VASCO MANUEL LEAL MARTINS DE ALMEIDA

POLIMORFISMO DAS REGIÕES HETEROCROMÁTICAS DOS CROMOSSOMAS 1, 9, 16 E Y NA ESPÉCIE HUMANA

Estudo Citogenético, Formal e de Ligação Factorial

PORTO — 1990

POLIMORFISMO DAS REGIÕES HETEROCROMÁTICAS DOS CROMOSSOMAS 1, 9, 16 E Y NA ESPÉCIE HUMANA

Estudo Citogenético, Formal e de Ligação Factorial

VASCO MANUEL LEAL MARTINS DE ALMEIDA

Assistente da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

POLIMORFISMO DAS REGIÕES HETEROCROMÁTICAS DOS CROMOSSOMAS 1, 9, 16 E Y NA ESPÉCIE HUMANA

Estudo Citogenético, Formal e de Ligação Factorial

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

PORTO - 1990

De acordo com o nº 2 do Artigo 8º do Decreto-lei nº 388/70, utilizaram-se neste trabalho resultados já publicados em colaboração, sob o nome de VASCO M. ALMEIDA, nos quais o autor foi o reponsável pela recolha, análise do material e obtenção dos resultados, tendo participado na discussão e na redacção da sua forma publicada:

ALMEIDA V M, AMORIM A (1990) Chromosome polymorphisms in paternity investigations. Advances in Forensic Haemogenetics 3. H. F. Polesky and W. R. Mayr, eds., pp. 366-368. Springer-Verlag Berlin.

AGRADECIMENTOS

A consecussão deste trabalho dependeu, em grande parte, do apoio de diversas pessoas e instituições em relação às quais desejamos expressar o nosso reconhecimento.

Ao Professor Doutor António Amorim manifestamos a nossa gratidão pela forma como orientou este trabalho bem como pela confiança e amizade que nos tem dedicado.

Ao Professor Doutor Amândio Tavares expressamos o nosso mais vivo agradecimento pelo acolhimento que nos dispensou no seu serviço, bem como pelo interesse e disponibilidade com que acompanhou o desenvolvimento deste trabalho. A ele devemos o despertar do nosso interesse pela Genética Humana.

Ao Professor Doutor João Machado Cruz expressamos o nossa gratidão pelo apoio que recebemos, por vezes em situções críticas, ao longo deste trabalho; a sua disponibilidade, experiência e amizade são-nos inestimáveis.

Ao Dr. Norberto Sá (Maternidade Júlio Diniz), Professor Doutor Alberto Barros (Faculdade de Medicina U.P.), Dr. Carlos Santos Jorge (Hospital Geral de Santo António), Dra. Aida Bártolo (Hospital Distrital de Famalicão) e Dra. Maria Fernanda Pacheco (Hospital Distrital de Barcelos) expressamos o nosso reconhecimento pela importante colaboração nas colheitas de sangue.

À Dra. Leonor Gusmão agradecemos o auxílio prestado na catalogação de metafases.

Ao Conselho Científico da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, em particular à Comissão Científica do Grupo de Zoologia-Antropologia, agradeço as facilidades concedidas na obtenção da situação de equiparado a bolseiro e na concessão de dispensa de serviço.

À direcção e corpo técnico do Instituto de Antropologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto agradeço toda a colaboração prestada.

Da mesma forma, expressamos o nosso sincero agradecimento ao corpo técnico do Serviço de Genética Médica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, especialmente à Sra. D. Marília Leal, pelo auxílio prestado durante a execução de parte deste trabalho.

