91, 1996.
- KÉCLARD, L., et al. Sickle cell disorder , β -globin gene cluster haplotypes and α -Thalassemia in neonates and adults from Guadeloupe. **Am. J. Hematol.** Vol. 55, p. 24-27, 1997.
- KLEIN, H. S. As origens africanas dos escravos brasileiros. In: PENA, S. D. **Homo brasilis: aspectos genéticos, lingüísticos, históricos e socioantropológicos do povo brasileiro**. 2^a ed. Ribeirão Preto, Funpec, 2002.
- KULOZIK, A. E. et al. Geographical survey of b-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle cell mutation. **Am J Hum Genet** Vol. 39, p. 239–244, 1986.
- LABIE, D., et al. Hemoglobins S and C in Upper Volta. **Hum. Genet.** Vol. 65, p. 300-302, 1984.
- LAPOUMEROUILLIE, C., et al. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: The Cameroon type. **Hum. Genet.**, Vol. 89, p. 333-337, 1992.
- LEWIS, P. O., ZAYKIN, D. Genetic data analysis: software for the analysis of discrete genetic data. Version 1.0 (d16c), 2001. Programa distribuido livremente pelos através do sítio: Disponível em: <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>>. Acesso em: 12 jun. 2007.
- LI, N.; STEPHENS, M. Modelling linkage disequilibrium, and identifying recombination hotspots using snp data. **Genetics**. Vol. 165, p. 2213-2233, 2003.
- LONG J., et al. Phylogeny of human beta-globin haplotypes and its implications for recent human evolution. **Am J Phys Anthropol** Vol. 81, p. 113–130, 1990.
- LOREY, F.W., et al. Distribution of hemoglobinopathy variants by ethnicity in a multiethnic state. **Genet. Epidemiol.** Vol. 13, p. 501–12, 1996.
- LOUREIRO, M. M.; ROZENFELD, S. Epidemiologia de internações por doença falciforme no Brasil. **Revista de Saúde Pública**. Vol. 39, n. 6, 2005.
- LYRA, I. M., et al. Clinical, hematological and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. **Cad. Saúde Pública**. Vol. 21, p. 1287-1290, 2005.
- MAGANA, M.T., et al. Analysis of betaS and betaA genes in a Mexican population with African roots. **Blood Cells Mol. Dis.**, Vol. 28, p. 121-126, 2002.

- MEARS, J. G., et al. Alpha-Thalassemia is related to prolonged survival in sickle cell anemia. **Blood**. Vol. 62, p. 286-290, 1983.
- MODIANO, D., et al. Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. **Nature**. Vol. 414: 305-308, 2001.
- MOUSINHO-RIBEIRO, R. C. et al. Genetic relationships among native americans based on beta-globin gene cluster haplotype frequencies. **Genet. Mol. Biol.** Vol. 26, no. 3, p. 229-234, 2003.
- MUNIZ, A., et al. Sickle cell anemia and beta-gene cluster haplotypes in Cuba. **Am. J. Hematol.**, Vol. 49, p. 163-164, 1995.
- NAGEL, R.L. Beta-Globin Gene haplotypes, mitochondrial DNA, the Y-chromosome: their impact on the genetic epidemiology of the major structural hemoglobinopathies. **Cellular and Molecular Biology**. Vol. 50, n. 1, p. 5-21, 2004.
- NAGEL, R.L.; RANNEY, H.M. Genetic epidemiology of structural mutations of the β -globin gene. **Seminars in Hematology**. Vol. 27, N. 4, p. 342-359, 1990.
- NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. Sarvier, São Paulo, 1997.
- NEI, M., **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York, NY, USA, 1987.
- NISHIDA, M. Manumission and ethnicity in urban slavery: Salvador, Brazil, 1808-1888. **Hispanic American Historical Review**. Vol. 73, p. 361-391, 1993.
- OHENE-FREMPONG, K., et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. **Blood** Vol. 91, p. 288-94, 1998.
- OLIVEIRA, S. F., et al. Heterogeneous Distribution of Hb.S and Hb.C Alleles in Afro-derived Brazilian Populations. **Int J Hum Genet**. Vol. 2, p. 153-159, 2002.
- OLSON, J.A.; NAGEL, R.L. Synchronized cultures of *P. falciparum* in abnormal red cells: The mechanism of the inhibition of growth in Hb.CC cells. **Blood**. **67**: 997-1001, 1986.
- ÖNER, P. D., et al. β^S haplotypes in various world populations. **Hum Genet** Vol. 89, p. 99-104, 1992.
- ORKIN, S.H. **Disorders of hemoglobin synthesis: the thalassemias**, p. 106-126, 1987.
- ORKIN, S.H. Selective restriction endonuclease cleavage of human globin genes. **J. Biol. Chem.** Vol. 253, p. 12-15, 1978.
- PAGNIER, J., et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** Vol. 81, p. 1771-1773, 1984.

- PANTE-DE-SOUSA, G., et al. Beta-globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon region: Evidence for a significant gene flow from Atlantic West Africa. **Ann. Hum. Biol.**, Vol. 1, p. 365-373, 1999.
- PASQUINI, R., PASSETO, R. **Hematologia fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2005.
- PLATT, O. S., et al. Pain in sickle cell disease: rates and risk factors. **N. Engl. J. Med.** V. 325, p. 11-16, 1991.
- PLATT, O. S., et al. Mortality in sickle cell disease: life expectancy and risk factors for early death. **N. Engl. J. Med.** Vol. 330, p. 1639-44, 1994.
- RAMALHO, A. S. **As Hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil**. Ribeirão Preto: Editora da Revista Brasileira de Genética, 1986.
- RAYMOND M.; F. ROUSSET. An exact test for population differentiation. **Evolution**. Vol. 49, p. 1280-1283, 1995.
- ROMANA, M., et al. Diverse genetic mechanisms operate to generate atypical betaS haplotypes in the population of Guadeloupe. **Hemoglobin**. Vol. 24, p 77-87, 2000.
- SANCHAISURIYA, K., et al. Molecular characterization of hemoglobin C in Thailand. **Am. J. Hematol.** Vol. 67, p. 189-193, 2001.
- SCHNEIDER, J. A., et al. Direct measurement of the male recombination fraction in the human β -globin hot spot. **Hum. Mol. Genet.** Vol. 11, p. 207-215, 2002.
- SHIMIZU, K., et al. Relationships between %Hb F or %G gamma and the haplotypes in the beta-globin gene cluster in the normal adult Japanese and Korean populations. **Hum Hered.** Vol. 42, p. 216-221, 1992.
- SHIMIZU, K. et al. β -globin gene haplotype characteristics of Colombian Amerinds in South America. **Hum Hered** Vol. 51, p. 54-63, 2001.
- SILVA, W. S., et al. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. Vol. 22, n. 12, p. 2561-2566, 2006.
- SMITH, R. A., et al. Recombination breakpoints in the human β -globin gene cluster. **Blood**. Vol. 92, p. 4415-4421, 1998.
- SODEMAN, W., SODEMAN, T. **Fisiologia patológica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 2000.
- STAMATOYANNOPOULOS G, NIENHUIS AW. Hemoglobin switching. In: STAMATOYANNOPOULOS G, NIENHUIS AW, MAJERUS PW, VARMUS H (eds) **The Molecular Basis of blood diseases**. 2^o ed. Saunders, Philadelphia, 1994, p. 107-155.

