MARIA JOÃO PRATA MARTINS RIBEIRO

POLIMORFISMOS BIOQUÍMICOS HUMANOS DETECTÁVEIS EM LEUCÓCITOS

GENÉTICA POPULACIONAL, FORMAL E DE LIGAÇÃO FACTORIAL

PORTO
1991

POLIMORFISMOS BIOQUÍMICOS HUMANOS

DETECTÁVEIS EM LEUCÓCITOS

Genética populacional, formal e de ligação factorial

MARIA JOÃO PRATA MARTINS RIBEIRO

Assistente da Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

POLIMORFISMOS BIOQUÍMICOS HUMANOS DETECTÁVEIS EM LEUCÓCITOS

Genética populacional, formal e de ligação factorial

Dissertação de Doutoramento
em Biologia apresentada à
Faculdade de Ciências
da Universidade do Porto

P O R T O
1 9 9 1

De acordo com o nº2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70, utilizaram-se neste trabalho resultados já publicados em colaboração, sob o nome Maria João PRATA, que a seguir se apresentam:

KÖMPF J, PRATA MJ, AMORIM A (1989) Genetic polymorphism of human peptidase C, PEPC (E.C.3.4.11): formal genetic and population data. Hum. Genet. 83: 197-198.

KÖMP F J, AMORIM A, RITTER H, PRATA MJ (1990) Genetic polymorphism of human peptidase C (PEPC). In POLESKY HF, MAYR WR (eds). Adv. Forens. Haemogenet. 3:316--319. Springer-Verlag, Berlin.

PRATA MJ, AMORIM A (1990) Formal and population genetics of F13A and FUCA1 polymorphism in Northern Portugal. Hum. Hered. 40: 45-48.

Em relação ao primeiro trabalho, a autora colaborou no protocolo experimental que permitiu definir a forma peptidásica discriminada.

Nos dois últimos, participou no desenvolvimento das técnicas electroforéticas, na realização das determinações fenotípicas e na análise e discussão dos resultados.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor António Amorim, a quem devo a minha opção pela Genética Humana; com ele aprendi que labor científico e dignidade intelectual são as faces de um mesmo propósito.

Sem o saber, a amizade e o entusiasmo com que se empenhou na sua orientação, este trabalho teria sido bem mais difícil de concretizar.

Ao Professor Doutor João Machado Cruz, pela disponibilidade que sempre manifestou, facilitando os meios e acarinhando os fins; ainda que afectado com problemas de saúde, não se eximiu a uma leitura global e crítica do trabalho, o que permitiu que, limando-se arestas, se conseguisse uma melhor consistência da exposição.

Ao Doutor Jost Kömpf, do Institut für Anthropologie und Humangenetik da Universidade de Tübingen, pelas sugestões inestimáveis e por ter providenciado as fenotipagens de F13B e HF.

Aos colegas Vasco Martins de Almeida, pelo auxílio na organização informática do texto, e Jorge Rocha, pela colaboração na afinação das técnicas respeitantes a FUCA1 e F13A.

Aos funcionários do Instituto de Antropologia " Dr. Mendes Correia", em particular às Drª Teresa, D. Margarida, D. Fernanda e D. Lúcia, pelo apoio técnico que, sem reservas, sempre dispensaram à realização do trabalho.

Ao Conselho Científico da Faculdade de Ciências e à sua Comissão Científica do 3º Grupo, da 3ª Secção, pelas facilidades concedidas na obtenção da situação de equiparação a bolseiro ou de dispensa de serviço docente.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica e à Reitoria da Universidade do Porto, pela concessão dos subsídios que permitiram estágios em Espanha e na Alemanha.

A todos aqueles que, anónima e desinteressadamente, consentiram a colheita do sangue necessário à investigação.

Finalmente, aos colegas e amigos, que não sendo expressamente nomeados, me merecem, pelo incentivo, um reconhecimento indizível.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 1

2. MATERIAL E MÉTODOS 7

2.1 Local de colheita e indivíduos amostrados 7

2.2 Obtenção e conservação das amostras 8

2.3 Preparação do leucolisado 9

2.4 Técnicas electroforéticas e métodos de detecção 11

2.4.1 F13A 12
2.4.2 FUCA1 14
2.4.3 GOT2 15
2.4.4 ME2 17
2.4.5 PEPC 17
2.4.6 PGM3 18

2.5 Consulta do banco de dados do IAFCP 20

2.6 Métodos de cálculo 20

3. RESULTADOS 23

3.1 Genética populacional 23

3.2 Genética formal 34

3.3 Ligação factorial 39

4. DISCUSSÃO 43

4.1 Genética bioquímica 43

4.1.1 F13A 50
4.1.2 FUCA1 54
4.1.3 GOT2 55
4.1.4 ME2 57
4.1.5 PEPC 58
4.1.6 PGM3 64

4.2 Análise populacional e de segregação 67

4.2.1 Genética populacional 71

4.2.1.1 Análise locus a locus 71

a) F13A 71
b) FUCA1 75
c) GOT2 81
d) ME2 85
e) PEPC 88
f) PGM3 94

4.2.1.2 Análise conjunta de pares de loci 102

4.2.1.3 Considerações gerais 113

4.2.2 Genética formal 117

a) ME2 120
b) PEPC 126

4.2.3 Avaliação do grau de informação e aplicabilidade dos marcadores leucocitários em investigações de paternidade 135

4.3 Análise de ligação factorial 146

4.3.1 ME2 146
4.3.2 PEPC, F13B, HF e FY 151

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES 157

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS 169

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 177

APÊNDICES

1 . INTRODUÇÃO

A aplicação, em larga escala, de técnicas electroforéticas de separação de proteínas resultou, nas últimas décadas, na detecção de um número considerável de polimorfismos genéticos e na descrição de amplas amostragens da diversidade genética humana (Lewontin, 1982).

A generalização de técnicas de focagem isoeléctrica em gradientes de pH livres ou imobilizados, capazes de discriminar produtos génicos com diferenças de apenas 0,001 unidades de ponto isoeléctrico , permite antever, desde já, uma expansão ainda maior dos progressos alcançados (Righetti, 1987).

No entanto, o esforço de investigação em Genética Bioquímica Humana tem-se centralizado em loci de proteínas

plasmáticas ou de enzimas eritrocitárias. Assim, desperdiça-se o potencial informativo da fracção sanguínea constituída por populações celulares mistas de leucócitos e plaquetas.

Ora, uma das características mais notáveis das isoenzimas, que tende a reflectir aspectos da organização intercelular e compartimentação de funções dentro da célula, é o seu padrão de localização específica - fenómeno que se manifesta ao nível tecidual, celular, e até mesmo, subcelular (Shaw, 1969; Masters, 1983).

A expressão isoenzimática diferencial condiciona, como é óbvio, o tipo de material biológico em que a análise genética de funções bioquímicas pode ser efectuado, pelo que é frequente recorrer a tecidos como placenta, cérebro ou fígado para a detecção de determinadas enzimas.

Esta estratégia é, porém, difícil de se compatibilizar com a condução da análise genética convencional, nomeadamente quando se pretende a inferência das regras de transmissão de polimorfismos genéticos e a sua prospecção em amplas amostragens populacionais, objectivos dificilmente alcançáveis se não se dispuser de materiais biológicos susceptíveis de colheita in vivo e, de preferência, nos dois sexos.

Alguns loci deste tipo de enzimas, em especial os responsáveis por formas lisossómicas ou mitocondriais, apresentam, contudo, níveis de expressão génica relativamente reduzidos em certos grupos de leucócitos. A capacidade de aí

serem detectados depende apenas, em muitos casos, da melhoria das condições de fenotipagem e de uma correcta obtenção e manipulação dos extractos leucocitários.

A pesquisa de polimorfismos genéticos na fracção sanguínea, que não a plasmática ou eritrocitária, constituiria, para além do mais, uma vantajosa rentabilidade da informação genética disponível no material biológico de eleição em Genética Bioquímica Humana.

Falar em investigação de polimorfismos ditos convencionais, numa altura em que a Genética Humana está, nitidamente, dominada pela tecnologia do DNA recombinante, pode parecer uma ingenuidade.

Na realidade, o potencial das técnicas modernas da Genética Molecular está bem patente nos enormes progressos conseguidos nos últimos anos ao nível do conhecimento do mapa cromossómico humano (Human Gene Mapping 10, 1989) e, tal como o previsto (Mckusick e Ruddle, 1977; Botstein et al, 1980; Bodmer, 1981), nas consequentes aplicações no âmbito da Genética Médica (Cooper e Schmidtke, 1989; Reiss e Cooper, 1990)

Contudo, e ao contrário das expectativas iniciais (Gill et al, 1985; Jeffreys et al, 1985; Baird et al, 1986; Smouse e Chakraborty, 1986), essa tecnologia não conseguiu estabelecer-se de forma convincente em alguns domínios científicos, nomeadamente na elucidação das relações de parentesco e, em especial, na investigação da paternidade

biológica.

Brinkmann et al (1989) salientam, ao formalizar as recomendações da "Society for Forensic Haemogenetics" quanto aos polimorfismos do DNA, que "Paternity testing with conventional techniques is a well established procedure as evidence in court cases. DNA polymorphisms need to be further explored. At the present time DNA techniques should be used only in combination with conventional systems", concordante com Reilly (1990) quando escreve, " Several needs remain unmet. ... standards need to be established for the operation of a DNA forensic laboratory...".

Assim, pelo menos enquanto não forem superadas as dificuldades que a tecnologia do DNA apresenta, de momento, no âmbito da investigação de paternidade, parece-nos legítimo tentar potencializar a eficiência das análises efectuadas à custa da introdução de marcadores convencionais.

A esmagadora maioria dos trabalhos em Genética Populacional dizem respeito a estudos sobre a dinâmica da variação alélica em loci individuais. Inadvertidamente, assume-se que a transmissão dos alelos de um dado locus é independente da dos alelos de outros loci e, portanto, que o valor adaptativo dos genótipos desse locus é independente dos de genótipos de outros loci (Hedrick, 1985). Estes modelos simplistas, embora importantes em determinados contextos, são em geral inapropriados para a detecção das forças que preservam o alelismo em proporções essencialmente constantes

numa dada população (Brackenridge et al, 1975).

Tal como Mohan Raj et al (1990), entre outros, sugerem, só a complexidade adicional da interacção entre loci diferentes pode providenciar uma via mais adequada para a detecção desses factores em populações humanas, oferecendo uma primeira aproximação à extensão da organização dos genótipos e, por extrapolação, do genoma humano.

Neste contexto, parece justificarem-se os objectivos prioritários do presente trabalho, objectivos que agora, explicitamente, se definem:

1 - Investigação de polimorfismos electroforéticos detectáveis na fracção não plasmática ou eritrocitária do sangue;

2 - Estudo da genética populacional e formal das variações observadas em cada sistema genético;

3 - Análise da distribuição fenotípica conjunta de pares de loci;

4 - Avaliação dos graus de informação e aplicabilidade dos polimorfismos estudados em investigações de paternidade;

5 - Estudo das relações de ligação factorial de loci sem localização cromossómica presentemente bem estabelecida.

2 . MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de colheita e indivíduos amostrados

A maioria das colheitas de sangue foram efectuadas, ou no Instituto de Antropologia da Faculdade de Ciências do Porto, ou na residência dos indivíduos amostrados no decurso de trabalhos de campo realizados, essencialmente, no distrito do Porto.

Para além de cooperantes voluntários, utilizaram-se também indivíduos envolvidos em processos de investigação de paternidade cujo exame biológico fora solicitado ao Instituto de Antropologia. Relativamente a estes, e numa pequena fracção, o sangue foi colhido no Hospital ou Centro de Saúde da área da residência, sendo posteriormente remetido por

correio.

Para cada novo dador registou-se o nome, a data, o local de nascimento e a residência. Procedeu-se ainda a um breve levantamento da história genealógica de cada indivíduo, tendo em vista a pesquisa de eventuais relações de parentesco próximo com outros dadores. Finalmente, foi inquirida e registada a existência de afecções clínicas hereditárias.

2.2 Obtenção e conservação das amostras

O sangue foi sempre colhido por punção venosa, em geral antecubital, extraindo-se um volume compreendido entre 8 a 10 ml.

Usou-se, como anticoagulante, uma solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) dissódico , segundo normas de preparação e utilização descritas por Amorim (1983).

A separação dos componentes sanguíneos efectuou-se num período que nunca excedeu as 24 horas após a colheita. Para tal, e de acordo com Siebert et al (1979), foi induzida a sedimentação num soluto macromolecular constituído por dextrano a 5% em soro fisiológico. À medida que os glóbulos vermelhos se iam depositando, a fracção sanguínea deles liberta era removida para um tubo de centrifugadora de fundo cónico. A operação era repetida as vezes necessárias até sedimentação completa dos eritrócitos, processo que demorava, em média, entre 1h30min a 2h.

Após centrifugação a 5000 r.p.m. durante 15 min., o

plasma sobrenadante era retirado, obtendo-se um sedimento enriquecido em leucócitos e plaquetas que se mantinha no próprio tubo e armazenava, sem aditivos, a -20°C, até à altura da utilização.

Por uma questão de ordem prática, passar-se-á a referir esta fracção sanguínea apenas por "leucocitária", ainda que no seu sentido estrito o termo não esgote os constituintes celulares da fracção em causa.

De igual modo, e pela mesma ordem de ideias, o produto obtido após lise celular daquela fracção passará a ser referido por "leucolisado".

Por norma, e dado o volume de sangue colhido, foi possível obter duas amostras leucocitárias de cada dador e, consequentemente, preparar, para cada um, dois leucolisados.

2.3 Preparação do leucolisado

O leucolisado foi sempre obtido por desintegração celular ultrassónica, recorrendo-se a dois processos de preparação:

1º)

- Sonicação ligeira (1x1 impulso de 4seg.) após adição de 150 µl de H_2O bidestilada;
- Centrifugação a 5000 r.p.m., durante 15 min.

2º)

- Sonicação forte (2x1 impulso de 5 seg.) após adição de 100 µl de uma solução em H_2O bidestilada constituida por Triton x 100 a 5% (v/v) e octyl-β-D-glucopiranosideo a 3,3% (p/v);
- Centrifugação a 5.000 r.p.m. durante 15 min.

O sobrenadante obtido pelo 1º processo utilizou-se para as determinações fenotípicas do polipeptídeo A do factor de coagulação XIII (F13A), da peptidase C (PEPC) e da fosfoglucomutase 3 (PGM3). No caso do F13A, o leucolisado aplicou-se directamente na matriz do gel.

Para as determinações de PEPC e PGM3, o leucolisado misturou-se com um gel de inserção, adiante descrito, e, uma hora antes da aplicação, foi-lhe adicionado uma solução de ditiotreitol (DTT) 32,4 mM na proporção volumétrica de 1:10.

O produto obtido pelo 2º processo utilizou-se nas determinações fenotípicas da fucosidase 1 (FUCA1), da forma mitocondrial da enzima málica (ME2) e da forma mitocondrial da transaminase glutâmico-oxaloacética (GOT2).

Para as determinações de FUCA1, as amostras submeteram-se a um tratamento prévio de dessialização: 10 µl de leucolisado misturaram-se com igual volume de neuraminidase (0,6 U/ml, Sigma N-2876) e as amostras incubaram-se, à temperatura ambiente, durante 18 a 20 h.

Quando se pretendia efectuar a fenotipagem dos seis

marcadores electroforéticos a partir de um mesmo extracto leucocitário, o leucolisado obtinha-se encadeando sequencialmente os dois processos de preparação, isto é, efectuava-se integralmente o 1º processo e, depois de retirada a quantidade de amostra necessária às determinações de F13A, PEPC e PGM3, dava-se, de imediato, início ao 2º processo de preparação a partir do produto excedente, incluindo o próprio sedimento.

Nas determinações fenotípicas efectuadas por electroforese em gel de amido, caso de GOT2, ME2, PEPC e PGM3, os leucolisados misturaram-se, previamente, com um gel de inserção de sacarose a 40% (p/v) e Sephadex G200 a 5% (p/v), na proporção volumétrica de 1:1.

2.4 Técnicas electroforéticas e métodos de detecção

As determinações fenotípicas foram efectuadas, ou por electroforese horizontal utilizando como matriz amido (GOT2, ME2, PEPC e PGM3) e agarose (F13A), ou por focagem isoeléctrica em poliacrilamida (FUCA1), seguida de visualização bioquímica específica, segundo técnicas que a seguir individualmente se pormenorizam.

As electroforeses em gel de amido (Starch Hydrolysed, Connaught) e em agarose (agarose 15 BDH-44302), e as focagens isoeléctricas, foram conduzidas com sistema de refrigeração a 8°C.

Os géis de poliacrilamida usados na determinação

fenotípica de FUCA1 foram feitos na unidade de preparação ultraMould, LKB, pela técnica de "sliding", de acordo com as instruções do fabricante.

Nos géis de amido, os zimogramas obtiveram-se pelo método de "sandwich", utilizando para o efeito papel de filtro Waterman nº1, papel igualmente utilizado na técnica de coloração do F13A, como também adiante se descreve.

Os períodos de incubação necessários a todas as colorações decorreram sempre à temperatura de 37°C.

Nos zimogramas cuja leitura era efectuada com luz utra-violeta, o comprimento de onda utilizado foi 254 nM.

2.4.1 F13A

A técnica electroforética utilizada para a fenotipagem de F13A foi a descrita por Kömpf e Ritter (1983):

TAMPÃO DO GEL: Tris 0,259 M, KCl 0,033 M, pH=8,3;

TAMPÃO DAS PONTES: Glicina 0,999 M, Tris 0,100 M, pH=8,3;

GEL: Agarose a 0,93% em 1 volume de tampão das pontes por cada 19 volumes de tampão do gel;

APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS: Inserção a 5cm da extremidade do gel, aplicando-se 7 µl de leucolisado;

CONDIÇÕES ELECTROFORÉTICAS: 7 v/cm até a hemoglobina migrar 8cm da origem.

Para a visualização do F13A recorreu-se à actividade

transglutaminásica adquirida após preactivação, com trombina e $CaCl_2$, das cadeias A (Schwartz et al, 1973). O método de coloração específica que se utilizou, foi, basicamente, o descrito por Graham et al (1984):

TAMPÃO DE INCUBAÇÃO: Tris 0,083 M, HCl 0,06 M, pH=7,6;

SOLUÇÃO DE INCUBAÇÃO: 20,7% de monodansilcadaverina 35 mM, 10,6% de DTT 5 mM, 30,6% de caseína a 3%, 10,6% de trombina (100 U/ml em soro fisiológico); 17,4% de $CaCl_2$ 200 mM.

Um papel de filtro embebido na solução de incubação aplicava-se na superfície do gel, ficando de seguida a incubar durante 16 a 18 h.

Este método tira partido da ligação covalente da monodansilcadaverina (fluorescente) à caseína em áreas de actividade transglutaminásica. De modo a realçar a fluorescência do complexo monodansilcadaverina / caseína, procedeu-se, sequencialmente, às seguintes operações após incubação:

1º - lavagem do gel em H_2O dest. (10min.);

2º - fixação em ácido tricloroacético a 10% (20min.);

3º - lavagem em H_2O dist. (15min);

4º - imersão do gel em ácido acético a 10% (1h);

5º - lavagem em H_2O dest. (30seg.);

6º - imersão do gel em tampão de incubação (10-20min).

Os padrões electroforéticos eram, então, inspeccionados sob luz ultravioleta.

2.4.2 FUCA1

A técnica de focagem isoeléctrica usada para a determinação dos fenótipos de FUCA1, foi a seguinte:

DIMENSÕES DO GEL: 0,3x110x245 mm;

GEL:

Acrilamida a 28%	1,8 ml
Bisacrilamida a 2%	0,8 ml
Sacarose	1,3 gr
Anfolinas (LKB)	
pH 4-6	200 µl
pH 5-7	200 µl
pH 3,5-10	130 µl
H_2O bidestilada	6,8 ml
TEMED	10 µl
Persulfato de amónio a 10%.	70 µl

APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS: A 1,5 cm do ânodo com tira de aplicação (SERVA); aplicam-se 6 µl de amostra;

SOLUÇÕES DOS ELÉCTRODOS : NaOH 1M no cátodo e H_3PO_4 1M no ânodo;

CONDIÇÕES ELÉCTRICAS:

PRÉ-FOCAGEM:

1500V ; 1W ; 25 mA - 30min.

" ; 2W ; " - 10min.

" ; 3W ; " - 10min.

" ; 4W ; " - 10min.

" ; 5W ; " - 10min.

FOCAGEM:

1500V ; 5W ; 25 mA - 1 hora após ser atingida voltagem constante, a focagem era interrompida.

A visualização da actividade de FUCA1 efectuou-se, basicamente, pelo método de Turner et al (1975):

TAMPÃO DE INCUBAÇÃO: K_2HPO_4 0,2 M, ácido acético 0,1M, pH=4,8;

SOLUÇÃO DE INCUBAÇÃO: 4-metilumbeliferil-L-fucosídeo 2,1 mM.

Uma folha de acetato de celulose (Shandon 68761004) embebida em solução de incubação colocava-se na superfície do gel. Após 1 hora de incubação, o zimograma inspeccionava-se sob luz ultravioleta. Os fenótipos de FUCA1 detectavam-se pela presença de bandas fluorescentes correspondentes à metilumbeliferona nos locais de actividade da enzima.

2.4.3 GOT2

Para a determinação dos fenótipos de GOT2, utilizou-se a técnica electroforéctica descrita por Siebert e Amorim (1987), com algumas modificações:

TAMPÃO DAS PONTES: Tris 0,250 M, ácido cítrico 0,066 M, pH=7,6;

TAMPÃO DO GEL: Tampão das pontes diluído 1:8;

CONDIÇÕES ELÉCTRICAS: 6,5 V/cm durante 17 h.

A visualização da actividade de GOT2 concretizou-se por dois processos alternativos. O 1º é, no essencial, o apresentado por Ritter e Kömpf (1979). O 2º método constitui uma modificação do descrito por Sakakibara et al (1983).

1º MÉTODO

TAMPÃO DE INCUBAÇÃO: Tris 0,50 M, ácido L-aspártico 0,15 M, pH= 8,7;

SOLUÇÃO DE INCUBAÇÃO: 2-oxoglutarato 17,7 mM, NADH 1,4 mM, MTT 2,4 mM, desidrogenase málica (Boehringer) 24 U/ml;

INCUBAÇÃO: entre 15 a 30 min .

O desenvolvimento da coloração ia sendo inspeccionado sob luz ultravioleta. Quando a defluorescência NADH-NAD era bem visível, procedia-se à contracoloração com solução de PMS. Os fenótipos de GOT2 apareciam como zonas brancas sob um fundo de formazan arroxeado.

2º MÉTODO

TAMPÃO DE INCUBAÇÃO: Tris 0,300 M, KCl 0,099 M, $MgCl_2$ 0,025 M, HIS-HCl 0,229 M, pH = 7,8;

SOLUÇÃO DE INCUBAÇÃO: Ácido L-cisteinossulfínico 196 mM, EDTA 2 mM, 2-oxoglutarato 7 mM, MTT 2 mM, PMS 3 mM, dextrano 10 mM, piridoxal fosfato 3 mM;

INCUBAÇÃO: Entre 10 a 20 min..

O gel era, então, imerso em ácido acético a 10% durante 5 min. As zonas de actividade de GOT2 correspondiam às bandas arroxeadas de formazan.

2.4.4 ME2

A técnica electroforética que se usou para a fenotipagem de ME2, foi a mesma que para GOT2.

O zimograma de ME2 obteve-se pelo método descrito por Siebert et al (1979):

TAMPÃO DE INCUBAÇÃO: Ácido L-málico 0,222 M, Tris 0,50 M, $MgCl_2$ 0,02 M, pH=7,5;

SOLUÇÃO DE INCUBAÇÃO: NADP 1 mM, MTT 2 mM, azul de Meldola (Boehringer) 0,1 mM;

INCUBAÇÃO: 2 a 3 horas.

Os padrões electroforéticos de ME2 tornavam-se mais nítidos se, após a incubação a 37°C, o gel ficasse durante aproximadamente 1 h, à temperatura de 4°C.

Os produtos génicos de ME2 detectavam-se a 3-4 cm da origem e, mais anodicamente, podiam também observar-se zonas de actividade correspondentes a ME1.

2.4.5 PEPC

Para a determinação dos fenótipos deste marcador utilizou-se o seguinte sistema electroforético contínuo descrito por Kömpf et al (1989):

TAMPÃO DAS PONTES: Tris 0,16 M, Histidina-HCl 0,15 M,

HCl 0,1 M, pH=6,0;

TAMPÃO DO GEL: Tampão das pontes diluído 1:15;

GEL: Amido a 13,2%;

CONDIÇÕES ELECTROFORÉTICAS: 7 v/cm durante 18h.

A detecção da actividade de PEPC fez-se tirando partido da possibilidade de se desencadear a reacção da GPT em zonas em que a alanina se libertava do dipéptido leucil--alanina sob a acção peptidásica. Utilizou-se o método descrito por Kömpf et al (1979):

TAMPÃO DE INCUBAÇÃO: Tris 0,5 M, HCl 0,3 M, pH= 8,0;

SOLUÇÃO DE INCUBAÇÃO: Leucil-alanina 8,2 mM, 2--oxoglutarato 1,5 mM, MTT 1,6 mM, GPT 2 U/ml (Sigma G-9880), LDH 65 U/ml;

INCUBAÇÃO: 1,30 h a 2 h.

O desenvolvimento do zimograma ia sendo controlado sob luz ultravioleta e, quando as zonas correspondentes à actividade de PEPC contrastavam o suficiente com o fundo fluorescente do gel , procedia-se à contracoloração com solução de PMS.

Para além da zona correspondente a PEPC, podia ainda observar-se, menos anodicamente, uma outra zona de actividade peptidásica determinada por PEPA.

2.4.6 PGM3

A técnica electroforéctica usada para a fenotipagem de PGM3 foi modificada de Fildes e Harris (1966):

TAMPÃO DAS PONTES: Ácido acético 0,40 M, NaOH 1,13 M, pH = 6,0;

TAMPÃO DO GEL: His-HCl 0,10 M, NaOH 0,05 M, pH= 6,0;

GEL: Amido a 15 %;

CONDIÇÕES ELÉCTRICAS: 6 V/cm, 17 h.

Os fenótipos de PGM3 visualizaram-se de acordo com o método descrito por Siebert et al (1980):

TAMPÃO DE INCUBAÇÃO: Tris 0,30 M, KCl 0,01 M, $MgCL_2$ 0,02 M, His-HCl 0,23 M, pH=7,8;

SOLUÇÃO DE INCUBAÇÃO: Glucose-1-fosfato (com 1% glucose-1,6-difosfato) 21,0 mM, glucose-1,6--difosfato 0,24mM, NADP 1,7 mM, desidrogenase da glucose-6-fosfato 195 U/ml, MTT 3,0 mM, azul de Meldola (Boerhinger) 0,1 mM;

INCUBAÇÃO: 2 a 3 h.

Ao fim daquele período de incubação, o zimograma obtido permitia, em geral, uma boa leitura dos fenótipos de PGM3, mas, tal como para ME2, os padrões electroforéticos tornavam-se mais nítidos se o gel permanecesse cerca de 1 hora à temperatura de 4°C.

No mesmo zimograma, podiam também observar-se as zonas de actividade de PGM1 e PGM2, mas os respectivos fenótipos tinham que ser lidos antes de 1 h após o início da incubação. Caso contrário, a sobreincubação tornava os padrões electroforécticos ilegíveis.

2.5 Consulta do banco de dados do IAFCP

Para efeitos de análise de associação gamética e de ligação factorial, os fenótipos referentes a outros marcadores, que não os apresentados neste trabalho, obtiveram-se por consulta do banco de dados existente no Instituto de Antropologia.

O mesmo ficheiro foi igualmente consultado quando se pretendia avaliar a verosimilhança de paternidade em famílias nucleares que apresentavam exclusões aparentes quanto a algum dos sistemas genéticos agora investigados, e em que a hipótese de não-paternidade biológica era confrontada com a da existência de alelos nulos na interpretação das exclusões observadas.

2.6 Métodos de cálculo

As frequências génicas apuraram-se por contagem directa de genes, à excepção de PEPC*O, cuja estimativa será descrita no ponto 4.2.2.

A eficiência total de exclusão de cada sistema genético calculou-se pela fórmula proposta por Selvin (1980), e a eficiência de exclusão pela 2ª regra de Landsteiner, segundo fórmula apresentada por Amorim et al (1986).

O valor médio de probabilidade de paternidade e índice de paternidade entre verdadeiros e falsos pais, determinou-se de acordo com Rocha (1988).

Na análise de ligação factorial, os valores de "lod score" obtiveram-se pelo método de Maynard-Smith et al (1961).

Na análise de associação fenotípica entre pares de loci utilizaram-se os normalizados testes X^2 de tabelas de contingência e, adicionalmente, testes de X^2 de concordância entre valores observados e esperados, baseados em frequências alélicas ou haplotípicas.

3. RESULTADOS

3.1 Genética populacional

As amostras populacionais investigadas foram estratificadas em função de dois parâmetros :

1. Sexo;

2. Área geográfica.

Quanto ao segundo, discriminaram-se ainda os indivíduos residentes dos naturais, e as subdivisões geográficas consideradas foram as seguintes:

A) Regiões: Norte, Centro e Sul.

Na região Norte incluíram-se os distritos de Porto, Viana do Castelo, Braga, Bragança e Vila Real.

Na região Centro, os distritos de Aveiro, Viseu, Coimbra, Guarda, Castelo Branco e

Leiria.

Na região Sul, incluíram-se os distritos de Lisboa, Setúbal, Portalegre, Évora, Beja e Faro.

B) Zonas: Minho e Trás-os-Montes.

A zona Minho engloba os distritos de Viana do Castelo e Braga.

A zona Trás-os-Montes, os distritos de Bragança e Vila Real.

C) Distritos: Porto.

Na tabela 3.1, apresentam-se as distribuições fenotípicas observadas para os seis loci investigados na amostra geral analisada, e que inclui todos os indivíduos fenotipados de nacionalidade portuguesa.

Nas tabelas 3.2 a 3.7 pormenorizam-se, individualmente, os resultados populacionais quanto a cada locus.

A discrepância de efectivos amostrais entre os valores indicados na tabela 3.1 e os das tabelas 3.2 a 3.7, resulta de se desconhecer, para alguns indivíduos , o local exacto da naturalidade ou residência. Todavia, foi assegurado para esses, para além da nacionalidade portuguesa, a inexistência de relações de parentesco próximas com outros indivíduos incluídos na amostra. Por outro lado, na tabela 3.1, incluiram-se indivíduos naturais das regiões autónomas da Madeira e dos Açores, mas que, pelo reduzido número, não se consideraram nas estratificações geográficas.

TABELA 3.1
Distribuição fenotípica de F13A, FUCA1, GOT2, ME2, PEPC e PGM3 e acordo com os resultados esperados segundo o princípio de Hardy-Weinberg na amostra global de Portugal continental.

SISTEMA GENÉTICO	AMOSTRA ESTUDADA	N	FENÓTIPOS					X^2	P (%) g.l.=1
F13A			1	21	2				
	Global	639	367 (365,89)	233 (235,29)	39 (37,82)			0,06	50-30
	Masc.	318	178 (176,64)	118 (120,73)	22 (20,63)			0,16	70-50
	Fem.	321	189 (189,29)	115 (114,42)	17 (17,29)			0,01	95-90
FUCA1			1	21	2				
	Global	701	353 (350,99)	286 (290,08)	62 (59,93)			0,14	70-50
	Masc.	345	176 (173,28)	137 (142,45)	32 (29,27)			0,51	50-30
	Fem.	356	177 (177,69)	149 (147,64)	30 (30,67)			0,03	90-80
GOT2			1	21	31	Outros			
	Global	792	763 (763,28)	26 (25,50)	3 (— 3,22 —)	-			
	Masc.	381	367 (367,11)	13 (12,79)	1 (— 1,10 —)	-			
	Fem.	411	396 (396,18)	13 (12,75)	2 (— 2,07 —)	-			
ME2			1	21	2				
	Global	704	281 (279,42)	325 (328,00)	98 (96,38)			0,07	80-70
	Masc.	339	130 (134,46)	167 (158,08)	42 (46,46)			1,08	30-20
	Fem.	365	151 (144,91)	158 (170,14)	56 (49,94)			1,86	20-10
PEPC			1	61	6	21	Outros		
	Global	452	287 (281,17)	137 (149,08)	26 (19,76)	2 (— 1,99 —)	-	3,07	10-5
	Masc.	227	141 (133,37)	66 (81,25)	20 (12,38)	-	-	7,99	0,1-0,5
	Fem.	225	146 (148,02)	71 (67,31)	6 (7,65)	2 (— 2,02 —)	-	0,59	50-30
PGM3			1	21	2				
	Global	720	389 (369,83)	254 (292,38)	77 (57,79)			12,42	<0,01
	Masc.	351	183 (168,23)	120 (149,54)	48 (33,23)			13,70	<0,01
	Fem.	369	206 (201,96)	134 (142,06)	29 (24,98)			1,19	30-20

TABELA 3.2

F13A: Distribuição fenotípica e acordo com os resultados esperados segundo o princípio de Hardy-Weinberg em amostras populacionais de zonas, regiões ou distritos de Portugal continental.