Ao Centro de Genética Humana e Biologia Social do Instituto Nacional de Investigação Científica agradecemos as faculdades concedidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Finalmente, omitindo os reconhecimentos estritamente pessoais e familiares, manifestamos o nosso apreço e gratidão a todos os colegas que, com as suas críticas, sugestões e apoio moral, de algum modo contribuiram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

I. PREÂMBULO E OBJECTIVOS 1

II. INTRODUÇÃO 5

1. HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA 5

2. POLIMORFISMO DAS REGIÕES HETEROCROMÁTICAS NAS POPULAÇÕES HUMANAS 7

2.1. Definição e variabilidade genética 7

2.2. Métodos quantitativos de avaliação 10

2.3. Capacidade reprodutiva em portadores 12

2.4. Segregação 14

2.5. Ligação factorial 16

2.6. Associação a situações patológicas 17

2.7. Investigação das relações de parentesco 19

III. MATERIAL E MÉTODOS 21

1. DEFINIÇÃO DAS AMOSTRAS

A. Adultos 21

B. Recém-nascidos 22

2. OBTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS 23

3. CULTURA DE LINFÓCITOS E OBTENÇÃO DE METAFASES 23

4. TÉCNICA DE BANDAS CBG 24

5. QUANTIFICAÇÃO 25

6. MARCADORES BIOQUÍMICOS 26

7. MÉTODOS DE CÁLCULO

a. Frequências 28

b. Ligação factorial 28

c. Eficiência de exclusão e média da probabilidade de paternidade entre verdadeiros pais 29

IV. RESULTADOS 31

1. GENÉTICA POPULACIONAL 31

2. GENÉTICA FORMAL 49

2.1. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1 49

2.2. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 9 49

2.3. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 16 53

2.4. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma Y 55
2.5. Análise da segregação por sexos 56

3. INVESTIGAÇÃO DA FILIAÇÃO BIOLÓGICA 60

4. LIGAÇÃO FACTORIAL 61

V. DISCUSSÃO 65

1. GENÉTICA POPULACIONAL 67

1.1. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1 67
1.2. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 9 70
1.3. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 16 73
1.4. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma Y 75
1.5. Inversões pericêntricas das regiões heterocromáticas 77
1.6. Variabilidade na classificação 79

2. GENÉTICA FORMAL 80

3. INVESTIGAÇÃO DAS RELAÇÕES DE PARENTESCO 84

4. LIGAÇÃO FACTORIAL 86

VI. CONCLUSÕES 93

VII. SUMMARY 99

VIII. BIBLIOGRAFIA 107

APÊNDICES

I. PREÂMBULO E OBJECTIVOS

A capacidade reprodutiva considerada em geral, ou em aspectos específicos, constitui um bom parâmetro de avaliação do efeito selectivo de um determinado polimorfismo genético.

Actualmente, constituem pontos de discussão em aberto a relação entre a ocorrência de polimorfismos cromossómicos, a diminuição da capacidade reprodutiva e o aumento do risco de abortamentos espontâneos de repetição; na realidade, analisando os inúmeros trabalhos publicados nesta área verifica-se que as observações antagónicas se sucedem e a

discussão persiste.

Em genética formal, revela-se pertinente a análise da eventual distorção da segregação de um determinado polimorfismo cromossómico em indivíduos heterozogóticos, bem como a determinação do "sex ratio" na descendência de portadores, nomeadamente nas famílias nucleares em que o progenitor masculino é portador de um polimorfismo da região heterocromática do cromossoma Y.

A determinação das relações de ligação entre as regiões polimórficas e outros marcadores genéticos reveste-se de importância sob dois aspectos, pois permite, nomeadamente, uma melhor definição da região cromossómica onde se situa um determinado locus, bem como o estabelecimento da transmissão das variantes cromossómicas.

Complementarmente, tem-se assistido à utilização dos polimorfismos cromossómicos na investigação das relações de parentesco, sobretudo nos casos em que o conjunto de exames efectuados conduza a valores de probabilidade de paternidade considerados insuficientes, ou seja, nos casos em que não se atinja a zona probabilística correspondente ao predicado verbal "practicamente provado".