- STEINBERG, M.H., et al. Hematological effects of atypical and Cameroon beta-globin gene haplotypes in adult sickle cell anemia. **Am. J. Hematol.** Vol. 59, p. 121-126, 1998.
- STEINBERG, M.H., et al. A. Beta-globin gene haplotype in Hb.SC disease. **Am. J. Hematol.** Vol. 52, p. 189-191, 1996.
- STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference in molecular population genetics. **J. R. Stat. Soc. B** Vol. 62, p. 605-655, 2000.
- STEPHENS, M.; SCHEET, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. **Am. J. Hum. Genet.** Vol. 76, p. 449-462, 2005.
- STEPHENS, M., et al. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. **Am. J. Hum. Genet.** Vol. 73, p. 1162-1169, 2003.
- STEPHENS, M., et al. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **Am. J. Hum. Genet.** Vol. 68, p. 978-989, 2001.
- SUTTON, M., et al. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. **Am J Hematol** Vol. 32, p. 66-69, 1989.
- TALACKI, C. A., et al. β -Globin gene cluster haplotypes in Hb. C heterozygotes. **Hemoglobin.** Vol. 14, p. 229-240, 1990.
- THOMAS, P. W., et al. Benign clinical course in homozygous sickle cell disease: a search for predictors. **J. Clin. Epidemiol.** Vol. 50, p. 121-126, 1997.
- TRAVI, M., et al. Molecular characterization of hemoglobin C in Sicily. **Am. J. Hematol.**, Vol.39, p. 5-8, 1992.
- VERGER, P. **Flux et reflux de la traite des négres entre le Golfe de Benin et Baia de Todos os Santos.** Paris, France : Mouton Press, 1968.
- VILLALOBOS-ARÁMBULA, A. R., et al. β -Thalassemia and β^A globin gene haplotypes in Mexican mestizos. **Hum. Genet.** Vol. 99, p. 498-500, 1997.
- VÍVENES DE LUGO, M., et al. Beta-globin cluster haplotypes as evidence of African gene flow to the Northeastern coast of Venezuela. **Am. J. Hum. Biol.** Vol. 15, p. 29-37, 2003.
- VOGEL, F.; MOTULSKY, A. G. **Genética Humana.** 3^a ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.
- WAGNER, S. C., et al. Caracterização molecular da anemia falciforme em pacientes de Porto Alegre. **Rev. Bras. Genet.** (Supl) Vol. 19, p. 244, 1996.
- WAINSCOAT J., et al. Evolutionary relationships of human populations from an analysis of nuclear DNA polymorphisms. **Nature** Vol. 319, p. 491-493, 1986.

- WALL, J. D., et al. Comparative linkage-desequilibrium analysis of the β -globin hot spot in primates. **Am. J. Hum. Genet.** Vol. 73, p. 1330-1340, 2003.
- WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. **The Thalassemia Syndromes.** Blackwell Scientific, Oxford, 1981.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution.** Vol. 38, p. 1358-1370, 1984.
- WILLIAMS, T. N., et al. Negative epistasis between the malaria-protective effects of alpha+ thalassemia and the sickle cell trait. **Nat. Genet.** Vol. 37, p. 1253-1257, 2005b.
- WILLIAMS, T. N., et al. Both heterozygous and homozygous α^+ thalassemias protect against severe and fatal Plasmodium falciparum malaria on the coast of Kenya. **Blood.** Vol. 106, p. 368-371, 2005a.
- WOOD, E. T., et al. The β -globin recombinational hotspot reduces the effects of strong selection around Hb.C, a recently arisen mutation providing resistance to malaria. **Am. J. Hum. Genet.** Vol. 77, p. 637-642, 2005.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Ann.Eugen.** Vol. 15, p. 323-354, 1951.
- ZAGO, M. A., et al. Bantu β^S cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. **Am. J. Phys. Anthropol.** Vol. 88, p. 295-298, 1992.
- ZAGO, M.A., Atypical beta(s) haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. **Am. J. Hematol.** Vol. 63: 79-84, 2000.

APÊNDICES

I Lista de Haplótipos. MS (modo sem recomb.); MRO (variação na taxa de recomb. com taxa de 0,0004); MR1 (presença de hotspot em região desconhecida); MOD. (taxa de recombinação de 0,0008). As linhas de cor cinza representam os indivíduos que apresentaram diferenças entre os haplótipos inferidos pelos métodos sem e com recombinação.

INDIVÍDUO	INPUT	MS- DEFAULT	MRO- DEFAULT	MR1- DEFAULT	MR2 1- DEFAULT
ID1	-?---+A	----++C	----++C	----++C	----++C
	-?+---+C	-++---+A	-++---+A	-++---+A	-++---+A
ID2	----+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	+++---+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID3	----++A	----++A	----++A	----++A	----++A
	-++---+A	-++---+A	-++---+A	-++---+A	-++---+A
ID4	?----+A	+----+A	----++A	----++A	----++A
	?----+A	----++A	+----+A	+----+A	+----+A
ID5	----++A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	+++---+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID6	----?+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	+++?+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID7	----++A	----++A	----++A	----++A	----++A
	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID8	?----+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	?+---+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID9	----++A	-+++++A	-++---+A	-++---+A	-+++++A
	++++++A	+----+A	+---++A	+---++A	+---++A
ID10	----++A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	+++---+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID11	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	-+++++A	-+++++A	-+++++A	-+++++A	-+++++A
ID12	----++A	----++A	----++A	----++A	----++A
	-+++++A	-+---+A	-+++++A	-+++++A	-+++++A
ID13	----++A	----++A	--++++A	--++++A	--++++A
	+---++A	+---++A	+----+A	+----+A	+----+A
ID14	?----+A	----++A	----++A	----++A	----++A
	?+++++A	-+---+A	-+++++A	-+++++A	-+++++A
ID15	----+A	----+A	----++A	----++A	----++A
	+---+A	+---+A	+---+A	+---+A	+---+A
ID16	?---+A	----+A	----+A	----+A	----+A
	?+---+A	--+---+A	--+---+A	--+---+A	--+---+A
ID17	?+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	?+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
ID18	?----+A	----++A	----++A	----++A	----++A
	?+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A

ID19	-----A	-++-++A	-++-++A	-++-++A	-++-++A
	++++++A	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A
ID20	?-----A	-++-++A	-++-++A	-++-++A	-++-++A
	?++-++A	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A
ID21	?-----A	-----A	-----A	-----A	-----A
	?+-++A	++++++A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
ID22	-----A	-++-++A	-++-++A	-++-++A	-++-++A
	++++++A	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A
ID23	-----A	-----A	-+---+A	-----A	-+---+A
	++-++A	++++++A	+-----A	++++++A	+-----A
ID24	-----A	----+S	----+S	----+S	----+S
	+---+S	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A
ID25	-----A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	++-++A	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A
ID26	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
ID27	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
ID28	----+A	----+A	----+A	----+A	----+A
	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
ID29	--++A	-++-++A	-++-++A	-++-++A	-++-++A
	++++++A	+---+A	+---+A	+---+A	+---+A
ID30	-+---?A	-++-++A	-++-++A	-++-++A	-++-++A
	++++++?A	++++++A	++++++A	++++++A	++++++A
ID31	-----?A	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A
	--++?A	--++A	--++A	--++A	--++A
ID32	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A
	--++A	--++A	--++A	--++A	--++A
ID33	-----A	----+A	----+A	----+A	----+A
	++-++A	++-++A	++-++A	++-++A	++-++A
ID34	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	++++++A	++++++A	++++++A	++++++A	++++++A
ID35	----+A	----+A	----+A	----+A	----+A
	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
ID36	-----A	-----A	----+A	-----A	----+A
	+---+A	+---+A	+---+A	+---+A	+---+A
ID37	-++-++A	-++-++A	-++-++A	-++-++A	-++-++A
	-++-++A	-++-++A	-++-++A	-++-++A	-++-++A
ID38	-----A	----+A	----+A	----+A	----+A
	+-----+A	+-----+A	+-----+A	+-----+A	+-----+A
ID39	-----A	----+A	----+A	----+A	----+A
	+---+A	+---+A	+---+A	+---+A	+---+A
ID40	-----+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	++-++A	+-----+A	+-----+A	+-----+A	+-----+A
ID41	-----A	----+S	----+S	----+S	----+S

	+----+S	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID42	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
ID43	-----A	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A
	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A
ID44	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A
	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A
ID45	++----A	++----A	++----A	++----A	++----A
	++----+A	++----+A	++----+A	++----+A	++----+A
ID46	-----?A	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A
	-++-?+A	-++-++A	-++-++A	-++-++A	-++-++A
ID47	-----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A
	++----+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID48	-----+A	-----S	-----S	-----S	-----S
	-+----+S	-+----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A
ID49	-----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A
	++----+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID50	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A
	-+++++A	-+++++A	-+++++A	-+++++A	-+++++A
ID51	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A
	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A
ID52	-++-?-A	-++-++A	-++-++A	-++-++A	-++-++A
	-++-?+A	-++-+-A	-++-+-A	-++-+-A	-++-+-A
ID53	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A
	-++-++A	-++-++A	-++-++A	-++-++A	-++-++A
ID54	-----A	-----S	-----S	-----S	-----S
	+----+S	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID55	?---+A	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A
	?---+S	-----S	-----S	-----S	-----S
ID56	-----+A	-++-++A	-++-++A	-++-++A	-++-++A
	+++--+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID57	-----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A
	++--+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID58	-----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A
	++--+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID59	-----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A
	++--+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID60	-----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A
	++--+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID61	-----A	-----+A	-+----+A	-----+A	-+----+A
	++--+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID62	-----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A
	++--+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID63	-----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A
	++--+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A