AMOSTRA ESTUDADA	N	FENÓTIPOS			X^2	P (%) g.l.=1
		1	21	2		
REGIÃO NORTE						
Porto						
Nat	288	155 (160,49)	120 (109,00)	13 (18,51)	2,94	10-5
Res	354	194 (197,64)	141 (133,74)	19 (22,62)	1,04	50-30
Minho						
Nat	40	21 (21,03)	16 (15,95)	3 (3,03)	0,00	>99
Res	30	17 (16,88)	11 (11,25)	2 (1,88)	0,01	90-80
T.M.						
Nat	92	56 (54,02)	29 (32,95)	7 (5,02)	1,33	30-20
Res	80	45 (43,51)	28 (30,98)	7 (5,51)	0,74	50-30
Total Nat	420	232 (253,49)	165 (158,00)	23 (26,50)	0,82	50-30
Total Res	464	256 (258,02)	180 (175,98)	28 (30,01)	0,24	70-50
REGIÃO CENTRO						
Total Nat	97	55 (53,45)	34 (37,11)	8 (6,44)	0,74	50-30
Total Res	82	49 (47,64)	27 (29,73)	6 (4,64)	0,69	50-30
REGIÃO SUL						
Total Nat	32	21 (19,53)	8 (10,94)	3 (1,53)	0,78	50-30
Total Res	32	21 (20,32)	9 (10,36)	2 (1,32)	0,55	50-30

T.M.- Trás-os-Montes.

TABELA 3.3
FUCA1: Distribuição fenotípica e acordo com os resultados esperados segundo o princípio de Hardy-Weinberg em amostras populacionais de zonas, regiões ou distritos de Portugal continental.

AMOSTRA ESTUDADA	N	FENÓTIPOS			X^2	P (%) g.l.=1
		1	21	2		
REGIÃO NORTE						
Porto						
Nat	309	162 (161,66)	123 (123,66)	24 (23,66)	0,01	>90
Res	377	201 (205,00)	154 (146,01)	22 (26,00)	1,13	30-20
Minho						
Nat	42	17 (17,36)	20 (19,28)	5 (5,36)	0,06	90-80
Res	33	14 (13,37)	14 (15,27)	5 (4,36)	0,23	70-50
T.M.						
Nat	99	40 (40,73)	47 (45,54)	12 (12,73)	0,10	80-70
Res	88	33 (34,38)	44 (41,25)	11 (12,38)	0,39	70-50
Total Nat	450	219 (219,12)	190 (189,79)	41 (41,10)	0,00	>99
Total Res	498	248 (251,61)	212 (204,74)	38 (41,65)	0,63	50-30
REGIÃO CENTRO						
Total Nat	102	57 (55,89)	37 (39,23)	8 (6,88)	0,33	70-50
Total Res	88	51 (48,75)	29 (33,50)	8 (5,75)	1,59	30-20
REGIÃO SUL						
Total Nat	35	21 (20,06)	11 (12,87)	3 (2,07)	0,56	70-50
Total Res	33	16 (17,46)	16 (13,09)	1 (2,45)	1,63	30-20

T.M.- Trás-os-Montes

TABELA 3.4
GOT2: Distribuição fenotípica e resultados esperados segundo o princípio de Hardy-Weinberg em amostras populacionais de zonas, regiões ou distritos de Portugal continental.

AMOSTRA ESTUDADA	N	FENÓTIPOS			
		1	21	31	OUTROS
REGIÃO NORTE					
Porto					
Nat	375	357 (357,22)	16 (15,59)	2 (-- 2,19 --)	-
Res	459	435 (435,26)	21 (20,47)	3 (-- 3,27 --)	-
Minho					
Nat	61	59 (59,02)	1 (0,98)	1 (-- 1,00 --)	-
Res	45	45 (45,00)	-	-	-
Trás-os-Montes					
Nat	97	94 (94,02)	3 (- - - - 2,98 - - - -)	-	-
Res	81	80 (80,00)	1 (- - - - 1,00 - - - -)	-	-
Total Nat	533	510 (510,22)	20 (19,61)	3 (-- 3,17 --)	-
Total Res	585	560 (560,23)	22 (21,53)	3 (-- 3,24 --)	-
REGIÃO CENTRO					
Total Nat	108	105 (105,02)	3 (- - - - 2,98 - - - -)	-	-
Total Res	84	82 (82,01)	2 (- - - - 1,99 - - - -)	-	-
REGIÃO SUL					
Total Nat	36	35 (35,01)	1 (- - - - 0,99 - - - -)	-	-
Total Res	34	33 (33,01)	1 (- - - - 0,99 - - - -)	-	-

TABELA 3.5
ME2: Distribuição fenotípica e acordo com os resultados esperados segundo o princípio de Hardy-Weinberg em amostras populacionais de zonas, regiões ou distritos de Portugal continental.

AMOSTRA ESTUDADA	N	FENÓTIPOS			X^2	P (%) g.l.=1
		1	21	2		
REGIÃO NORTE						
Porto						
Nat	349	135 (135,54)	165 (163,91)	49 (49,55)	0,02	90-80
Res	416	163 (163,75)	196 (194,50)	57 (57,75)	0,02	90-80
Minho						
Nat	56	25 (23,15)	22 (25,71)	9 (7,14)	1,17	30-20
Res	42	19 (17,36)	16 (19,28)	7 (5,36)	1,21	30-20
T.M.						
Nat	91	32 (33,24)	46 (43,52)	13 (14,24)	0,30	70-50
Res	77	25 (26,89)	41 (37,23)	11 (12,89)	0,79	50-30
Total Nat	496	192 (191,89)	233 (233,24)	71 (70,87)	0,00	>99
Total Res	535	207 (207,92)	253 (251,21)	75 (75,88)	0,03	90-70
REGIÃO CENTRO						
Total Nat	104	47 (46,45)	45 (46,11)	12 (11,44)	0,06	90-80
Total Res	82	37 (35,57)	34 (36,88)	11 (9,56)	0,50	50-30
REGIÃO SUL						
Total Nat	34	12 (11,18)	15 (16,63)	7 (6,18)	0,33	70-50
Total Res	34	15 (12,97)	12 (16,06)	7 (4,97)	2,17	20-10

T.M.- Trás-os-Montes

TABELA 3.6
PEPC: Distribuição fenotípica e acordo com os resultados esperados segundo o princípio de Hardy-Weinberg em diversas amostras populacionais de zonas, distritos ou regiões de Portugal continental.

AMOSTRA ESTUDADA	N	FENÓTIPOS					X^2	P (%) g.l.=1
		1	61	6	21	OUTROS		
REGIÃO NORTE								
Porto								
Nat	216	137 (133,78)	65 (71,60)	13 (9,58)	1 (--- 1,04 ---)	-	1,91	20-10
Res	244	157 (153,44)	71 (78,52)	14 (10,04)	2 (--- 2,00 ---)	-	2,36	20-10
Trás-os-Montes								
Nat	53	32 (33,29)	19 (16,64)	1 (2,08)	1 (--- 1,99 ---)	-	0,95	50-30
Res	49	29 (30,25)	19 (16,50)	1 (2,25)			1,12	30-20
Total Nat	300	190 (187,23)	92 (97,98)	16 (12,82)	2 (--- 1,97 ---)	-	1,20	30-20
Total Res	320	203 (200,01)	98 (104,38)	17 (13,62)	2 (--- 1,99 ---)	-	1,27	30-20
REGIÃO CENTRO								
Total Nat	53	35 (35,71)	17 (15,59)	1 (1,70)			0,43	70-50
Total Res	49	35 (35,14)	13 (12,71)	1 (1,15)			0,03	90-80

TABELA 3.7
PGM3: Distribuição fenotípica e acordo com os resultados esperados segundo o princípio de Hardy-Weinberg em amostras populacionais de zonas, regiões ou distritos de Portugal continental.

AMOSTRA ESTUDADA	N	FENÓTIPOS			X^2	P (%) g.l.=1
		1	21	2		
REGIÃO NORTE						
Porto						
Nat	326	175 (173,01)	125 (128,96)	26 (24,03)	0,31	70-50
Res	398	216 (210,59)	147 (157,84)	35 (29,58)	1,88	20-10
Minho						
Nat	46	23 (20,89)	16 (20,22)	7 (4,89)	2,00	20-10
Res	33	17 (16,03)	12 (13,94)	4 (3,03)	0,64	50-30
T.M.						
Nat	101	55 (52,04)	35 (40,92)	11 (8,04)	2,11	20-10
Res	88	52 (49,50)	28 (23,00)	8 (5,50)	2,02	20-10
Total Nat	473	253 (245,82)	176 (190,34)	44 (36,84)	0,31	70-50
Total Res	519	285 (276,04)	187 (204,92)	47 (38,03)	3,97	5-2
REGIÃO CENTRO						
Total Nat	107	57 (55,41)	40 (43,18)	10 (8,41)	0,58	50-30
Total Res	95	45 (43,12)	38 (41,77)	12 (10,11)	0,78	50-30
REGIÃO SUL						
Total Nat	36	19 (16,00)	10 (16,00)	7 (4,00)	5,06	2-1
Total Res	36	21 (19,51)	11 (13,99)	4 (2,51)	1,64	30-20

T.M.- Trás-os-Montes

Os resultados da análise conjunta de pares de loci estão sumariados na tabela 3.8.

Todos os pares de loci investigados envolveram, sempre, pelo menos um locus de um sistema genético leucocitário.

O segundo locus de cada par foi seleccionado com base no seguinte:

- Quando para o locus leucocitário do par se desconhecia a localização cromossómica definitiva - caso específico de ME2 - a distribuição populacional conjunta foi investigada para todos os loci marcadores disponíveis, quer se tratasse de leucocitários, eritrocitários ou plasmáticos;

- Quando a localização cromossómica do locus marcador leucocitário de um par era bem conhecido, a análise restringiu-se apenas a pares de loci em situação cromossómica relativamente próxima, incluindo igualmente marcadores leucocitários, eritrocitários ou plasmáticos.

TABELA 3.8
Análise da distribuição populacional conjunta de 38 pares de loci e acordo com os valores esperados baseados em frequências génicas (X^2T) ou tabelas de contingência (X^2C).

ASSOCIAÇÃO ESTUDADA	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	X^2T	X^2C	g.l.	P(%)
ME2 x ABO	719	5,16	-	8	70-80
ME2 x ACP1	473	18,60	-	9	2-5
ME2 x ADA	484	0,64	-	3	80-90
ME2 x AK1	502	2,05	-	2	30-50
ME2 x ALAD	501	3,56	-	3	20-30

TABELA 3.8 - Continuação.

ASSOCIAÇÃO ESTUDADA	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	X^2T	X^2C	g.l.	P(%)
ME2 x AMY2	523	0,74	-	1	30-50
ME2 x BF	171	6,28	-	5	20-30
ME2 x C3	481	10,17	-	5	5-10
ME2 x ESD	549	4,31	-	6	50-70
ME2 x F13A	596	5,21	-	6	50-70
ME2 x FUCA1	592	2,55	-	6	80-90
ME2 x FY	500	10,08	-	6	10-20
ME2 x GALT	451	4,51	-	5	30-50
ME2 x GC	525	4,49	-	4	30-50
ME2 x GLO1	497	3,28	-	6	70-80
ME2 x GOT2	722	8,12	-	2	1-2
ME2 x GPT	491	3,48	-	3	30-50
ME2 x HP	528	8,46	-	6	20-30
ME2 x ORM1	200	2,12	-	5	80-90
ME2 x PEPC	352	1,76	-	4	70-80
ME2 x PGD	448	0,81	-	2	50-70
ME2 x PGM1	682	3,93	-	5	50-70
ME2 x PGM3	626	5,40	-	6	30-50
ME2 x PGP	479	4,24	-	5	50-70
ME2 x PLG	225	2,66	-	3	30-50
ME2 x RHC	646	5,36	-	6	30-50
ME2 x RHE	646	1,02	-	4	80-90
ME2 x TF	172	5,08	-	5	30-50
ME2 x UMPK	499	0,86	-	1	30-50
F13A x GLO1	497	4,54	-	6	50-70
F13A x PGM3	673	-	2,55	4	50-70
FUCA1 x PGD	470	0,27	-	1	50-70
FUCA1 x RHC	607	12,91	-	6	2-5
FUCA1 x RHE	607	3,87	-	4	30-50
FUCA1 x UMPK	459	3,95	-	2	10-20
GOT2 x PGP	571	0,34	-	1	50-70
PEPC x FY	297	4,93	-	5	30-50
PGM3 x GLO1	512	-	5,45	4	20-30

3.2 Genética formal

As distribuições fenotípicas na população portuguesa de pares mãe/filho, relativamente a cada um dos sistemas genéticos investigados, encontram-se descritos na tabela 3.9, sendo de salientar que não se observou nenhuma exclusão mãe/filho.

Nas tabelas 3.10 a 3.15, apresentam-se, para os mesmos sistemas genéticos, os resultados da análise de segregação em descendentes de famílias nucleares.

De referir que no sistema PEPC se registou uma família com exclusão aparente de maternidade e outra com exclusão, também aparente, de paternidade.

Nas mesmas tabelas indicam-se, em simultâneo, as distribuições correspondentes dos tipos de cruzamentos na população portuguesa.

Tabela 3.9
Distribuição fenotípica de F13A, FUCA1, GOT2, ME2, PEPC e PGM3 em pares mãe/filho.

PEPC

Mãe	Filho					N
	1	61	6	21	2	
1	94 (103,66)	31 (23,87)				125
61	23 (23,87)	30 (29,51)	12 (5,50)			65
6		4 (5,50)				4
21				1 * (0,81)	1 * (0,01)	2
N	117	65	12	1	1	196

PEPC*1 = 0,809 ; X^2 = 12,22 ; g.l.= 4;
PEPC*2 = 0,005 0,02 > P > 0,01

GOT2

Mãe	Filho				N
	1	21	31	2	
1	271 (270,40)	4 (4,78)	1 * (0,97)		276
21	6 (4,78)	3 * (4,86)		1 * (0,08)	10
31	1 * (0,97)		1 * (0,97)		2
N	278	7	2	1	288

GOT2*1 = 0,979 X^2=0,57; g.l.=1;
GOT2*2 = 0,017 0,50> P >0,25

* classes somadas para cálculo de X^2

TABELA 3.9 - Continuação.

F13A

Mãe	Filho			N
	1	21	2	
1	103 (100,44)	30 (34,40)	-	133
21	41 (34,40)	43 (46,18)	12 (11,78)	96
2	-	11 (11,78)	3 (4,03)	14
N	144	84	15	243

F13A*1 = 0,745 ; X^2 = 2,43 ; g.l. = 5; 0,80 > P > 0,70

FUCA1

Mãe	Filho			N
	1	21	2	
1	77 (81,43)	35 (34,83)	-	112
21	46 (34,83)	49 (49,73)	13 (14,19)	108
2	-	13 (14,90)	4 (6,37)	17
N	123	97	17	237

FUCA1*1 = 0,700 ; X^2 = 5,20 ; g.l.= 5; 0,50 > P > 0,30

ME2

Mãe	Filho			N
	1	21	2	
1	72 (68,84)	41 (40,92)	-	113
21	39 (40,92)	68 (65,24)	17 (24,32)	124
2	-	33 (24,32)	9 (14,46)	42
N	111	142	26	279

ME2*1 = 0,627 ; X^2 = 7,71 ; g.l.= 5; 0,20 > P > 0,10

PGM3

Mãe	Filho			N
	1	21	2	
1	94 (99,55)	47 (40,13)	-	141
21	42 (40,13)	51 (56,31)	17 (16,18)	110
2	-	20 (16,18)	4 (6,52)	24
N	136	118	21	275

PGM3*1 = 0,713 ; X^2 = 3,99 ; g.l. = 5 0,70 > P > 0,50

TABELA 3.10 - F13A: Segregação fenotípica em 116 famílias nucleares com 340 descendentes e distribuição populacional de tipos de cruzamento.

CRUZAMENTO		DESCENDÊNCIA					
TIPO	N	FENÓTIPOS			N	X^2	P(%)
		1	21	2			
1 x 1	31 (33,05)	72			72		
1 x 21	54 (48,74)	79 (89,00)	99 (89,00)		178	2,25	10-25 a
21 x 21	16 (17,98)	12 (11,00)	24 (22,00)	8 (11,00)	44	1,09	50-75 b
2 x 21	9 (6,62)		14 (12,00)	10 (12,00)	24	0,67	25-50 a
1 x 2	6 (8,98)		22		22		
TOTAL	116	163	159	18	340		

F13A*1 = 0,731 X^2 = 3,11 ; g.l.= 3 ; 0,50 > P > 0,30
a) g.l.=1
b) g.l.=2

TABELA 3.11 - FUCA1: Segregação fenotípica em 115 famílias nucleares com 320 descendentes e distribuição populacional de tipos de cruzamentos.

CRUZAMENTO		DESCENDÊNCIA					
TIPO	N	FENÓTIPOS			N	X^2	P(%)
		1	21	2			
1 x 1	36 (34,73)	130			130		
1 x 21	48 (48,48)	53 (56,00)	59 (56,00)		112	0,32	75-90 b
21 x 21	12 (16,92)	8 (7,75)	17 (15,50)	6 (7,75)	31	0,55	75-50 a
2 x 21	7 * (5,90)		9 (7,50)	6 (7,50)	15	0,50	25-50 b
2 x 1	11 (8,46)		29		29		
2 x 2	1 * (0,52)			3	3		
TOTAL	115	191	114	15	320		

FUCA1*1 = 0,741 X^2 = 2,63 ; g.l.= 3; 0,50 > P > 0,30
* classes somadas para cálculo de X^2
a) g.l.=2
b) g.l.=1

TABELA 3.12 - GOT2: Segregação fenotípica em 165 famílias nucleares com 452 descendentes e distribuição populacional de tipos de cruzamentos.

CRUZAMENTO		DESCENDÊNCIA						
TIPO	N	FENÓTIPOS				N	X^2	P(%)
		1	21	2	31			
1 x 1	148 (147,70)	384				384		
1 x 21	14 (14,70)	24 (24,00)	24 (24,00)			48	0,00	>99 [a]
1 x 31	2 (1,82)	7 (7,50)			8 (7,50)	15	0,07	75-90 [a]
21 x 21	1 (0,37)	- * (1,25)	4 (2,50)	1 * (1,25)		5	2,20	10-25 [a]
TOTAL	165	415	28	1	8	452		

GOT2*1 = 0,973 ; GOT2*2 = 0,024 X^2 = 0,12 ; g.l.= 1 ; 0,80 > P > 0,70
a) g.l.=1
* classes somadas para cálculo de X^2

TABELA 3.13 - ME2: Segregação fenotípica em 151 famílias nucleares com 411 descendentes e distribuição populacional de tipos de cruzamentos.

CRUZAMENTO		DESCENDÊNCIA					
TIPO	N	FENÓTIPOS			N	X^2	P(%)
		1	21	2			
1 x 1	25 (21,27)	61			61		
1 x 21	40 (53,80)	55 (62,5)	70 (62,5)		125	1,80	10-25 [a]
2 x 21	22 (21,52)		41 (32,00)	23 (32,00)	64	5,06	0,01-0,02 [a]
21 x 21	45 (34,02)	34 (26,50)	46 (53,00)	26 (26,50)	106	3,06	10-25 [b]
		89 (89,00)	157 (147,50)	49 (58,50)	295	2,15	10-25 [a]
2 x 1	19 (17,00)		55		55		
TOTAL	151	150	212	49	411		

ME2*1 = 0,613 X^2 = 7,84 ; g.l.= 3 ; 0,05 > P > 0,02
a) g.l.= 1
b) g.l.= 2

TABELA 3.14
PEPC: Segregação fenotípica em 101 famílias com 324 descendentes e distribuição populacional de tipos de cruzamentos.

CRUZAMENTO		DESCENDÊNCIA						
TIPO	N	FENÓTIPOS				N	X^2	P (%)
		1	61	6	[21 + OUTROS]			
1 x 1	40	119			-	119		
	(40,34)	(118,99)			(0,01)			
1 x 61	38	63	69 *	5 *		137	0,02	a 75-90
	(40,94)	(68,50)	(68,08)	(0,42)				
61 x 61	11	8	15	8		31	0,03	b 95-99
	(10,39)	(7,75)	(15,50)	(7,75)				
6 x 1	11	- *	32	2 *	- *	34	1,00	a 25-50
	(5,52)	(0,79)	(32,99)	(0,21)	(0,01)			
1 x 21	1	2			1	3	0,33	a 50-75
	(0,20)	(1,50)			(1,50)			
TOTAL	101	192	116	15	1	324		

PEPC*1 = 0,790 ; PEPC*6 = 0,203 X^2 = 7,76 ; g.l.= 1 ; P < 0,01
PEPC*2 = 0,002 ; PEPC*0 = 0,005
* classes somadas para cálculo de X^2
a) g.l.=1
b) g.l.=2

TABELA 3.15 - PGM3: Segregação fenotípica em 117 famílias com 326 descendentes e distribuição populacional de tipos de cruzamentos.

CRUZAMENTO		DESCENDÊNCIA					
TIPO	N	FENÓTIPOS			N	X^2	P(%)
		1	21	2			
1 x 1	29 (32,97)	77			77		
1 x 21	58 (49,12)	81 (75,5)	70 (75,5)		151	0,80 [a]	25-50
21 x 21	11 (18,30)	15 (12,75)	22 (25,5)	14 (12,75)	51	1,00 [b]	50-70
2 x 21	9 (6,82)		14 (10,5)	7 (10,5)	21	2,33 [a]	10-25
1 x 2	10 (9,14)		26		26		
TOTAL	117	173	132	21	326		

PGM3*1 = 0,729 $X^2 = 5,60$; g.l. = 3 ; $0,20 > P > 0,10$

a) g.l.=1
b) g.l.=2

3.3 Ligação factorial

As relações de ligação factorial entre ME2 e 27 sistemas genéticos, apresentam-se na tabela 3.16, onde os valores de "lod scores" foram discriminados em função da informação de segregação (materna ou paterna).

Por sua vez, a tabela 3.17 diz respeito aos valores de "lod scores" obtidos entre os pares de loci do grupo de ligação integrando PEPC, F13B e HF, e entre estes e FY.

TABELA 3.16
Análise de ligação entre ME2 e 27 sistemas genéticos.

SISTEMA GENÉTICO	INFOR. SEGRE.*	FRACÇÃO DE RECOMBINAÇÃO						NÚMERO	
		0,01	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	FAM.	DESC.
ABO									
	P	-24,35	-12,18	-7,30	-3,04	-1,13	-0,25	12	43
	M	-18,68	-8,71	-4,86	-1,72	-0,52	-0,09	11	44
ACP1									
	P	-17,35	-8,60	-5,12	-2,12	-0,79	-0,18	10	33
	M	-2,80	-1,44	-0,89	-0,39	-0,15	-0,04	2	4
ALAD									
	P	-7,01	-3,61	-2,22	-0,97	-0,38	-0,09	3	10
	M	-3,62	-1,65	-0,90	-0,31	-0,10	-0,02	3	11
AMY2									
	P	-2,73	-0,81	-0,15	0,25	0,24	0,09	5	14
	M	-0,82	-0,21	-0,01	0,07	0,05	0,02	3	7
BF									
	P	-6,13	-2,81	-1,54	-0,52	-0,14	-0,02	3	15
	M	-10,63	-5,25	-3,12	-1,28	-0,48	-0,11	5	20
C3									
	P	-1,40	-0,72	-0,44	-0,19	-0,08	-0,02	1	3
	M	-3,62	-1,63	-0,87	-0,26	-0,06	-0,00	2	10
ESD									
	P	-5,84	-2,57	-1,36	-0,43	-0,12	-0,02	6	18
	M	-2,15	-0,32	0,25	0,47	0,33	0,11	8	20
F13A									
	P	-13,30	-5,48	-2,59	-0,49	0,08	0,09	16	46
	M	-12,50	-5,36	-2,73	-0,80	-0,19	-0,03	17	46
F13B									
	P	-10,92	-5,51	-3,33	-1,42	-0,54	-0,12	6	20
	M	-3,26	-0,78	0,02	0,41	0,32	0,11	7	22
FUCA1									
	P	-6,72	-3,35	-2,00	-0,84	-0,31	-0,01	6	13
	M	-9,16	-3,95	-2,01	-0,57	-0,11	-0,07	13	31
FY									
	P	-15,87	-7,23	-3,91	-1,25	-0,30	-0,03	12	41
	M	-9,96	-4,07	-1,86	-0,22	0,24	0,17	10	34
GALT									
	P	-9,81	-5,05	-3,11	-1,36	-0,53	-0,12	4	18
	M	-3,91	-1,91	-1,12	-0,45	-0,16	-0,04	1	8
GC									
	P	-10,05	-4,74	-2,69	-1,02	-0,35	-0,07	9	25
	M	-8,86	-3,63	-1,68	-0,25	0,13	0,09	8	30
GLO1									
	P	-8,06	-3,50	-1,82	-0,56	-0,14	-0,02	9	27
	M	-11,45	-5,46	-3,13	-1,21	-0,42	-0,09	8	27

* INFORMAÇÃO DE SEGREGAÇÃO: P- Paterna ; M- Materna

TABELA 3.16 - continuação.

SISTEMA GENÉTICO	INFOR. SEGRE.*	FRACÇÃO DE RECOMBINAÇÃO						NÚMERO	
		0,01	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	FAM.	DESC.
GOT2									
	P	-11,21	-5,77	-3,55	-1,55	-0,61	-0,14	2	18
	M	-2,80	-1,44	-0,89	-0,39	-0,15	-0,04	2	4
GPT									
	P	-15,88	-7,29	-4,01	-1,40	-0,43	-0,08	12	43
	M	-5,55	-2,32	-1,14	-0,30	-0,06	-0,00	8	21
HF									
	P	-4,95	-1,76	-0,64	0,07	0,16	0,06	9	25
	M	-2,15	-0,30	0,28	0,52	0,37	0,12	6	19
HP									
	P	-7,24	-3,30	-1,80	-0,63	-0,20	-0,04	8	20
	M	-1,40	-0,72	-0,44	-0,19	-0,08	-0,02	1	2
ORM1									
	P	-9,46	-4,20	-2,22	-0,70	-0,18	-0,02	10	28
	M	-7,83	-3,81	-2,23	-0,90	-0,33	-0,07	5	16
PEPC									
	P	-12,84	-6,14	-3,50	-1,29	-0,40	-0,07	6	28
	M	-10,34	-4,99	-2,90	-1,15	-0,41	-0,09	7	23
PGM1									
	P	-23,70	-11,08	-6,21	-2,24	-0,71	-0,14	17	62
	M	-11,38	-4,85	-2,43	-0,62	-0,07	0,02	14	37
PGM3									
	P	-12,70	-4,93	-2,10	-0,14	0,26	0,13	15	47
	M	-22,08	-10,71	-6,25	-2,50	-0,90	-0,20	14	51
PGP									
	P	-9,81	-5,05	-3,11	-1,36	-0,53	-0,12	4	14
	M	-0,81	-0,19	0,02	0,12	0,10	0,03	2	5
PLG									
	P	-13,14	-6,44	-3,79	-1,54	-0,56	-0,13	11	29
	M	-9,46	-4,20	-2,22	-0,70	-0,18	-0,02	9	28
RH									
	P	-18,45	-9,06	-5,35	-2,18	-0,80	-0,18	15	40
	M	-24,52	-11,29	-6,22	-2,17	-0,66	-0,12	21	66
TF									
	P	-1,40	-0,72	-0,44	-0,19	-0,08	-0,02	1	2
	M	-1,40	-0,72	-0,44	-0,19	-0,08	-0,02	1	2
UMPK									
	P	-2,80	-1,44	-0,89	-0,39	-0,15	-0,04	1	4
	M	-7,24	-3,28	-1,77	-0,58	-0,16	-0,02	5	19

* INFORMAÇÃO DE SEGREGAÇÃO: P - paterna; M - materna.

TABELA 3.17
Relações de ligação entre PEPC, F13B, HF e FY.

PAR DE LOCI	INFOR. SEGRE.*	FRACÇÃO DE RECOMBINAÇÃO							NÚMERO		θ Máx	Z
		0,001	0,01	0,05	0,10	0,20	0,30	0,400	FAM.	DESC.		
PEPC-HF												
	P	3,01	3,89	4,08	3,73	2,69	1,54	0,51	11	30	0,03	4,12
	M	-2,99	-0,09	1,54	1,86	1,58	0,94	0,30	10	30	0,11	0,87
PEPC-F13B												
	P	6,91	6,78	6,21	5,48	4,00	2,40	0,88	9	32	0,00	6,92
	M	4,50	4,40	3,96	3,40	2,27	1,19	0,34	10	25	0,00	4,51
F13B-HF												
	P	6,01	5,90	5,40	4,76	3,42	2,02	0,69	8	28	0,00	6,02
	M	0,60	1,53	1,89	1,78	1,24	0,65	0,18	8	20	0,05	1,89
PEPC-FY												
	P	-22,47	-12,55	-5,90	-3,33	-1,22	-0,39	-0,08	9	31	-	-
	M	-34,46	-19,56	-9,51	-5,54	-2,19	-0,77	-0,17	11	43	-	-
F13B-FY												
	P	-18,58	-10,62	-5,23	-3,08	-1,23	-0,44	-0,09	6	21	-	-
	M	-22,77	-12,85	-6,18	-3,58	-1,40	-0,50	-0,11	9	31	-	-
HF-FY												
	P	-6,29	-3,32	-1,37	-0,65	-0,13	0,01	0,01	4	12	-	-
	M	-10,79	-5,84	-2,57	-1,36	-0,43	-0,12	0,02	7	20	-	-

* INFORMAÇÃO DE SEGREGAÇÃO: P - paterna; M - materna.

4 . DISCUSSÃO

4.1 Genética Bioquímica

Tal como inicialmente explicitámos, um dos objectivos primordiais deste trabalho incide sobre a pesquisa de variabilidade genética de funções bioquímicas susceptíveis de demonstração na fracção sanguínea que se designa por leucocitária, desde que essas mesmas funções não fossem detectáveis em material biológico de mais fácil manipulação - caso de glóbulos vermelhos ou plasma - ou que a sua demonstração em leucócitos constituísse uma potencialização técnica ou económica das respectivas fenotipagens.

Tendo em vista a sua posterior utilização na investigação da filiação biológica, a análise foi

selectivamente canalizada para a heterogeneidade genética determinada por loci na situação de polimorfismo e, simultaneamente, por uma fenotipagem que garantisse, do ponto de vista técnico, um grau de reprodutibilidade, de facilidade de rotina e de custo financeiro global compatíveis com os padrões exigidos pela potencial aplicação.

Os resultados apresentados referem-se àquelas funções bioquímicas que, no conjunto das investigadas no decurso do trabalho, se consideraram corresponder, em rigor, às condições enunciadas.

O seu número é bem o reflexo das dificuldades que a fenotipagem de marcadores leucocitários apresenta e que está de igual forma patente na relativa escassez de publicações que envolvem esse tipo de polimorfismos.

Tais dificuldades, que procurámos, dentro do possível, ultrapassar, prendem-se, em grande parte, com três aspectos, mutuamente condicionantes, e que é importante salientar.

O primeiro problema surge, desde logo, com a reduzida quantidade de extracto leucocitário que se obtem com o volume de sangue por norma recolhido.

Aumentar a quantidade de sangue a colher em cada indivíduo, era uma solução a que não interessava recorrer, dada a eventual pouca aceitação por parte de alguns dadores, acrescida da dificuldade de execução na faixa etária mais baixa dos mesmos.

Procurou-se, por isso, a partir dos habituais 8-10ml

de volume total de sangue, utilizar um processo de separação que resultasse no mínimo desperdício da fracção leucocitária.

A utilização de dextrano como meio macromolecular em que a sedimentação era induzida, revelou-se bastante eficaz, dado que promovia uma rápida deposição dos eritrócitos e, por consequência, uma separação de leucócitos facilitada. Além do mais, tinha a vantagem de ser um produto bastante mais económico do que outros compostos para o efeito generalizados. Por outro lado, a remoção progressiva da fracção não eritrocitária à medida que a eritrocitária ia sedimentando, ainda que fastidiosa, proporcionava volumes de extractos leucocitários que compensavam a morosidade da tarefa.

Um segundo tipo de dificuldades que surge com frequência quando se trabalha com extractos leucocitários, advem do facto de, para muitos loci de funções bioquímicas, os níveis de actividade aí encontrados serem francamente baixos, sobretudo quando comparados com os observados em outros tecidos ou orgãos em que os mesmos loci também se expressam.

Para algumas enzimas agora investigadas, em especial ME2 e PGM3, a análise em leucócitos não constitui, propriamente, o material de mais fácil investigação, por se registarem aí níveis de actividade muito próximos dos liminares de detecção qualitativa.

Por isso, e sobretudo para estas duas enzimas, a preparação do leucolisado constitui, do ponto de vista

técnico, uma fase bastante crítica: um tratamento preparativo menos cuidado ou adequado pode resultar em perda considerável de actividade enzimática, com consequente compromisso da possibilidade de a detectar.

Nessa medida, testaram-se diversos processos de preparação do leucolisado, dos quais os dois apresentados no ponto 2.3 foram os que lograram proporcionar melhores padrões electroforéticos, pelo que passaram a ser utilizados como tratamento de rotina.