No trabalho que passamos a expor, é nosso objectivo contribuir para aprofundar o conhecimento sobre os

polimorfismos das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9, 16 e Y, através nomeadamente de:

1. levantamento e comparação da incidência dos polimorfismos cromossómicos nas populações de
   - indivíduos em idade reprodutora
   - recém-nascidos

   do Norte do Portugal;
2. estudo da segregação em famílias nucleares em que pelo menos um dos progenitores seja portador de um polimorfismo das regiões heterocromáticas;
3. estudo da ligação factorial entre as regiões polimórficas e marcadores genéticos bioquímicos;
4. aplicação do estudo deste tipo de polimorfismos na investigação das relações de parentesco.

II. INTRODUÇÃO

1. HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA

A heterocromatina, definida pelas suas propriedades picnóticas em ambos os cromossomas de um determinado par, despertou o interesse dos citologistas há mais de sessenta anos (Heitz, 1928); a manutenção do estado condensado em interfase permaneceu desde então como a sua principal característica.

A síntese tardia do DNA é uma propriedade constante deste tipo de cromatina (Lima-de-Faria, 1959; Taylor, 1960;

Lima-de-Faria e Jaworska, 1968; Comings, 1971; Crossen, 1983).

A noção de heterocromatina facultativa ou constitutiva abrange diferenças funcionais fundamentais: na heterocromatina facultativa o genoma encontra-se num estado de repressão temporária; o mecanismo de inactivação não põe em jogo uma modificação do DNA, pois não há uma degradação do material genético. Contrariamente, no que respeita à heterocromatina constitutiva, é geralmente aceite não haver transcrição de DNA (Sieger et al, 1970; Stahl e Hartung, 1981), sendo composta, na sua maior parte, por DNA mediana ou altamente repetitivo. A ligação de proteínas específicas (que não histonas), existentes no núcleo, a determinadas regiões da cromatina será responsável pela estrutura terciária da heterocromatina (Kurnit, 1974; Kanda, 1978) designada como "chromatin folding code" por Vogt (1990).

A heterocromatina constitutiva é usualmente considerada geneticamente inactiva, uma vez que não possui, muito provavelmente, genes estruturais, bem como pelo facto de normalmente não ocorrerem entrecruzamentos que envolvam os segmentos heterocromáticos (Gropp et al, 1969; Hotta e Stern, 1979). Também nestes pontos a discussão persiste, dado existirem descritos entrecruzamentos entre regiões heterocromáticas homólogas (John, 1973; Klasterska et al, 1974; Brandham e Bhattarai, 1977; Yamamoto e Miklos, 1978; Kurnit, 1979; Thelma e Rao, 1982; Crossen, 1983) e

actividade de transcrição (Sperling et al, 1986; 1987).

Diversos investigadores aventaram um papel essencialmente estrutural deste tipo de cromatina que abrangeria algumas propriedades como a protecção de regiões vitais do genoma em relação a factores mutagénicos externos (Hsu, 1975), estabelecimento de barreiras de fertilidade, podendo em algumas situações facilitar a diversidade no decurso da evolução e da especiação (Thelma et al, 1988), bem como indução da atracção dos cromossomas homólogos na meiose (Yunis et al, 1971)

2. POLIMORFISMOS DAS REGIÕES HETEROCROMÁTICAS NAS POPULAÇÕES HUMANAS

2.1. Definição e variabilidade genética

O desenvolvimento observado no final da década de sessenta, e início da de setenta, de diversas técnicas de bandas, conduziu a um interesse crescente nos polimorfismos relacionados com a heterocromatina constitutiva.

Este tipo de heterocromatina representa o mais notável heteromorfismo cromossómico, devido à sua variação em comprimento, contrapondo-se a outros heteromorfismos resultantes de variações na ordem interna e na composição dos cromossomas.

As variações cromossómicas relacionadas com as regiões heterocromáticas eram já conhecidas antes da introdução das técnicas de bandas mas, apenas com aquele tipo de metodologia foi possível determinar com segurança toda a sua variabilidade. Como consequência, o termo heteromorfismo ou variante foi então recomendado para referir variações das regiões heterocromáticas detectadas na população geral (Paris Conference, 1971; Supplement, 1975).