ID64	-----A	-++++A	-++++A	-++++A	-++++A
	++-+++A	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A
ID65	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A
	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A
ID66	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A
	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A	+-----A
ID67	-+--?+A	-++++A	-++++A	-++++A	-++++A
	-+--?+A	-++++A	-++++A	-++++A	-++++A
ID68	----?+A	-----A	-----A	-----A	-----A
	----?+A	-----A	-----A	-----A	-----A
ID69	-----A	-----C	-----C	-----C	-----C
	-----C	-----A	-----A	-----A	-----A
ID70	-----A	-----A	-+---A	-----A	-+---A
	++-+++A	++-+++A	+-----A	++-+++A	+-----A
ID71	-----A	-----A	-----A	-----A	-----A
	+---+++A	+---+++A	+---+++A	+---+++A	+---+++A
ID72	-----A	-++++A	-++++A	-++++A	-++++A
	+++--A	+---A	+---A	+---A	+---A
ID73	-----A	-----A	-----A	-----A	-----A
	-+-----A	-+-----A	-+-----A	-+-----A	-+-----A
ID74	-+-----A	-+-----A	-+-----A	-+-----A	-+-----A
	-+---+S	-+---S	-+---S	-+---S	-+---S
ID75	-----A	-----A	-----A	-----A	-----A
	-----A	-----A	-----A	-----A	-----A
ID76	?--?+A	-----A	-----A	-----A	-----A
	?--?+A	-----A	-----A	-----A	-----A
ID77	-----A	-----A	-----A	-----A	-----A
	-----A	-----A	-----A	-----A	-----A
ID78	-----A	-----A	-----A	-----A	-----A
	+---+++A	+---+++A	+---+++A	+---+++A	+---+++A
ID79	-----A	-----A	-----A	-----A	-----A
	-----A	-----A	-----A	-----A	-----A
ID80	---?--A	-----A	-----A	-----A	-----A
	---?+A	-----A	-----A	-----A	-----A
ID81	?--?+A	-----A	-----A	-----A	-----A
	?+?+A	-+-----A	-+-----A	-+-----A	-+-----A
ID82	?--??+A	-----A	-----A	+-----A	+-----A
	?--??+A	+-----A	+-----A	-----A	-----A
ID83	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	-+++--+A	-+++--+A	-+++--+A	-+++--+A	-+++--+A
ID84	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	-+++--+A	-+++--+A	-+++--+A	-+++--+A	-+++--+A
ID85	-----A	-----A	-----A	-----A	-----A
	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
ID86	-----A	-----A	-----A	-----A	-----A

	-+---++A	-+----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A
ID87	----++A	----++A	----++A	----++A	----++A
	-+---++A	-+---++A	-+---++A	-+---++A	-+---++A
ID88	-----A	----+A	-+---+A	----+A	-+---+A
	++-++A	++-++A	+----+A	++-++A	+----+A
ID89	----++A	----++A	----++A	----++A	----++A
	----++A	----++A	----++A	----++A	----++A
ID90	?-++A	----++A	----++A	----++A	----++A
	?-++A	----++A	----++A	----++A	----++A
ID91	-----A	----+A	----+A	----+A	----+A
	----++A	----+A	----+A	----+A	----+A
ID92	----++A	----++A	----++A	----++A	----++A
	--++++A	--++A	--++++A	--++++A	--++++A
ID93	-+----+A	-++++A	-++++A	-++++A	-++++A
	+++++A	++-++A	++-++A	++-++A	++-++A
ID94	-+----A	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
	++-++A	++-++A	++-++A	++-++A	++-++A
ID95	-+----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A	-+----+A
	++-++A	++-++A	++-++A	++-++A	++-++A
ID96	?-A	----+A	----+A	----+A	----+A
	?+--++A	++-++A	-+----+A	-+----+A	-+----+A
ID97	----+S	----+S	----+S	----+S	----+S
	----+S	----+S	----+S	----+S	----+S
ID98	--??++A	----++A	----++A	----++A	----++A
	-+??++A	-++++A	-+---++A	-+---++A	-+---++A
ID99	--?--A	----+A	----+A	----+A	----+A
	+?-++A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID100	-+?--A	-+----+A	-+---++A	-+---++A	-+---++A
	-+?++A	-++++A	-+----+A	-+----+A	-+----+A
ID101	--?--A	-----A	-----A	-----A	-----A
	+?-++A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID102	-----A	-++++A	-++++A	-++++A	-++++A
	+++++A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID103	-----A	-+---++A	-+---++A	-+---++A	-+---++A
	++-++A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID104	---?+-A	----+A	----+A	----+A	----+A
	-++?++A	-++++A	-++++A	-++++A	-++++A
ID105	-+?++A	-+---++A	-+---++A	-+---++A	-+---++A
	-++?++A	-++++A	-++++A	-++++A	-++++A
ID106	----+A	----++A	----++A	----++A	----++A
	+---++A	+---+A	+---+A	+---+A	+---+A
ID107	----++A	----++A	----++A	----++A	----++A
	----++A	----++A	----++A	----++A	----++A
ID108	-+?++A	-+---++A	-+---++A	-+---++A	-+---++A
	-++?++A	-++++A	-++++A	-++++A	-++++A

ID109	-----A	-----A	-----A	-----A	-----A
	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID110	-----A	-----A	-----A	-----A	-----A
	-----S	-----S	-----S	-----S	-----S
ID111	-+----A	-+----S	-+----S	-+----S	-+----S
	-+++S	-+++A	-+++A	-+++A	-+++A
ID112	-----A	-+----S	-+----S	-+----S	-+----S
	+++--S	+---+A	+---+A	+---+A	+---+A
ID113	-----A	-----C	-----C	-----C	-+++C
	+++--C	+++--A	+++--A	+++--A	+---+A
ID114	-----A	-----S	-----S	-----S	-----S
	-+++S	-+++A	-+++A	-+++A	-+++A
ID115	-----A	-----S	-----S	-----S	-----S
	+----+S	+----+A	+----+A	+----+A	+----+A
ID116	?---+A	-----A	-----A	-----A	-----A
	?---+S	-----S	-----S	-----S	-----S
ID117	-+----A	-+----A	-+----A	-+----A	-+----A
	-+---S	-+---S	-+---S	-+---S	-+---S
ID118	-----A	-----A	-----A	-----A	-----A
	-----S	-----S	-----S	-----S	-----S
ID119	-+----A	-+----S	-+----S	-+----S	-+----S
	-+++S	-+++A	-+++A	-+++A	-+++A
ID120	-----A	-+----S	-+----S	-+----S	-+---S
	+++--S	+++--A	+++--A	+++--A	+---+A
ID121	-----A	-----A	-----A	-----A	-----A
	-----S	-----S	-----S	-----S	-----S
ID122	---?+A	-----S	-----S	-----S	-----S
	-++?+S	-+++A	-+++A	-+++A	-+++A
ID123	?---+A	-----A	-----A	-----A	-----A
	?---+S	-----S	-----S	-----S	-----S
ID124	-----A	-----S	-----S	-----S	-----S
	-+++S	-+++A	-+++A	-+++A	-+++A
ID125	-----A	-----S	-----S	-----S	-+++A
	+++--S	+++--A	+++--A	+++--A	+---S
ID126	-----A	-+----S	-+----S	-+----S	-+---S
	+---+S	+---+A	+---+A	+---+A	+---+A
ID127	-+--?A	-+----A	-+----A	-+----A	-+----A
	-+--?S	-+----S	-+----S	-+----S	-+----S
ID128	-----A	-----A	-----S	-----S	-----S
	-+++S	-+----S	-+----A	-+----A	-+----A
ID129	-----A	-----S	-----S	-----S	-----S
	-+++S	-+++A	-+++A	-+++A	-+++A
ID130	-----A	-----S	-----S	-----S	-+++A
	+++--S	+++--A	+++--A	+++--A	+---S

ID131	-----A	-----S	-----S	-----S	-+---+A
	++---+S	++---+A	++---+A	++---+A	+-----S
ID132	-----A	-----S	-----S	-----S	-----S
	-+---+S	-+---+A	-+---+A	-+---+A	-+---+A
ID133	-----A	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A
	-----+S	-----S	-----S	-----S	-----S
ID134	?-----A	-----S	+-----+A	+-----+A	+-----+A
	?-----+S	+-----+A	+-----S	+-----S	+-----S
ID135	?--?-A	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A
	?--?+S	-----S	-----S	-----S	-----S
ID136	-----A	-----+A	-----+A	-----+A	-----+A
	-----+S	-----S	-----S	-----S	-----S

II Frequências dos haplótipos da β -globina nas populações de Maragójepe, Cachoeira e Iguape e do grupo de portadores da Hb.S (AS) com seus respectivos desvios, calculadas pelo programa PHASE 2.1.1 através do modo sem recombinação. As linhas de cor cinza representam os haplótipos com frequência igual ou superior a 1% (0,01) em pelo menos um dos quatro grupos.