O primeiro, em que o meio de extracção era constituído apenas por H_2O, e em que as células eram submetidas a uma sonicação ligeira, revelou ser o mais apropriado para as enzimas localizadas no citoplasma celular, ou seja, PGM3, F13A e PEPC. Em contrapartida, para as enzimas localizadas no interior de organitos celulares, caso das enzimas mitocondriais ME2 e GOT2 ou da enzima lisossómica FUCA1, o tratamento mais eficaz foi o segundo, isto é, aquele em que as células eram submetidas a uma sonicação mais forte e em que, como solução de extracção, se utilizava uma mistura de detergentes não-iónicos (Triton 100x e octyl-β-D-gluco-piranosideo).

Como para nenhuma das três enzimas referidas se notou qualquer perturbação do padrão de migração electroforética após tratamento com aqueles reagentes, é provável que estes actuem apenas ao nível da solubilização de fragmentos de membrana contendo compostos que pudessem estar ligados às proteínas em causa.

Por fim, refira-se um terceiro tipo de problemas que a fenotipagem de marcadores leucocitários apresenta e que têm a ver com características intrínsecas do próprio material biológico.

A fracção leucocitária, e agora falamos em leucocitária no sentido estrito, é composta por uma população celular mista em que todos os constituintes celulares se caracterizam por apresentarem sistemas muito activos, não apenas de síntese, mas também, e em particular, dado o tipo de investigação em causa, sistemas muito activos de degradação proteica, nestes incluindo proteases muito eficazes. Isto estará na origem do envelhecimento extremamente rápido a que está sujeito este tipo de material biológico, envelhecimento esse a que algumas funções enzimáticas são particularmente sensíveis.

ME2 foi das enzimas investigadas aquela que se revelou mais vulnerável ao envelhecimento, apresentando uma diminuição acelerada de actividade catalítica que resultava em perda total de actividade. Também PGM3 e PEPC manifestaram efeitos marcados da degradação da amostra, que se traduziam por um aumento considerável das suas reactividades a radicais SH, o que resultava no aparecimento de isoenzimas mais acídicas, dificultando ou inviabilizando até a diferenciação das formas normais.

De igual modo, e no que concerne a GOT2, era frequente observar-se em extractos pouco frescos diversas isoenzimas adicionais, mas estas originadas por desaminação

progressiva das formas mais jovens (Williams e John, 1979; Gracy, 1983).

F13A e FUCA1 foram os loci de funções bioquímicas mais tolerantes ao envelhecimento da amostra, pelo menos em comparação com os outros investigados.

O aparecimento de "artefactos" ou a inibição progressiva da actividade enzimática são factores que perturbam a leitura correcta dos fenótipos e comprometem a credibilidade da própria fenotipagem. Por isso, procurou-se, dentro do possível, evitar que os efeitos do envelhecimento da amostra se fizessem sentir.

Assim, deu-se particular cuidado ao processo de armazenamento: o sangue foi sempre tratado num período que não excedeu as 24 horas após a colheita e, na impossibilidade de proceder de imediato às correspondentes fenotipagens, os extractos leucocitários foram armazenados a -20°C, imergindo os tubos em acetona liquída para promover um congelamento mais rápido.

Uma vez descongeladas, as amostras nunca foram reusadas e procedeu-se às fenotipagens no menor prazo possível após a colheita.

Constatou-se que, em geral, resultados plenamente satisfatórios eram obtidos em extractos com menos de um mês de armazenamento, mas, após esse período, a frequência com que surgiam dificuldades de fenotipagem, especialmente para ME2, desaconselhava exceder tal período para proceder às respectivas análises.

Como termo de comparação é de referir que para a maioria dos marcadores eritrocitários ou plasmáticos, e salvo excepções pontuais, a fenotipagem é possível, sem problemas de maior, em amostras armazenadas nas condições idênticas às atrás referidas, por períodos superiores, e para não se errar por excesso, a 1 ou 2 anos.

Tais dificuldades limitam a investigação neste tipo de material biológico e impõem uma gestão cuidadosa da sua utilização, tanto mais quanto pretendíamos a fenotipagem simultânea de diversos marcadores a partir do mesmo extracto leucocitário, na tentativa de explorar ao máximo o seu potencial grau de informação.

Naturalmente, vimo-nos obrigados a limitar o número de funções bioquímicas pesquisadas, até porque, à excepção de GOT2 e ME2 que com sucesso se pôde fenotipar conjuntamente, todos os outros sistemas genéticos exigiam técnicas analíticas individuais, o que se traduzia, na prática, pelo gasto na totalidade de uma dada amostra leucocitária.

Também a reduzida quantidade de amostra condicionou, em parte, a selecção das próprias técnicas analíticas. Assim, recorreu-se sempre àquelas que, sem perda de poder discriminante, exigissem a mínima quantidade de extracto leucocitário, mesmo que tal correspondesse a um ligeiro compromisso da vertente económica da fenotipagem.

No geral, quanto à estratégia tecnológica utilizada, pode dizer-se que a nossa preocupação dominante foi

potencializar técnicas de fenotipagem, em leucócitos, de marcadores electroforéticos, na convicção de que tal poderia resultar num rendimento analítico global positivo em relação a parâmetros como reprodutibilidade, praticabilidade ou custo por fenotipagem.

Parece oportuno, entretanto, tecer algumas considerações de índole técnico-analítica sobre cada um dos polimorfismos investigados.

4.1.1 F13A

Desde a técnica apresentada por Board (1979) quando descreve, pela primeira vez, o polimorfismo genético do F13A, uma variedade considerável de metodologias foi, subsequentemente, aparecendo para a determinação dos fenótipos correspondentes.

As metodologias diferem, desde logo, pelo tipo de técnicas utilizadas: electroforese convencional em gel de agarose, ou, segundo a tendência mais generalizada nos últimos anos, focagem isoeléctrica em gel de agarose ou poliacrilamida.

Por sua vez, a técnica analítica parece ser condicionante do processo de visualização dos produtos génicos do F13A. Com efeito, verifica-se que as fenotipagens por focagem isoeléctrica se acompanham, sistematicamente, de vias de detecção imunológica, quer por técnicas convencionais (Weidinger et al 1983; Eiberg et al 1984), quer pelo mais

sofisticado processo de "imunoblotting" (Dykes et al, 1986; Suzuki et al, 1986; Stahl e Mayr, 1990), enquanto que as fenotipagens por electroforese em agarose recorrem, de preferência, à detecção funcional, tirando partido da actividade transglutaminásica das cadeias A pré-activadas por trombina e $CaCl_2$ (Graham et al 1984; Castle e Board, 1985).

Esta selectividade quanto aos processos de visualização dos fenótipos do F13A não será, por seu lado, alheia ao tipo de material biológico em que o polimorfismo é, por norma, investigado: plasma ou plaquetas. Na realidade, em trabalhos com plaquetas, têm sido obtidos, de forma indiscriminada, resultados satisfatórios por detecção funcional ou imunológica, mas, pelo contrário, em trabalhos com plasma, a detecção funcional tem-se revelado manifestamente insuficiente, e só a grande sensibilidade da via imunológica parece permitir a obtenção de fenotipagens inequívocas.

Tal não será de estranhar se se entender que cerca de 50% do conteúdo sanguíneo do F13A é providenciado pelas plaquetas (McDonagh et al, 1969), e daí o sucesso da detecção funcional neste tipo de material biológico.

A multiplicidade de métodos de investigação, e a sua progressiva sofisticação , não se traduziu, porém, nem numa melhoria significativa do poder de resolução analítico, nem tão pouco num aumento da capacidade de discriminação de heterogeneidade genética. Perante este panorama põe-se, com legitimidade, a questão de saber se a utilização de técnicas

mais sofisticadas na investigação do polimorfismo do F13A compensará, em termos analíticos, o aumento do custo financeiro da fenotipagem que tais técnicas, de forma intrínseca, acarretam.

Pelo menos, para a detecção dos produtos génicos comuns, tal não se justifica a não ser como mero exercício de preciosismo laboratorial. É nessa convicção que a técnica que se utilizou se afigura, no global, como bastante vantajosa, já que consegue articular, em simultâneo, um conjunto de parâmetros que, do ponto de vista técnico-analítico, nos parecem francamente positivos.

De facto, é de acentuar que:

1º - Recorre a uma convencional electroforese em gel de agarose, técnica muito simples quanto à execução laboratorial e, em termos financeiros, muito pouco onerosa. O facto de o tampão das pontes poder ser reusado só vem reforçar este último aspecto.

É uma técnica de grande reprodutibilidade e com poder de resolução bastante fino, como ilustra a Fig.1 (ver APÊNDICE 2) em que estão fotográficamente documentados os padrões electroforéticos observados por rotina quanto ao F13A.

2º - É uma técnica em que os produtos génicos são detectados pelas propriedades enzimáticas e não pelas características imunológicas. Sempre que possível, é preferível optar por detecções funcionais em detrimento das

imunológicas, pois para além de serem, em geral, menos onerosas do que as segundas, a via imunológica tem a desvantagem de não ter sensibilidade para alelos que, sem alteração das propriedades imunológicas, surjam por mutações ao nível do local activo, isto é, para alelos com actividade enzimática nula ou alterada quantitativamente.

No caso do F13A, está até descrita uma disfunção de coagulação (Castle e Board, 1983; Ichinose e Davie, 1988), provocada, em alguns casos, não pela ausência de cadeias A, mas pelo facto de serem destituídas de actividade enzimática (Mackee, 1983).

Embora a frequência do alelo responsável pela afecção seja muito baixa, no caso específico do F13A, e até como medida de precaução, a via mais adequada para a visualização dos seus produtos génicos é a detecção funcional.

3º - Finalmente, porque sendo uma técnica que exigia de preferência, um material biológico que possibilitasse a detecção funcional, permitiu recorrer a uma fracção sanguínea cuja obtenção dispensou qualquer trabalho preparativo suplementar. Com efeito, ao contrário de outros investigadores que utilizam este método de detecção, não vimos necessidade de proceder a um tratamento diferencial para a selecção de plaquetas. O processo de separação dos componentes sanguíneos utilizado permite obter, como já foi dito, uma fracção celular mista, rica não apenas em glóbulos brancos mas também em plaquetas.

Entretanto, está também demonstrada a presença de F13A em alguns tipos de leucócitos, nomeadamente em monócitos (Boda et al, 1989). Daí que a simples utilização da fracção "leucocitária", enriquecida em células possuidoras de F13A, possa facultar concentrações suficientes deste factor de coagulação para viabilizar a sua detecção funcional.

Saliente-se, por último, que a detecção funcional se revelou absolutamente inoperante quando, em vez de leucolisados, se experimentou utilizar amostras de plasma.

4.1.2 FUCA1

Os padrões electroforéticos observados comummente em relação a FUCA1 estão apresentados na Fig. 2 (ver APÊNDICE 2). Para a sua determinação, utilizou-se uma técnica de focagem isoeléctrica em gel de poliacrilamida, com gradiente de pH enriquecido entre 4 e 7, gama de pH em que se enquadram os pontos isoeléctricos da maioria das isoenzimas de α-FUCA.

Aliás, à excepção dos trabalhos primordiais sobre FUCA1 efectuados por electroforese em gel de amido (Turner et al, 1974), todos os subsequentes usam, por sistema, técnicas de focagem isoeléctrica em gel de poliacrilamida uma vez que, em termos de resolução, proporcionam resultados francamente melhores que os passíveis de obter por técnicas mais convencionais.

Do ponto de vista técnico, o aspecto mais delicado que esta função bioquímica apresenta, surge em consequência de

existirem múltiplas formas isoenzimáticas de α-FUCA, resultantes da coexistência de diferentes estados de glicolização (Alhadeff et al, 1976; O'Brien et al, 1987; Dicioccio e Brown, 1988) da cadeia primária da enzima e cujo teor em resíduos de ácido siálico é, em parte, determinante do seu comportamento electroforético (Kress et al, 1980).

Por essa razão, quando se utilizam leucolisados nativos, é possível observar, após focagem isoeléctrica, entre 8 a 10 formas de α-FUCA, ao passo que quando as amostras são submetidas a tratamento de dessialização por neuraminidase se assiste a uma diminuição do número de isoenzimas, para 6 a 8, por desaparecimento das mais acídicas, e concomitante aumento de actividade das mais catódicas, sugerindo, de facto que as formas mais acídicas resultam da ligação de resíduos de ácido siálico à enzima.

Em amostras não dessializadas, a presença de um número muito grande de isoenzimas perturba, consideravelmente, a discriminação da variabilidade genética determinada por FUCA1, pelo que um tratamento prévio e eficiente das amostras com neuraminidase deve ser tido como fulcral para uma correcta leitura dos fenótipos correspondentes.

4.1.3 GOT2

Pelo facto de este locus marcador se encontrar nas populações até agora estudadas, Portugal inclusivé, numa

situação muito próxima do limiar de polimorfismo, tem sido relegado, um pouco inevitavelmente, para um plano secundário em termos de prioridades de investigação.

Não se considerou, no entanto, que à partida se lhe devesse dedicar menor atenção e procurou-se, até, recorrer a técnicas menos convencionais na expectativa de poder revelar heterogeneidade genética ainda não aparente. Estes propósitos, porém, não lograram ir além do estabelecimento de uma técnica de focagem isoeléctrica que, apesar de proporcionar excelentes padrões fenotípicos, não revelou mais que os alelos já descritos GOT2*1, GOT*2 ou GOT2*3.

Assim, não vimos interesse em adoptar qualquer uma das técnicas agora referidas como alternativa à técnica electroforética de rotina apresentada no ponto 2.4.3, até porque esta última era também utilizada, e em simultâneo, para a determinação dos fenótipos de ME2. Preterí-la em favor de qualquer outra equivaleria, por conseguinte, não apenas a um duplo acréscimo de encargos financeiros, e duplo porque tal corresponderia à introdução de uma técnica suplementar, ainda por cima intrinsecamente mais onerosa, mas ainda a um acréscimo sem contrapartida de trabalho laboratorial.

Pelos mesmos motivos, e ao contrário do que Toyomatsu et al (1984) sugerem, a fenotipagem de GOT2 em amostras de plasma não nos parece uma alternativa a adoptar. Para além do mais, os níveis séricos de GOT2 são normalmente baixos e estão muito sujeitos a flutuações quantitativas

determinadas por condições fisiológicas diversas (Pol et al, 1989).

Pode-se afirmar que a prossecução dos estudos de GOT2 só foi incentivada por ser possível proceder às correspondentes determinações fenotípicas em boas condições (ver Fig.3 do APÊNDICE 2) conjuntamente com ME2, esse, sim, marcador de grande interesse na investigação da filiação biológica. O reduzido grau de informação de GOT2 quanto a este aspecto não justificaria, se tal fosse necessário, um empenhamento que lhe fosse dirigido em especial.

4.1.4 ME2

A referência a dificuldades de fenotipagem de ME2 em leucócitos continua ainda a ser uma constante, apesar de, pelo menos desde 1979, Siebert et al terem demonstrado ser possível fazê-lo sem grandes problemas.

A maioria dos investigadores que se debruçou sobre este polimorfismo tem, contudo, preferido usar materiais biológicos de mais difícil acesso: prepúcios (Cohen e Omenn, 1979), fibroblastos de cultura (Povey et al, 1975), tecido cardíaco (Papiha et al, 1989), Burchell et al, 1977), ou, com mais frequência, amostras de cérebro (Ghosh et al 1980; Bhattacharyya e Saha 1984, Papiha et al 1989, entre outros).

A opção é consentânea com o facto de os níveis de actividade da enzima aí encontrados serem bastante elevados, facilitando, naturalmente, a detecção dos produtos genéticos

determinados por ME2.

Contudo, tal como Siebert et al, ou mesmo Amorim (1983), considera-se também que a determinação dos fenótipos de ME2 é absolutamente viável em amostras leucocitárias. É verdade que a concentração de ME2 ao nível deste tipo de células é tão baixo que a sua detecção, como atrás já se referiu, requer cuidados redobrados, em particular em torno da manipulação da amostra e das condições da sua conservação.

Não descurando tais aspectos, é possível obter bons padrões electroforéticos de ME2 em leucócitos, como se pretende ilustrar na Fig.4 (ver APÊNDICE 2) em que estão apresentados os fenótipos comuns que observámos para este marcador genético.

4.1.5 PEPC

Há que reconhecer que o estudo deste polimorfismo foi, em grande, parte determinado por aquilo a que se pode chamar um feliz conjunto de casualidades. Na realidade, o propósito inicial incidia sobre a pesquisa de variabilidade genética de uma outra peptidase - PEPA. Com base nos resultados apresentados por Lewis (1973), procurava-se evidenciar em leucócitos a existência dos alelos PEPA*1 e PEPA*8.

Porém, apesar de se ter observado alguma heterogeneidade quanto à expressão fenotípica de PEPA, não se conseguiu sistematizar as diferenças encontradas e, deste

modo, não foi possível esclarecer o mecanismo, genético ou não, subjacente a tal variabilidade, nem tão pouco confirmar o modelo de transmissão postulado por Lewis, mesmo quando na aparência se reproduziu as suas condições de fenotipagem.

Se exceptuarmos uma pseudo confirmação que se referirá a seguir, mais nenhuma equipa de investigação pôde comprovar a existência de polimorfismo genético para o locus PEPA (Kühnl et al, 1979).

Quanto aos presentes resultados,embora pareçam não corroborar mais uma vez esta hipótese, também não favorecem, de forma linear, a hipótese contrária. Com efeito, a variabilidade fenotípica registada, ainda que não reprodutível ou interpretável nas condições testadas, pode apenas significar que ainda não tenha sido encontrada a forma mais adequada para a sua investigação.

Nessa altura, usavam-se como padrões de referência algumas amostras que haviam sido fenotipadas supostamente para PEPA no Institut für Anthropologie und Humangenetik de Tübingen, por recurso a um sistema electroforético descrito por Kömpf et al (1979) para a investigação do que consideraram ser PEPA. Tal suposição havia sido fundamentada na semelhança de frequências populacionais dos produtos génicos detectados com aquele sistema e as reportadas por Lewis.

Notou-se, de imediato, a discrepância de fenótipos obtidos quando as mesmas amostras eram submetidas a

electroforese nas condições descritas por Kömpf et al ou por Lewis .

Por coincidência, num estudo de ligação factorial conduzido pela própria equipa de investigação alemã (Kömpf et al, 1988), indicava-se forte ligação entre o locus que designaram PEPA e um locus marcador do cromossoma 1 (HF), o que estranhamente contrariava a localização definitiva de PEPA no cromossoma 18 (Creagan et al, 1973).

Perante os resultados, instalou-se a dúvida quanto à forma peptidásica cuja heterogeneidade era discriminada pelas duas técnicas electroforéticas em jogo.

Teve-se, então, oportunidade de colaborar na elaboração e execução de um protocolo experimental que permitiu esclarecer a dúvida com que nos deparávamos.

Para tal, foram decisivas as seguintes observações:

1 . Quanto à especificidade de substrato

Duas formas enzimáticas apresentavam afinidade para o substrato, leucil-alanina, que se utilizava por rotina para a visualização da actividade peptidásica e, consequentemente, com uma só solução de coloração desenvolviam-se duas zonas de actividade.

Quando, porém, se substituía, na solução de incubação, leucil-alanina pelo dipéptido valil-alanina, apenas se observava o aparecimento da zona de actividade menos anódica.

De acordo com estudos prévios de afinidade diferencial de substratos (Lewis e Harris 1967; Rapley et al, 1971), a zona menos anódica seria a determinada por PEPA, dado que PEPC é incapaz de hidrolizar valil-alanina.

Em relação ao dipéptido leucil-alanina, PEPC manifestava uma reactividade um pouco mais acentuada que PEPA.

2 . Quanto à estrutura quartenária

No "sistema Kömpf", o padrão electroforético dos presumíveis heterozigóticos era constituído por apenas duas bandas principais (abstração feita das isoenzimas secundárias), ou seja, um padrão típico de uma enzima monomérica. Estudos anteriores, e já referidos, haviam demonstrado que este seria o tipo estrutural de PEPC, enquanto que, pelo contrário, PEPA seria, estruturalmente, um dímero. Assim sendo, a heterogeneidade genética observada no "sistema Kömpf" seria, ao contrário do que de início se supunha, determinada por PEPC e, por exclusão de hipóteses, a outra zona de actividade peptidásica, a menos anódica, seria referente a PEPA.

Face a tais observações, uma análise comparativa mais crítica dos resultados globais permitiu concluir o seguinte:

1º. A peptidase que mais se evidenciava no "sistema Kömpf" era na realidade PEPC e, portanto, a variabilidade genética, supostamente atribuída a PEPA, dizia de facto

respeito a PEPC.

Neste sistema, PEPA aparece muito próximo da zona de aplicação das amostras, dando azo a que, em corridas electroforéticas não prolongadas o suficiente, se confunda com a zona daquilo a que poderemos designar "actividade residual" determinada por detritos celulares que ficam, por norma, retidos na origem. Daí que esta peptidase tivesse passado relativamente desapercebida.

2º. No "sistema Lewis", ambas as peptidases ficam bem individualizadas. PEPC aparece junto à frente do tampão sem manifestar variação. Em oposição, o sistema discrimina heterogeneidade electroforética ao nível da zona de actividade peptidásica mais lenta determinada por PEPA.

Foi, pois, perante esta situação que nos vimos, de certa forma, impelidos ao estudo do polimorfismo genético de PEPC.

Na Fig.5 (ver APÊNDICE 2) está fotograficamente representado um zimograma dos padrões electroforéticos que observámos.

Por norma, as determinações fenotípicas foram feitas em leucolisados, embora ocasionalmente tivéssemos recorrido a amostras de glóbulos vermelhos. Na realidade, PEPC expressa-se, quer em glóbulos brancos, quer em glóbulos vermelhos, mas, em geral, o nível de actividade nestes últimos é bastante mais baixo.

Por outro lado, observa-se em hemolisados o

aparecimento de isoenzimas secundárias com actividade muito mais marcada do que em leucócitos. É possível que estas isoenzimas surjam, em parte, por reacção com glutationa oxidada, abundante, em especial, em eritrócitos, suposição que se baseia no facto de os padrões electroforéticos de PEPC apresentarem alguma reversibilidade consoante as amostras se submetiam ou não a tratamento com DTT.

As melhores definições fenotípicas de PEPC foram obtidas quando este tratamento era efectuado e, sem dúvida, sempre que se utilizaram extractos leucocitários.

O recurso, por rotina a glóbulos brancos em detrimento dos vermelhos foi ainda incentivado por se conhecer a existência de, pelo menos, um alelo, PEPC*4, indetectável em glóbulos vermelhos (Povey et al, 1972). Os autores consideram que o produto génico de PEPC*4 apresentará, possivelmente, termolabilidade muito elevada e, em consequência, será mais sujeito a uma degradação precoce.

Apesar de os glóbulos vermelhos serem possuidores de longevidade considerável, são incapazes de efectuar síntese proteíca no estado maduro (que corresponde, como se sabe, à quase totalidade da fase de circulação na corrente sanguínea) e, portanto, não admira que não expressem, ou expressem de modo deficiente, uma forma enzimática que cedo entrou em processo de degradação sem que tivesse sido possível proceder à respectiva substituição. Pelo contrário, os leucócitos mantêm sempre activo o mecanismo de síntese proteíca durante todo o período de vida, pelo que alelos do tipo de PEPC*4,

incluindo este, possam aqui ser pesquisados com maior probabilidade de êxito.

Até à data, não se detectou a presença desse alelo na população portuguesa, mas, por princípio, a alternativa que oferecerá maior credibilidade à própria fenotipagem será a pesquisa de PEPC em leucócitos.

Para finalizar, não podemos deixar de referir um inconveniente, que talvez não seja menor, em torno da investigação do polimorfismo de PEPC e que diz respeito à componente financeira: em média, o preço da fenotipagem de PEPC atinge valores bastante superiores aos da maioria dos outros marcadores investigados. Tal é determinado pela utilização, nos tampões, de uma espécie molecular muito dispendiosa, histidina-HCl, característica potenciada por se tratar de um produto altamente instável.

A situação só ficou um pouco minorada por se ter conseguido reusar duas a três vezes o tampão das pontes desde que as soluções dos compartimentos negativo e positivo fossem armazenadas separadamente, e só misturadas na altura da utilização seguinte.

De qualquer forma, é um parâmetro que condiciona a utilização sistemática deste marcador genético, questão que retomaremos mais tarde (ponto 4.2.3).

4.1.6 PGM3

Problemas de fenotipagem idênticos aos referidos

para ME2 envolvem também o polimorfismo de PGM3, sendo mais uma vez resultantes dos baixos níveis de actividade encontrados na maioria dos tecidos ou orgãos humanos. Não é, pois, de estranhar que quase todas as investigações sobre PGM3 se tenham servido de extractos placentários como material biológico (Hopkinson e Harris, 1968; Donald, 1977; Corbo et al, 1980; Melo et al, 1988; entre outros).

Contudo, alguns autores (Scheil e Scheffrahn, 1987; Günther, 1982 ou Bissbort et al, 1975), conseguem também fenotipar PGM3 utilizando aquilo que denominam hemolisados como fonte de enzima. Uma análise mais atenta desses trabalhos permite, porém, deduzir que o termo "hemolisados" não corresponde, na verdade, ao seu significado estrito.

Na realidade, a separação dos componentes sanguíneos não é feita diferencialmente, limitando-se os autores a separar a fracção celular do sangue da plasmática. Aquilo que referem como hemolisado é resultante, não só da lise de eritrócitos, como o termo sugeriria, mas também da lise de glóbulos brancos, população celular que será de facto a responsável pela possibilidade de aí ser detectado PGM3 (Watter e Ananthakrishnan, 1980).

Para quem pretenda utilizar sangue, o isolamento da fracção leucocitária contituirá o processo mais adequado à investigação de PGM3 (Goedde e Stahn, 1974), na medida em que, concentrando a população celular onde o locus se expressa, possibilita uma detecção mais cómoda da heterogeneidade genética que lhe está associada. Por outro lado, trabalhar com

leucolisados permite reduzir as concentrações de alguns substractos utilizados na solução de incubação, nomeadamente glucose-1-fosfato e desidrogenase da glucose-1-fosfato, para o nível das utilizadas em placenta, concentrações por norma muito inferiores e, consequentemente, menos dispendiosas que as exigidas pelos trabalhos em "hemolisados".

Na Fig.6 (ver APÊNDICE 2), é apresentado um zimograma dos fenótipos comuns de PGM3.

No caso concreto deste marcador, as amostras foram sempre submetidas a um tratamento prévio com DTT, o que induzia uma melhoria significativa dos padrões electroforéticos.

Embora o fenómeno seja bem conhecido, constatou-se que os produtos peptídicos de PGM3 eram muito sujeitos a alterações in vitro ocorrentes no período de armazenamento dos extractos celulares. Em amostras menos frescas, era frequente observar-se o aparecimento de enzimas adicionais, com mobilidade electroforética mais anódica e concominante diminuição da intensidade de coloração das duas isoenzimas principais. O facto destas alterações serem reversíveis após adição de agentes redutores , sugere que as isoenzimas de armazenamento se formem por reacção progressiva dos grupos sulfidril livres de resíduos cisteína, com glutationa oxidada existente na amostra. A fonte principal de glutationa oxidada seria a contaminação dos extractos leucocitários com glóbulos vermelhos. Como o grau de contaminação é variável de amostra para amostra, é impossível controlar o estado de oxidação das

isoenzimas de PGM3, o que cria dificuldades na interpretação dos padrões electroforéticos obtidos. Assim, um fenótipo 2 de uma amostra oxidada pode confundir-se com um 1 não oxidado, ou com um 2-1 se a oxidação não estiver completa.

Como Fisher e Harris (1972) recomendam, o ideal será testar PGM3 em amostras em estado de total oxidação ou de total redução. No nosso caso, optou-se pela segunda alternativa já que DTT manifestou muito boas propriedades redutoras.

4.2 Análise populacional e de segregação

Pôr em prática técnicas de fenotipagem de marcadores genéticos exige, pelo menos de início, o estabelecimento de mecanismos que garantam a segurança das próprias fenotipagens. Tal é, em parte, providenciado pela análise de segregação em pares mãe-filho ou em descendentes de famílias nucleares, estudos que, por sua vez, constituem a metodologia genético-estatística apropriada à confirmação dos modelos genéticos formais dos sistemas a introduzir, e à pesquisa de distorções de segregação eventualmente específicas da população em análise.

Como se depreende, foi imprescindível ter-se realizado esse tipo de estudos que, entre outros aspectos, proporcionaram, indirectamente, um manancial suplementar de resultados do âmbito da genética populacional.

Por outro lado, incluiu-se ainda nas amostras investigadas uma percentagem não negligenciável de indivíduos envolvidos em processos de investigação da paternidade biológica.

Esta conjugação de factores permite apresentar, agora, amostragens populacionais globais de efectivo bastante numeroso. Aliás, do ponto de vista da mera caracterização populacional, tais efectivos poderiam até ser considerados excessivos se, em relação ao critério geográfico, as amostras apresentassem um grande grau de consistência.

Ao integrar, porém, indivíduos envolvidos em exames de paternidade, promoveu-se uma perda considerável de homogeneidade amostral. Com efeito, os respectivos locais de residência ou naturalidade espalhavam-se por regiões de Norte a Sul do país, o que obrigou ao afastamento da metodologia amostral inicialmente formulada e que se baseava, apenas, na caracterização genética da região Norte de Portugal.

Considerou-se, no entanto, que seria, de qualquer modo, interessante não excluir nenhuma região sobre a qual possuíssemos efectivos não excessivamente reduzidos do ponto de vista de análise genético-demográfica.

Assim, para além de se apresentarem resultados globais, e no sentido de diluir possíveis heterogeneidades de ordem geográfica, apresentam-se também resultados parciais obtidos, precisamente por estratificação da amostra total segundo parâmetros de índole geográfica.

Como seria de esperar, ao concentrarmos o "esforço

amostral" na região Norte do país e, em particular, no distrito do Porto, as subamostras obtidas surgem com uma grande desproporção numérica: se para a região Sul do país o número de indivíduos fenotipado nunca atinge as 4 dezenas e na região Centro apenas se aproxima da centena, na região Norte esse valor ultrapassa, em média, os 400 indivíduos, o que nos tentou a efectuar subestratificações por distritos ou zonas.

Conscientes deste desiquilíbrio como fonte de eventuais artefactos estatísticos, não se deixou, todavia, de efectuar uma análise de heterogeneidade interpopulacional, que, bem entendido, não deve ser considerado como mais que preliminar.

O critério adoptado para cada um dos cinco marcadores sobre os quais a análise incidiu, GOT2 excluída, foi o seguinte:

1º - Só foram consideradas amostras cuja distribuição fenótipica interna estivesse de acordo com a esperada segundo a lei de Hardy-Weinberg.

2º - Começou-se sempre por comparar as unidades geográficas consideradas para a região Norte: distrito do Porto e zonas Minho e Trás-os-Montes. À falta de indícios de heterogeneidade interamostral, os resultados globais desta região foram utilizados na fase seguinte da análise que incidiu sobre a comparação entre as três grandes regiões do país: Norte, Centro e

Sul. Caso contrário, o teste foi efectuado considerando todas as amostras como entidades autónomas.

3º - A interpretação dos resultados foi sempre feita sob reserva, procurando articulá-los no contexto das fortes desigualdades de efectivos amostrais de que dispúnhamos.

Testes de heterogeneidade foram também aplicados à comparação entre amostras de indivíduos naturais e residentes numa determinada unidade geográfica.

Quando se efectuou este tipo de subdivisão amostral tinha-se por intuito delinear um esboço de estratificação geracional. Ao considerar-se que a população residente numa determinada área geográfica poderia ser mais representativa do "pool" genético a partir do qual se iria iniciar a geração posterior à pretensamente representada pelos indivíduos naturais dessa mesma área, estava-se ciente da não linearidade do pressuposto invocado. Por outro lado, ainda que tal achega resultasse na amostragem de populações com uma geração de intervalo, sensivelmente, o período de tempo não seria suficiente para que ficassem indelevelmente gravadas possíveis alterações na estrutura genética das populações. Estas são, em geral, processos gradativos, e ainda que não forçosamente lentos, nunca de tal modo drásticos que se possam tornar notórios no espaço de apenas uma geração.

Apesar de tudo, foi-se tentado a efectuar a referida

estratificação, na medida em que poderiam tornar-se aparentes indícios do fluxo genético subjacente às numerosas migrações que caracterizam a história recente da demografia portuguesa.

Posto isto, ir-se-á iniciar a discussão do capítulo precisamente pela análise locus a locus de heterogeneidades genéticas intra e interpopulacionais, após o que se procurará interpretar os resultados da análise populacional conjunta de pares de loci. Terminar-se-á a parte da genética das populações com uma tentativa de análise genético-demográfica integrada a nível nacional.

No ponto 4.2.2, passaremos à análise dos resultados obtidos no âmbito da Genética formal.

Finalmente, no ponto 4.2.3, haverá uma referência ao domínio da Genética aplicada ao discutir o grau de informação e de utilidade dos sistemas genéticos estudados em investigações de paternidade.

Desta forma, procura-se dar cumprimento aos objectivos formulados em 2º, 3º e 4º lugares da INTRODUÇÃO.

4.2.1 Genética populacional

4.2.1.1 Análise locus a locus

a) F13A

A distribuição fenotípica do F13A observada, quer na amostra global, quer nas subamostras investigadas, não se

afastou da esperada numa situação de equilíbrio de Hardy--Weinberg.