Haplótipos	Hb	Total	S.E	Maragójepe	S.E	Cachoeira	S.E	Iguape	S.E	Portadores	S.E
----++	A	0,122124	0,012527	0,061197	0,015363	0,160935	0,028208	0,165706	0,021572	0,131195	0,020162
----++	C	0,011029	0,000025	0,010416	0,000065	0,014705	0,000128	0,015624	0,000119	0,000000	0,000000
----+-	A	0,063648	0,010195	0,072110	0,015254	0,061159	0,014839	0,081797	0,023141	0,022741	0,000560
----+-	S	0,087393	0,003316	0,030727	0,002276	0,029314	0,001195	0,062497	0,000219	0,336539	0,019745
-----+	A	0,040811	0,009172	0,043868	0,017202	0,071589	0,011830	0,023447	0,016416	0,011787	0,014506
-----+	S	0,000210	0,000893	0,000000	0,000056	0,000000	0,000081	0,000000	0,000000	0,001240	0,005391
-----	A	0,020158	0,005165	0,017911	0,008268	0,031636	0,006220	0,023351	0,013910	0,002261	0,006804
-----	S	0,004043	0,002143	0,000453	0,002127	0,000095	0,001181	0,000001	0,000124	0,024164	0,012104
---+++	A	0,037991	0,008978	0,054378	0,016805	0,057656	0,018762	0,018600	0,006897	0,000000	0,000000
---+++	A	0,000080	0,000536	0,000165	0,001302	0,000074	0,001040	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
---+++	A	0,020971	0,005843	0,043758	0,013145	0,003016	0,006323	0,020114	0,007940	0,000000	0,000087
---+-	A	0,000101	0,000694	0,000180	0,001373	0,000162	0,001535	0,000002	0,000162	0,000000	0,000031
---+-	A	0,000057	0,000456	0,000159	0,001294	0,000002	0,000173	0,000000	0,000013	0,000000	0,000014
---+-	A	0,000489	0,002204	0,000656	0,002949	0,000610	0,002931	0,000447	0,002606	0,000000	0,000027
-+---+	A	0,074351	0,010712	0,070823	0,014646	0,077593	0,019890	0,100428	0,025499	0,039079	0,010439
-+---+	S	0,000057	0,000456	0,000000	0,000000	0,000000	0,000006	0,000000	0,000002	0,000303	0,002619
-+---+	A	0,034706	0,007678	0,043893	0,009843	0,033448	0,014590	0,030072	0,017402	0,023447	0,003996
-+---+	A	0,035519	0,008074	0,024045	0,013169	0,039575	0,014990	0,062189	0,011770	0,015260	0,016046
-+-----	A	0,000072	0,000510	0,000000	0,000067	0,000291	0,002061	0,000001	0,000118	0,000000	0,000026
-+-----	S	0,033004	0,003282	0,000000	0,000000	0,014705	0,000140	0,031246	0,000250	0,136130	0,020442
-++-++	A	0,037568	0,008876	0,071421	0,018463	0,038438	0,013757	0,011869	0,011627	0,000000	0,000106
-++-++	A	0,080158	0,010404	0,099889	0,019881	0,037174	0,009610	0,122087	0,019408	0,042785	0,007318

III Frequências dos haplótipos da β -globina nas populações de Maragóipe, Cachoeira e Iguape e do grupo de portadores da Hb.S com seus respectivos desvios, calculadas pelo programa PHASE 2.1.1 através do modo variação na taxa de recombinação. As linhas de cor cinza representam os haplótipos com frequência igual ou superior a 1% (0,01) em pelo menos um dos quatro grupos.

Haplótipos	Hb	Total	S.E	Maragóipe	S.E	Cachoeira	S.E	Iguape	S.E	Portadores	S.E
----++	A	0,143731	0,018338	0,085616	0,023025	0,183912	0,035468	0,186840	0,027394	0,145034	0,027489
----++	S	0,000270	0,001158	0,000021	0,000467	0,000117	0,001306	0,000062	0,000983	0,001335	0,006105
----++	C	0,007390	0,003429	0,006984	0,004896	0,012339	0,005404	0,007820	0,007812	0,000000	0,000000
----+-	A	0,065312	0,012190	0,067837	0,018153	0,069532	0,020468	0,076018	0,023183	0,037643	0,015863
----+-	S	0,066410	0,009723	0,020461	0,009398	0,023349	0,007934	0,053396	0,007705	0,251900	0,043443
-----+	A	0,053044	0,014520	0,055933	0,022382	0,087220	0,020432	0,032152	0,018917	0,024439	0,022964
-----+	S	0,000040	0,000403	0,000041	0,000653	0,000000	0,000067	0,000015	0,000491	0,000139	0,001918
-----+	C	0,000040	0,000384	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000173	0,001634	0,000000	0,000000
-----	A	0,014023	0,006013	0,008808	0,009523	0,026014	0,009272	0,018505	0,014061	0,000319	0,002797
-----	S	0,004569	0,004329	0,001058	0,003298	0,000779	0,003293	0,000833	0,003676	0,023494	0,022100
----+++	A	0,018186	0,010629	0,025758	0,019722	0,029850	0,017908	0,006883	0,008876	0,000192	0,002079
----+++	C	0,000593	0,001352	0,000000	0,000000	0,002367	0,005404	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
----+-	A	0,000835	0,001925	0,000562	0,002354	0,002460	0,006120	0,000097	0,001228	0,000000	0,000000
----+-	S	0,000155	0,000769	0,000386	0,001967	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000120	0,001649
----+-	A	0,000056	0,000475	0,000115	0,001144	0,000065	0,000979	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
---+--	A	0,015499	0,007374	0,032036	0,015252	0,003825	0,007253	0,010961	0,011935	0,004114	0,009426
---+--	C	0,000111	0,000629	0,000317	0,001790	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
---+--	A	0,004908	0,005428	0,010891	0,012531	0,001701	0,004703	0,001494	0,004626	0,001764	0,006083
---+--	S	0,001311	0,002529	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,001915	0,005124	0,005304	0,011650
---+--	A	0,003088	0,003996	0,006752	0,009146	0,000798	0,003332	0,001103	0,004107	0,001543	0,005942
--+---	A	0,001549	0,002909	0,003261	0,006612	0,001161	0,003966	0,000481	0,002762	0,000001	0,000156
--+---	S	0,000568	0,001612	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,001255	0,004468	0,001691	0,006262

- - + + + +	A	0,008270	0,006158	0,014670	0,012642	0,002250	0,005294	0,010438	0,008298	0,000449	0,003163
- - + + + -	A	0,000088	0,000565	0,000000	0,000000	0,000325	0,002162	0,000034	0,000725	0,000000	0,000000
- + - - + +	A	0,075021	0,014704	0,071319	0,016946	0,065274	0,025384	0,111287	0,029275	0,045191	0,025342
- + - - + +	S	0,000080	0,000598	0,000000	0,000028	0,000044	0,000799	0,000000	0,000066	0,000423	0,003293
- + - - + +	C	0,001387	0,002277	0,001646	0,003800	0,000000	0,000000	0,003428	0,006467	0,000000	0,000000
Haplótipos	Hb	Total	S.E	Maragojipe	S.E	Cachoeira	S.E	Iguape	S.E	Portadores	S.E
- + - - + -	A	0,030039	0,008886	0,041294	0,010650	0,026116	0,018171	0,025638	0,016722	0,017890	0,013653
- + - - + -	S	0,010816	0,007081	0,001385	0,003536	0,005947	0,007217	0,001807	0,004996	0,051983	0,035419
- + - - - +	A	0,041967	0,012764	0,026662	0,015098	0,035672	0,020037	0,069423	0,020479	0,045158	0,029383
- + - - - +	S	0,000081	0,000601	0,000000	0,000000	0,000045	0,000809	0,000063	0,000994	0,000344	0,002801
- + - - - +	C	0,000110	0,000626	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000464	0,002652	0,000000	0,000000
- + - - - -	A	0,003521	0,003670	0,001660	0,004049	0,008484	0,009865	0,003187	0,007124	0,000387	0,002968
- + - - - -	S	0,015663	0,008741	0,000000	0,000000	0,008671	0,007234	0,012646	0,011452	0,065127	0,039543
- + - + + +	A	0,036341	0,009251	0,068553	0,017949	0,038343	0,014042	0,010713	0,012143	0,000250	0,002371
- + - + + -	A	0,000550	0,001412	0,001113	0,003218	0,000581	0,002865	0,000049	0,000872	0,000000	0,000000
- + - + + -	S	0,000377	0,001128	0,001016	0,003091	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000115	0,001615
- + - + - +	A	0,000210	0,000986	0,000239	0,001642	0,000502	0,002727	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
- + + - + +	A	0,069279	0,012385	0,087637	0,020453	0,036340	0,010800	0,106308	0,023799	0,026133	0,016706
- + + - + +	C	0,000518	0,001280	0,001469	0,003626	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
- + + - + -	A	0,012806	0,004365	0,015490	0,007672	0,016240	0,007439	0,004272	0,006990	0,014016	0,011187
- + + - + -	S	0,003013	0,003478	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,003070	0,006208	0,014163	0,017708
- + + - - +	A	0,006738	0,006950	0,005403	0,008185	0,003942	0,007298	0,011693	0,015025	0,006793	0,011847
- + + - - -	A	0,001435	0,002458	0,001031	0,003313	0,004260	0,007649	0,000031	0,000694	0,000024	0,000734
- + + - - -	S	0,003068	0,004029	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,006685	0,010002	0,009238	0,014426
- + + + + +	A	0,010264	0,005394	0,022342	0,010718	0,004913	0,006936	0,003840	0,008112	0,001634	0,005871
- + + + + -	A	0,000246	0,000947	0,000000	0,000000	0,000896	0,003517	0,000097	0,001225	0,000000	0,000000