A análise estatística em que a fracção masculina e a feminina da população foram confrontadas também não evidenciou qualquer heterogeneidade entre as duas subamostras.

Na tabela 4.1, apresentam-se as estimativas de frequências génicas nas diversas unidades geográficas consideradas.

TABELA 4.1
F13A: Frequências génicas em amostras populacionais de zonas, regiões ou distritos de Portugal continental.

AMOSTRA ESTUDADA	NATURAIS		RESIDENTES	
	N	F13A*1	N	F13A*1
REGIÃO NORTE				
Porto	288	0,747±0,018	354	0,747±0,016
Minho	40	0,725±0,049	30	0,725±0,058
Trás-os-Montes	92	0,766±0,031	80	0,738±0,035
TOTAL	**420**	**0,749±0,015**	**464**	**0,746±0,014**
REGIÃO CENTRO	**97**	**0,742±0,031**	**82**	**0,762±0,033**
REGIÃO SUL	**32**	**0,781±0,052**	**32**	**0,797±0,050**
PORTUGAL				
Masc.	318	0,745±0,017		
Femin.	321	0,768±0,017		
TOTAL	**639**	**0,757±0,012**		

Ressalta, de imediato, a pequena variabilidade quanto aos valores encontrados, não se podendo considerar

excepcional o ligeiro aumento da frequência do alelo F13A*1 na região Sul do país. Dado o reduzido número de indivíduos fenotipados pertencentes àquela zona, as estimativas obtidas estão ainda sujeitas a consideráveis flutuações, atribuíveis a meras distorções amostrais.

A existência de grande homogeneidade geográfica foi, aliás, comprovada pela análise estatística, a qual não revelou contrastes significativos na população portuguesa quanto a este marcador genético.

Situação idêntica foi registada ao nível das comparações entre naturais e residentes numa dada área.

Outro resultado não seria de esperar. Com efeito, no pressuposto que o fluxo de indivíduos dentro duma população seria o factor que, com maior acuidade, poderia alterar as respectivas frequências génicas com repercussão na estratificação naturais/residentes, tais alterações só seriam previsíveis num panorama de migrações entre populações genéticamente diferenciadas.

A não observação de heterogeneidade entre os dois estratos populacionais é, pois, concordante com a pequena variabilidade genético-demográfica que se observou para o F13A.

Mediante estes resultados, achámos que a estimativa de frequências génicas inferidas a partir da amostra global poderia ser considerada representativa da população portuguesa.

Por isso, na tabela 4.2, esses foram os valores

utilizados para a comparação com os anteriormente apurados em outros países.

TABELA 4.2
F13A: Frequências génicas em diversos grupos populacionais.

POPULAÇÃO	AMOSTRA BIOLÓGICA	N	F13A*1	F13A*4	F13A*5	REFERÊNCIAS
Portugal	leucócitos	639	0,757	-	-	esta investigação
Dinamarca	plasma	161	0,817	0,003	0,003	Eiberg et al, 1984
Noruega	"	244	0,79	-	-	Olaissen et al, 1983
R.F.A						
Hessen	"	187	0,786	-	-	Kühnl et al, 1981
SO	plaquetas	303	0,795	0,002	-	Weidinger et al, 1983
E.U.A						
Brancos	plasma	873	0,773	0,011	-	Dykes et al, 1986
Negros	"	148	0,797	-	-	"
Austrália	plaquetas	204	0,80	-	-	Board, 1979
Japão	plasma	266	0,891	0,002	-	Suzuki et al, 1986

Como se pode constatar, Portugal é o país que possui a mais baixa frequência do alelo F13A*1. O contraste é marcante se comparado com o Japão, país onde as frequências apuradas para este locus lhe conferem estatuto de marcador de grande interesse antropológico.

Mas, mesmo restringindo a observação a populações europeias, em que a amplitude de variação das frequências génicas é bastante estreita, Portugal apresenta indícios de uma ligeira diferenciação genética.

Seria interessante dispor de resultados de regiões geográficas mais próximas de Portugal, nomeadamente de Espanha, para poder avaliar se a tendência genético-demográfica que se esboça é específica do nosso país.

De qualquer modo, o alargamento do espaço amostral, quer no interior de Portugal, quer a regiões circunvizinhas, é um passo que se afigura de extrema importância para uma correcta e eficiente caracterização genético-demográfica de Portugal.

b) FUCA1

Na tabela 4.3, são apresentadas as frequências génicas de FUCA1 nas diferentes amostras populacionais investigadas.

Também para este marcador não se observou qualquer diferença estatisticamente significativa quanto às distribuições fenotípicas observadas e as esperadas segundo a lei de Hardy-Weinberg. Não significativas foram ainda as diferenças registadas entre machos e fêmeas.

Já no que respeita à análise de heterogeneidades interpopulacionais, os dados apurados para FUCA1 revestem-se de alguma peculiaridade.

De facto, ao comparar as três subamostras em que se dividiu os residentes na região Norte, o teste evidenciou um grau de heterogeneidade intraamostral atingindo o nível da significância estatística ($H=12,15$; g.l.=4; $2,5\% > P > 1\%$).

TABELA 4.3
FUCA1: Frequências génicas em amostras populacionais de zonas, regiões ou distritos de Portugal continental.

AMOSTRA ESTUDADA	NATURAIS		RESIDENTES	
	N	FUCA1*1	N	FUCA1*1
REGIÃO NORTE				
Porto	309	0,723±0,018	377	0,737±0,023
Minho	42	0,643±0,052	33	0,639±0,059
Trás-os-Montes	99	0,641±0,034	88	0,625±0,036
TOTAL	450	0,698±0,015	498	0,711±0,014
REGIÃO CENTRO	102	0,740±0,031	88	0,744±0,033
REGIÃO SUL	35	0,757±0,051	33	0,727±0,055
PORTUGAL				
Masc.	345	0,709±0,017		
Femin.	356	0,707±0,017		
TOTAL	701	0,708±0,012		

No sentido de detectar o factor de perda de homogeneidade, compararam-se, duas a duas, as subamostras em causa, testando o equilíbrio de Hardy-Weinberg com frequências cruzadas. Os resultados estão sumariados na parte inicial da tabela 4.4.

Como se pode ver, delineiam-se com uma certa clareza, duas unidades distintas na região Norte: - por um lado, aquela constituída por Minho e Trás-os-Montes, que entre si não manifestam quaisquer sinais de diferenciação genética, e, por outro lado, o distrito do Porto, cujas frequências

génicas são significativamente diferentes das do Minho e Trás-os-Montes (consideradas individual ou conjuntamente).

TABELA 4.4
FUCA1: Comparação 2 a 2 das amostras investigadas.

AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	X^2 1	P (%) g.l.=2	X^2 2	P (%) g.l.=2
Porto	Minho	33,24	<<0,1	4,23	20-10
Porto	T.M.	40,67	<<<0,1	11,50	0,5-0,1
Minho	T.M.	0,49	50-20	0,26	90-70
		***			
Porto	Minho + T.M.	53,61	<<<0,1	15,05	<0,1
Porto	Centro	1,35	70-50	1,58	50-30
Porto	Sul	1,45	50-30	1,74	50-30
Centro	Minho + T.M.	12,63	<0,1	17,35	<<0,1
Sul	Minho + T.M.	3,48	20-10	12,04	0,5-0,1
Centro	Sul	1,75	50-30	1,85	50-30

T.M. - Trás-os-Montes

Mediante tais resultados, e até para minimizar factores de enviesamento dos testes por reduzido tamanho amostral, incluiu-se os residentes em Minho ou Trás-os-Montes numa só unidade amostral e estendeu-se as comparações duas a duas às regiões Centro e Sul do país (2ª parte da tabela 4.4).

Mais uma vez os dados apontam para uma nítida diferenciação do Minho e Trás-os-Montes das regiões Centro e Sul, as quais, por sua vez, comparadas entre si, se podem considerar possuidoras de frequências génicas estatisticamente

não dissemelhantes.

Será que estes resultados reflectem, de facto, uma realidade genético-demográfica, ou serão apenas determinados por meros efeitos amostrais?

Ao reflectir sob a questão, fomos confrontados com um conjunto de elementos pouco elucidativos e, em certa medida, contraditórios.

Assim, por exemplo, na estratificação por naturalidades, embora já se desenhem traços de heterogeneidade genética, esta não assume ainda valores de significância estatística. Ora, à partida, parecia-nos que qualquer tipo de diferenciação interpopulacional deveria deixar vestígios mais marcados a este nível de estratificação do que propriamente na dos residentes. Estes representam, em princípio, a camada populacional mais sujeita a movimentações migratórias que são, por natureza, factor de diluição de diferenças genéticas entre grupos populacionais. Indício de tal tendência parece ser, aliás, a menor amplitude de variação de frequências génicas observada no grupo dos residentes do que no dos naturais,entre a região Norte, Centro e Sul.

Analisando, porém, os resultados no contexto da história recente da demografia portuguesa, a situação deixa de se afigurar tão paradoxal.

Com efeito, Trás-os-Montes é uma das zonas do país com maior incidência de êxodo populacional, quer para o interior, quer para o exterior do país, sem compensação por afluxo de indivíduos de outras regiões. A desertificação do

Nordeste português é uma realidade que continua bem actual.

É ainda consabidamente conhecido que os poucos que aí regressam são, em geral, originários dessa mesma zona.

Por conseguinte, a diferenciação genética que se observa para Trás-os-Montes, pode não ser mais que a simples tradução do isolamento a que esta região geográfica foi e continua a ser votada.

Nesta perspectiva, o facto de a diferenciação só ser significativa no grupo dos residentes, mas não no dos naturais, ganha alguma aceitação: tal pode ser sinal de que é uma diferenciação que se acentua com o tempo, provavelmente a um ritmo compassado com o da desertificação da própria região.

Por outro lado, sabe-se também que para as grandes densidades populacionais que actualmente existem no litoral Norte de Portugal (não incluindo a área metropolitana do Porto, cujo crescimento envolve parâmetros mais complexos), contribuíu, de forma substancial, o afluxo de indivíduos provenientes das zonas interiores do Norte, ideia que é consentânea com a grande semelhança de frequências génicas entre Minho e Trás-os-Montes, detectadas neste trabalho.

Quanto às frequências génicas observadas no distrito do Porto, se não estranhamos o facto de contrastarem com as de Trás-os-Montes, o mesmo não poderemos dizer da distanciação em relação ao Minho. O intercâmbio populacional, ainda que preferencialmente direccionado para a zona metropolitana do Porto, tem sido ao longo dos anos tão marcado que esperaríamos

encontrar contrastes menos acentuados. No entanto, as frequências estimadas para o Minho devem ser interpretadas com particular reserva, dado o escasso número de indivíduos fenotipados pertencentes à região.

Mais uma vez, só o alargamento das amostragens populacionais poderá confirmar a interpretação sugerida pelos presentes resultados.

Na tabela 4.5, as frequências génicas estimadas para Portugal são confrontadas com as estimativas obtidas para outros países.

TABELA 4.5
FUCA1: Frequências génicas em diversos grupos populacionais.

POPULAÇÃO	AMOSTRA BIOLÓGICA	N	FUCA1*1	REFERÊNCIA
PORTUGAL	leucócitos	701	0,708	esta investigação
GRA-BRETANHA				
Inglaterra	linfócitos	169	0,678	Gill e Sutton, 1984
Inglaterra e Escócia	leucócitos	109	0,75	Corney et al, 1977
FRANÇA				
Rennes	"	350	0,64	Trinh-Dinh-Khoi et al, 1979
R.F.A				
SO	"	267	0,71	Siebert, 1986
O	"	468	0,745	Henke e Netzer, 1982
U.S.A				
Brancos	"	194	0,753	Turner et al, 1975
Negros	"	27	0,926	"

Em relação a FUCA1, é extremamente escasso o número de resultados populacionais, desconhecendo-se a existência de quaisquer publicações referentes a regiões geograficamente próximas de Portugal.

No global, pode dizer-se que as frequências agora estimadas se enquadram na gama de variação observada em populações caucasóides.

O único trabalho em que encontrámos referência a outros grupos populacionais foi o de Turner et al (1975), que regista uma frequência muitíssimo elevada do alelo FUCA1*1 num grupo de negros norte-americanos. Embora um pouco abusivamente, ao extrapolar esse valor para outros grupos negróides de origem africana, não constatámos vestígios aparentes de influência de elementos africanos na população portuguesa quanto a FUCA1.

c) GOT2

Quanto a este polimorfismo, a distribuição de frequências por classes fenotípicas é de tal ordem assimétrica que não permitiu a efectuação de qualquer tipo de análise estatística. Pela mesma razão, para o cálculo de frequências génicas, não considerámos para a região Norte as habituais subdivisões em três unidades.

As frequências génicas apuradas para GOT2 encontram-se na tabela 4.6, enquanto que na tabela 4.7 se incluem valores previamente reportados para outras populações.

TABELA 4.6
GOT2: Frequências génicas em diversas amostras populacionais de zonas, regiões ou distritos de Portugal continental.

AMOSTRA ESTUDADA	N	GOT2*1	GOT2*2	GOT2*3
REGIÃO NORTE				
Nat	533	0,978±0,004	0,019±0,004	0,003±0,002
Res	585	0,979±0,004	0,019±0,004	0,002±0,002
REGIÃO CENTRO				
Nat	108	0,986±0,008	0,014±0,008	-
Res	84	0,988±0,008	0,012±0,008	-
REGIÃO SUL				
Nat	36	0,986±0,014	0,014±0,014	-
Res	34	0,985±0,015	0,015±0,015	-
PORTUGAL				
Masc.	381	0,982±0,005	0,017±0,005	0,001±0,001
Femin.	411	0,982±0,005	0,016±0,004	0,002±0,002
TOTAL	792	0,982±0,003	0,016±0,003	0,002±0,001

Quanto a Portugal, existia já uma publicação anterior sobre GOT2 (Amorim, 1983), referente a uma amostra de indivíduos residentes no distrito do Porto, sendo manifesta a concordância com os resultados agora obtidos.

Como Amorim refere, e à semelhança do que acontece em outras populações, as frequências das variantes de GOT2, em Portugal, são extremamente baixas.

No entanto, e talvez esse seja o aspecto de maior realce no que concerne à genética demográfica de GOT2, a maioria dos indivíduos portadores das variantes GOT2*2 ou GOT2*3 pertenciam à região Norte do país, onde encontrámos,

inclusivé, um indivíduo possuidor do fenotípo raríssimo 2. A análise familiar revelou ser filho de heterozigóticos 2-1.

Embora para este marcador uma análise genético-demográfica deva ser feita com especial cautela, é-se tentado a admitir que o ligeiro aumento da frequência de GOT2*2 na região Norte não esteja destituído de alguma plausibilidade. De facto, na vizinha Espanha, sobre a qual dispomos de dados referentes à Galiza, os valores reportados, dentro dos limites da relativa raridade, apresentam a mais elevada frequência do alelo GOT2*2 alguma vez registada.

TABELA 4.7
GOT2: Frequências génicas em diversos grupos populacionais.

POPULAÇÃO	AMOSTRA BIOLÓGICA	N	GOT2*1	GOT2*2	GOT2*3	REFERÊNCIA
PORTUGAL						
Total	leucócitos	792	0,982	0,016	0,002	esta investigação
Porto	"	543	0,977	0,021	0,002	Amorim, 1983
ESPANHA						
Galiza	"	432	0,975	0,025	-	Llano et al, 1990
R.F.A						
SO	hemolisados	640	0,981	0,019	-	Ritter e Kömpf, 1979
O	"	310	0,9774	0,0226	-	Driesel et al, 1982
SUIÇA	"					
Zurique	"	211	0,9787	0,0213	-	Scheil e Scheffrahn, 1987
GRÃ-BRETANHA						
Brancos	placenta	710	0,983	0,017	-	Hackel et al, 1972
Negros	"	38	0,961	-	0,040	"
NIGÉRIA						
Negros	"	525	0,925	0,009	0,066	"
JAPÃO	plasma	1860	0,9957	0,0043	-	Toyomasu et al, 1984

Não deixa, pois, de ter sentido o resultado que se apurou, desde que interpretado no contexto de uma certa homogeneidade genética do Norte da Península Ibérica.

Igualmente pertencentes à região Norte do país eram os três únicos indivíduos portadores do fenótipo 3-1. O facto de serem da região Norte não tem, pelo menos para já, qualquer outro significado para além de terem surgido na única amostra investigada com efectivo suficiente para permitir a detecção de um alelo com tão baixa frequência.

A existência do alelo GOT2*3 na população portuguesa, de resto já anteriormente detectada por Amorim, não deixa de ser algo surpreendente. De facto, e apesar de os estudos demográficos sobre GOT2 serem em número reduzido, o alelo só foi até hoje encontrado, à excepção de Portugal, em grupos populacionais de origem negróide, onde a frequência é considerável.

Porém, os indivíduos portugueses de fenótipo 3-1 eram brancos, e todos desconheciam a existência de ancestrais negros nas respectivas famílias.

Uma interpretação sugestiva que a presença deste alelo na população portuguesa proporciona, assumindo que GOT2*3 seja o mesmo alelo que o registado em populações negras, é que possa constituir um vestígio arcaico da ténue miscegenação com povos de origem africana que terá ocorrido a partir do séc. XV e se prolongou até à actualidade.

Independentemente da pequena relevância histórico-cultural do processo, é bem provável que essa tivesse sido a

via responsável pela introdução de GOT2*3 em Portugal.

Todavia, a confirmação da hipótese passará, obrigatoriamente, por uma prospecção genética alargada aos países africanos de expressão portuguesa com os quais nos relacionámos com maior intimidade histórica/biológica.

d) ME2

Na tabela 4.8, apresentam-se as estimativas das frequências génicas de ME2 apuradas durante esta investigação, enquanto que a tabela 4.9 diz respeito à confrontação com

TABELA 4.8
ME2: Frequências génicas em amostras populacionais de zonas, regiões ou distritos de Portugal continental.

AMOSTRA ESTUDADA	NATURAIS		RESIDENTES	
	N	ME2*1	N	ME2*1
REGIÃO NORTE				
Porto	349	0,623±0,018	416	0,627±0,017
Minho	56	0,643±0,045	42	0,643±0,052
Trás-os-Montes	91	0,604±0,036	77	0,591±0,040
TOTAL	**496**	**0,622±0,015**	**535**	**0,623±0,015**
REGIÃO CENTRO	**104**	**0,668±0,033**	**82**	**0,659±0,037**
REGIÃO SUL	**34**	**0,574±0,060**	**34**	**0,618±0,059**
PORTUGAL				
Masc.	339	0,630±0,018		
Femin.	365	0,630±0,018		
TOTAL	704	0,630±0,013		

resultados apurados em estudos anteriores, incluindo um sob o distrito do Porto (Amorim, 1983).

Nenhuma das amostras analisadas manifestou discordância com a distribuição fenótipica esperada em situação de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Aliás, quanto à análise estatística no âmbito da genética populacional deste marcador, pode dizer-se que a concordância com as hipóteses formuladas foi uma constante: nenhum dos testes de heterogeneidade efectuados atingiu valores de significância estatística.

Mesmo no grupo dos naturais, em que as frequências génicas observadas na região Sul destoavam um pouco das da região Centro, a amostra do Sul era numericamente tão insignificante que o seu peso se diluía, por completo, no conjunto de resultados comparados no teste de heterogeneidade correspondente.

Não se esqueça que as frequências estudadas para a região Sul apresentaram desvios-padrões muito elevados, pelo que os respectivos valores devem ficar sob reserva até posterior reavaliação por alargamento da amostragem populacional.

Passando agora para o nível das comparações interpopulacionais, é de registar o perfeito enquadramento dos valores obtidos para Portugal na gama da variação observada em populações europeias.

Estas, por sua vez, diferenciam-se com nitidez de

TABELA 4.9
ME2: Frequências génicas em diversos grupos populacionais.

POPULAÇÃO	AMOSTRA BIOLÓGICA	N	ME2*1	REFERÊNCIA
PORTUGAL				
Total	leucócitos	704	0,630	esta investigação
Porto	"	294	0,610	Amorim, 1983
ESPANHA				
Galiza	"	434	0,592	Llano et al, 1990
R.D.A.				
N	"	313	0,657	Stöhlmacher e Haferland, 1989
R.F.A				
SO	"	316	0,63	Siebert e Amorim, 1987
GRÃ-BRETANHA				
NE	Cérebro	121	0,607	Papiha et al, 1989
S	"	291	0,651	Saha et al, 1978
Escócia	Coração	66	0,63	Burchell et al, 1977
E.U.A				
Brancos	Cérebro	132	0,693	Cohen e Omenn, 1972
Negros	"	20	0,83	"
ÍNDIA	"	182	0,56	Ghosh et al, 1980

grupos raciais negros que, embora mal caracterizados, parecem possuir frequências muito elevadas do alelo ME2*1.

A ser assim, fica também aparentemente excluída, quanto a ME2, qualquer influência de elementos genéticos africanos na população portuguesa.

Ainda quanto ao mesmo item, não deixa de ser curiosa a extrema proximidade entre as frequências génicas observadas em Trás-os-Montes e na Galiza. O estudo conduzido

por Llano et al (1990), recorre exclusivamente a indivíduos autóctones da Galiza, aí residentes e com os quatro avós naturais da mesma região. O estrato populacional investigado é aquele que, em princípio, conservará mais traços do perfil genético ancestral da população galega.

Por motivos diversos, que não propriamente decorrentes do critério amostral, também a população de Trás-os-Montes é aquela cujo património genético se viu ao longo dos anos menos alterado por factores evolutivos, que não os predominantes em grupos populacionais fechados, isto é, deriva génica.

A grande semelhança quanto às frequências génicas nestas duas regiões pode ser interpretada como um vestígio genético da sua origem que, consensualmente, se aceita ser comum, e que se reflecte, ainda hoje, nas grandes afinidades linguísticas e sócio-culturais que caracterizam as populações do Norte da Península Ibérica.

e) PEPC

Os resultados do âmbito da Genética populacional de PEPC de que dispomos são ainda muito incipientes.

Dada a escassez numérica das amostragens, eliminaram-se até algumas das estratificações geográficas que considerámos para os outros marcadores, nomeadamente a zona Minho e a região Sul.

O panorama que se desenhou quanto à Genética populacional de PEPC, surge com contornos gerais bastante indefinidos, embora, como se irá ver a seguir, com alguns paralelismos com o registado em PGM3.

Na fracção masculina da população, detectou-se um desvio às proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg já significativo, embora na amostra global, sem sexos discriminados, a distorção fenotípica dessa fracção se diluísse, resultando num valor de X^2 próximo, mas não atingindo o limite de confiança de 5%.

A perturbação da distribuição fenotípica nos machos era providenciada por um excesso considerável de homozigóticos e, como seria de esperar, a tendência era igualmente patente na amostra de residentes ou naturais do distrito do Porto, única subamostra, à excepção da região Norte na globalidade, com efectivo numérico suficiente para se fazer também a discriminação por sexos.

Os resultados dessa estratificação são os constantes da tabela 4.10.

Na fracção feminina, pelo contrário, a discrepância entre valores esperados e observados era, em geral, mínima.

Heterogeneidade geográfica, associada a mobilidade diferencial por sexos, como hipótese explicativa dos resultados, não se afigura de grande admissibilidade se nos reportarmos à análise da tabela 4.11 onde se apresentam as frequências génicas registadas em diversas subamostras e que,

TABELA 4.10
PEPC: Discriminação por sexos em 2 subamostras e acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

AMOSTRA	FENÓTIPOS					N	PEPC*1	PEPC*2	X^2	P(%) g.l.=1
	1	61	6	21	OUTROS					
NATURAIS										
Porto										
M	70 (66,04)	32 (39,92)	10 (6,03)			112	0,768	-	4,42	0,05-0,02
F	67 (67,85)	33 (31,50)	3 (3,66)	1 (-- 0,99 --)	-	104	0,808	0,005	0,20	0,75-0,50
REGIÃO NORTE										
M	94 (90,01)	49 (56,97)	13 (9,02)			156	0,760	-	3,05	0,10-0,05
F	96 (97,51)	43 (40,31)	3 (4,17)	2 (-- 1,99 --)	-	144	0,823	0,007	0,53	0,50-0,25
RESIDENTES										
Porto										
M	82 (77,62)	33 (41,76)	10 (5,62)			125	0,788	-	5,50	0,02-0,01
F	75 (75,84)	38 (36,73)	4 (4,45)	2 (-- 1,98 --)	-	119	0,798	0,008	0,10	0,75-0,50
REGIÃO NORTE										
M	101 (96,81)	50 (58,39)	13 (8,80)			164	0,768	-	3,39	0,10-0,05
F	102 (103,39)	48 (45,59)	4 (5,03)	2 (-- 1,99 --)	-	156	0,814	0,006	0,36	0,75-0,50

TABELA 4.11
PEPC: Frequências génicas em amostras populacionais de zonas, regiões ou distritos de Portugal continental.

AMOSTRA ESTUDADA	NATURAIS			RESIDENTES		
	N	PEPC*1	PEPC*2	N	PEPC*1	PEPC*2
REGIÃO NORTE						
Porto	216	0,787±0,020	0,002±0,002	244	0,793±0,018	0,004±0,003
T.M.	53	0,793±0,039	0,009±0,009	49	0,786±0,041	-
TOTAL	300	0,790±0,017	0,003±0,002	320	0,791±0,016	0,003±0,002
REGIÃO CENTRO	53	0,821±0,037	-	49	0,847±0,036	-
PORTUGAL						
Masc.	227	0,767±0,020	-			
Femin.	225	0,811±0,018	0,004±0,003			
TOTAL	452	0,789±0,014	0,002±0,001			

T.M.- Trás-os-Montes

pelo contrário, revelam uma grande consistência genética interamostral, confirmada, aliás, no teste de heterogeneidade correspondente.

No entanto, relativamente a PEPC, os resultados de genética formal, que adiante serão discutidos em pormenor, vieram pôr em evidência um aspecto da Genética de PEPC, inaparente na análise populacional, mas de grande relevância na interpretação dos resulatdos obtidos nessa área. De facto, a segregação em famílias nucleares revelou a existência de um produto génico de PEPC sem expressão electroforética diferenciada.

A presença de alelos mulos é, indiscutivelmente, factor de perturbação da distribuição fenotípica,

condicionando precisamente o aparecimento de um excesso de homozigóticos, uma vez que indivíduos heterozigóticos para o alelo nulo são indistinguíveis dos homozigóticos para o outro alelo.

No caso específico de PEPC, só é de estranhar o facto de a tendência apenas se manifestar na fracção masculina da população, podendo, no entanto, ser uma circunstância perfeitamente fortuita.

Seria, porém, de particular interesse, definir até que ponto esta distribuição é exclusiva da população portuguesa.

De momento, resultados comparáveis com os nossos são escassíssimos. Os publicados pela equipa de Kömpf apresentam amostragens ainda exíguas para a tendência, eventualmente, se começar a expressar.

Todavia, um trabalho de Kondler e Wiebecke (1981), ainda efectuado sob a falsa suposição de se tratar de PEPA, apresenta resultados que, pelo menos, não se opõem aos agora obtidos.

Apresentam-se, a título de curiosidade, na tabela 4.12, e a sua leitura deve ser efectuada fazendo a seguinte correspondência: PEPA*1=PEPC*1; PEPA*8=PEPC*6 e PEPA*2=PEPC*2.

Embora os autores não atribuíssem grande importância ao facto de o acordo com os valores esperados se aproximar do nível de significância estatística, não deixa de ser sugestiva a carência relativa de heterozigóticos e concominante excesso

TABELA 4.12
Distribuição fenotípica de PEPA numa amostra de indivíduos da região Centro da R.F.A. (Kondler e Wiebecke, 1981).

N	FENÓTIPOS						X^2	P=(%) g.l.=2
	1	81	8	21	82	2		
434	212 (201,9)	158 (176,6)	48 (38,6)	12 (11,6)	5 (5,1)	- (0,2)	4,82	10-5

de homozigóticos, situação que se ajusta bem ao resultado apurado.

A existência de um alelo nulo como fonte de distorção da distribuição fenotípica de PEPC não se apresenta, portanto, destituída de algum suporte circunstancial.

Claro que perturbações ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, determinadas, ou pelo menos agravadas, por alelos nulos, são de muito difícil demonstração a nível populacional, o que torna mais premente o alargamento das amostragens que deverão ser efectuadas com um rigor metodológico particularmente cuidado.

Na tabela 4.13, as frequências génicas encontradas em dois grupos populacionais da então República Federal Alemã são comparadas com as agora obtidas. O alelo que designamos de PEPC*2, dado o padrão de mobilidade electroforética, trata-se do mesmo que Kömpf et al referem de PEPC*R e Kondler e Wiebecke de PEPA*2.

O valor de PEPC*1 encontrado em Portugal é o mais elevado dos três, salientando-se a maior raridade de PEPC*2.

TABELA 4.13
PEPC: Frequências génicas em 3 amostras populacionais.

POPULAÇÃO	AMOSTRA BIOLÓGICA	N	PEPC*1	PEPC*2	REFERÊNCIA
PORTUGAL	leucócitos	452	0,789	0,002	esta investigação
R.F.A. SO	"	322	0,721	0,003	Kömpf et al, 1989
Würzburg	"	434	0,680	0,020	Kondler e Wiebecke, 1981

No que concerne a este alelo, os dois trabalhos conduzidos na RFA apresentam valores um pouco díspares, mas estimativas exactas de alelos com este nível de frequências exigem efectivos amostrais particularmente grandes.

De momento, quaisquer outras considerações sob a distribuição populacional do polimorfismo de PEPC seriam demasiado prematuras.

f) PGM3

De todos os seis marcadores investigados, PGM3 foi aquele cujos resultados de genética populacional se afiguraram de mais difícil interpretação.

Na amostra global, começámos por detectar um desvio altamente significativo entre as proporções fenotípicas observadas e as esperadas segundo o princípio de Hardy-Weinberg. A distorção em relação ao padrão previsto era, basicamente, providenciado por um excesso notório de qualquer um dos dois tipos de homozigóticos em detrimento da classe de

heterozigóticos.

Um excesso de homozigóticos sugere, de imediato, a existência de qualquer tipo de subestruturação da amostra populacional, nomeadamente a existência de um grupo de subamostras heterogéneas de uma dada população, tal como enunciado no classicamente conhecido princípio de Wahlund.

Mas, a existir heterogeneidade, no caso concreto de PGM3, não foi possível evidenciá-la de forma inequívoca. De facto, como se pode ver pela análise da tabela 4.14 em que se indicam as frequências génicas observadas para PGM3, no grupo dos naturais apenas duas unidades geográficas apresentam valores que se afastam um pouco dos valores médios registados.

TABELA 4.14
PGM3: Frequências génicas em amostras populacionais de zonas, regiões ou distritos de Portugal continental.

AMOSTRA ESTUDADA	NATURAIS		RESIDENTES	
	N	PGM3*1	N	PGM3*1
REGIÃO NORTE				
Porto	326	0,729±0,017	398	0,727±0,016
Minho	46	0,674±0,049	33	0,697±0,057
Trás-os-Montes	101	0,718±0,032	88	0,750±0,033
TOTAL	**473**	**0,721±0,015**	**519**	**0,729±0,014**
REGIÃO CENTRO	**107**	**0,720±0,031**	**95**	**0,674±0,034**
REGIÃO SUL	**36**	**0,667±0,055**	**36**	**0,736±0,052**
PORTUGAL				
Masc.	351	0,692±0,017		
Femin.	369	0,740±0,016		
TOTAL	**720**	**0,717±0,012**		

Essas unidades - Minho e Zona Sul - eram aquelas com efectivo amostral menos numeroso, susceptíveis ainda, por conseguinte, de consideráveis flutuações por efeito amostral.

A região Sul, inclusivé, manifestou um desvio significativo em relação às expectativas de Hardy-Weinberg, pelo que não foi considerada no teste de heterogeneidade interpopulacional. Este, por sua vez, não indiciou qualquer tipo de diferenciação amostral.

No conjunto dos residentes, o resultado do teste foi idêntico, embora aqui as três subamostras da região Norte tivessem sido englobadas individualmente, dado que no conjunto também a região Norte apresentava um desvio que ultrapassava, ligeiramente, o nível de confiança utilizado (ver Tabela 3.7).

Na análise global dos resultados, ressalta um aspecto interessante: por sistema, todas as subamostras apresentam, quer dentro dos limites da significância estatística, quer ultrapassando esse limite em dois casos, um excesso de indivíduos homozigóticos. Não é de estranhar, portanto, que na amostra global se assista a um efeito cumulativo dos desvios parciais, resultando num valor final altamente significativo.

A não observação, quanto a PGM3, da condição enunciada no princípio de Wahlund sugere-nos, no entanto, uma outra hipótese explicativa dos resultados. Como se sabe, em populações de efectivo pequeno acentua-se o efeito de deriva génica, o que resulta, igualmente, numa tendência para a diminuição da heterozigotia média.

Esta tendência que se insinua, sem excepção, em todas as amostras que investigámos, pode bem ser um reflexo de uma certa hierarquização estrutural determinada pelo facto de, às migrações interpopulacionais, se sobrepor, apesar de tudo, a identidade de grupo de cada região. Isto é, os cruzamentos continuarem preferencialmente a efectuar-se entre indivíduos pertencentes à mesma região geográfica, pelo que cada uma delas conservará algumas características de grupo populacional relativamente fechado.