+ - - - + +	A	0,023142	0,010258	0,014092	0,012492	0,047912	0,020811	0,017756	0,015482	0,012986	0,017428
+ - - - + +	C	0,000319	0,001035	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,001352	0,004393	0,000000	0,000000
+ - - - + -	A	0,014250	0,008027	0,011346	0,010955	0,028012	0,018786	0,013319	0,012091	0,000732	0,004016
+ - - - + -	S	0,002885	0,003764	0,001679	0,004238	0,001890	0,005155	0,000470	0,002670	0,010739	0,016594
+ - - - - +	A	0,094637	0,023358	0,115668	0,035079	0,118264	0,029514	0,058290	0,026195	0,064962	0,033021
+ - - - - +	S	0,000161	0,000926	0,000052	0,000735	0,000030	0,000662	0,000076	0,001093	0,000717	0,004542
+ - - - - +	C	0,000243	0,000913	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,001032	0,003881	0,000000	0,000000
+ - - - - -	A	0,011929	0,007272	0,016359	0,011331	0,009439	0,011256	0,015593	0,015035	0,000736	0,004026
+ - - - - -	S	0,010674	0,007404	0,005120	0,006647	0,003218	0,006080	0,004770	0,008247	0,042947	0,032123
+ - - + + +	A	0,005085	0,004924	0,007570	0,009668	0,009680	0,010729	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
+ - - + + -	A	0,000353	0,001083	0,000000	0,000000	0,001408	0,004327	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
+ - - + - +	A	0,000088	0,000725	0,000166	0,001591	0,000118	0,001445	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
+ - - - + +	A	0,002567	0,003514	0,004974	0,007678	0,001703	0,004706	0,001085	0,004112	0,000818	0,004232
+ - - - + -	A	0,001306	0,002567	0,003638	0,007167	0,000000	0,000000	0,000097	0,001227	0,000000	0,000000
Haplótipos	Hb	Total	S.E	Maragojipe	S.E	Cachoeira	S.E	Iguape	S.E	Portadores	S.E
+ - - + - -	S	0,000298	0,001092	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000533	0,002837	0,001058	0,004788
+ - - - - +	A	0,012705	0,009513	0,018082	0,015574	0,001746	0,004757	0,014195	0,014669	0,015776	0,016916
+ - - - - -	A	0,008203	0,006290	0,018139	0,013615	0,004915	0,006937	0,002361	0,006249	0,000157	0,001887
+ - - - - -	S	0,002505	0,003609	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,005362	0,009036	0,007685	0,013568
+ - - + + +	A	0,001186	0,002418	0,003357	0,006857	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
+ - - + - +	A	0,000085	0,000651	0,000239	0,001840	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
+ + - - + +	A	0,007291	0,006454	0,008763	0,009780	0,011933	0,013566	0,004019	0,008110	0,001679	0,006246
+ + - - + +	C	0,000123	0,000662	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000525	0,002816	0,000000	0,000000
+ + - - + -	A	0,006432	0,005798	0,004999	0,007197	0,014962	0,014636	0,003866	0,007536	0,000161	0,001905
+ + - - + -	S	0,000320	0,001159	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,001977	0,007133
+ + - - - +	A	0,041010	0,014532	0,043791	0,019255	0,030784	0,021475	0,057515	0,020868	0,026758	0,022990

++---+	C	0,000195	0,000824	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000830	0,003505	0,000000	0,000000
++----	A	0,007816	0,004364	0,013742	0,005744	0,003950	0,007495	0,007139	0,009840	0,001870	0,006322
++-----	S	0,001411	0,002462	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000288	0,002101	0,008323	0,014853
++-+++	A	0,003228	0,003900	0,007590	0,009412	0,002220	0,005677	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
++-+-+	A	0,000099	0,000755	0,000146	0,001323	0,000191	0,001788	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
+++--+	A	0,003154	0,004084	0,005619	0,008095	0,002496	0,005521	0,002339	0,006226	0,000000	0,000000
+++--	A	0,000316	0,001076	0,000898	0,003054	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
+++--+	A	0,001004	0,002448	0,001402	0,004197	0,000370	0,002304	0,001510	0,005228	0,000394	0,002965
+++---	A	0,000217	0,000949	0,000363	0,002018	0,000354	0,002254	0,000000	0,000040	0,000000	0,000068
+++---	S	0,000151	0,000813	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000315	0,002197	0,000482	0,003274
+++++	A	0,000812	0,001910	0,002301	0,005420	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000

IV Frequências dos haplótipos da β -globina nas populações de Maragogipe, Cachoeira e Iguape e dos portadores da Hb.S com seus respectivos desvios, calculadas pelo programa PHASE 2.1.1 através do modo hotspot de recombinação em região desconhecida. As linhas de cor cinza representam os haplótipos com frequência igual ou superior a 1% (0,01) em pelo menos um dos quatro grupos.

Haplótipos	Hb	Total	S.E	Maragogipe	S.E	Cachoeira	S.E	Iguape	S.E	Portadores	S.E
-----++	A	0,154818	0,022012	0,094425	0,026036	0,200395	0,036338	0,194895	0,029903	0,156875	0,032293
-----++	S	0,000197	0,000938	0,000072	0,000865	0,000103	0,001224	0,000032	0,000702	0,000849	0,004748
-----++	C	0,006425	0,003572	0,006058	0,005139	0,010866	0,006459	0,006667	0,007728	0,000000	0,000000
-----+-	A	0,064080	0,011062	0,067419	0,016539	0,066852	0,020597	0,072244	0,021824	0,040629	0,016877
-----+-	S	0,063472	0,009507	0,018545	0,009665	0,022352	0,008262	0,052305	0,007440	0,241053	0,043476
-----+	A	0,050863	0,014092	0,053386	0,022426	0,083575	0,019629	0,031247	0,018757	0,023601	0,022931
-----+	S	0,000044	0,000406	0,000010	0,000328	0,000000	0,000068	0,000000	0,000071	0,000249	0,002375
-----+	C	0,000044	0,000401	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000189	0,001706	0,000000	0,000000
-----	A	0,013172	0,005570	0,007543	0,008838	0,024952	0,009013	0,017954	0,013852	0,000296	0,002672
-----	S	0,004400	0,004075	0,001077	0,003428	0,000906	0,003537	0,000615	0,003042	0,022605	0,020703
---++++	A	0,019092	0,011714	0,028918	0,022369	0,028614	0,018335	0,007376	0,009049	0,000066	0,001218
---++++	C	0,000960	0,001615	0,000000	0,000000	0,003840	0,006459	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
---++-	A	0,001276	0,002258	0,000811	0,002791	0,003856	0,007340	0,000100	0,001245	0,000000	0,000000
---++-	S	0,000248	0,000927	0,000679	0,002572	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000062	0,001186
---++-	A	0,000066	0,000557	0,000145	0,001295	0,000061	0,000950	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
---+-++	A	0,015209	0,007464	0,031400	0,015226	0,003089	0,006514	0,011442	0,011859	0,004175	0,009121
---+-++	C	0,000104	0,000609	0,000300	0,001742	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
---+--	A	0,004865	0,005174	0,010956	0,012103	0,001447	0,004381	0,001489	0,004791	0,001758	0,006094
---+--	S	0,001297	0,002380	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,001787	0,004972	0,005420	0,011541
---+--	A	0,003467	0,004237	0,007186	0,009206	0,001014	0,003726	0,001742	0,005366	0,001643	0,005935
---+---	A	0,001610	0,002924	0,003382	0,006763	0,001283	0,004151	0,000432	0,002569	0,000001	0,000147

--+---	S	0,000721	0,001993	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,001743	0,005338	0,001926	0,007174
+++++	A	0,007707	0,006361	0,013823	0,012995	0,001752	0,004765	0,009916	0,008407	0,000366	0,002862
++++-	A	0,000195	0,000843	0,000000	0,000000	0,000589	0,002884	0,000201	0,001763	0,000000	0,000000
-+---+	A	0,076145	0,015661	0,073279	0,017874	0,064251	0,025871	0,114214	0,029742	0,045161	0,025851
-+---+	S	0,000085	0,000587	0,000000	0,000000	0,000044	0,000800	0,000015	0,000491	0,000427	0,003229
-+---+	C	0,001247	0,002053	0,001450	0,003606	0,000000	0,000000	0,003138	0,006260	0,000000	0,000000
Haplótipos	Hb	Total	S.E	Maragojipe	S.E	Cachoeira	S.E	Iguape	S.E	Portadores	S.E
-+---+	A	0,028732	0,007853	0,040121	0,009840	0,024599	0,017142	0,024445	0,015621	0,016430	0,014093
-+---+	S	0,011656	0,006884	0,001264	0,003401	0,006813	0,007333	0,001773	0,004955	0,056041	0,034921
-+----+	A	0,041705	0,012038	0,025234	0,014276	0,033240	0,018733	0,071265	0,020964	0,047741	0,029563
-+----+	S	0,000107	0,000714	0,000000	0,000000	0,000045	0,000811	0,000108	0,001300	0,000432	0,003483
-+----+	C	0,000096	0,000585	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000406	0,002484	0,000000	0,000000
-+-----	A	0,004138	0,003671	0,002291	0,004557	0,009795	0,010231	0,003561	0,007116	0,000235	0,002304
-+-----	S	0,014000	0,007945	0,000000	0,000000	0,007804	0,007339	0,010992	0,010784	0,058623	0,036880
-++-+++	A	0,034467	0,009201	0,065695	0,018196	0,037059	0,013914	0,008541	0,011105	0,000142	0,001792
-++-+-	A	0,000940	0,001733	0,002192	0,004246	0,000545	0,002777	0,000125	0,001393	0,000000	0,000000
-++-+-	S	0,000771	0,001543	0,002088	0,004170	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000204	0,002145
-++-+-	A	0,000235	0,001044	0,000312	0,001971	0,000497	0,002774	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
-++-++	A	0,068335	0,011522	0,085391	0,020085	0,036727	0,010556	0,106236	0,022537	0,024634	0,016652
-++-++	C	0,000922	0,001594	0,002609	0,004513	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
-++-+-	A	0,012739	0,004361	0,015479	0,007468	0,016439	0,007239	0,004882	0,007313	0,012452	0,011447
-++-+-	S	0,003982	0,003837	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,004241	0,006948	0,018449	0,019379
-++-+-	A	0,005911	0,006446	0,004933	0,007805	0,003300	0,006753	0,009797	0,013654	0,006472	0,012144
-++-+-	A	0,001421	0,002368	0,000989	0,003210	0,004238	0,007701	0,000031	0,000698	0,000045	0,001015
-++-+-	S	0,002828	0,003767	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,006050	0,009341	0,008671	0,014090
-+++++	A	0,009644	0,005203	0,021650	0,010669	0,004327	0,006701	0,003269	0,007462	0,001077	0,004830

- + + + + -	A	0,000430	0,001204	0,000000	0,000000	0,001626	0,004612	0,000102	0,001258	0,000000	0,000000
+ - - - + +	A	0,021239	0,009663	0,012582	0,012238	0,045778	0,020341	0,015897	0,014561	0,010553	0,016481
+ - - - + +	C	0,000283	0,000979	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,001198	0,004158	0,000000	0,000000
+ - - - + -	A	0,013285	0,007998	0,009780	0,010596	0,026256	0,018292	0,013464	0,012153	0,000663	0,003827
+ - - - + -	S	0,002752	0,003871	0,001357	0,003722	0,001872	0,005156	0,000668	0,003160	0,010384	0,017063
+ - - - - +	A	0,090953	0,022151	0,111968	0,033346	0,114281	0,028701	0,054444	0,024853	0,061959	0,032797
+ - - - - +	S	0,000199	0,000981	0,000073	0,000869	0,000059	0,000926	0,000047	0,000859	0,000890	0,004727
+ - - - - +	C	0,000410	0,001157	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,001743	0,004919	0,000000	0,000000
+ - - - - -	A	0,014050	0,008096	0,018396	0,012414	0,011200	0,012081	0,019422	0,016192	0,001089	0,004861
+ - - - - -	S	0,011790	0,007905	0,006032	0,007040	0,004119	0,006604	0,004613	0,008394	0,046664	0,034283
+ - - + + +	A	0,004094	0,004711	0,006394	0,009359	0,007385	0,009991	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
+ - - + + -	A	0,000460	0,001216	0,000000	0,000000	0,001843	0,004869	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
+ - - + - +	A	0,000140	0,000926	0,000292	0,002254	0,000147	0,001469	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
+ - - - + +	A	0,002103	0,003206	0,004182	0,007181	0,001367	0,004270	0,000755	0,003563	0,000680	0,003873
+ - - - + -	A	0,001053	0,002264	0,002935	0,006343	0,000000	0,000000	0,000080	0,001117	0,000000	0,000104
Haplótipos	Hb	Total	S.E	Maragojipe	S.E	Cachoeira	S.E	Iguape	S.E	Portadores	S.E
+ - - - + -	S	0,000224	0,000952	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000347	0,002303	0,000876	0,004374
+ - - - - +	A	0,012553	0,010054	0,019709	0,017577	0,002241	0,005285	0,012565	0,014288	0,012932	0,015749
+ - - - - -	A	0,008212	0,005835	0,018801	0,013065	0,004314	0,006696	0,002099	0,005857	0,000070	0,001264
+ - - - - -	S	0,003349	0,003993	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,007065	0,010123	0,010392	0,015105
+ - + + + +	A	0,001058	0,002333	0,002997	0,006608	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
+ - + + - +	A	0,000048	0,000446	0,000136	0,001268	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
+ + - - + +	A	0,007098	0,006193	0,009037	0,009999	0,011377	0,013331	0,003544	0,007984	0,001474	0,005844
+ + - - + +	C	0,000126	0,000668	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000532	0,002835	0,000000	0,000000
+ + - - + -	A	0,006198	0,005212	0,004479	0,006515	0,015163	0,013943	0,003422	0,007065	0,000181	0,002021
+ + - - - -	S	0,000287	0,001090	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,001782	0,006712

++---+	A	0,041647	0,014691	0,044823	0,018926	0,033424	0,022809	0,057220	0,020691	0,024816	0,022569
++---+	C	0,000413	0,001161	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,001752	0,004930	0,000000	0,000000
++----	A	0,008605	0,004538	0,014437	0,006098	0,005527	0,008709	0,008149	0,010312	0,001322	0,005322
++----	S	0,002192	0,002983	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000681	0,003191	0,012592	0,017373
++-+++	A	0,002823	0,003585	0,006658	0,008591	0,001916	0,005500	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
++-+-+	A	0,000147	0,000953	0,000209	0,001651	0,000292	0,002397	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
+++--+	A	0,004151	0,004350	0,007400	0,009104	0,003823	0,006450	0,002488	0,006139	0,000000	0,000000
+++--	A	0,000331	0,001126	0,000941	0,003196	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
+++--+	A	0,001137	0,002607	0,001686	0,004697	0,000405	0,002405	0,001569	0,005162	0,000459	0,003198
+++---	A	0,000173	0,000828	0,000313	0,001911	0,000254	0,001915	0,000000	0,000039	0,000000	0,000069
+++---	S	0,000232	0,001010	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000544	0,002864	0,000639	0,003756
+++++	A	0,001111	0,002212	0,003146	0,006274	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000

V Frequências dos haplótipos da β -globina nas populações de Maragogipe, Cachoeira e Iguape e dos portadores da Hb.S com seus respectivos desvios, calculados pelo programa PHASE 2.1.1 através do modo hotspot em posição conhecida (entre o 5° e 6° marcadores). As linhas de cor cinza representam os haplótipos com frequência igual ou superior a 1% (0,01) em pelo menos um dos quatro grupos.