Porém, a aparente razoabilidade da interpretação dificilmente resiste ao facto surpreendente de, na estratificação da amostra global por sexos, se ter constatado ser apenas a fracção masculina a responsável pela distorção do padrão de distribuição fenotípica. Com efeito, se o sexo feminino não apresentava perturbações significativas das proporções de Hardy-Weinberg, no sexo masculino era altamente significativo o excesso de homozigóticos observados.

Resolveu-se, então, estender a subdivisão por sexos àquelas subamostras com efectivos numéricos não excessivamente reduzidos. Os resultados são os constantes da tabela 4.15.

Em geral, as amostras masculinas apresentavam valores de X^2 mais elevados que as femininas, aproximando-se já de muito perto, no caso dos residentes da região Norte, do limite de significância estatística.

De salientar ainda que, na zona de Trás-os-Montes, se detectaram diferenças estatisticamente significativas entre

frequências génicas de machos e fêmeas (X^2= 6,30; g.l.= 2; 0,05>P>0,025 para naturais; X^2= 9,74; g.l.= 2; 0,01>P>0,005 para residentes).

No distrito do Porto, a diferenciação entre sexos era de sentido oposto à observada em Trás-os-Montes. Embora não atingindo os limites de significância estatística , PGM3*1 era menos frequente nos machos que em fêmeas, situação inversa à de Trás-os-Montes.

TABELA 4.15
PGM3: Discriminação por sexos em diversas subamostras e acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

AMOSTRA ESTUDADA	FENÓTIPOS			N	PGM3*1	X^2	P(%) g.l.=1
	1	21	2				
NATURAIS							
Porto							
M	82 (79,73)	64 (68,54)	17 (14,73)	163	0,699	0,72	50-25
F	93 (93,58)	61 (59,85)	9 (9,57)	163	0,758	0,06	90-75
T.M.							
M	31 (30,72)	14 (14,55)	2 (1,72)	47	0,809	0,07	90-75
F	24 (22,04)	21 (24,92)	9 (7,04)	54	0,639	1,34	25-10
REGIÃO NORTE							
M	127 (121,94)	86 (96,12)	24 (18,94)	237	0,717	2,63	25-10
F	126 (123,91)	90 (94,19)	20 (17,90)	236	0,725	0,47	50-25
REGIÃO CENTRO							
M	26 (24,92)	20 (22,15)	6 (4,92)	52	0,692	0,49	50-25
F	31 (30,57)	20 (20,87)	4 (3,56)	55	0,746	0,10	75-50

TABELA 4.15 - continuação.

AMOSTRA ESTUDADA	FENÓTIPOS 1	21	2	N	PGM3*1	X^2	P(%) g.l.=1
RESIDENTES							
Porto							
M	97 (92,99)	76 (84,03)	23 (18,98)	196	0,689	1,79	25-10
F	119 (118,18)	71 (72,65)	12 (11,16)	202	0,765	0,11	75-50
T.M.							
M	30 (29,31)	11 (12,38)	2 (1,31)	43	0,826	0,53	50-25
F	22 (20,67)	17 (19,65)	6 (4,67)	45	0,678	0,83	50-25
REGIÃO NORTE							
M	138 (131,75)	92 (104,52)	27 (20,73)	257	0,716	3,69	10-5
F	147 (144,40)	95 (100,21)	20 (17,39)	262	0,742	0,71	50-25
REGIÃO CENTRO							
M	22 (20,45)	16 (19,09)	6 (4,46)	44	0,682	1,15	50-25
F	23 (22,67)	22 (22,67)	6 (5,67)	51	0,667	0,04	90-75

T.M. Trás-os-Montes

Naturalmente, ao considerar-se o Norte na globalidade, as diferenças neutralizaram-se, resultando em frequências génicas nos dois sexos muito semelhantes entre si.

Concluindo, quer a análise global, quer a análise por sexos, fazem suspeitar da existência de factores de perturbação não casuais da distribuição fenotípica de PGM3.

Tais factores surgiram, invariavelmente, mais acentuados na fracção masculina da população. Ela é, por tradição sócio-cultural, a que apresenta maior índice de mobilidade interpopulacional e, por conseguinte, será aquela que com maior facilidade absorverá, e melhor reflectirá, eventuais alterações à estrutura genética de grupos populacionais determinadas por migrações interregionais.

Que a heterogeneidade observada, associada ao padrão de distribuição interpopulacional, sugere, de imediato, a existência de um tipo qualquer de hierarquização geográfica, parece-nos uma leitura razoável da análise dos resultados observados.

Mais uma vez a sua comprovação exige o alargamento numérico das amostragens populacionais, passando, no caso concreto de PGM3, obrigatoriamente, pela discriminação por sexos.

Na tabela 4.16, apresentam-se frequências génicas de PGM3 recolhidas de publicações referentes a diversos grupos populacionais.

Para Portugal, o termo de comparação usado não foi o inferido da amostra global, dado não estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg, mas antes as frequências individuais encontradas nas diferentes subamostras (tabela 4.14).

Pode dizer-se que os valores observados em amostras portuguesas tendem a enquadrar-se num dos limites da gama de variação observada em populações europeias.

TABELA 4.16
PGM3: Frequências génicas em diversos grupos populacionais.

POPULAÇÃO	AMOSTRA BIOLÓGICA	N	PGM3*1	REFERÊNCIA
ESPANHA				
Galiza	leucócitos	417	0,667	Llano et al, 1990
R.F.A				
Dusseldorf	hemolisados	462	0,7392	Günther, 1982
SO	"	289	0,7682	Bissbort et al, 1975
DINAMARCA	leucócitos	1031	0,7454	Lamm, 1970
SUIÇA				
Zurique	hemolisados	220	0,7909	Scheil e Scheffrahn, 1987
NORUEGA				
Oslo	placenta	660	0,7341	Monn e Gjønnaess, 1971
ITÁLIA	"	559	0,7800	Corbo et al, 1980
GRÃ-BRETANHA	"	583	0,73	Hopkinson e Harris, 1968
NIGÉRIA	"	235	0,34	"
BRASIL				
Negros, NE	"	299	0,5452	Melo et al, 1988
JAPÃO				
Hiroshima	hemolisados	2961	0,6927	Neel et al, 1988
Nagasaki	"	1983	0,6926	"

Aliás, nestas, a frequência mais baixa de PGM3*1 registou-se na vizinha Espanha, mais propriamente na Galiza, onde a frequência deste alelo consegue ser mais baixa que as encontradas em amostras portuguesas.

Relativamente a este polimorfismo, existe uma nítida demarcação de grupos populacionais negros, que manifestam tendência inversa à de populações caucasóides, ou seja, a

frequência de PGM3*1 é mais elevada que a do outro alelo comum.

No entanto, no que diz respeito à população portuguesa, não nos parece que os valores observados possam ser atribuíveis à intromissão de características africanas. A miscegenação com povos de origem africana tem sido , como se sabe, irrelevante.

Embora sem afinidades particularmente marcadas com a vizinha Espanha, à excepção da pequena região do Minho em que as semelhanças são manifestas, talvez faça mais sentido interpretar os presentes resultados no contexto de uma certa diferenciação genético-geográfica envolvendo todo o Norte da Península Ibérica.

4.2.1.2 Análise conjunta de pares de loci

Em análise conjunta de pares de loci, ao contrário do que acontece em análise locus a locus, as frequências alélicas dos loci investigados não são suficientes para descrever a variação genética de uma dada população, na medida em que associações preferenciais de não-alelos em gâmetas podem ocorrer (Hedrick, 1985).

Um parâmetro adicional de grande importância, a este nível de análise, são as frequências haplotípicas observadas.

Sabe-se que para um dado par de loci, e uma vez estabelecidas as condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg, os

alelos dos dois loci atingem uma fase de associação aleatória nos gâmetas apenas assimptoticamente (Spiess, 1977).

O desvio em relação à aleatoriedade da reunião de não-alelos em gâmetas é designado, habitualmente, por desequilíbrio gamético.

É possível demonstrar que a taxa de aproximação às frequências gaméticas de equilíbrio pode ser bastante retardada por efeito de ligação entre dois loci, enquanto factores como interacções epistáticas interloci, migração ou heterogeneidade populacional, entre outros, podem ser responsáveis não só pela não dissipação de desequilíbrios gaméticos, mas, inclusivé, pelo seu aparecimento em determinadas populações (Nei e Li, 1973; Li, 1976).

À complexidade da dinâmica de variação, considerando múltiplos loci, há que corresponder com métodos de análise rigorosos.

Neste trabalho, optou-se por um modelo em que a variação populacional é descrita em termos de desequilíbrio gamético (D), testando a significância estatística da hipótese nula Ho: $D = 0$ versus H1: $D \neq 0$, de acordo com o método sugerido por Sinnock e Sing, 1972.

Assim, assegurado que a distribuição fenotípica de loci individuais não se afastava da esperada segundo o formalismo de Hardy-Weinberg, calculou-se, para cada um dos pares de loci investigados, um X^2 (X^2T) que pretendia medir a significância dos desvios à distribuição genotípica conjunta baseada apenas em frequências génicas, ou seja,

assumindo D=0. Este X^2 possui (k-g-1) graus de liberdade, em que k é o número de classes fenotípicas observadas e g o número de estimativas independentes de frequências génicas.

Em 2 dos 38 pares de loci estudados, este teste não foi aplicado. Referimo-nos, em concreto, aos pares PGM3/F13A e PGM3/GLO1, por se ter verificado que a distribuição fenotípica individual de PGM3 se afastava, significativamente, da esperada em condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg. O modo menos enviesado de testar o acaso na distribuição conjunta em tais condições, pareceu ser análise de contingência, teste que se aplicou, pontualmente, nestes dois casos.

Sempre que se registaram valores de X^2 estatisticamente significativos, procurou-se identificar o tipo de associação particular responsável pelos desvios observados.

Na realidade, X^2T pode ser repartido em dois outros X^2s aditivos entre si:

$$X^2T = X^2G + X^2D$$

X^2G - É calculado com base em frequências haplotípicas e possui (k-g'-1) graus de liberdade, sendo g' o número de estimativas independentes de frequências haplotípicas;

X^2D - Obtem-se pela diferença entre X^2T e X^2G, possui (g-g') graus de liberdade e pode ser interpretado como uma medida dos desvios genotípicos às expectativas de Hardy-Weinberg atribuíveis a desequilíbrios gaméticos; por

outras palavras, X^2G é uma medida da significância estatística de D.

Como a análise da tabela 3.15 revela, 35 dos 38 pares de loci investigados apresentaram valores de X^2T não significativos, podendo para eles aceitar-se a hipótese de a probabilidade dos genótipos, considerando dois loci em simultâneo, ser o produto das frequências individuais dos genótipos de cada locus.

TABELA 4.17
Distribuição fenotípica conjunta de ME2/ACP1.

ME2	ACP1							TOTAL
	B	A	AB	BC	AC	BR	C	
1	80 (83,6) [81,2]	19 (15,9) [16,5]	70 (72,8) [73,2]	18 (12,0) [12,9]	4 (5,2) [5,8]	-	1 a (0,4) b [0,51]	192 (190,2)
21	93 (96,4) [97,4]	20 (18,3) [18,0]	88 (84,0) [83,8]	13 (13,9) [13,5]	1 (6,0) [5,8]	1 a (0,3) b [0,3]	-	216 (219,5)
2	38 (27,8) [29,2]	7 (5,3) [4,9]	13 (24,2) [24,0]	2 a (4,0)b [3,5]	5 a (1,7) b [1,4]	-	-	65 (63,3)
TOTAL	211 {207,8}	46 {39,4}	171 {181,0}	33 {29,9}	10 c {13,0}	1 c {1,1}	1 c {0,6}	473

{ } - valores esperados segundo o formalismo de Hardy-Weinberg para cada locus;
( ) - valores esperados de distribuição conjunta baseados em frequências alélicas;
[ ] - valores esperados de distribuição conjunta baseados em frequências haplotípicas;

(a) - classes associadas para o cálculo de X^2T;

(b) - " " " " " " X^2G;

(c) - " " " " " " X^2 para ACP1.

TABELA 4.18
Distribuição fenotípica conjunta de ME2/GOT2

ME2	GOT2			TOTAL
	1	21	31	
1	280 (275,3) [276,5]	3 (8,9) [7,2]	3 a (1,1)b [1,9]	286 {285,5}
21	319 (325,0) [324,5]	17 (10,5) [11,3]	-	336 {337,0}
2	97 (95,9) [95,2]	3 a (3,1)b [4,2]	-	100 {99,5}
TOTAL	696 {696,2}	23 {22,6}	3 {3,0}	722

( ), [ ], { }, (a) e (b) - ver legenda da tabela 4.17

TABELA 4.19
Distribuição fenotípica conjunta de FUCA1/RHC

ME2	RHC			TOTAL
	C	Cc	c	
1	54 (57,6) [56,1]	161 (148,2) [147,7]	89 (95,3) [92,3]	304 {301,1}
21	42 (48,4) [49,2]	116 (124,4) [124,7]	89 (80,0) [78,9]	247 {252,8}
2	19 (10,2) [10,8]	24 (26,1) [26,3]	13 (16,8) [16,0]	56 {53,1}
TOTAL	115 {116,1}	301 {298,7}	191 {192,1}	607

( ), [ ], { } - ver legenda da tabela 4.17

Em três dos pares de loci estudados, especificamente ME2/ACP1, ME2/GOT2 e FUCA1/RHC, registaram-se, porém, valores de X^2T significativos, pelo que para eles se desencadeou a metodologia estatística atrás apresentada.

A distribuição fenotípica conjunta para esses pares de loci, juntamente com a esperada com base em frequências génicas e haplotípicas, apresentam-se nas tabelas 4.17, 4.18 e 4.19.

A tabela 4.20, diz, em concreto, respeito aos valores registados de X^2T, X^2G e X^2D para os mesmos pares de loci.

TABELA 4.20
Valores de X^2T, X^2G e X^2D para os pares de loci com desvios significativos em relação às frequências de equilíbrio.

PAR DE LOCI INVESTIGADO	X^2 T	g.l.	X^2 G	g.l.	X^2 D	g.l.
ME2 x ACP1	18,60 *	9	16,93 ***	6	1,67 ****	3
ME2 x GOT2	8,12 **	2	5,63 **	1	2,49 ****	1
ME2 x RHC	12,91 *	6	11,93 *	5	0,98 ****	1

* - 0,05 > P >0,02
** - 0,02 > P >0,01
*** - 0,010> P > 0,01
**** - P não significativo para o nível de confiança de 5%

Como esta tabela demonstra, em qualquer uma das três combinações de loci, o desequilíbrio gamético, de que X^2D constitui uma medida, não é estatisticamente diferente de

zero, o que quer dizer que as frequências haplotípicas observadas não diferem das esperadas no pressuposto de D = 0, ou seja, de serem o produto das frequências alélicas individuais.

Do ponto de vista genético, isto significa que não existe qualquer tipo de associação preferencial dos alelos nos gâmetas, como aliás se pretende evidenciar na tabela 4.21, em que as frequências gaméticas de equilíbrio são confrontadas com as observadas na população para os pares ME2/ACP1, ME2/GOT2 e FUCA1/RHC.

TABELA 4.21
Frequências haplotípicas observadas e esperadas para os pares de loci **ME2/ACP1, ME2/GOT2 e FUCA1/RHC.**

PAR DE LOCI (AxB)	HAPLÓTIPO (A-B)	FREQUÊNCIA OBSERVADA	FREQUÊNCIA ESPERADA
ME2 x ACP1	1-A	0,1866	0,1830
	1-B	0,4144	0,4203
	1-C	0,0328	0,0302
	1-R	0,0005	0,0006
	2-A	0,1020	0,1056
	2-B	0,2484	0,2424
	2-C	0,0148	0,0174
	2-R	0,0005	0,0004
ME2 x GOT2	1-1	0,619	0,618
	1-2	0,008	0,010
	1-3	0,002	0,001
	2-1	0,363	0,365
	2-2	0,008	0,006
	2-3	0,000	0,001
FUCA1 x RHC	1-C	0,304	0,308
	1-c	0,400	0,396
	2-C	0,133	0,129
	2-c	0,162	0,166

Tal situação tem como contraponto, e como não poderia deixar de ser, o facto de, para os mesmos pares de loci, os valores de X^2G atingirem níveis de significância estatística.

Sendo assim, os desvios às expectativas de Hardy-Weinberg, quer quando se consideram frequências alélicas (X^2T), quer haplotípicas (X^2G), só podem ser interpretados em termos de associações puramente genotípicas, perturbadoras da reunião dos genótipos de loci individuais em genótipos conjuntos, ou de gâmetas em genótipos.

Identificado o tipo de associação específica responsável pelas distorções observadas, há que analisar agora:

1 - O padrão de associação genotípica intrínseco a cada par de loci;

2 - Os factores determinantes das associações observadas.

Quanto ao primeiro aspecto, os resultados apurados não foram particularmente elucidativos.

Em relação a ME2/ACP1, as parcelas individuais que mais contribuíam para os valores globais de X^2s foram os fenótipos ME2-2/ACP1-B, em nítido excesso relativamente aos valores esperados, e ME2-2/ACP1-AB, classe, pelo contrário, deficitária. As duas parcelas combinadas constituíam 48% e 45% dos valores de X^2T e X^2G, por ordem respectiva, detectados na análise conjunta de ME2/ACP1.

Para os desvios registados no par ME2/GOT2, as classes com maiores contribuições parcelares foram classes de baixa frequência, em concreto ME2-1/GOT2-21 e ME2-21/GOT2-21, que conjugadas se saldavam em 98% de X^2T e 95% de X^2G.

Por último, quanto a FUCA1/RHC, a única classe com desvio, só por si, significativo foi FUCA1-2/RHC-C que contribuia com 59% de X^2T e 52% de X^2G.

Portanto, no global, não se evidenciou para qualquer dos três pares de loci, um padrão claro regulamentador da associação preferencial de determinados genótipos em prejuízo de outros.

Tal constatação levanta, por sua vez, o problema do significado real dos desvios detectados ou, por outras palavras, em que medida as amostragens efectuadas retratam, com objectividade, a organização da variabilidade génica bilocus na população em análise.

Não se pode ignorar que, para os três pares de loci os desvios registados, embora significativos, não são de tal modo acentuados que se possa pôr linearmente de parte a hipótese de amostragem deficiente.

Procurou-se, por isso, comparar os presentes resultados com outros previamente publicados. Apesar da escassez de investigações do género, e apenas relativamente a trabalhos com amostragens populacionais numerosas e efeitos de heterogeneidade intraamostrais neutralizados, é considerável a percentagem de desequilíbrios gaméticos detectados envolvendo

pares de loci não sinténicos entre si (Sinnock e Sing, 1972; Payne e Huntsman, 1982; Hernández et al, 1990; Rasmuson et al, 1979; entre outros).

A existência de comprovadas associações preferenciais de não-alelos em gâmetas, embora específicas das populações em análise, permite antever a existência de outro tipo de associações de carácter não gamético e, portanto, a desenrolar-se numa fase pós-zigótica, ideia que os presentes resultados aparentemente consubstanciam.

No entanto, referências na literatura a este tipo de associações são inexistentes e, mesmo do ponto de vista teórico, a análise multilocus tem sido clássica e, quase exclusivamente, formalizada em termos de desequilíbrios gaméticos.

Remetendo-nos à segunda questão em aberto, e apesar de ser plausível que associações gaméticas ou genotípicas possam compartilhar de factores de desencadeamento comuns, tudo o que de momento possa ser adiantado sobre interacções entre loci de tipo exclusivamente genotípico não pretende ser mais que uma contribuição para o desenvolvimento de uma metodologia de investigação especificamente orientada.

Associações genotípicas, sejam elas quais forem, sugerem, de imediato, a actuação de mecanismos selectivos. As associações agora detectadas envolvem, porém, loci cujos produtos génicos desempenham funções biológicas tão diferenciadas, e na aparência tão estanques entre si, que é pouco provável que eventuais interacções epistáticas entre os

pares de loci pudessem ser linear e inequivocamente demonstradas.

Com igual verosimilhança, a não aleatoriedade na reunião de genótipos poderá ser determinada por meros factores inerentes à estruturação genética da população em causa.

Por exemplo, a inexistência de acaso nas regras de acasalamento seria, com certeza, factor de perturbação da distribuição genotípica conjunta.

Qualquer que seja a natureza das associações genotípicas, ou até mesmo gaméticas, e definitivamente demonstradas numa dada população, a inferência dos factores que as determinam passaria pela extensão à análise simultânea de múltiplos loci da via de pesquisa classicamente utilizada em análise locus a locus, nomeadamente:

1 - Estudo da distribuição populacional de tipos de cruzamentos considerando dois (ou mais) loci em simultâneo;
2 - Análise de segregação fenotípica em pares mãe/filho e descendentes de famílias nucleares;
3 - Determinação da capacidade reprodutiva dos indivíduos portadores de genotípicos específicos.

Claro que, pela ordem de grandeza dos tamanhos amostrais que tal via de pesquisa exigiria, só uma acção integrada envolvendo instituições congéneres tornaria viável,

pelo menos a curto prazo, a efectuação duma análise populacional do género.

Para finalizar, e no pressuposto de que o património genético deixa traços da sua história tanto mais indeléveis quanto mais fortemente ligados forem os genes, há que realçar o facto de não se terem detectado desequilíbrios gaméticos entre pares de loci com localização cromossómica relativamente próxima. Mesmo entre FUCA1 e RHC, loci de confirmada vizinhança cromossómica, desequilíbrio gamético pode ser rejeitado como fonte específica de não distribuição independente.

Enquanto não for inequivocamente demonstrada a natureza das associações genotípicas agora observadas, parece-nos legítimo concluir que, pelo menos em termos de desequilíbrios gaméticos, a população em estudo se caracteriza por uma grande estabilidade genética, o que pode ser entendida como o reflexo de elevado conservadorismo quanto ao seu património genético.

4.2.1.3 Considerações gerais

O estudo da estrutura de uma população envolve a integração de variáveis múltiplas, desde as biológicas e demográficas até às sociais e ecológicas (Workman, 1980).

A descrição da estrutura genética de uma população, não esgotando todas as perspectivas de análise, é, porém, um

aspecto essencial da sua caracterização. Para o esclarecimento das causas e do padrão de variação genético no espaço e no tempo, compreende-se que seja fundamental especificar as características básicas da estrutura geográfica e demográfica da população em investigação.

Ao procurar articular os resultados agora obtidos no âmbito da Genética populacional no contexto da geografia e da história demográfica portuguesas, deparámos com um obstáculo sistemático, a exiguidade dos tamanhos amostrais de grande parte das unidades geográficas , circunstância que dificultou a definição, sem ambiguidades, de um padrão de variação genético-geográfico.

No global, e apesar de algumas incongruências, esboçaram-se os contornos gerais desse padrão.

Começa-se por realçar a inexistência de heterogeneidades genéticas marcadas entre as três grandes regiões do país: regões Norte, Sul e Centro.

Se por factores histórico-culturais, condicionados na origem mas ultrapassando largamente as meras barreiras geográficas, tem sentido considerar, ainda hoje, estas três hierarquias regionais, do ponto de vista genético essa hierarquização está, na aparência, ausente.

Não nos podemos esquecer que um dos aspectos histórico-estruturais mais marcantes no nosso país, é o fenómeno de migração, interna ou externa (Nazareth, 1988).

Mais ainda, e restringindo-nos às migrações internas

pela sua importância como factor de diluição de heterogeneidades genéticas, embora não sendo um fenómeno recente, intensificou-se extraordinariamente a partir da década de 50 (Guichard, 1982). A intensa mobilidade que afectou a presente geração da população portuguesa envolve, em termos absolutos, uma participação bastante homogénea de todo o país (Ribeiro et al, 1987).

Não é de estranhar que num país com área territorial pequena, heterogeneidades genéticas de índole regional, a terem existido, se fossem diluindo ao longo dos tempos sob a pressão de movimentações populacionais internas.

No entanto, a uniformidade genética observada entre as regiões Norte, Centro e Sul, é difícil de conciliar com a quantidade de desiquilíbrios genéticos detectados. Quer na análise locus a locus (PEPC, PGM3), quer na análise simultânea de pares de loci (ME2/ACP, ME2/GOT2, FUCA1/RHC), o número de desvios observados ultrapassa o legitimamente esperado, mesmo no pressuposto de que a lista de condições necessárias para o estabelecimento do equilíbrio de Hardy-Weinberg dificilmente se verifica numa dada população (Cavalli-Sforza e Bodmer, 1971).

Esses desequilíbrios, difíceis de interpretar, como vimos, ao nível das associações entre loci, sugerem a actuação de factores de perturbação das condições de panmixia, nomeadamente, a existência de heterogeneidades genéticas intrapopulacionais.

A não detecção de heterogeneidades marcadas leva-nos a repensar o modo como a estratificação geográfica foi efectuada.

De facto, ao considerarmos as regiões Norte, Centro e Sul como unidades de comparação, ignorámos a lei geral das migrações internas no nosso país: o exôdo das regiões do interior para as do litoral, que lhe confere uma nítida orientação este-oeste.

O processo de assimetria litoral/interior tem sido tão flagrante que, em termos demográficos, só faz sentido considerar, actualmente, duas grandes áreas no país: a faixa litoral, desde o Minho à ala algarvia, e a zona interior desde Trás-os-Montes até ao sul da Serra algarvia (Ribeiro et al, 1987).

Qualquer tentativa de detecção de heterogeneidades genéticas só terá condições mínimas de sucesso se o critério de estratificação geográfica levar em linha de conta este aspecto essencial da demografia portuguesa.

Indícios da eficácia de uma estratégia desse tipo é o facto de se ter detectado em relação a FUCA1 uma certa diferenciação genética de Trás-os-Montes.

Interessa também destacar que, no global, as frequências génicas estimadas para Portugal se harmonizam, razoavelmente, com as observadas em outras populações europeias.

Vicissitudes diversas fizeram com que Portugal sofresse, até há pouco tempo, uma nítida marginalização em

relação a outros países europeus.

O isolamento é, como se sabe, factor de vulnerabilização populacional a efeitos de deriva genética. Essa será uma explicação plausível para o facto de algumas frequências se situarem nos extremos da gama de variação detectada em países europeus.

No geral, porém, as afinidades são notórias, o que significa que o isolamento populacional a que Portugal esteve sujeito não teve, por correspondência, um afastamento genético declarado de outros grupos populacionais com os quais compartilhou uma origem comum.

Por fim, e como Amorim (1983) também salienta, é notória a ausência da influência de elementos genéticos africanos na população portuguesa. Geneticamente, corrobora-se assim o saber comum de que o relacionamento estreito e secular de Portugal com populações africanas não resultou num fenómeno de miscegenação relevante. Pelo contrário, a sua ocorrência teve sempre carácter meramente esporádico, como aliás também atesta a inexistência de mestiços na população portuguesa.

4.2.2 Genética formal

Antes de iniciar a discussão deste capítulo, há que fazer uma ressalva introdutória.

Na realidade, no sentido estrito do domínio da

Genética formal, poderá enquadrar-se qualquer tipo de resultados visando a inferência, ou pelo menos a confirmação, de modelos genéticos explicativos das variações fenotípicas observadas para um dado sistema genético.

Com esse intuito, empreendeu-se uma abordagem analítica que envolvia, basicamente, dois tipos complementares de investigação: análise de segregação fenotípica em pares mãe/filho e em descendentes de famílias nucleares.

A prossecução do que nos propúnhamos resultou, em simultâneo, ainda que de forma lateral, num conjunto de resultados classicamente enquadrados no âmbito da Genética populacional, nomeadamente os concernentes à distribuição fenotípica na população de pares mãe/filho e de tipos de cruzamento, mas que, ao mesmo tempo, funcionam como indicadores de grande utilidade na investigação de irregularidades de segregação.

Achou-se, por isso, que seria demasiado artificial, e muito pouco cómodo, fazer com base nos mesmos resultados a sua análise populacional e formal autonomamente.

Assim, neste item, será feita uma discussão conjunta que, e a título de sistematização, envolverá os seguintes tópicos:

- Análise de segregação fenotípica em pares mãe/filho ou descendentes de famílias nucleares, pressupondo um determinado modelo genético formal, e as proporções mendelianas como referência;

- Análise de distribuição populacional de pares mãe/filho e de tipos de cruzamento, assumindo como termo de comparação os valores esperados com base nas condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os resultados obtidos para F13A, FUCA1, GOT2 e PGM3 manifestaram, em geral, acordo razoável com as hipóteses postuladas, pelo que as respectivas genéticas formais, até agora tão pouco exploradas, se vêm agora um pouco mais consolidadas. Para cada um dos marcadores referidos, os modos de transmissão que a seguir se apresentam, juntamente com a respectiva autoria, podem-se considerar, de momento, incontroversos:

F13A - locus autossómico com 2 alelos codominantes: F13A*1 e F13A*2 - Board, 1979;

FUCA1 - locus autossómico com 2 alelos codominantes: FUCA1*1 e FUCA1*2 - Turner et al, 1975;

GOT2 - locus autossómico com 3 alelos codominantes: GOT2*1, GOT2*2 e GOT2*3 - Davidson et al, 1970;

PGM3 - locus autossómico com 2 alelos codominantes: PGM3*1 e PGM3*2 - Hopkinson e Harris, 1968.

No que respeita a ME2 e a PEPC, os resultados registados, pela sua ambiguidade relativa, merecem um tratamento individualizado.

a) ME2

Quer a segregação fenotípica em pares mãe/filho, quer a observada na descendência de famílias nucleares, não revelaram incompatibilidades declaradas com a hipótese formal previamente formulada por Cohen e Omenn (1972), segundo o qual os fenótipos de ME2 estariam sob o controlo genético de um locus autossómico com 2 alelos codominantes, ME2*1 e ME2*2.

Registaram-se, porém, alguns desajustes em relação a um padrão regular de transmissão mendeliana.

Com efeito, a distribuição populacional de pares mãe/filho surgiu com um desvio, relativamente à esperada, pressupondo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, não muito confortável em termos de confiança estatística: $X^2 = 7,71$; g.l.=5; $0,02 > P > 0,01$. A distorção era, basicamente, devida a uma deficiência de pares com filhos de fenótipo 2.

No sentido de tentar esclarecer o factor de enviesamento da distribuição, procedeu-se a uma triagem de pares entrando em consideração com o sexo da criança, isto é, seleccionando-se para cada mãe, ou o primeiro filho de sexo feminino, ou o primeiro filho de sexo masculino, e considerando, como critério de seriação, o número de registo de entrada no banco de dados, em analogia, diga-se, com a triagem de todos os pares mãe/filho em geral. Os resultados apresentam-se na tabela 4.22.

Curiosamente, se nos pares em que o filho era de sexo feminino os resultados manifestaram um bom enquadramento em relação aos esperados, o mesmo não acontecia naqueles em

Tabela 4.22
Distribuição fenotípica de ME2 em pares mãe/filho com filhos discriminados por sexo.

MÃE	FILHO				FILHA			
	FENÓTIPO			N	FENÓTIPO			N
	1	21	2		1	21	2	
1	46 (40,57)	23 (25,47)		69	47 (45,22)	26 (27,36)		73
21	24 (25,47)	47 (41,46)	6 (15,99)	77	31 (27,36)	37 (43,92)	19 (16,56)	87
2		24 (15,99)	5 (10,04)	29		19 (16,56)	8 (10,02)	27
TOTAL	70	94	11	175	78	82	27	187
	ME*1 = 0,614 X^2= 14,58; g.l.= 5; 0,02> P> 0,01				ME2*1 = 0,623 X^2= 2,84 ; g.l.= 5; 0,80> P >0,70			

que o filho era masculino. Nestes, observou-se um desvio estatisticamente significativo, que era sobretudo providenciado por uma proporção assimétrica e, de por si significativa, de pares mãe 2/filho 2-1 em comparação com o par inverso, e ainda por uma carência de pares 2/2. A distorção reflectia-se, por sua vez, na própria distribuição fenotípica na classe dos filhos, que diferia significativamente da esperada segundo o princípio de Hardy-Weinberg (X^2= 7,87; g.l.= 1; 0.005>P>0.001)

Transferiu-se, então, a atenção para o nível da análise familiar, procurando encontrar algum paralelismo quanto ao padrão de segregação (ver tabela 3.13).

A análise da tabela revela, de facto, uma segregação

um pouco irregular no cruzamento 2x2-1, onde a distorção em relação às proporções mendelianas ultrapassava, ainda que por pouco, o nível de significância estatística (X^2= 5,06; g.l.=1; 0,02 >P> 0,01).

Face a esta observação, reanalisaram-se os resultados, levando também em consideração o sexo dos indivíduos. A tabela 4.23, diz precisamente respeito a esses resultados, que no global não se revelaram muito esclarecedores.

Permitiram, no entanto, pôr de parte a existência de qualquer tipo de associação inequívoca sexo/fenótipo, como a análise de pares mãe/filho parecia suportar.

Contraditoriamente, evidenciou que a tendência preferencial para a segregação de descendentes 2-1, em detrimento dos de fenótipo 2 no cruzamento 2x2-1, era mais marcada, e até de si já significativa, quando o pai era 2 e a mãe 2-1, do que no cruzamento recíproco: X^2= 4,84 , g.l.= 1 , 0,05 >P> 0,02 no cruzamento pai 2 x mãe 21 e X^2= 2,79 , g.l.=1, 0,10 >P> 0,05, no cruzamento recíproco (ambos os valores foram calculados desprezando o sexo dos descendentes).