Haplótipos	Hb	Total	S.E	Maragogipe	S.E	Cachoeira	S.E	Iguape	S.E	Portadores	S.E
-----++	A	0.172091	0.016358	0.109321	0.024605	0.222630	0.030990	0.209942	0.027410	0.174620	0.031034
-----++	S	0.000187	0.000865	0.000083	0.001023	0.000059	0.000928	0.000001	0.000096	0.000875	0.004604
-----++	C	0.004070	0.003010	0.004145	0.005099	0.007244	0.007352	0.003375	0.006430	0.000000	0.000000
-----+-	A	0.061372	0.010192	0.064624	0.016201	0.062803	0.019879	0.065985	0.021562	0.045321	0.017238
-----+-	S	0.057599	0.007011	0.014004	0.008773	0.020714	0.007734	0.051387	0.007081	0.218378	0.035028
-----+	A	0.042447	0.010182	0.041349	0.018295	0.076121	0.013947	0.024788	0.015964	0.018963	0.019443
-----+	C	0.000088	0.000562	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000374	0.002387	0.000000	0.000000
-----	A	0.012156	0.004651	0.005219	0.007186	0.023502	0.008731	0.018765	0.012789	0.000139	0.002023
-----	S	0.003650	0.003639	0.000802	0.002929	0.000733	0.003201	0.000791	0.003495	0.018671	0.019487
----++++	A	0.014428	0.010816	0.023389	0.021626	0.019074	0.015151	0.005964	0.007841	0.000134	0.001740
----++++	C	0.001867	0.001838	0.000000	0.000000	0.007462	0.007352	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
----++-	A	0.001742	0.002343	0.001075	0.003168	0.005398	0.008078	0.000072	0.001059	0.000000	0.000000
----++-	S	0.000428	0.001185	0.001157	0.003273	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000133	0.001733
----+-	A	0.000037	0.000387	0.000083	0.000930	0.000031	0.000678	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
---+--	A	0.016470	0.007923	0.033664	0.016021	0.004281	0.007832	0.011099	0.011501	0.005664	0.010825
---+--	C	0.000259	0.000940	0.000740	0.002676	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
---+-	A	0.005925	0.004735	0.014598	0.012154	0.001010	0.003719	0.001245	0.004284	0.001413	0.005489
---+-	S	0.001915	0.002581	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.003001	0.006155	0.007464	0.012236
---+--	A	0.002792	0.003382	0.005920	0.007597	0.000732	0.003199	0.001132	0.004324	0.001588	0.005887
---+--	A	0.000917	0.001977	0.002041	0.004879	0.000665	0.003055	0.000143	0.001490	0.000000	0.000088

--+---	S	0.000406	0.001290	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000932	0.003859	0.001176	0.005044
---+++	A	0.008160	0.006556	0.015329	0.013812	0.001081	0.003837	0.010297	0.008074	0.000370	0.002875
---++-	A	0.000380	0.001171	0.000000	0.000000	0.001270	0.004130	0.000268	0.002030	0.000000	0.000000
---++-	S	0.000052	0.000433	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000323	0.002689
-+---++	A	0.083123	0.015225	0.077157	0.018110	0.070978	0.026179	0.125891	0.029236	0.052229	0.027448
-+---++	S	0.000070	0.000508	0.000000	0.000033	0.000015	0.000473	0.000000	0.000066	0.000405	0.003037
-+---++	C	0.001203	0.001911	0.001075	0.003169	0.000000	0.000000	0.003507	0.006519	0.000000	0.000000
Haplótipos	Hb	Total	S.E	Maragojipe	S.E	Cachoeira	S.E	Iguape	S.E	Portadores	S.E
-+---+-	A	0.027549	0.007086	0.039558	0.008718	0.023828	0.016374	0.022741	0.014974	0.014060	0.013678
-+---+-	S	0.013389	0.005418	0.001042	0.003125	0.007595	0.007349	0.002001	0.005221	0.065750	0.029785
-+----+	A	0.038966	0.010928	0.023875	0.012834	0.027885	0.017118	0.068253	0.020317	0.046537	0.027689
-+----+	S	0.000106	0.000644	0.000000	0.000000	0.000072	0.001029	0.000077	0.001094	0.000424	0.003293
-+----+	C	0.000139	0.000702	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000595	0.002990	0.000000	0.000000
-+-----	A	0.005093	0.003839	0.003004	0.005194	0.011519	0.010375	0.004663	0.008167	0.000324	0.002697
-+-----	S	0.011713	0.005518	0.000000	0.000000	0.007023	0.007346	0.009539	0.010542	0.047778	0.027074
-++-+++	A	0.034383	0.008387	0.066400	0.017205	0.038251	0.012730	0.005819	0.009505	0.000234	0.002296
-++-+-	A	0.001815	0.002119	0.004131	0.005099	0.001273	0.004136	0.000168	0.001610	0.000000	0.000000
-++-+-	S	0.001377	0.001814	0.003769	0.005005	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000302	0.002602
-++-+-	A	0.000118	0.000734	0.000198	0.001498	0.000193	0.001760	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
-++-++	A	0.063859	0.010715	0.078508	0.017893	0.037139	0.010814	0.101861	0.022010	0.017785	0.015559
-++-++	C	0.001575	0.001819	0.004457	0.005154	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
-++-+-	A	0.013324	0.004064	0.017165	0.007313	0.015742	0.006358	0.006887	0.007809	0.010455	0.011334
-++-+-	S	0.005677	0.003597	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.005772	0.007541	0.026698	0.019276
-++-+-	A	0.007246	0.006756	0.005632	0.007604	0.004060	0.007175	0.012489	0.014934	0.008116	0.012648
-++-+-	A	0.001488	0.002296	0.001127	0.003371	0.004354	0.007307	0.000031	0.000696	0.000002	0.000193
-++-+-	S	0.002455	0.003028	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.004898	0.008324	0.008053	0.012470

- + + + + +	A	0.009994	0.005094	0.024983	0.011732	0.003114	0.006008	0.001537	0.004978	0.000374	0.002893
- + + + + -	A	0.000817	0.001557	0.000000	0.000000	0.003056	0.005967	0.000242	0.001928	0.000000	0.000000
- + + + + -	S	0.000078	0.000529	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000504	0.003345
+ - - - + +	A	0.019038	0.007842	0.011134	0.010843	0.044107	0.019048	0.013542	0.012003	0.006210	0.012184
+ - - - + +	C	0.000131	0.000683	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000560	0.002905	0.000000	0.000000
+ - - - + -	A	0.009889	0.005695	0.005485	0.007412	0.022141	0.015411	0.010143	0.009754	0.000208	0.002163
+ - - - + -	S	0.001704	0.002545	0.001027	0.003168	0.001279	0.004222	0.000159	0.001567	0.006348	0.012269
+ - - - - +	A	0.094244	0.021025	0.120809	0.032917	0.113918	0.028775	0.055493	0.023850	0.062040	0.031778
+ - - - - +	S	0.000139	0.000756	0.000062	0.000803	0.000058	0.000922	0.000077	0.001092	0.000514	0.003582
+ - - - - +	C	0.000867	0.001561	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.003685	0.006633	0.000000	0.000000
+ - - - - -	A	0.019900	0.007360	0.026008	0.012937	0.016403	0.013294	0.027019	0.015938	0.001563	0.005827
+ - - - - -	S	0.016788	0.006860	0.009282	0.007296	0.006568	0.007311	0.006379	0.009380	0.064044	0.032797
+ - - + + +	A	0.003078	0.003980	0.004900	0.008013	0.005416	0.008530	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
+ - - + + -	A	0.000944	0.001606	0.000000	0.000000	0.003776	0.006424	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
+ - - + - +	A	0.000231	0.001271	0.000467	0.002798	0.000263	0.002071	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
+ - - + - +	A	0.001944	0.003038	0.003647	0.006479	0.001655	0.004647	0.000656	0.003139	0.000542	0.003468
Haplótipos	Hb	Total	S.E	Maragojipe	S.E	Cachoeira	S.E	Iguape	S.E	Portadores	S.E
+ - - - + -	A	0.000796	0.001720	0.002231	0.004862	0.000000	0.000000	0.000032	0.000704	0.000000	0.000051
+ - - - + -	S	0.000136	0.000695	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000329	0.002243	0.000369	0.002870
+ - - - - +	A	0.012757	0.009303	0.021867	0.017468	0.002865	0.005824	0.011180	0.012662	0.010543	0.014390
+ - - - - -	A	0.006430	0.004973	0.015439	0.012182	0.003197	0.006066	0.000764	0.003433	0.000061	0.001176
+ - - - - -	S	0.003515	0.003469	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.007266	0.009603	0.011147	0.014406
+ - - + + +	A	0.000592	0.001865	0.001679	0.005287	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
+ - - + - +	A	0.000096	0.000726	0.000270	0.002064	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
+ + - - + +	A	0.007098	0.005959	0.009322	0.009688	0.011257	0.013030	0.003491	0.007650	0.001121	0.005039
+ + - - + +	C	0.000063	0.000476	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000267	0.002024	0.000000	0.000000