Esta vinculação pontual de segregação ao sexo dos progenitores parece, pela sua fragilidade, meramente ocasional.

O mesmo não se poderá dizer da segregação preferencial de descendente 2-1, uma vez que também no cruzamento 1x2-1 ou 2-1x1 se observou um ligeiro excesso de filhos pertencentes a essa classe fenotípica.

TABELA 4.23 - ME2: Segregação fenotípica em famílias nucleares com discriminação por sexos e distribuição populacional de tipos de cruzamentos.

TIPO DE CRUZAMENTO		TOTAL			FENÓTIPO DOS DESCENDENTES						X^2	P(%)
Pai	Mãe	Cruz.	Desc.		1		21		2			
			M	F	M	F	M	F	M	F		
1	x 1	25 (21,27)	25	36	25	36						
1	x 21	19 (26,90)	36	22	15 (18,00)	9 (11,00)	21 (18,00)	13 (11,00)			1,73	a 50-25
21	x 1	21 (26,90)	38	29	19 (19,00)	12 (14,50)	19 (19,00)	17 (14,50)			0,86	a 75-50
21	x 21	45 (34,02)	59	47	20 (14,75)	14 (11,75)	29 (29,50)	17 (23,50)	10 (14,75)	16 (11,75)	7,17	b 10-25
21	x 2	12 (10,76)	20	19			13 (10,00)	10 (9,50)	7 (10,00)	9 (9,50)	1,85	a 50-25
2	x 21	10 (10,76)	12	13			8 (6,00)	10 (6,50)	4 (6,00)	3 (6,50)	4,18	a 10-25
			165		54 (51,75)		90 (82,50)		21 (30,75)		3,87	c 0,05-0,02
				130		35 (37,25)		67 (65,00)		28 (27,75)	0,20	c 75-90
1	x 2	13 (8,50)	16	17			16	17				
2	x 1	6 (8,50)	9	13			9	13				
TOTAL		151	215	196	79	71	115	97	21	28		

ME2*1 = 0,613 X^2 = 13,32 ; g.l. = 6 ; 0,05 > P > 0,02

a) g.l.=2
b) g.l.=4
c) g.l.=1

Aliás, quando se efectuou o balanço global de segregação nos cruzamentos potencialmente informativos (área a tracejado nas tabelas 3.13 e 4.23), constatou-se que nos descendentes do sexo masculino havia um predomínio bastante acentuado, mas ainda não significativo, de indivíduos 2-1, tendo como contrapartida uma carência relativa de indivíduos 2. Tal resultado não deixa de ser interessante por vir ao encontro da tendência já esboçada na segregação pares mãe/filho.

Também na distribuição populacional dos tipos de cruzamentos se observaram algumas irregularidades. Com efeito, encontrou-se um desvio significativo em relação ao esperado pressupondo cruzamentos ao acaso (Tab 3.13 e 4.23)

As classes com maiores contribuições parciais para o desvio total foram as correspondentes ao cruzamento 1x2-1, onde a frequência foi, manifestamente, inferior à esperada, e ao cruzamento 21x21, onde a situação foi inversa. No que concerne ao primeiro cruzamento referido, a análise da tabela 4.23 demonstra que o desvio não está dependente da separação entre recíprocos.

Pode dizer-se que os dados agora apurados sobre a Genética formal de ME2 se caracterizam, no global, por uma alguma indefinição.

Resultados comparáveis são escassíssimos por razões que se prendem com o tipo de material biológico que a maioria dos autores utiliza para o estudo deste polimorfismo. Numa

revisão da bibliografia disponível, conseguiu-se apenas encontrar dois trabalhos (Siebert et al, 1979; Stöhlmacher e Haferland, 1989), que no total se saldaram por um conjunto de 130 pares mãe/filho (filhos não discriminados por sexo) e que, analisados conjuntamente, não evidenciaram a tendência que agora se delineou.

O significado real das distorções observadas para ME2 afigura-se, pois, de díficil avaliação, até porque não foi possível evidenciar um padrão homogéneo e inequívoco condutor dos pequenos enviesamentos observados.

De momento, ignorar os desvios detectados, ou considerá-los apenas fortuitos por se terem registado em especial em classes de baixa frequência, parece, pelo seu número, tão prematuro como tentar conotá-los com eventuais pressões selectivas.

De seguro, o que os presentes resultados indicam é que há, quanto a ME2, um ligeiro desajuste relativamente a um padrão regular de transmissão mendeliana e, em simultâneo, inconsistências populacionais que sugerem que alguma ou algumas das condições necessárias para o estabelecimento do equilíbrio de Hardy-Weinberg não se cumprem na população em análise.

A inferência dos factores responsáveis por essas perturbações exigirá um alargamento extraordionário do espaço amostral para se poderem mobilizar valores numéricos incontroversos, sobretudo ao nível das classes fenotípicas de menor frequência.

b) PEPC

Na análise de segregação referente a PEPC, considerou-se de início, como hipótese formal de transmissão genética, a sugerida por Kömpf et al, 1989: um locus autossómico com 3 alelos codominantes, PEPC*1, PEPC*6 e PEPC*2.

A segregação fenotípica em pares mãe/filho não demonstrou inconsistências quanto a este modelo, uma vez que nem se observou qualquer exclusão mãe/filho, nem o aparecimento de fenótipos não previstos.

Porém, na análise familiar, surgiram duas famílias nucleares manifestando incompatibilidades relativamente ao modelo genético em causa, o que obrigou à reformulação por ajustamento do mesmo.

Em ambas se observaram exclusões aparentes no sistema PEPC. Na primeira, em que o pai era 61 e a mãe 1, registaram-se 5 filhos, numa fratria de 13, de fenótipo 6. Na segunda família, pai 6 x mãe 1, 2 dos 5 filhos eram fenotipicamente 1.

A possibilidade de erro técnico na fenotipagem foi posta de parte, pois os mesmos indivíduos foram testados diversas vezes em condições independentes. Por outro lado, nem a paternidade nem a maternidade biológica foram refutadas por qualquer outro marcador genético constante da bateria habitualmente utilizada para o efeito no Instituto de Antropologia.

Sendo assim, a segregação fenotípica nos descendentes destas duas famílias só pode ser explicada fazendo intervir no modelo genético de transmissão um outro alelo sem expressão electroforética diferenciada, ou seja, um alelo nulo, que passaremos a designar PEPC*0.

Nesse caso, a mãe da primeira família , embora de fenótipo 1, seria genotipicamente 1-0, e os filhos de fenótipo 6 seriam obrigatoriamente 6-0.

Na segunda família, o portador do alelo nulo seria o pai, que o terá transmitido aos descendentes de fenótipo 1.

A detecção de um alelo nulo no sistema PEPC não surpreende em absoluto. Com efeito, em 1983, Kömpf e Ritter haviam detectado exclusões aparentes em pares mãe/filho quanto a PEPA, sistema genético que, como já se escreveu, mais tarde se demonstrou ser PEPC.

É de destacar que, no trabalho em que o equívoco é desfeito, e onde se apresentam resultados de segregação familiar, não se conseguiu evidenciar a presença do mesmo gene.

Também neste trabalho, confrontados com uma família com 5 dos filhos manifestamente incompatíveis com o fenótipo da mãe, vimo-nos na contingência de todas as exclusões terem escapado ao método da triagem adoptada para a recolha de pares mãe/filho, o que na prática tornou inoperente este nível de investigação para a detecção do alelo nulo.

O facto só vem reforçar a ideia comum de que a

detecção de alelos silenciosos é extremamente falível.

Primeiro, pelo método de detecção em si, ou seja, por não se detectar directamente um produto génico, mas antes uma incompatibilidade fenotípica de um indivíduo face a uma hipótese de genótipo dos seus progenitores cujo fenótipo destes favorece. Daqui resulta que, no mínimo, um par de genótipos (entenda-se indivíduos) são necessários para seguramente detectar um único alelo nulo.

Segundo, por serem genes que, em geral, se encontram no nível da relativa raridade e, por conseguinte, a estimativa da sua frêquencia é extremamente permeável a qualquer tipo de estratificação populacional, estratificação que pode ser determinada por factores tão variáveis como os de índole geográfica, social ou cultural, ou seja, precisamente aqueles mais determinantes na hierarquização das regras de acasalamento entre os indivíduos de uma dada população.

O aumento da possibilidade de detectar alelos silenciosos vê-se, assim, na dependência de dois parâmetros fundamentais.

Por um lado, o tamanho do espaço amostral, inevitavelmente grande, e que, dado envolver, ou pares mãe/filho ou famílias nucleares, não se pode dizer que seja fácil de concretizar.

Por outro, a detecção de alelos nulos e, portanto, a capacidade de estimar a sua frequência de forma tão correcta quanto possível, é significativamente determinada pelos critérios amostrais utilizados. Uma metodologia amostral menos

adequada pode resultar em valores perigosamente falseados, quer por sobreestimativa, no caso, por exemplo, do esforço amostral incidir sobre grupos populacionais fechados, ou em subestimativas no caso contrário, isto é, em que o esforço amostral seja demasiado disperso.

De qualquer forma, a determinação da frequência de alelos silenciosos resulta em valores que serão sempre aproximações, tanto menores em relação ao valor real quanto mais apropriado for o método utilizado para a sua determinação. Na impossibilidade de proceder a uma contagem directa dos genes, para alelos nulos o método mais apropriado será aquele que consiga processar o máximo de classes de informação fenotípica mobilizadas. De momento, existem até metodologias estatísticas bastante eficazes, mas cujas condições de aplicabilidade se limitam aos grupos amostrais que, em simultâneo, permitam uma estimativa preliminar do alelo silencioso (por outras palavras, com exclusões declaradas), e que apresentem todas, ou pelo menos a grande maioria, das constelações fenotípicas previsíveis.

Neste caso concreto, foi impossível utilizar qualquer método mais sofisticado para a estimativa de PEPC*0: no grupo dos pares mãe/filho, porque não incluía qualquer incompatibilidade fenotípica; no grupo dos tipos de cruzamentos, porque uma grande fracção de tipos previstos não se encontrava representada.

Optou-se, pois, por recorrer a uma pseudo-contagem

directa de genes: no conjunto de genes amostrados em casais, contabilizou-se dois como de tipo PEPC*0, uma vez que só se consideraram como heterozigóticos aqueles dois indivíduos para os quais havia provas indirectas de serem portadores do referido alelo.

Inevitavelmente, o valor obtido, PEPC*0= 0,005, surge como uma subestimativa da frequência do gene, na medida em que não foi possível quantificar toda a fracção de portadores do gene.

Crê-se que o valor real de PEPC*0 será bastante superior, não obstante essa presunção se basear apenas em provas circunstanciais.

Desde logo, e retrocedendo à distribuição fenotípica na população (ponto 4.2.1.1), o excesso global de indivíduos homozigóticos é francamente significativo na fracção masculina da população. Embora o alelo nulo não possa ser, em exclusivo, responsabilizado pela distorção observada, a sobreposição, ou analogia, do padrão de distorção observado não deixa de ser sugestiva.

Insinuante é também a segregação fenotípica em pares mãe/filho (tabela 3.9). A observação de um par 2-1/2 levanta, pela raridade com que era esperado, algumas dúvidas de interpretação. Considerando a frequência de PEPC*0= 0,005 e PEPC*2=0,005, a probabilidade condicionada ao fenótipo de o filho ser 2-2 ou 2-0 é de 0,33 e 0,67, respectivamente.

Se se entender que a frequência de PEPC*0 está

subestimada, então esses valores redundam numa diferenciação ainda maior.

Afigura-se, pois, como bastante mais plausível, que o indivíduo de fenótipo 2 seja um portador para o alelo silencioso.

Ainda quanto à análise de pares mãe/filho, é de assinalar o afastamento significativo em relação à distribuição fenotípica esperada segundo o princípio de Hardy-Weinberg. O desvio era, basicamente, provocado por uma assimetria por excesso de pares 1/6-1 e 6-1/6, este

Tabela 4.24
Distribuição fenotípica de PEPC em pares mãe/filho com filhos discriminados por sexo.

MÃE	FILHO					FILHA				
	FENÓTIPO				N	FENÓTIPO				N
	1	61	6	21		1	61	6	2	
1	59 (67,56)	22 (16,13)			81	61 (67,52)	22 (15,38)			83
61	18 (16,13)	22 (20,07)	6 (3,85)		46	18 (15,38)	14 (19,03)	7 (3,50)		39
6		2 * (3,85)			2		4 * (3,50)			4
21				1 * (0,42)	1	1 * (0,67)			1 * (0,01)	2
TOTAL	77	46	6	1	130	80	40	7	1	128
	PEPC*6 = 0,192 ; PEPC*2 = 0,004 X^2= 6,54; g.l.= 3; 0,05 < P < 0,10					PEPC*6 = 0,184 ; PEPC*2 = 0,008 X^2= 9,60; g.l.= 3; 0.02 > P > 0,01				

* classes somadas para cálculo de X^2

individualmente já significativo em comparação com os inversos 6-1/1 e 6/6-1.

Tal como para ME2, aprofundou-se a análise à discriminação das crianças por sexo, estando os resultados sumariados na tabela 4.24.

Como se pode ver, a tendência desenha-se em ambos os grupos, mas só ultrapassa, ligeiramente, o nível de significância estatística naquele que incluía crianças de sexo feminino.

Esta assimetria não tem paralelismo ao nível da segregação familiar, onde os resultados observados se ajustam perfeitamente a um padrão regular de transmissão mendeliana, desde que se entre em linha de conta com a existência do alelo PEPC*0.

Na tabela 4.25, processaram-se os mesmos resultados discriminando o sexo dos indivíduos, o que permitiu concluir que, na aparência, o sexo não tem qualquer tipo de vinculação com a informação genética que cada criança recebe dos pais.

Reportando-nos ainda à mesma tabela, não se notou nos cruzamentos em que a mãe era 1, qualquer tendência a originar, preferencialmente, descendentes 6-1 ou 6 se a mãe fosse 6-1, em contradição com o que a análise de segregação em pares mãe/filho sugeria.

A propósito dos tipos de cruzamento, é de assinalar o desvio já significativo relativamente à distribuição prevista pressupondo as condições de equilíbrio de Hardy-

TABELA 4.25 - PEPC: Segregação fenotípica em famílias nucleares com discriminação por sexos e distribuição populacional de tipos de cruzamentos.

TIPO DE CRUZAMENTO	TOTAL			FENÓTIPO DOS FILHOS							
Pai x Mãe	Cruz.	Desc.		1		61		6		21	
		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
1 x 1	40 (40,34)	59	60	59	60						
1 x 61	22 (20,47)	43	23	18 (21,50)	12 (11,50)	25 (21,36)	11 (11,43)	– (0,13)	– (0,07)		
61 x 1	16 (20,47)	36	35	19 (18,01)	14 (17,50)	13 (17,89)	20 (17,39)	4 (0,11)	1 (0,11)		
61 x 61	11 (10,39)	19	12	5 (4,75)	3 (3,00)	10 (9,50)	5 (6,00)	4 (4,75)	4 (3,00)		
6 x 1	7 (2,76)	10	17	– (0,23)	– (0,40)	9 (9,70)	16 (16,50)	1 (0,06)	1 (0,10)		
1 x 6	4 (2,76)	2	5	– (0,05)	– (0,12)	2 (1,94)	5 (4,85)	– (0,01)	– (0,03)		
1 x 21	1 (0,20)	1	2	– (0,50)	2 (1,00)					1 (0,50)	– (0,99)
TOTAL	101	170	154	101	91	59	57	9	6	1	2

PEPC*1 = 0,790 ; PEPC*6 = 0,203 X^2 = 10,27 ; g.l.= 3 ; 0,02 > P > 0,01

PEPC*2 = 0,002 ; PEPC*0 = 0,005

-Weinberg. A classe que contribuía, quase exclusivamente, para o desvio observado, era uma das de frequência relativa mais baixa, concretizando o cruzamento 1x6. Complementarmente, a tabela 4.25 revela que é sobretudo o cruzamento pai 1 x mãe 6 que mais se afasta do valor esperado.

A existência, consubstanciada neste trabalho, dum alelo nulo no sistema PEPC é, seguramente, factor de perturbação da distribuição fenotípica na população de indivíduos, de pares mãe/filho ou de tipo de cruzamento.

Porém, é-se tentado a admitir que, pelo menos no referente aos dois últimos níveis de análise, os desvios só atingem o nível de significância por um mero efeito amostral.

A observação de bastantes classes de baixa frequência potencia eventuais incorrecções amostrais, situação que pode empurrar, falaciosamente, a probabilidade dos valores de X^2 para níveis de significância estatística.

A título de consideração final sobre a Genética formal de PEPC, e apelando àquilo que ao longo deste trabalho se tem vindo a tornar um lugar comum, surge expressar a necessidade de alargar o espaço amostral, se se pretender estimar com correcção a frequência do alelo PEPC*0 e esclarecer os aspectos mais ambíguos que os presentes resultados evidenciaram.

4.2.3 Avaliação do grau de informação e aplicabilidade dos marcadores leucocitários em investigações da paternidade

Em investigação de paternidade biológica, o ideal seria que qualquer veredicto formal pudesse ser dado, ou no sentido da refutação inequívoca da paternidade, ou, quando tal não se verificasse, ser formulado em termos de verosimilhanças de paternidade que se enquadrassem no predicado verbal "paternidade praticamente provada".

Na prática, contudo, existe sempre uma fracção residual, mas não desprezível, de casos em que o resultado final não é tão linear.

Embora essa fracção tenha tendência a aumentar com o número de casos investigados, o seu valor relativo está dependente da quantidade de informação genética que é possível mobilizar de cada vez, ou seja, da disponibilidade técnica de cada laboratório em termos do número e do poder informativo dos sistemas genéticos que a sua bateria de análise integra.

O enriquecimento de qualquer bateria em novos marcadores afigura-se, pois, e em última análise, sempre pertinente.

Daí que, e de acordo com um dos objectivos propostos, se procurasse avaliar os graus de informação e aplicabilidade dos marcadores leucocitários agora estudados no diagnóstico da paternidade.

O potencial informativo das análises efectuadas tem sido, classicamente, medido pela eficiência de exclusão á priori.

Os valores obtidos isoladamente para cada marcador, bem como o mesmo valor acumulado, apresentam-se na tabela 4.26.

TABELA 4.26
Eficiência de exclusão á priori por sistema genético e valor acumulado.

SISTEMA GENÉTICO	EFICIÊNCIA DE EXCLUSÃO Á PRIORI (%)		
	TOTAL	EXCLUSÕES DE 1ª ORDEM	EXCLUSÕES DE 2ª ORDEM
F13A	15,02	8,24	6,78
FUCA1	16,45	7,83	8,62
GOT2	1,78	1,73	0,05
ME2	17,88	7,01	10,87
PEPC	13,98	8,52	5,47
PGM3	15,96	8,01	7,95
EFICIÊNCIA DE EXCLUSÃO ACUMULADA	**58,61**	**34,96**	**33,97**

Como era de esperar, dada a assimetria de frequências génicas, GOT2 é o sistema genético com menor conteúdo informativo em investigações de paternidade. De facto, tomando um par mãe/filho ao acaso, a probabilidade de GOT2 excluir como presumível pai um indivíduo também ao acaso

dentro da população portuguesa, não chega a 2%. No entanto, é de salientar que este valor é basicamente proporcionado por exclusões de 1ª ordem (mais de 97%) que são, como se sabe, aquelas que oferecem maior credibilidade.

No global, os seis marcadores leucocitários possuem uma eficiência de exclusão de 58,61%, valor em si de razoável magnitude e em que é de destacar o facto de as exclusões de 1ª ordem (51%) predominarem sobre as de 2ª (49%).

Como Amorim et al (1986) acentuam, se o critério de selecção de uma bateria de análise for a eficiência de exclusão á priori, a escolha dos sistemas genéticos deve ser principalmente ponderada em função das eficiências de exclusão de 1ª ordem.

Nessa perspectiva, um valor de 34,96% (eficiência de exclusão de 1ª ordem, acumulada) afigura-se como um contributo importante em qualquer bateria de análise.

A eficiência de exclusão possui enviesamentos de definição - cuja discussão ultrapassa o âmbito do presente trabalho - que têm posto em causa o seu valor como estimador do potencial informativo de um ou mais sistemas genético no âmbito da investigação da paternidade.

De acordo com Rocha (1988), o critério mais avalizado para o efeito, é o da comparação dos valores médios de probabilidade de paternidade (W) ou do índice de paternidade (L) entre verdadeiros e falsos pais.

Para cada um dos seis marcadores leucocitários,

TABELA 4.27
Valores médios de W e L entre verdadeiros e falsos pais por sistema genético e acumulados.

SISTEMA GENÉTICO	POR LOCUS					ACUMULADO				
	W (%)	L	W(%)	L	WV - WF (%)	W(%)	L	W(%)	L	WV - WF (%)
	entre verdadeiros pais		entre falsos pais			entre verdadeiros pais		entre falsos pais		
FUCA1	56,00	1,273	44,00	0,786	12,00	56,00	1,273	44,00	0,786	12,00
F13A	55,76	1,260	44,24	0,793	11,52	61,61	1,605	38,39	0,623	23,22
GOT2	51,00	1,041	49,00	0,961	2,00	62,55	1,670	37,45	0,599	25,10
ME2	56,18	1,282	43,82	0,780	12,36	68,16	2,141	31,84	0,467	36,32
PGM3	55,93	1,269	44,07	0,788	11,86	73,09	2,716	26,91	0,368	46,18
PEPC	55,60	1,252	44,40	0,799	11,20	77,29	3,403	22,71	0,294	54,58

WV - Valor médio de W entre verdadeiros pais

WF - " " " " " falsos "

calcularam-se esses valores, que são os constantes da tabela 4.27, onde também se apresentam os valores médios acumulados.

Numa análise global interessa destacar que, considerados conjuntamente, os seis marcadores possuem um valor médio de W de 77,29% na fracção populacional constituída pelos verdadeiros pais, enquanto que na dos falsos pais esse valor é de apenas 22,71%.

A diferença entre estes dois valores é considerada uma medida directa do conteúdo informativo dos sistemas genéticos em jogo. Neste caso concreto, a sua capacidade de distinguir verdadeiros pais de falsos pais é de 54,52%.

Interpretando os resultados em termos de L, a capacidade dos seis marcadores leucocitários discriminarem entre a hipótese de paternidade e a de não paternidade é de 3,40 para 0,29.

Avaliada quantitativamente a potencial contribuição dos marcadores estudados em investigações de paternidade, convirá agora discutir se satisfazem outros requisitos indispensáveis a uma utilização optimizada nesse domínio.

Quanto à solidez do modelo genético formal, F13A, FUCA1, GOT2 e PGM3 satisfazem plenamente as condições de utilização.

Também para ME2 não parece que as ligeiras irregularidades detectadas na segregação em pares mãe/filho e nos descendentes de famílias nucleares possam constituir

factor de enviesamento relevante nas análises em causa.

Contudo, os resultados da genética formal de PEPC, ao evidenciarem a existência de um alelo nulo, levaram-nos a reanalisar a utilidade deste marcador em investigações de paternidade.

Alelos nulos são factor de perturbação da elucidação das relações genealógicas em geral, podendo conduzir a refutações erradas da paternidade ao mimetizarem, falaciosamente, exclusões de 2ª ordem.

Actualmente, estão descritos alelos silenciosos para um grande número de sistemas genéticos utilizados por rotina em investigação da paternidade (Polesky et al, 1983; Mohrenweiser, 1987). O caso de PEPC*0 destaca-se, porém, por apresentar uma frequência génica relativamente elevada para a categoria de genes em que se insere.

Em tais condições, o conteúdo informativo deste sistema genético fica nitidamente diminuído, facto que se procurou ilustrar ao reavaliar a sua eficiência de exclusão entrando em linha de conta com o alelo PEPC*0. O valor obtido foi de apenas 8,61%, ainda que integrando, exclusivamente, exclusões de 1ª ordem.

Por outro lado, exclusões de 2ª ordem no sistema PEPC perdem ainda mais credibilidade do que habitualmente as caracteriza, na medida em que a proporção de exclusões aparentes aumenta, consideravelmente, no conjunto total de exclusões.

Assim, o transtorno introduzido pelo alelo nulo não pode ser apenas apreciado em termos de perda de conteúdo informativo, mas também face à atitude de indefinição que gera perante constelações fenotípicas de trios presumível pai/mãe/filho, sugerindo refutação de paternidade por exclusão de 2ª ordem na circunstância desse veredicto não ser corroborado por mais nenhum sistema genético da bateria de análise.

Como Valentin (1977), entre outros, salienta, à disponibilidade de uma base alargada de informação genética contrapõe-se o aumento do risco de estabelecer exclusões incorrectas. Como tal, uma medida de segurança constantemante preconizada, mas que na prática poucos laboratórios concretizam, é a prospecção de alelos silenciosos numa dada população antes da introdução de um sistema genético numa bateria de análise (Henningsen, 1981).

Sistemas genéticos com alelos nulos de frequência elevada deveriam ser, senão evitados, pelo menos manuseados com particular restrição.

Pelo que foi exposto, PEPC deve considerar-se nessas condições.

Um outro aspecto a ter em atenção antes da introdução de novos sistemas genéticos numa bateria de análise, é o dos requisitos em tecnologia laboratorial que a sua fenotipagem exige, associado ao custo intrínseco do preço da fenotipagem.

Com efeito, se susceptibilidades a falhas técnicas poêm em causa a segurança de utilização dum sistema genético em investigação de paternidade, encargos globais muito elevados constituem factor proibitivo do recurso sistemático à análise genética no diagnóstico de paternidade.

Em referência ao primeiro ponto, estes seis marcadores leucocitários apresentam um grau de dificuldade de manipulação laboratorial da mesma ordem de grandeza da maioria dos outros marcadores utilizados para o efeito, e que se pode considerar baixo.

Quanto ao custo por fenotipagem, só PEPC se afasta dos valores médios por sistema genético, pelo facto, como dissémos oportunamente, de a sua fenotipagem exigir o uso de uma espécie molecular bastante onerosa.

O aumento relativo do custo de fenotipagem de PEPC, não se pode considerar, todavia, excessivo.

Em resumo, da análise global das condições de aplicabilidade e informação dos marcadores leucocitários estudados na investigação de paternidade, poderá concluir-se, desde já, o seguinte:

1º F13A, FUCA1, GOT2, ME2, PEPC e PGM3 são sistemas genéticos que obecem aos padrões normalizados para a integração numa bateria de análise, podendo dar um contributo importante ao esclarecimento do problema.

2º GOT2 e PEPC são, dos seis sistemas estudados,

aqueles cujas condições de utilização são menos favoráveis.

GOT2, porque, para além de apresentar um conteúdo informativo relativamente reduzido, possui frequências génicas muito assimétricas, pelo que a sua caracterização genética, populacional e formal, se vê extremamente dificultada, em especial quanto à possibilidade de se detectarem alelos nulos.

PEPC, porque pela frequência bastante elevada de PEPC*O, transtorna, substancialmente, a condução do tratamento clássico de situações de exclusão de paternidade, obrigando a que sejam sempre processadas bioestatisticamente em termos de probabilidade de não-paternidade.

Embora GOT2 e PEPC não devam ser, liminarmente, excluídos de uma bateria de análise, poderiam considerar-se dispensáveis se a bateria integrasse marcadores genéticos em excesso, fase em que não se encontra a presentemente disponível no Instituto de Antropologia da Faculdade de Ciências.

Antes de finalizar este capítulo há que abordar uma última questão.

A manipulação de um número progressivamente alargado de marcadores genéticos em testes de paternidade, é fonte também de novos problemas. Assim, na estratégia bioestatística vulgarizada, perfeitamente razoável para um número limitado de

sistemas genéticos, é assumido que cada locus segrega independentemente dos outros, o que legitima a inferição de verosimilhanças de paternidade por combinação multiplicativa dos valores parciais obtidos em cada sistema.

Com o número progressivo de loci adicionados à bateria, torna-se necessário reavaliar aquela pressuposto já que, aumentando a possibilidade de alguns estarem fortemente ligados, aumenta, implicitamente a probabilidade de ocorrerem associações não aleatórias entre alelos de loci diferentes, associações essas que podem, de igual modo, ocorrer entre loci não ligados factorialmente (Chakravarti e Li, 1983).

Verificando-se tal situação, a insistência no pressuposto de independência induziria a verosimilhanças de paternidade forçosamente falseadas. O tratamento bioestatístico deverá ser reajustado fazendo intervir alguns parâmetros adicionais, nomeadamente frequências haplotípicas, fracções de recombinação e valores de desequilíbrio gamético (Chakraborty e Hedrick, 1983).

Para além do mais, e como Smouse e Adams (1983) salientam, sendo a informação fornecida pelo segundo de um par de loci ligados parcialmente perdida, há que avaliar criticamente a pertinência da própria introdução do segundo locus na bateria de análise.

Assim, compreende-se que se tenha dispersado a análise conjunta de pares de loci, por pares envolvendo, de cada vez, um locus de um marcador leucocitário e de outros utilizados por rotina em investigações de paternidade,

incluíndo loci com proximidade cromossómica reconhecida.

Como se viu no ponto 4.2.1.2, associações preferenciais entre não alelos em gâmetas não foram detectadas, nem sequer entre FUCA1 e RH, loci de todos, os de mais estreita vizinhança cromossómica.

Ainda que não se esgotasse a análise de todas as associações 2 a 2 possíveis, estes primeiros resultados parecem vir reforçar a pertinência da utilização dos marcadores leucocitários em investigações de paternidade, uma vez que foram eliminados como factores de enviesamento eventuais associações gaméticas declaradas.

Porém, não devemos ignorar os indícios de associações genotípicas que encontrámos envolvendo alguns pares de loci estudados.

Embora de momento não se possa excluir a hipótese de deficiência amostral, tais associações, a confirmarem-se, deveriam ser tidas em consideração aquando da sua utilização, em simultâneo, em testes de paternidade.

Nesse caso, e dada a natureza das associações, frequências haplotípicas seriam irrelevantes, sendo necessário jogar com frequências de classes genotípicas de pares de loci que manifestassem associações comprovadas.

Só deste modo, valores de verosimilhanças de paternidade reflectiriam a organização da variabilidade genética na população portuguesa.

4.3 Análise de ligação factorial

A análise de ligação foi apenas conduzida para *loci* que, de momento, não possuíssem localização cromossómica definitiva, caso de ME2, ou quando tal pudesse contribuir para um reforço de resultados previamente pouco consolidados, especificamente o estudo das relações de ligação entre PEPC, F13B, HF e FY.

Os resultados obtidos proporcionaram a seguinte discussão:

4.3.1 ME2

Até à data, ME2 tem resistido às escassas tentativas de localização cromossómica a que foi sujeito.

Estudos de hibridação celular somática restringiram-se aos efectuados por Povey *et al* (1975) e, por sinal, revelaram-se pouco conclusivos. De facto, a detecção de uma aparente não sintenia com ME1 (*locus* localizado em 6q12, Chen *et al*, 1973) e de uma certa consistência quanto à possibilidade de ME2 se localizar no cromossoma 1, não conseguiram ser posteriormente confirmadas.

Investigações subsequentes limitaram-se à análise de ligação em famílias nucleares, e a obtenção de valores de "lod scores" superiores a 3 (Kömpf *et al*, 1985) entre ME2 e F13A (*locus* localizado entre 6p25-->p24, Olaisen *et al*, 1985), induziram à localização provisória de ME2 no cromossoma 6.

No sentido de elucidar a situação, centralizou-se, de início, a análise de ligação apenas entre ME2 e F13A. No entanto, a relativa inconsistência entre os resultados obtidos e os publicados por Kömpf et al, levaram a estender a análise das relações de ligação entre ME2 e um total de 27 outros sistemas genéticos (tabela 3.16).

Dada a aditividade de valores de "lod scores" obtidos em estudos independentes, na tabela 4.28, sumaria-se a conjugação dos resultados agora obtidos com outros previamente reportados.

O sexo da informação de segregação só se específica para ME2/F13A e ME2/HF, por serem os únicos pares em que a discriminação é feita nas respectivas publicações.

Relativamente à possível ligação entre ME2 e F13A, é manifesta uma certa contradição entre os resultados agora obtidos e os apurados por Kömpf et al.

Estes últimos favorecem, com bastante clareza, ligação estreita entre ME2 e F13A, uma vez que num total de 18 famílias nucleares com 54 descendentes, só obtiveram "lod scores" positivos. O valor máximo que encontraram foi de 4,33 para θ=0,10 (ambos os sexos combinados).

Em contrapartida, os presentes resultados apontam, pelo menos para a mesma fracção de recombinação, para exclusão inequívoca de ligação entre os dois loci: z= -5,32 no total e, por sexo, valores individuais inferiores a -2, num conjunto de 33 famílias com 12 descendentes.

Considerados em simultâneo, os dois conjuntos de

TABELA 4.28 .
Valores de "lod scores" entre ME2 e outros loci de sistemas genéticos compilados de:
1) Kömpf et al, 1985; 2) esta investigação
3) Kömpf et al, 1988; 4) Kömpf et al, 1982.