++----	A	0.004989	0.004151	0.003363	0.005422	0.013534	0.012641	0.001690	0.004944	0.000177	0.001999
++----	S	0.000232	0.000911	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.001430	0.005607
++----	A	0.037307	0.013088	0.041810	0.018350	0.030178	0.020622	0.051443	0.018960	0.017940	0.019041
++----	S	0.000041	0.000387	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000043	0.000248	0.002361
++----	C	0.000767	0.001494	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.003263	0.006351	0.000000	0.000000
++----	A	0.009808	0.004487	0.014971	0.006447	0.007023	0.009486	0.011264	0.011130	0.000788	0.004158
++----	S	0.003133	0.003116	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000811	0.003466	0.018189	0.018531
++++++	A	0.002146	0.003297	0.005263	0.008058	0.001175	0.004237	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
++-++-	A	0.000132	0.000970	0.000199	0.001736	0.000249	0.002116	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
+++--+	A	0.003155	0.004035	0.005290	0.007857	0.003336	0.006159	0.001928	0.005415	0.000000	0.000000
+++--	A	0.000215	0.000891	0.000614	0.002544	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
+++--	A	0.001171	0.003096	0.001686	0.005063	0.000397	0.002383	0.001697	0.005772	0.000479	0.003266
+++---	A	0.000272	0.001062	0.000573	0.002443	0.000283	0.002021	0.000000	0.000032	0.000000	0.000057
+++---	S	0.000114	0.000652	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000237	0.001911	0.000371	0.002879
+++++	A	0.001031	0.002234	0.002925	0.006337	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000

VI Frequências dos haplótipos do cluster 5' da β -globina em cromossomos β^A , β^S e β^C nas populações de Maragojipe, Cachoeira e Iguape, indivíduos portadores da Hb.S e nos pacientes com hemoglobinopatias (Hb. SS, Hb. SC e Hb. CC) e seus respectivos desvios. As frequências foram calculadas pelo programa PHASE 2.1.1 através do modo sem recombinação. As linhas de cor cinza representam os haplótipos com frequência igual ou superior a 1% (0,01) em pelo menos um dos grupos.

Haplótipos	Hb	AS	S.E.	Maragojipe	S.E.	Cachoeira	S.E.	Iguape	S.E.
----+	A	0.159101	0.023485	0.143385	0.022930	0.224800	0.034009	0.240676	0.023570
----+	S	0.309833	0.030190	0.028632	0.005170	0.028149	0.004259	0.061929	0.002932
----+	C	0.000000	0.000000	0.005710	0.005184	0.014454	0.001909	0.003508	0.006520
-----	A	0.012344	0.013866	0.058950	0.016092	0.100850	0.012688	0.045895	0.012372
-----	S	0.024570	0.014278	0.000720	0.002644	0.000551	0.002792	0.000000	0.000067
----+	A	0.000036	0.000908	0.050448	0.018161	0.057539	0.018741	0.020111	0.008538
----+	C	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000252	0.001909	0.000000	0.000000
---++	A	0.000923	0.005088	0.048965	0.016720	0.004510	0.007960	0.023890	0.011172
---++	S	0.000326	0.002714	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000001	0.000147
---++	A	0.000000	0.000000	0.000003	0.000169	0.000001	0.000120	0.000211	0.001803
-+++	A	0.065420	0.015156	0.118756	0.018868	0.113985	0.026735	0.139605	0.022474
-+++	S	0.016688	0.021208	0.001067	0.003159	0.001589	0.004566	0.000000	0.000039
-+++	C	0.000000	0.000000	0.004707	0.005184	0.000000	0.000000	0.011948	0.006628
-+---	A	0.011313	0.014976	0.015860	0.011316	0.037828	0.010013	0.059349	0.011619
-+---	S	0.135547	0.024053	0.000000	0.000000	0.013117	0.004566	0.030675	0.003128
-+---	C	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000167	0.001606
-++++	A	0.000000	0.000092	0.068037	0.015494	0.035864	0.013223	0.010509	0.011711
-++++	A	0.061265	0.012252	0.110010	0.017260	0.062003	0.010260	0.122316	0.016230
-++++	S	0.002074	0.007043	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000315	0.002198
-++++	S	0.000585	0.003618	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000259	0.002260
++++	A	0.003605	0.008303	0.030489	0.012765	0.005659	0.007155	0.006537	0.010762
++++	A	0.027143	0.022932	0.026688	0.012627	0.099648	0.021496	0.029046	0.013523
++++	S	0.000347	0.002795	0.000061	0.000796	0.000166	0.001889	0.000000	0.000006
++++	C	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000087
+----	A	0.071618	0.020748	0.132337	0.026944	0.129787	0.030873	0.077948	0.024133
+----	S	0.007992	0.015520	0.000770	0.002934	0.000547	0.002782	0.000569	0.002926
+----	A	0.000000	0.000000	0.000132	0.001170	0.000205	0.001729	0.000000	0.000000
+---+	A	0.000000	0.000000	0.000520	0.002669	0.000312	0.002133	0.000000	0.000000
+---+	A	0.044854	0.003648	0.062979	0.012283	0.014697	0.000369	0.043090	0.013408
+---+	A	0.000334	0.002742	0.007622	0.010598	0.007275	0.013847	0.001010	0.004211
+----	A	0.042041	0.023805	0.072143	0.021593	0.044424	0.026423	0.070092	0.017580
+----	S	0.002035	0.006846	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000025
++++	A	0.000000	0.000000	0.003037	0.008020	0.000422	0.002470	0.000000	0.000000
++++	A	0.000000	0.000000	0.004083	0.007865	0.001355	0.004254	0.000263	0.002329
++++	A	0.000001	0.000110	0.000205	0.001453	0.000003	0.000207	0.000002	0.000196
++++	A	0.000000	0.000000	0.003527	0.007947	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000

ANEXOS

Lista de artigos utilizados para obtenção das frequências dos sítios de restrição e dos haplótipos β^A nas populações africana, europeia e indígena.

ANTONARAKIS, S. E., et al. Nonrandom association of polymorphic restriction sites in the β -globin gene cluster. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. VOL. 79, p. 137-141, 1982.

ANTONARAKIS, S.E., et al. Origin of the beta S-globin gene in blacks: The contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 81, p. 853-856, 1984.

ANTONARAKIS, S.E., et al. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. **Human Genetics**. Vol. 69, p. 1-14, 1985.

CHAKRAVATI A.B., et al. Nonuniform recombination within the human β -globin gene cluster. **Am. J. Hum. Gen.** Vol. 36, p. 1239-1258, 1984.

CHEN, L. et al. Evolution of beta-globin haplotypes in human populations. **Mol Biol Evol** Vol. 7, p.423-437, 1990.

FLINT, J., et al. The population genetics of the hemoglobinopathies. **Baillieres Clin. Haematol.** Vol. 11, p. 1-51, 1998.

GUERREIRO, J. F., et al. β -globin gene cluster haplotypes in Yanomama Indians from the Amazon region of Brazil. **Hum. Genet.** Vol. 89, p. 629-631, 1992.

LONG J., et al. Phylogeny of human beta-globin haplotypes and its implications for recent human evolution. **Am J Phys Anthropol** Vol. 81, p. 113-130, 1990.

MOUSINHO-RIBEIRO, R. C., et al. Genetic relationships among native americans based on beta-globin gene cluster haplotype frequencies. **Genet. Mol. Biol.** Vol. 26, no. 3, p. 229-234, 2003.

ÖNER, P. D., et al. β^S haplotypes in various world populations. **Hum Genet** Vol. 89, p. 99-104, 1992.

PAGNIER, J., et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** Vol. 81, p. 1771-1773, 1984.

PANTE-DE-SOUSA, G., et al. Beta-globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon region: Evidence for a significant gene flow from Atlantic West Africa. **Ann. Hum. Biol.**, Vol. 1, p. 365-373, 1999.