SISTEMA GENÉTICO	REFER.	INFOR. SEGR. *	FRACÇÃO DE RECOMBINAÇÃO 0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
F13A							
	1	P	1,48	1,65	1,35	0,79	0,24
		M	2,41	2,68	2,28	1,45	0,54
	2	P	-5,48	-2,59	-0,49	0,08	0,09
		M	-5,36	-2,73	-0,80	-0,19	-0,03
	TOTAL	P	-4,00	-0,94	0,86	0,87	0,33
		M	-2,95	-0,05	1,48	1,26	0,51
		A	-6,95	-0,99	2,34	2,13	0,84
HF							
	3	P	-4,01	-2,24	-0,82	-0,28	-0,06
		M	-2,95	-1,32	-0,19	0,07	0,04
	2	P	-1,76	-0,64	0,07	0,16	0,06
		M	-0,30	0,28	0,52	0,37	0,12
	TOTAL	P	-5,77	-2,88	-0,75	-0,12	0,00
		M	-3,25	-1,04	0,33	0,44	0,16
		A	-9,02	-3,92	-0,42	0,32	0,16
ABO							
	4	A	-5,2	-3,0	-1,0	-0,3	
	2	A	-20,89	-12,16	-4,76	-1,65	
	TOTAL		-26,09	-15,16	-5,76	-1,95	
ACP1							
	4	A	-1,1	0,2	0,8	0,6	
	2	A	-10,04	-6,01	-2,51	-0,94	
	TOTAL		-11,14	-5,81	-1,71	-0,34	
BF							
	4	A	-1,6	-0,7	-0,1	-0,1	
	2	A	-8,06	-4,66	-1,80	-0,62	
	TOTAL		-9,66	-5,36	-1,90	-0,72	
ESD							
	4	A	-1,6	-0,7	-0,1	0,1	
	2	A	-2,89	-1,11	-0,04	0,21	
	TOTAL		-4,49	-1,81	-0,14	0,31	

TABELA 4.28 - continuação.

SISTEMA GENÉTICO	REFER.	INFOR. SEGR. *	FRACÇÃO DE RECOMBINAÇÃO 0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
FY							
	4	A	-3,6	-2,0	-0,8	-0,3	
	2	A	-11,30	-5,77	-1,47	-0,06	
	TOTAL		-14,90	-7,77	-2,27	-0,36	
GALT							
	4	A	-5,5	-3,3	-1,4	-0,5	
	2	A	-6,96	-4,23	-1,81	-0,69	
	TOTAL		-12,46	-7,53	-3,21	-1,19	
GC							
	4	A	-4,3	-2,7	-1,2	-0,5	
	2	A	-8,37	-4,37	-1,27	-0,22	
	TOTAL		-12,67	-7,07	-2,47	-0,72	
GLO1							
	1	A	-12,25	-6,15	-1,59	-0,21	0,03
	2	A	-8,96	-4,95	-1,77	-0,56	-0,11
	TOTAL		-21,21	-11,10	-3,36	-0,77	-0,08
GPT							
	4	A	0,2	0,5	0,6	0,4	
	2	A	-9,61	-5,15	-1,70	-0,49	
	TOTAL		-9,41	-4,65	-1,10	-0,09	
HP							
	4	A	-2,4	-1,3	-0,5	-0,1	
	2	A	-4,02	-2,24	-0,82	-0,28	
	TOTAL		-6,42	-3,54	-1,32	-0,38	
PGM1							
	4	A	-1,4	-0,2	0,5	0,4	
	2	A	-15,93	-8,64	-2,86	-0,78	
	TOTAL		-17,33	-8,84	-2,36	-0,38	
PGM3							
	1	A	-16,57	-9,51	-3,60	-1,20	-0,24
	2	A	-15,64	-8,35	-2,64	-0,64	0,07
	TOTAL		-32,21	-17,86	-6,24	-1,84	-0,17
RH							
	4	A	-4,7	-2,5	-0,8	-0,2	
	2	A	-20,35	-11,57	-4,35	-1,46	
	TOTAL		-25,05	-24,07	-5,15	-1,66	

* INFORMAÇÃO DE SEGREGAÇÃO: P - paterna; M - materna; A - ambos.

dados neutralizam-se parcialmente, resultando num valor global que permite excluir ligação paa $\theta = 0,05$, enquanto que para fracções de recombinação superiores, os valores de "lod scores", ainda que positivos, não atingem o valor crítico (Z=3) a partir do qual a hipótese de ligação pode ser seguramente aceite.

Apesar de, de momento, não se poder aceitar a asserção de ligação entre ME2 e F13A, há que reconhecer que continua a ser o único caso em que a hipótese de ligação apresenta alguma plausibilidade.

Com efeito, e analisando conjuntamente as tabelas 3.16 e 4.28, que constituem uma compilação quase exaustiva de todos os dados de ligação envolvendo ME2, não há nenhuns outros valores que estimulem uma indicação de ligação tão imediata.

Mesmo em relação a AMY e HF (*loci* situados no cromossoma 1), a positividade dos "lod scores" é demasiado ténue para que uma eventual consistência com os resultados de Povey *et al* possa ser inferida.

Ao certo, o que a análise das mesmas tabelas permite, é excluir ligação de ME2 em relação aos seguintes sistemas genéticos:

Para $\theta < 0,20$ - ABO, FY, GALT, GC, GLO1, PGM1, PGM3, RH, PEPC e PLG.

Para $\theta < 0,10$ - ACP1, BF, GPT, HF, HP, ALAD, F13A, FUCA1, GOT2, ORM1, PGP e UMPK.

Para $\theta < 0,05$ - ESD, C3 e F13A.

Para $\theta < 0,01$ - AMY e TF.

Perante esta situação, terá que permanecer transitória a localização de ME2 no braço curto do cromossoma 6, enquanto resultados mais convincentes não vierem clarificar o problema.

Parece que esse propósito dificilmente será realizado por recurso a polimorfismos convencionais. Isto na presunção, tal como como Kömpf et al sugerem, de que a localizar-se no cromossoma 6, ME2 se situará numa posição distal em relação a F13A.

Na realidade, entre a região telomérica de 6p e o locus do F13A desconhece-se a existência de quaisquer outros loci de polimorfismos convencionais. Estão, contudo, cartografados para essa mesma região diversos polimorfismos de DNA.

Talvez as relações de ME2 com esse tipo de marcadores possam ser mais bem sucedidas do que as análises até agora efectuadas.

4.3.2 PEPC, F13B, HF e FY

Estudos de hibridação celular somática permitiram situar o locus de PEPC no braço curto do cromossoma 1 (Ruddle et al, 1972).

Por sua vez, Cook e Hamerton (1979) conseguem limitar a localização cromossómica do mesmo locus à região

1q25 ou 1q42.

Muito recentemente, Rocha et al (1989), por recurso a análise familiar, integram PEPC num grupo de ligação envolvendo F13B e HF.

É precisamente a existência desse grupo de ligação que os presentes resultados procuraram consolidar.

Quer a detecção de ligação estreita entre PEPC e F13A (Zmáx= 11,38 para θ= 0,00 em machos e fêmeas), quer as relações entre PEPC e HF (Zmáx=5,72 com θ= 0,11 nas fêmeas e θ= 0,03 nos machos) ou entre F13B e HF (Zmáx= 7,52 para θ=0,05 em fêmeas e θ= 0,00 em machos), reforçam os resultados anteriormente publicados.

Na tabela 4.29, os "lod scores" obtidos nesta investigação foram conjugados com os de Rocha et al. Quanto a F13B/HF, incluíram-se também os dados apurados por Eiberg et al (1987) quando detectaram pela primeira vez prova formal de ligação entre aqueles loci, o que lhes permitiu assinalar F13B numa região do cromossoma 1 próxima da de HF (mais precisamente 1q32, Human Gene Mapping 10, 1989).

A conjugação dos resultados disponíveis torna as relações de ligação entre os três loci substancialmente mais clarificadas, induzindo uma tentativa de ordenação cromossómica.

Com efeito, constatou-se que PEPC e F13B se comportam quase como uma unidade de transmissão, o que poderá traduzir uma vizinhança cromossómica bastante estreita. Esta

TABELA 4.29
Valores de "lod scores" entre PEPC-F13B, PEPC-HF e F13B-HF compilados a partir de: 1) Rocha et al, 1989; 2) Eiberg et al, 1987 e 3) esta investigação.

PAR DE LOCI	REFER.	INFOR. SEGRE.*	FRACÇÃO DE RECOMBINAÇÃO						
			0,001	0,01	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
PEPC-F13B									
	1	P	2,70	2,66	2,44	2,16	1,55	0,90	0,29
	3		6,91	6,78	6,21	5,48	4,00	2,40	0,88
			9,61	9,44	8,65	7,64	5,55	2,90	1,17
	1	M	4,80	4,71	4,31	3,78	2,67	1,53	0,49
	3		4,50	4,40	3,96	3,40	2,27	1,19	0,34
			9,30	9,11	8,27	7,18	4,94	2,72	0,83
	1	A	7,50	7,37	6,75	5,94	4,22	2,43	0,78
	3		11,41	11,18	10,17	8,88	6,27	3,59	1,22
			18,91	18,55	16,92	14,82	10,49	7,02	2,00
PEPC-HF									
	1	P	0,61	1,54	1,96	1,89	1,42	0,82	0,25
	3		3,01	3,89	4,08	3,73	2,69	1,54	0,51
			3,62	5,43	6,04	5,62	4,11	2,36	0,76
	1	M	1,21	2,14	2,51	2,40	1,83	1,09	0,36
	3		-2,99	-0,09	1,54	1,86	1,58	0,94	0,30
			-1,78	1,05	4,05	4,26	3,41	2,03	0,66
	1	A	1,82	3,68	4,47	4,29	3,25	1,91	0,61
	3		0,02	3,80	5,62	5,59	4,27	2,48	0,81
			1,82	7,48	10,09	9,88	7,52	4,39	1,42
F13B-HF									
	1	P		2,42	2,75	2,57	1,88	1,05	0,32
	2			5,70	5,71	5,11	3,57	1,95	0,58
	3			5,90	5,40	4,76	3,42	2,02	0,69
				14,02	13,86	12,44	8,87	5,02	1,59
	1	M		3,54	3,23	2,84	2,02	1,17	0,38
	2			3,47	5,37	5,44	4,31	2,04	0,93
	3			1,53	1,89	1,78	1,24	0,65	0,18
				8,54	10,49	10,06	7,57	3,86	1,49
	1	A		5,96	5,98	5,41	3,90	2,22	0,70
	2			7,93	10,67	10,45	7,93	4,60	1,51
	3			7,43	7,29	6,54	4,66	2,67	0,87
				21,32	23,94	22,40	16,49	9,49	3,08

*INFORMAÇÃO DE SEGREGAÇÃO: P - paterna; M - materna; A - ambos.

situação é corroborada pelo facto de, pelo menos em termos de fracção de recombinação, PEPC ou HF estarem sensivelmente equidistantes de HF.

Por outro lado, e apesar de não ter sido possível calcular valores máximos de Z ou θ com os dados globais, existem indícios de que a fracção de recombinação entre PEPC e HF é ligeiramente superior à de F13B e HF.

Logo, as hipóteses mais verosímeis para o ordenamento possível dos três *loci* parecem restringir-se a: HF - F13B - PEPC ou PEPC - F13B - HF.

Ou seja, tudo indica que HF se localizará numa posição próximal ou distal relativamente ao bloco F13B-PEPC, ocupando F13B a posição central.

Procurando uma mais completa elucidação do problema, estudaram-se as relações de ligação entre F13B, PEPC e HF com FY, *locus* cuja localização cromossómica está assinalada em 1q21-q25 (HGM10), havendo suspeita que a região mais provável seja 1q22-q23 (McAlpine *et al*, 1989).

Os resultados obtidos (tabela 3.17), ainda que pouco substanciais, permitem excluir ligação, a menos de 20%, entre PEPC e FY ou F13B e FY e, a menos de 10%, entre HF e FY.

Para outras fracções de recombinação, os "lod scores" são, em geral, negativos, pelo que proximidade cromossómica declarada pode ser, aparentemente, rejeitada.

Sendo assim, os presentes resultados compatibilizam-se, razoavelmente, com a hipótese de PEPC ocupar a posição

mais distal do grupo de ligação em que se insere, situação que conciliada com o que se conhece sobre a localização física dos loci, remeteria PEPC para a região 1q42.

Embora tal dedução necessite de uma mais sólida comprovação, não deixa de ser sugestiva a concordância com os resultados de Brook et al (1987), os quais usando uma translocação, maparam PEPC em posição distal a 1q32.1, não obstante esse resultado não vir ainda homologado no último Human Gene Mapping (HGM10).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Procurou-se, neste trabalho, aproveitar a fracção leucocitária do sangue para a investigação de *loci* de polimorfismos bioquímicos, na tentativa de rentabilizar a utilização de um material biológico de fácil acesso e simples manipulação e que, simultaneamente, não condiciona a condução da análise genética convencional, ao contrário de materiais biológicos alternativos frequentemente utilizados para a investigação de alguns desses *loci*.

Tal contributo viu-se dificultado, entre outros factores, pela reduzida quantidade de material biológico disponível e pelos baixos níveis de actividade que a maioria das funções enzimáticas, em geral, aí apresentam.

Apesar de tudo, foi possível proceder à fenotipagem

simultânea, e em boas condições técnicas, de seis sistemas genéticos, F13A, FUCA1, GOT2, ME2, PEPC e PGM3, em que a investigação, por recurso à fracção leucocitária, nos parece surgir em nítida vantagem por:

1. Permitir a realização de amplas amostragens populacionais, ao contrário de tecidos como placenta, cérebro ou coração, materiais biológicos habitualmente utilizados para o estudo de ME2, PGM3 ou GOT2;

2. Ser perfeitamente compatível com a realização de estudos clássicos de genética formal, nomeadamente análise de segregação em pares mãe/filho ou descendentes de famílias nucleares, razão pela qual se apresentam, agora, os primeiros resultados desse tipo relativamente a alguns dos sistemas genéticos investigados;

3. Viabilizar, no caso específico do F13A, o recurso a um método de detecção por via funcional, em oposição à via imunológica que acompanha sistematicamente a fenotipagem em amostras de plasma e que, como oportunamente se discutiu, nos parece menos favorável;

4. Minimizar problemas de termoestabilidade elevada, associados a alguns produtos génicos de PEPC e que se fazem sentir, em especial, quando este polimorfismo é investigado em eritrócitos;

5. Dispensar, relativamente a FUCA1, a separação diferencial e específica de linfócitos.

Se nos remetermos à potencial aplicação em investigações de paternidade biológica, a valorização desse aproveitamento torna-se mais evidente.

Nessa área, os padrões exigidos, materializáveis na possibilidade de formular deliberações finais inequívocas, são cada vez mais elevados, verificando-se que continua a ser de grande actualidade o recurso a marcadores convencionais.

De facto, e não obstante o potencial das metodologias genéticas mais modernas ser virtualmente ilimitado na elucidação da identidade biológica e das relações de parentesco, a sua progressiva generalização tem-se acompanhado do aparecimento de alguns problemas práticos, cuja clarificação é considerada crítica para uma adequada operacionalidade nesses domínios (King, 1989).

Sobretudo para a avaliação da paternidade biológica, surge como essencial a normalização das metodologias de análise e, até, da própria interpretação dos resultados (Chimera et al, 1989).

De qualquer modo, a introdução de novas técnicas, em particular durante a fase inicial, deve efectuar-se gradualmente e, sempre, de forma complementar em relação a técnicas já convencionais mas, seguramente, mais bem consolidadas.

Neste contexto, torna-se nítido o interesse da integração dos marcadores leucocitários agora investigados numa bateria de análise.

A avaliação das condições de aplicabilidade e grau de informação no diagnóstico da paternidade passou, inevitavelmente, por uma prévia documentação da genética populacional e formal dos marcadores em estudo.

Paralelamente, e numa perspectiva mais antropológica, procurou-se efectuar uma caracterização do perfil genético-demográfico de Portugal continental.

Em especial, no referente à última abordagem, fomos confrontados com um obstáculo sistemático: a magnitude dos tamanhos amostrais que tal via de pesquisa exige, associada à dificuldade em definir o padrão de estratificação geográfica a adoptar.

Na realidade, num país com área territorial reduzida e com uma tendência migratória interna muito acentuada, heterogeneidades genéticas de índole geográfica, a subsistirem, só poderão ser evidenciadas se a metodologia amostral se modular em função da história recente da sua demografia.

A dimensão antropológica da caracterização genética ganha mais sentido se perspectivada no confronto com outros grupos populacionais , em especial com aqueles com os quais, historicamente, nos relacionámos. No entanto, a quase inexistência de estudos sobre regiões ibéricas ou africo-americanas de expressão portuguesa, dificultou a inferência das tendências genéticas que mais nos individualizam.

Assim, o esboço de uma certa identidade genética com o Norte de Espanha, ou a aparente ausência de influência de

elementos genéticos não-europeus, podem ser ilações meramente provisórias.

A sua confirmação passaria pelo alargamento acentuado do espaço amostral às regiões referidas e, de preferência, pela extensão da análise a um número mais vasto de marcadores genéticos.

Claro que um projecto deste tipo ultrapassaria, largamente, os recursos materiais e humanos de uma única instituição, só sendo exequível, a médio prazo, pela conjugação de esforços de instituições congéneres.

Pelo menos, a expansão da caracterização genética a países afro-americanos de expressão portuguesa, afigura-se-nos do máximo interesse, na medida em que, se a inversa não é verdadeira, acreditamos que seriam, seguramente, aí encontrados vestígios genéticos da permanência dos portugueses nessas regiões.

O alargamento do espaço amostral surge, igualmente, como premente para o esclarecimento de algumas irregularidades de segregação detectadas na análise de genética formal e à clarificação do tipo de associações observadas na análise conjunta de alguns pares de loci.

Enfim, apesar dos condicionalismos referidos, e de outros que o presente trabalho, concerteza, enferma, julgamos ter dado algum contributo para o aprofundamento da genética de F13A, FUCA1, GOT2, ME2, PEPC e PGM3, e, de uma forma global mas sintética, poder formular as seguintes

CONCLUSÕES

1. Genética bioquímica

1.1 A fracção não eritrocitária ou plasmática do sangue constitui um bom material biológico para a investigação dos polimorfismos genéticos determinados pelos loci F13A, FUCA1, GOT2, ME2, PEPC e PGM3.

O seu uso em detrimento de materiais biológicos alternativos frequentemente utilizados, parece indiscutivelmente vantajoso.

1.2 O sucesso da fenotipagem destes polimorfismos é, em grande parte, determinado pelo estado de conservação das amostras e pela execução de um tratamento diferencial do leucolisado para formas enzimáticas citoplasmáticas ou mitocondriais e lisossómicas.

Para FUCA1, uma dessialização prévia com neuraminidase deve considerar-se essencial.

Por sua vez, para PEPC e PGM3, um tratamento com DTT elimina, substancialmente, algumas deficiências de reprodutubilidade dos padrões electroforécticos que lhes estão associadas.

1.3 Para cada marcador, foram aperfeiçoadas técnicas electroforéticas ou de focagem isoeléctrica que se caracterizam, no global, por uma execução laboratorial relativamente simples, por um bom poder resolvente e, à excepção de PEPC, por um custo financeiro reduzido. O aumento

do preço por fenotipagem registado quanto a PEPC, não se pode considerar, mesmo assim, excessivo.

2. Genética formal

2.1 Os resultados obtidos nesta investigação são concordantes com os modelos genéticos, previamente postulados, explicativos das variações fenotípicas observadas para F13A, FUCA1, GOT2 e PGM3.

As respectivas genéticas formais, até agora pouco documentadas, podem considerar-se, de momento, bem consolidadas.

2.2 Quanto a PEPC, a detecção de provas circunstanciais da existência de um alelo nulo, levou ao ajustamento do seu modelo genético formal, fazendo intervir para além dos alelos codominantes PEPC*1, PEPC*2 e PEPC*6, anteriormente já considerados, o alelo PEPC*O.

2.3 Em relação a ME2, observaram-se, na análise de segregação em descendentes de famílias nucleares, ligeiros desajustes relativamente a um padrão regular de transmissão mendeliana.

As irregulariedades de segregação não apontam, contudo, para a rejeição do modelo genético formal, até agora considerado (locus autossómico com alelos codominantes, ME2*1 e ME2*2).

Inexistência de neutralidade selectiva quanto a alguns genótipos ou deficiência amostral, são hipóteses

explicativas dos resultados observados, cuja discriminação só o alargamento do espaço amostral poderá proporcionar.

3. Genética populacional

3.1 Não se detectaram indícios significativos de diferenciação genética entre a região Norte, Centro ou Sul do país, quanto a qualquer um dos marcadores investigados.

3.2 Porém:

3.2.1 a existência, na fracção masculina da população, de desvios significativos em relação às proporções esperadas em panmixia, quanto a PEPC e PGM3;

3.2.2 e a distorção, estatisticamente significativa, da distribuição populacional de tipos de cruzamentos em ME2 e PEPC,

fazem suspeitar da existência na população portuguesa, de factores de desvio ao estabelecimento do equilíbrio de Hardy-Weinberg, dos quais o que se afigura mais verosímil, é a existência de heterogeneidade genética de índole geográfica, ideia sugestivamente corroborada pela:

3.2.3 observação, quanto a FUCA1, de dissemelhança genética entre a zona de Trás-os-Montes e as outras subdivisões populacionias consideradas, à excepção da região Minho.

3.3 A não observação de quaisquer outros contrastes

genéticos declarados, aconselha à reformulação do padrão de estratificação geográfico a adoptar em futuras investigações, fazendo intervir o eixo litoral/interior como condutor das subdivisões geográficas.

3.4 As frequências génicas estimadas quanto aos seis marcadores enquadram-se, razoavelmente, na gama de valores observados em populações europeias, não tendo sido, aparentemente, encontrada influência de elementos genéticos africanos na população de Portugal continental.

3.5 A análise conjunta de pares de loci, não revelou a existência de desequilíbrios gaméticos na população portuguesa.

Contudo, entre ME2/ACP1, ME2/GOT2 e FUCA1/RHC, observaram-se associações de tipo exclusivamente genotípico.

A dedução da natureza de tais associações requer um aprofundamento e diversificação das análises a efectuar.

3.6 A avaliação das condições de aplicabilidade e grau de informação dos seis marcadores leucocitários em investigações de paternidade biológica, permite considerá-los de grande utilidade no domínio.

F13A, FUCA1, ME2 e PGM3 são os que possuem características mais favoráveis.

GOT2 é o marcador genético menos informativo. Contudo, atendendo a que a sua fenotipagem praticamente não acarreta aumento de encargos técnicos (o sistema electroforé-

tico é utilizado em simultâneo para a investigação de ME2), ou financeiros, não deve ser liminarmente excluido de uma bateria de análise.

A presença de um alelo nulo no sistema PEPC, obriga a um reajustamento do tratamento formal mais generalizado em situações de exclusão aparente de paternidade, exigindo que passem a ser sempre processadas estatísticamente em termos de probabilidade de não-paternidade.

4. Ligação factorial e cartografia genética

4.1. ME2

Não resultaram desta investigação provas formais de ligação entre ME2 e um total de vinte e sete sistemas genéticos estudados.

Especificamente quanto às relações entre ME2 e F13A, a obtenção de valores de "lod scores" negativos ou francamente baixos, parece opor-se à possibilidade de ligação entre os dois loci.

No entanto, analisando os resultados agora apurados em combinação com outros previamente publicados, as únicas relações que favorecem, com alguma plausibilidade, a hipótese de ligação, são, precisamente, as observadas entre ME2 e F13A, situação que não é discordante com a considerada no Human Gene Mapping 10, onde se localiza, provisoriamente, o locus de ME2 no braço curto do cromossoma 6. A condição de "provisória" não pôde ser desmentida.

4.2. PEPC-HF-F13B

A existência, no braço longo do cromossoma 1, de um grupo de ligação envolvendo os loci PEPC, HF e F13B, ficou, substancialmente, mais consolidada.

A análise dos valores de "lod score" entre PEPC, HF, F13B e ainda FY, permitiram formular uma primeira tentativa de ordenamento cromossómico: HF-F13B-PEPC, ocupando PEPC a posição mais distal no cromossoma.

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS

In the last decades large scale application of electrophoretic techniques for protein discrimination resulted on the detection of a great number of genetic polymorphisms and on the description of large samples from the human genetic diversity.

However, research effort in human biochemical genetics has been concentrated on plasmatic proteins or erythrocytic enzyme loci. In this way, and except when specifically oriented for HLA typing, the informative potencial of the blood fraction constituted by leucocytes and platelets mixed cell populations, is wasted.

One of the main goals of this work falls, precisely, upon investigation of biochemical functions detectable in that fraction, as long as: a) they were not present in red blood cells or plasma, or b) provided that leucocyte material constitute a technical or economical improvement of phenotyping procedures.

Such approach settled on the capacity for simultaneously phenotyping, in good technical conditions, of six genetic markers - F13A, FUCA1, GOT2, ME2, PEPC and PGM3 - about which leucocyte demonstration appears to be clearly advantageous, considering that:

- it makes possible to carry out large populational surveys, in opposition to tissues such as heart, brain or placenta, usually used for ME2, PGM3 or GOT2 investigations;

- it is absolutely suitable for classic studies on formal genetics , namely, segregation analysis on mother/child pairs or offspring from nuclear families;

- it allows, specifically for F13A, a functional detection method instead of the imunological one, that is required if plasma samples are used;

- it minimizes stability problems associated with some gene products of PEPC, particularly strong when red blood cells are used;

- it avoids, concerning FUCA1, differential and specific lymphocyte separation.

That improvement becomes more clear if we keep in mind the potencial application of those genetic polymorphisms on kinship research, in special, on biological paternity.

The evaluation of the potencial value of those leucocyte markers in paternity testing, ordered a previous investigation on their populational and formal genetics.

At the same time, under an anthropological point of view, a characterization of the genetic-demographic profile from continental Portugal was conducted.

Specially concerning the last approach, some main difficulties turned up. First, the magnitude of the sample size needed associated to the difficulty on defining a correct

geographic stratification pattern. Second, the nearly non existence of the same kind of studies concerning Iberic or Portuguese speaking Afro-american regions.

In those conditions it is extremely arduous to make evident the genetic-demographic variation pattern and simultaneously inferring those genetic trends which individualize our country.

Besides single locus genetic analysis, a joint populational distribution study of loci pairs was performed.

Twenty seven loci pairs were analysed, involving, each time, a leucocyte marker loci and others routinely assayed in paternity expertises.

As a matter of fact, the inclusion of a great number of loci in a paternity typing battery is implicitly followed by an increasing probability of nonrandom associations occurrence between alleles at different loci, which, if confirmed, would require a reevaluation of the common biostatistical strategy in which paternity likelihood is calculated by combining in a multiplicative way individual values obtained for each genetic system.

Finally, another aim of the present work, was the study of linkage relationships of ME2, locus without definitive chromosomal localization, and in relation to the recently discovered linkage group involving PEPC, HF and F13B, reinforce its existence and to try the establishement of the corresponding gene order.

Based on the results obtained , we think to be possible to draw, in a synthetic manner, the following

CONCLUSIONS

1. Biochemical Genetics

1.1 The non erythrocytic or plasmatic blood fraction, is a good biological material for research of the genetic systems determined by the loci F13A, FUCA1, GOT2, ME2, PEPC and PGM3.

Its use instead of alternative biological materials commonly employed, seems undoubtedly profitable.

1.2 The phenotyping success of those polymorphisms, greatly depends upon sample conservation state and upon the execution of a differential treatment of the leucolisate to lysosomal and mithocondrial or cytoplasmatic enzymatic forms.

Concerning FUCA1, a previous desialization treatment it is essential.

On the other hand, for PEPC and PGM3, a DTT reducing treatment substantially removes some reproducity problems of the electrophoretic patterns frequently observed.

1.3 For each marker, electrophoretic or isoelectrofocusing techniques were improved. Globally they are characterized by an easy laboratorial execution, a good resolving power and, excepting PEPC, by a low financial cost.

The rise in phenotyping costs observed for PEPC can not be considered, nevertheless, excessive.

2. Formal genetics

2.1 The results obtained in this work are in agreement with genetic models previously formulated to explain phenotypic variation observed in F13A, FUCA1, GOT2 and PGM3.

Their formal genetics , poorly studied up to now, can be considered, at the moment, well established.

2.2 Concerning PEPC, the former proposed genetic mode of inheritance - an autossomal locus with three codominant genes, PEPC*1, PEPC*2 and PEPC*6 - was readjusted by adding a null allele, PEPC*0, detected on family analysis.

2.3 In relation to ME2, minor distortions relatively to a regular pattern of mendelian inheritance were observed on segregation analysis of descendents from nuclear families.

However, the segregation irregularities do not point to the rejection of the formal genetic model accepted until now (autossomal locus with two codominant genes ME2*1 and ME2*2).

Sample size enlargement appears absolutely necessary to clarify the segregation distortions observed.

3. Populational genetics

3.1 No evidence of genetic differentiation between North, Center and South regions of the country, were detected regarding any of the genetic systems studied.

3.2 However

3.2.1 the occurrence in the male populational fraction of significant deviations on PEPC and PGM3 relatively to expected panmitic proportions;

3.2.2 and the statistically significant distortion of mating types populational distribution observed on ME2 and PEPC;

suggests the occurrence of disturbing factors to the establishment of the Hardy-Weinberg equilibrium on the portuguese population. Geographic genetic heterogeneity, seems quite admissible, as long as:

3.2.3 was observed, concerning FUCA1, genetic dissimilarity between Trás-os-Montes and the other populational subdivisions considered, excepting Minho region.

3.3 In future studies, the littoral/interior geographic pattern is advised for sample stratification, in order to reflect the migratory flow registered within Portugal during the last decades.

3.4 Gene frequencies estimates relatively to the six markers studied, fit well in the range of values observed for european populations, and no influence of african genetic elements on portuguese continental population has been detected.

3.5 Pairwise loci joint analysis, has not revealed any gametic desiquilibria within the portuguese population.

Notwithstanding, between ME2/ACP1, ME2/GOT2 and FUCA1/RHC, genotipic associations were recorded.

Explanation for that kind of associations demands for an analysis deepening and diversification.

3.6 All the six leucocyte markers studied can be considered reliable and helpfull tools in routine paternity expertises.

F13A, FUCA1, ME2 and PGM3 are the most favourable features owners for that purpose.

GOT2 is the less informative genetic marker. However, since its typing does not require any rise in technical work (the electrophoretic system is simultaneously used for ME2 phenotyping) or financial charges, it must not be excluded from a battery.

The null gene on PEPC system, demands that all apparent paternity "exclusion" cases should be statistically evaluated.

4. Linkage and gene mapping

4.1 ME2

Nuclear family analysis did not reveal formal proofs of linkage between ME2 and twenty seven genetic systems studied.

Specifically concerning ME2 and F13A linkage relationships, the attainment of negative or clearly low lod score values, odds against linkage between the two loci.

Nevertheless, analysing the present results in

combination with others previously reported, the only relations that plausibly favour linkage, are those observed precisely between ME2 and F13A, situation that doesn't contradict that considered on the Human Gene Mapping 10, where, provisionally, ME2 locus is assigned to the short arm of chromosome 6. The condition "provisional" could not be rejected.

4.2 PEPC-HF-F13B

The existence on the long arm of chromosome 1 of a linkage group involving PEPC, HF and F13B loci, rendered with this work substancially more consolidated.

Analysis of lod score values between PEPC, HF, F13B and FY, made possible a first attempt of gene chromosomal ordering: HF-F13B-PEPC, PEPC holding the most distal position on the chromosome.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHADEFF JA, TENNANT L, O'BRIEN J S (1976) Altered isoenzyme patterns of liver α-L-fucosidase in cystic fribosis. Clin. Genet. 10: 63-72.

AMORIM A (1983) Contribuição para o conhecimento da genética humana. Estudos de genética bioquímica, formal e populacional e de ligação factorial. Tese de dissertação de doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

AMORIM A , ROCHA J, ALMEIDA N (1986) Types of exclusion and efficiency criteria for paternity testings. In BRINKMANN B, HENNINGSEN K (eds).Adv. Forens. Haemogenet. 1: 419--422. Springer-Verlag, Berlin.

BAIRD M, BALAZS I, GIUSTI A, MIYAZAKI L, NICHOLAS L, WEXLER K, KANTER E, GLASSBERG J, ALLEN F, RUBINSTEIN P, SUSSMAN L (1986) Allele frequency distribution of two highly polymorphic DNA sequences in three ethnic groups and its application to the determination of paternity. Am. J. Hum. Genet. 39: 489-501.

BHATTACHARYYA SP, SAHA N (1984) Mitochondrial malic enzyme polymorphism among different ethnic groups in Singapore. Hum. Hered. 34: 393-395.

BISSBORT S, KÖMPF J, BETHGE R , GUSSMANN S (1975) Population genetics of human red cell phosphoglucomutase isozyme

PGM3 (E.C.:2.7.5.1). Gene frequencies in Southwestern Germany. Humangenetik 27: 57-58.

BOARD PG (1979) Genetic polymorphism of the A subunit of human coagulation factor XIII. Am. J. Hum. Genet. 31: 116-124.

BODA Z, PFLIEGLER G, MUSZBEK L, TÓTH A, ÁDÁNY R, HÁRSFALVI J, PAPP Z, TORNAI I, RAK K (1989) Congenital factor XIII deficiency with multiple benign breast tumours and successful pregnancy with substitutive therapy. Haemost. 19: 348-352.

BODMER WF (1981) Gene clusters, genome organization, and complex phenotypes. When the sequence is known, what will it mean? Am. J. Hum. Genet. 33: 664-682.

BOTSTEIN D, WHITE RL, SKOLNICK M, DAVIS RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.Am. J. Hum. Genet. 32:314-331.

BRACKENRIDGE CJ, CASE J, SHEEHY AJ (1975) Distributions, sex and age effects, and joint associations between phenotypes of 14 genetic systems in an australian population sample. Hum. Hered. 25: 520-529.

BRINKMANN B, BÜTLER R, LINCOLN P, MAYR WR, ROSSI U (1989) Recommendations of the Society for Forensic Haemogenetics concerning DNA polymorphisms. Forens. Sci. Int.43:109-111.

BROOK JD, SKINNER M, ROBERTS SH, RETTIG WJ, ALMOND JW, SHAW DJ (1987) Further mapping of markers around the centromere of human chromosome 19. Genomics 1: 320-328.

BURCHELL A, CROSBY A, COHEN PTW (1977) Human mitochondrial malic enzyme variants: properties of the

different polymorphic forms. Ann. Hum. Genet. 41: 1-7.

CASTLE SL, BOARD PG (1983) Biochemical characterization of genetically variant and abnormal blood coagulation factor XIIIA subunits. Clin. Chim. Acta 133: 141-151.

CASTLE SL, BOARD PG (1985) An extended survey of the genetic polymorphism at the human coagulation factor XIII: a subunit structural locus. Hum. Hered. 35: 101-106.

CAVALLI-SFORZA LL, BODMER WF (1971) The genetics of human populations. W.F. Freeman and Company, San Francisco.

CHAKRABORTY R, HEDRICK PW (1983) Paternity exclusion and the paternity index for two linked loci. Hum. Hered.33: 13-23.

CHAKRAVARTI A, LI CC (1983) The effect of linkage on paternity calculations. In WALKER RH (ed.) Inclusion probabilities in parentage testing. pp 411-420. American Association of blood banks. Arlington.

CHEN TR, McMORRIS FA, CREAGAN R, RICCIUTI F, TISCHFIELD J, RUDDLE F (1973) Assignment of the genes for malate oxidoreductase decarboxylating to chromosome 6 and peptidase B and lactate dehydrogenase B to chromosome 12 in man. Am. J. Hum. Genet. 25: 200-207.

CHIMERA JA, HARRIS CR, LITT M (1989) Population genetics of the highly polymorphic locus DI6S7 and its use in paternity evaluation. Am. J. Hum. Genet. 45: 926-931.

COHEN PTW, OMENN GS (1972) Human malic enzyme: high frequency polymorphism of the mitochondrial form. Biochem. Genet. 7: 303-311.

COOK PJL, HAMERTON JL (1979) Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 1. Cytogenet. Cell Genet. 25:9-20.

COOPER DN, SCHMIDTKE J (1989) Diagnosis of genetic disease using recombinant DNA. Second edition. Hum. Genet. 83: 307-334.

CORBO RM, PALMARINO R, SPENNATI GF, PASCONE R, LUCARELLI P (1980) Human placental phosphoglucomutase locus 3 studies in the italian population. Jpn. J. Hum. Genet. 25: 325-328.

CORNEY G, FISHER RA, COOK PJL, NOADES J, ROBSON EB (1977) Linkage between α-fucosidase and the rhesus blood group. Ann. Hum. Genet. 40: 403-405.

CREAGAN R, TISCHFIELD J, McMORRIS FA, CHEN S, HIRSCHI M, CHEN TR, RICCIUTI F, RUDDLE FH (1973) Assignment of the genes for human peptidase A to chromosome 18 and cytoplasmic glutamic oxaloacetate transaminase to chromosome 10 using somatic-cell hybrids. Cytogenet. Cell Genet. 12: 187.

DAVIDSON RG, CORTNER JA, RATTAZZI MC, RUDDLE FH, LUBS HA (1970) Genetic polymorphisms of human mitochondrial glutamic oxaloacetic transaminase. Science 169: 391-392.

DICIOCCIO RA, BROWN KS (1988) Biosynthesis, processing and extracellular release of α-L-fucosidase in lymphoid cell lines of different genetic origens. Biochem. Genet. 26: 401-420.

DONALD LJ (1977) Placental enzyme polymorphisms in Canadian populations. Hum. Hered. 27: 280-284.

DRIESEL AJ, BIEROTTE E, RÖHRBORN G (1982) Human GOTM phenotypes in Western Germany (Düsseldorf region). Hum. Hered. 32: 145-146.

DYKES DD, MILLER S, POLESKY H (1986) Gene frequency distribution of F13A and F13B in U.S. whites, blacks, amerindians and mexican-americans. In BRINKMANN B, HENNINGSEN K (eds). Adv. Forens. Haemogenet. 1: 261-267. Springer-- Verlag, Berlin.

EIBERG H, NIELSEN LS, MOHR J (1984) Confirmation of F13A assignment and sequence information concerning F13A-HLA--GLO. Clin. Genet. 26: 385-388.

EIBERG H, NIELSEN LS, MOHR J (1987) Human complement factor H (HF) linked to coagulation factor XIIIB (F13B). Cytogenet. Cell Genet. 46: 610.

FILDES RA, HARRIS H (1966) Genetically determined variation of adenylate kinase in man. Nature 209: 261-263.

FISHER RA, HARRIS H (1972) "Secondary" isozymes derived from the three PGM loci. Ann. Hum. Genet. 36: 69-77.

GHOSH U, BANERJEE PK, SAHA N (1980) Mitochondrial malic enzyme polymorphism in an Indian population. Hum. Hered. 30: 159-160

GILL P, JEFFREYS AJ, WERRET DJ (1985) Forensic application of DNA "fingerprints". Nature 318: 577-579.

GILL P, SUTTON JG (1984) α-L-fucosidase polymorphism in human semen, blood and vaginal fluid. Hum. Hered. 34: 231-239.

GOEDDE HW, STAHN M (1974) PGM3 (PGM1, PGM2) Phenotyping in human leucocytes with a simplified method. Humangenetik 22: 243-245.

GRACY RW (1983) Epigenetic formation of isozymes: the effect of aging. In RATTAZZI MC, SCANDALIOS JG, WHITT GS (eds). Isozymes: current topics in biological and medical research 7. pp 187-202. Alan R. Liss, Inc., New York.

GRAHAM JB, EDGELL C-JS, FLEMING H, NAMBOODIRI KK, KEATS BJB, ELSTON RC (1984) Coagulation factor XIIIA: a usefull polymorphic genetic marker. Hum. Genet: 67: 132-135.

GUICHARD F (1982) Atlas demográfico de Portugal. Livros Horizonte. Lisboa.

GÜNTHER A (1982) Gene frequencies of human red cell phosphoglucomutase (PGM3) in Western Germany (Düsseldorf region). Hum. Hered. 32: 142-144.

HACKEL E, HOPKINSON DA, HARRIS H (1972) Population studies on mitochondrial glutamate-oxaloacetate transaminase. Ann. Hum. Genet. 35: 491-496.

HEDRICK PW (1985) Genetics of populations. Jones and Bartlett Publishers, Inc.,Boston.

HENKE J, NETZER T (1982) Forensic application and polymorphism of the human lysosomal α-fucosidase (E.C. 3.2.1.51). Forens. Sci. Int. 19: 107-111.

HENNINGSEN K (1981) Evidencial value of haemogenetic investigations in paternity research. Proc. 9th Int. Congr. Forensic Haemogenet.: 311-329.

HERNÁNDEZ JL, ELSTON RC, WARD LJ (1990) Gametic equilibrium between 24 polymorphic markers. Hum. Genet. 85: 343-348.

HOPKINSON DA, HARRIS H (1968) A third phosphoglucomutase locus in man. Ann. Hum. Genet. 31: 359-367.

HUMAN GENE MAPPING 10 (1989) Tenth international workshop on human gene mapping. Cytogenet. Cell Genet. 51: 1-1148.

ICHINOSE A, DAVIE EW (1988) Characterization of the gene for the a subunit of human factor XIII (plasma transglutaminase), a blood coagulation factor. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5829-5833.

JEFFREYS AJ, WILSON V, THEIN SL (1985) Individual-specific "fingerprints" of human DNA. Nature 316: 76-79.

KING M-C (1989) Genetic testing of identity and relationship. Am. J. Hum. Genet. 44: 179-181.

KÖMPF J, LUCKENBACH C, KLOOR D, SCHUNTER F, WERNET P, RITTER H (1988) Human factor H (ß1H-globulin): linkage analysis. Hum. Genet. 79: 181-182.

KÖMPF J, PRATA MJ, AMORIM A (1989) Genetic polymorphism of human peptidase C, PEPC (E.C.3.4.11): formal genetic and population data. Hum. Genet. 83: 197-198.

KÖMPF J, RITTER H (1983) Formalgenetik der Polymorphismen Peptidase A, mitochondriales Malic Enzym, Alpha Fucosidase und Gerinnungsfaktor XIIIA. Proc. 10th Int. Congr. Soc. Forens. Haemogenet.: 487-492.

KÖMPF J, SCHUNTER F, WERNET P, RITTER H (1985) Linkage between the loci for mitochondrial malic enzyme (ME2) and

coagulation factor XIIIA subnit (F13A). Hum. Genet. 70: 43-44.

KÖMPF J, SIBERT G, RITTER H (1979) Common polymorphism of peptidase A: formal genetics and population data. Hum. Genet. 51: 323-325.

KÖMPF J, SIBERT G, RITTER H (1982) Linkage studies on the ME2 polymorphism. Cytogenet. Cell Genet. 32:292.

KONDLER R, WIEBECKE D (1981) Studie zur Populationsgenetik der Peptidase A (E.C.3.4.11) und des mitochondrialen Malatenzymes (E.C.1.1.1.40) aus Leukozyten in der Bevölkerung Unterfrankens. Proc. 9th Congr. Soc. Forens. Haemogenet.: 77-81.

KRESS BC, FREEZE HH, HERD JK, ALHADEFF JA, MILLER AL (1980) Purification and characterization of I-cell disease α-L--fucosidase. Jour. Biol. Chem. 255: 955-961.

KÜHNL P, ANNEKEN K, SPIELMANN W (1979) PEPA9, a new, unstable variant in the peptidase A system. Hum. Genet. 47: 187--191.

KÜHNL P, KRECKEL P, SPIELMANN W (1981) Faktor XIII--polymorphismen: subunits FXIIIA und FXIIIB. Proc. 9th Int. Congr. Soc. Forens. Haemogenet.: 591-595.

LAMM LU (1970) Family, population and mother-child studies of two phosphoglucomutase loci (PGM1 and PGM3). Lack of close linkage between the two loci (w>0,33). Hum. Hered. 20: 292-304.

LEOWTIN R (1982) Human diversity. Scientific American Books, Inc,. New York.

LEWIS WHP (1973) Common polymorphism of peptidase A. Electrophoretic variants associated with quantitative variation of red cell levels. Ann. Hum. Genet. 36: 267-271.

LEWIS WHP, HARRIS H (1967) Human red cell peptidases. Nature 215: 351-355.

LI CC (1976) First course in population genetics. The Boxwood Press, Pacific Grove, California.

LLANO C, CAEIRO JLB, BOÁN F (1990) A population study of leucocyte enzymes (GOT2, ME2 and PGM3) in Galicia (NW Spain). Hum. Hered. 40: 52-54.

MASTERS C (1983) Subcellular localization of isozymes- an overview. In RATTAZZI MC, SCANDALIOS JG, WHITT GS (eds). Isozymes: current topics in biological and medical research 7. pp 1-21. Alan R. Liss, Inc.,New York.

MAYNARD-SMITH S, PENROSE LS, SMITH CAB (1961) Mathematical tables for research workers in human genetics. J A Churchil Ltd., London.

McALPINE PJ, COOPLAND G, GUY C, JAMES S, KOMARNICKI L, MAcDONALD M, STRANC L, LEWIS M, PHILIPPS S, COGHLAN G, KAITA H, COX DW, GUINTO ER, MAcGILLIVRAY R (1989) Mapping the genes for erythrocytic α-spectrin 1 (SPTA1) and coagulation factor V (F5). Cytogenet. Cell Genet. 51:1042.

McDONAGH J, McDONAGH RP, DELAGE JM, WAGNER RH (1969) Factor XIII in human plasma and platelets. J. Clin. Invest. 48: 940-945.

McKEE PA (1983) Hemostasis and disorders of blood coagulation. In STANBURY JB, WYNGAARDEN JB, FREDRICKSON DS, GOLDSTEIN

JL, BROWN MS. The metabolic basis of inherited disease. pp 1531-1560. Mcgraw-Hill, Inc.,New York.

McKUSICK VA, RUDDLE FH (1977) The status of the gene map of the human chromosomes. Science 196: 390-405.

MELO MCA, LIMA AMVMD, SILVA MCBO, SOUSA MGF, AZEVEDO ES (1988) PGM3 polymorphism in human placenta samples from Bahia, Brazil. Gene Geog. 2: 65-69.

MOHAN RAJ BK, DAMODARAN C, SEKHARAN PC (1990) Studies of association between some genetic systems (ABO, MN, ESD, GLO, C3 and HP). Hum. Hered. 40: 190-192.

MOHRENWEISER HW (1987) Functional hemizygosity in the human genome: direct estimate from twelve erytrocyte enzyme loci. Hum. Genet. 77: 241-245.

MONN E, GJØNNAESS H (1971) Placental phosphoglucomutase types in Norway. Hum. Hered. 21: 254-257.

NAZARETH JM (1988) Princípios e métodos de análise da demografia portuguesa. Editorial Presença. Lisboa.

NEEL JV, SATOH C, SMOUSE P, ASAKAWA J, TAKAHASHI N, GORIKI K, FUJITA M, KAGEOKA T, HAZAMA R (1988) Protein variants in Hiroshima and Nagasaki: tales of two cities. Am. J. Hum. Genet. 43: 870-893.

NEI M, LI WH (1973) Linkage disequilibrium in subdivided populations. Genetics 75: 213-219.

O'BRIEN JS, WILLEMS PJ, FUKUSHIMA H, WET JR, DARBY JK, DICIOCCIO R, FOWLER ML, SHOWS TB (1987) Molecular biology of the alpha-L-fucosidase gene and fucosidosis. Enzyme 38: 45-53.

OLAISEN B , GEDDE-DAHL T, TEISBERG P, THORSBY E, SIVERTS A, JONASSEN R, WILHELMY MC (1985) A structural locus for coagulation factor XIII (F13A) is located distal to the HLA region on chromosome 6p in man. Am. J. Hum. Genet. 37: 215-220.

OLAISEN B, SIVERTS A, GEDDE-DAHL T, JONASSEN R, TEISBERG P (1983) Coagulation factor 13A and -B polymorphism. Proc. 10th Int. Congr. Soc. Forens. Haemogenet.: 459-465.

PAPIHA SS, JACKSON A, RANASINGHE H (1989) Population and biochemical genetics of the human mitochondrial malic enzyme. Ann. Hum. Biol. 16: 369-374.

PAYNE RH, HUNTSMAN RG (1982) Evidence for association between alleles at two linked loci, GLO (Glyoxalase I) and Hp (Haptoglobin). Hum. Hered. 32: 208-215.

POL S, BOUSQUET-LEMERCIER B, PAVÉ-PREUX M, BULLE F, PASSAGE E, HANOUNE J, MATTEI MG, BAROUKI R (1989) Chromosomal localization of human aspartate aminotransferase genes by in situ hybridization. Hum. Genet. 83: 159-164.

POLESKY HF, SHOURADA JM, DYKES DD (1983) The frequency of "null" genes calculated from trios in disputed parentage cases. Proc. 10th Inter. Congr. Soc. Forens. Haemogenet.: 161-166.

POVEY S, CORNEY G, LEWIS WHP, ROBSON EB, PARRINGTON JM, HARRIS H (1972) The genetics of peptidase C in man. Ann. Hum. Genet. 35: 455-465.

POVEY S, WILSON DE, HARRIS H (1975) Sub-unit structure of soluble and mitochondrial malic enzyme: demonstration of

human mitochondrial enzyme in human-mouse hybrids. Ann. Hum. Genet. 39: 203-212.

RAPLEY S, LEWIS WHP, HARRIS H (1971) Tissue distribution, substrate specificities and molecular sizes of human peptidases determined by separate gene loci. Ann. Hum. Genet. 34: 307-320.

RASMUSON M, HEIKEN A, SWAN T (1979) The occurrence of inter--locus disequilibrium in combinations of genetic marker systems in man. A study on material from swedish paternity cases. Hereditas. 91: 279-293.

REILLY PR (1990) 1989 American Society of Human Genetics Social Issue Committee Report. Am. J. Hum. Genet. 47: 343-344.

REISS J, COOPER DN (1990) Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of human genetic disease. Hum. Genet. 85: 1-8.

RIBEIRO O, LAUTENSACH H, DAVEAU S (1987) Geografia de Portugal III. O povo português. Edições João Sá da Costa. Lisboa.

RIGHETTI PG (1987) Isoelectric focusing: theory, methodology and applications. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

RITTER H, KÖMPF J (1979) Human mitochondrial glutamic--oxaloacetic transaminase, GOTM: formal genetics. Hum. Genet. 51: 327-329.

ROCHA JM (1988) Análise da quantificação da informação genética em investigações de paternidade. Trabalho de síntese. Provas de aptidão pedagógica e capacidade cien-

tífica. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

ROCHA JM, KÖMPF J, LUCKENBACH C, KLOOR D, KRCZAL D, AMORIM A, RITTER H (1989) Linkage data on F13B, HF and PEPC. Cytogenet. Cell Genet. 51: 1067.

RUDLE FH, RICCIUTI F, McMORRIS FA, TISCHFELD J, CREAGAN R, DARLINGTON G, CHEN T (1972) Somatic cell genetic assignment of peptidase C and the Rh linkage group to chromosome A-1 in man. Science 176: 1429-1439.

SAHA N, JEREMIAH SJ, POVEY S (1978) Further data on mitochondrial malic enzyme in man. Hum. Hered. 28: 421-425.

SAKAKIBARA S, SHIOMI K, KOBAYASHI S, IKEDA T, INAI S, KAGAMIYAMA H (1983) A convenient and sensitive method for the determination of serum aspartate aminotransferase isozymes after electrophoresis. Clin. Chim. Acta 133: 119-123.

SCHEIL HG, SCHEFFRAHN W (1987) Genfrequenzen der Enzyme ALADH, GOT2, GPT, PGM3, SAHH und UMPK in einer schweizerischen Population. Anthrop. Anz. 45: 255-260.

SCHWARTZ ML, PIZZO SV, HILL RL, McKEE PA (1973) Human factor XIII from plasma and platelets. Molecular weights, subunit sctructures, proteolytic activation, and cross-linking of fibrinogen and fibrin. Jour. Biol. Chem. 248: 1395-1407.

SELVIN S (1980) Probability of nonpaternity determined by multiple alleles codominant systems. Am. J. Hum. Genet. 32: 276-278.

SHAW CR (1969) Isozymes: classification, frequency and significance. Int. Rev. Cyt. 25: 297-332.

SIEBERT GA (1986) Polymorphisms in leucocytes: population data on malic enzyme and alpha-L-fucosidase. In BRINKMANN B, HENNINGSEN K (eds). Adv. Forens. Haemogenet. 1: 232-234. Springer-Verlag, Berlin.

SIEBERT G, AMORIM A (1987) Mitochondrial malic enzyme in human leukocytes. Hum.Hered. 37: 122-123.

SIEBERT G, RITTER H, KÖMPF J (1979) Mitochondrial malic enzyme (E.C.1.1.1.40) in human leukocytes: formal genetics and population genetics. Hum. Genet. 51: 319-322.

SIEBERT G, RITTER H, KÖMPF J (1980) Substrate affinity in PGM1, PGM2 and PGM3 isozymes. Hum. Genet. 56: 213-215.

SINNOCK P, SING CF (1972) Analysis of multilocus genetic systems in Tecumseh, Michingan. I. Defenition of the data set and tests for goodness-of-fit to expectations based on gene, gamete, and single-locus phenotype frequencies. Am.J. Hum. Genet. 24: 381-392.

SMOUSE PE, ADAMS J (1983) The use of closely linked genetic markers for paternity analysis, with special consideration of the HLA complex. In WALKER RH (ed.) Inclusion probabilities in parentage testing. pp 397-407. American Association of Blood Banks, Arlington.

SMOUSE PE, CHAKRABORTY R (1986) The use of restriction fragment length polymorphisms in paternity analysis. Am. J. Hum. Genet. 38: 918-939.

SPIESS EB (1977) Genes in populations. John Wiley, New York.

STAHL S, MAYR WR (1990) Polymorphisms of coagulation factores 13A and 13B in west Germany. In POLESKY HF, MAYR WR (eds). Adv. Forens. Haemogenet. 3: 294-295. Springer--Verlag, Berlin.

STÖHLMACHER P, HAFERLAND W (1989) Human malic enzyme-2 polymorphism in the GDR. Hum. Hered. 39: 58-60.

SUZUKI K, MATSUI K, MATSUMOTO H (1986) FXIIIA polymorphim in a japanese population: occurrence of FXIIIA*4 allele. Electrophoresis 7: 289-290.

TOYOMASU T, SAKAKIBARA S, KAGAMIYAMA H, MATSUMOTO H (1984) Genetic polymorphism of mitochondrial glutamate--oxaloacetate transaminase in Japanese. Hum. Genet. 66: 90-91.

TRINH-DINH-KHOI I, GLAISE D, Le TREUT A, FAUCHET R, GODIN Y, Le GALL JY (1979) Genetic polymorphism of α-L-fucosidase in Brittany (France). Hum. Genet. 51: 293-296.

TURNER BM, BERATIS NG, TURNER VS, HIRSCHHORN K (1974) Isozymes of human α-L-fucosidase detectable by starch gel electrophoresis. Clin. Chim. Acta 57: 29.

TURNER BM, TURNER VS, BERATIS NG, HIRSCHHORN K (1975) Polymorphism of human α fucosidase. Am. J. Hum. Genet. 27: 651-661.

VALENTIN J (1977) The reliability of multiple exclusions of paternity. Proc.7th Int. Congr. Soc. Forens. Haemogenet.: 591-593.

WALTER H, ANANTHAKRISHNAN R (1980) Sistemas fosfoglucomutasas. In GEORGE THIEME VERLAG (eds).Genética Humana. I/3 pp446--464. Ediciones Toray, S.A. Barcelona.

WEIDINGER S, SCHWARZFISHER F, LEIFHEIT H-J, CLEVE H (1983) Improved method for phenotyping of human coagulation factor XIII A. Proc. 10th Int. Congr. Soc. Forens. Haemogenet.: 447-452.

WILLIAMS JA, JOHN RA (1979) Generation of aspartate amino transferase multiptle forms by deamination. Biochem. J. 177: 121-127.

WORKMAN PL, (1980) Genetic and demographic structure of populations: an introduction. In ERIKSSON AW, FORSIUS H, NEVANLINNA HR, WORKMAN PL, NORIO RK (eds). Population structure and genetic disorder. pp 3-6. Academic Press, London.

APÊNDICE 1

Símbolos utilizados para referir loci e respectivos nomes, traduzidos em português, segundo recomendações do "Human Gene Mapping 10", 1989.

ABO	Grupo sanguíneo ABO
ACP1	Fosfatase ácida, solúvel
ADA	Desaminase da adenosina
AK1	Cinase adenílica 1
ALAD	Desidratase delta-aminolevulínica
AMY2	Alfa-amilase 2, pancreática
BF	Factor B da properdina
C3	Componente 3 do complemento
ESD	Esterase D
F13A	Polipeptídeo A1 do factor de coagulação XIII
F13B	Polipeptídeo B do factor de coagulação XIII
FUCA1	Alfa-L-fucosidase
FY	Grupo sanguíneo Duffy
GALT	Uridiltransferase da galactose-1-fosfato
GC	Componente específico de grupo
GLO1	Glioxalase I
GOT2	Transaminase glutâmico-oxaloacética 2, mitocondrial
GPT	Transaminase glutâmico-pirúvica
HF	Componente H do complemento
HP	Haptoglobina
ME1	Enzima málica 1, solúvel
ME2	Enzima málica 2, mitocondrial
ORM1	Orosomucóide 1
PEPA	Peptidase A
PEPC	Peptidase C
PGD	Desidrogenase do fosfogluconato

PGM1	Fosfoglucomutase 1
PGM3	Fosfoglucomutase 3
PGP	Fosfatase do fosfoglicolato
PLG	Plasminogéneo
RH	Grupo sanguíneo Rhesus
TF	Transferrina
UMPK	Cinase do monofosfato de uridina

APÊNDICE 2

Documentação fotográfica

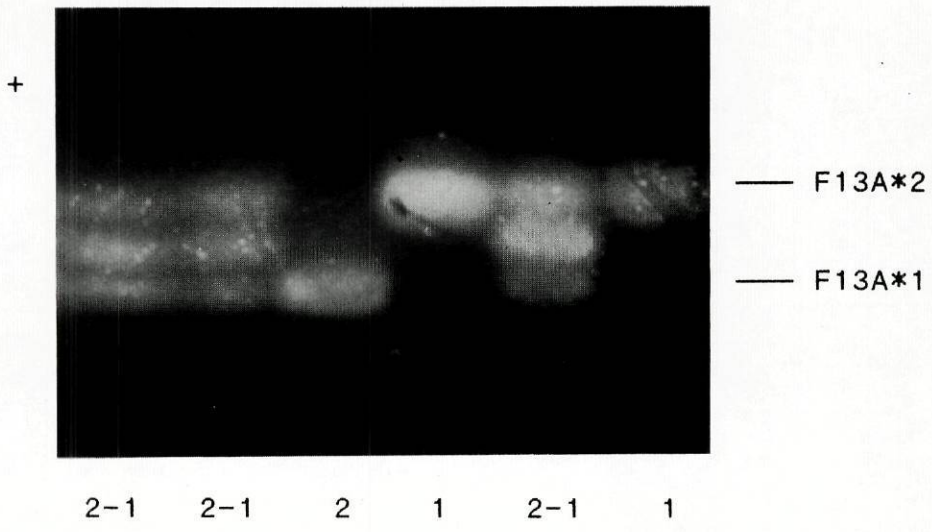


FIGURA 1: fenótipos comuns de F13A

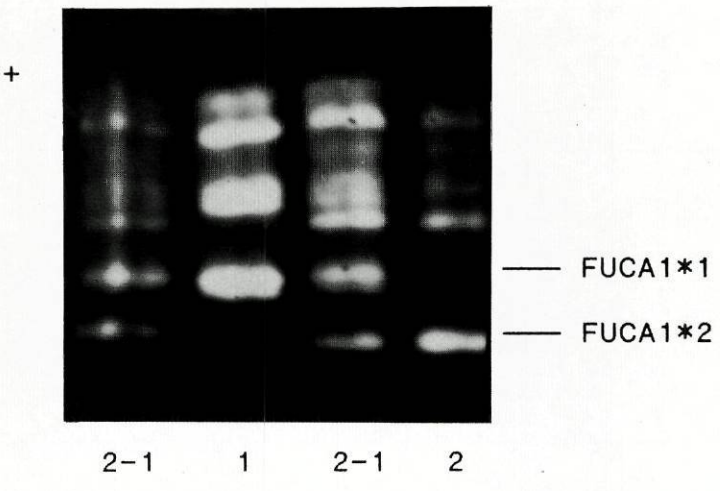


FIGURA 2: fenótipos comuns de FUCA1

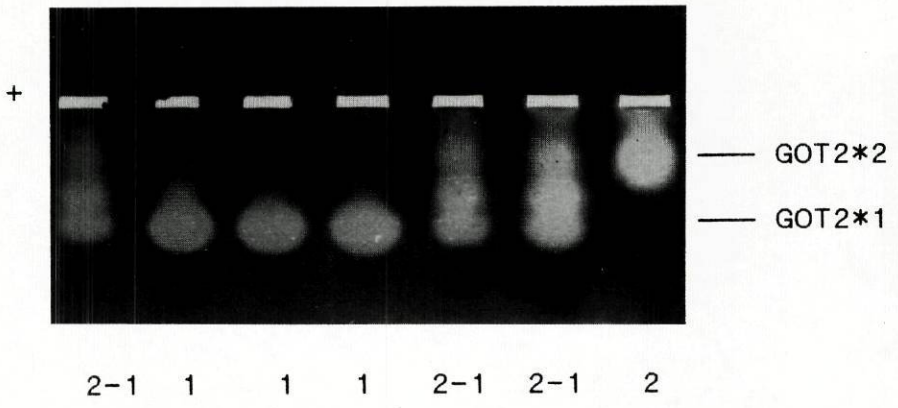


FIGURA 3: GOT2- fenótipo raro 2 comparado com os fenótipos comuns.

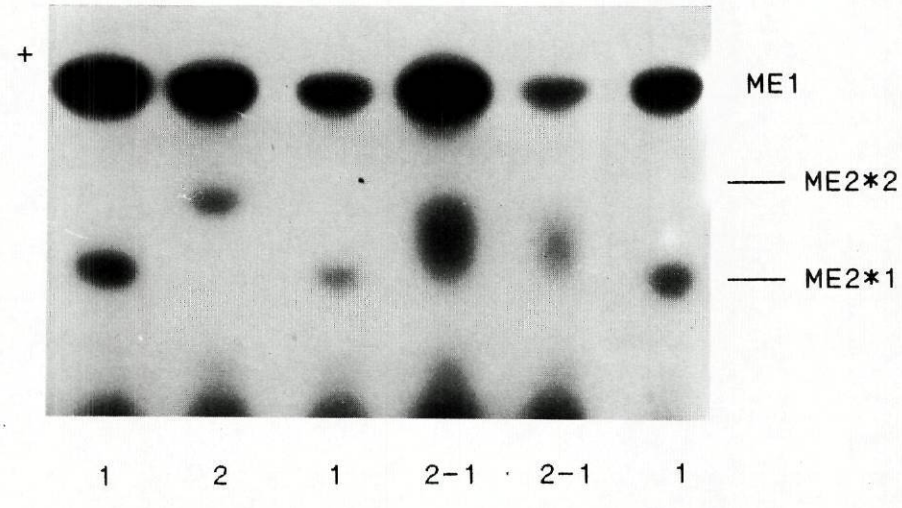


FIGURA 4: fenótipos comuns de ME2

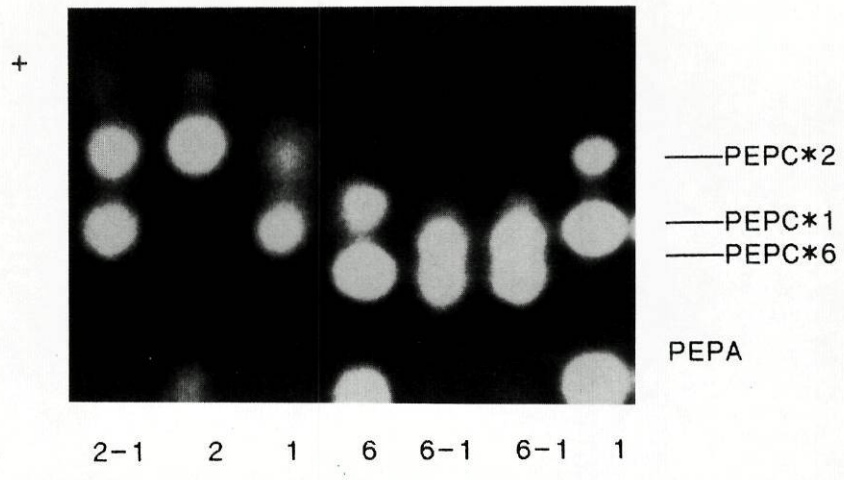


FIGURA 5: PEPC- fenótipos raros 2 e 2-1 comparados com os fenótipos comuns.

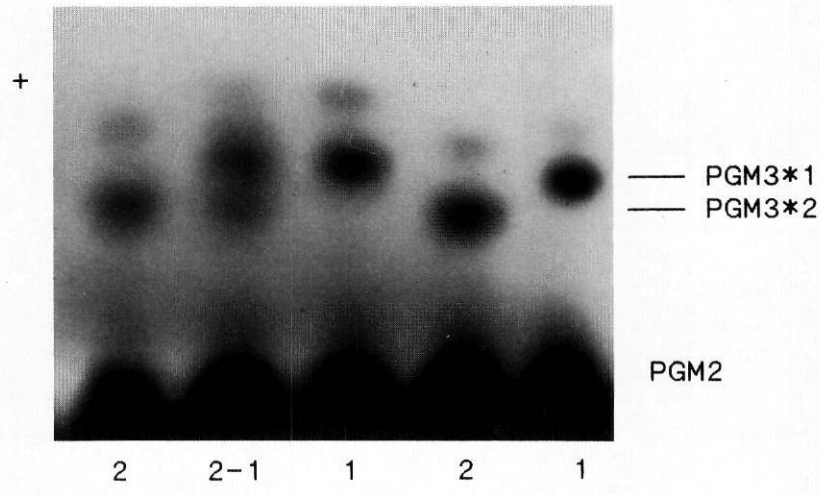


FIGURA 6: fenótipos comuns de PGM3