As variações morfológicas das zonas constituídas por heterocromatina constitutiva, nomeadamente as regiões justacentroméricas dos cromossomas 1, 9 e 16 e a região distal do braço longo do cromossoma Y são evidenciadas pelo método de bandas C (Arrighi e Hsu, 1971; Sumner, 1972). A formação deste tipo de bandas resulta, aparentemente, de interacções entre o DNA e proteínas (Kurnit, 1974; Kanda, 1978).

A quantidade de heterocromatina pode influenciar o controlo da separação dos centrómeros, uma vez que nos cromossomas em que a região heterocromática é de menores dimensões, observa-se que a separação anafásica dos centrómeros é mais precoce do que nos homólogos com uma região heterocromática de maior tamanho (Vig e Zinkowski, 1985; Lin et al, 1986; Zhang et al, 1987).

Uma tendência à associação das regiões heterocromáticas tem sido descrita por alguns autores. Schmid et al (1975) descreveram em metafases humanas

uma atracção heterocromática das regiões paracentroméricas dos cromossomas 1, 9 e 16 e dos satélites dos cromossomas acrocêntricos; no entanto, o emparelhamento entre as regiões heterocromáticas dos cromossomas homólogos manifesta-se com maior frequência em relação a cromossomas não homólogos (Haaf et al, 1986). Segundo Bobrow et al (1971), Iorio e Wyandt (1973) e Tishler et al (1974) é também usual a associação das regiões heterocromáticas com o nucléolo.

Os estudos realizados em diversas populações humanas revelam, de uma maneira generalizada, uma incidência elevada relativamente à variabilidade do comprimento das regiões heterocromáticas em pares de homólogos (Craig-Holmes et al, 1973; Tüür et al, 1974; Ferguson-Smith, 1974; Mckenzie e Lubs, 1975; Ghosh e Sing, 1975 ;1976; Brown et al, 1980; Ibraimov et al, 1982).

Podemos também encontrar, na vasta bibliografia existente sobre este ponto, estudos comparativos entre escalões etários (Müller et al, 1975; Buckton et al, 1976), diferentes grupos raciais (Lubs e Ruddle, 1971; Ghosh e Sing, 1975; Lubs et al, 1977; Matsuura et al, 1979; Verma et al, 1981; Erdtman et al 1981 ; Hsu e Benn, 1984; Zanenga et al, 1984, Cavalli et al, 1984: Hsu, 1987; Hsu et al, 1987) e entre os sexos masculino e feminino (Verma et al, 1978; Podugolnikova et al, 1979 b); Cavalli et al, 1985; Potluri et al, 1985).

Dado o elevado número de resultados de estudos populacionais existentes sobre os polimorfismos das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9, 16 e Y, pareceu-nos preferível a sua apresentação sob forma condensada no capítulo V (Discussão), permitindo, assim, uma mais fácil comparação com os resultados obtidos neste trabalho.

2.2. Métodos quantitativos de avaliação

Uma das dificuldades com que deparamos ao quantificar as regiões heterocromáticas é o facto de não estarem ainda estabelecidos valores normalizados para aquelas regiões.

Efectivamente, existe actualmente uma considerável variedade de métodos propostos para a quantificação das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9, 16 e Y, tais como:

a) Classificação segundo cinco classes discretas baseada no tamanho das bandas C (Paris Conference, 1971; ISCN, 1978); quatro classes de tamanho (Buckton et al, 1976); e três classes de tamanho tais como "normal", "maior que o normal" e "menor que o normal" (Craig-Holmes et al, 1975; Mckenzie e Lubs, 1975; Nielsen e Sillessen, 1975; Ferguson-Smith, 1974; Ghosh e Sing, 1976; Tharapel e Summitt, 1978). Este tipo de classificação não permite uma definição objectiva para as diferentes classes, o que tem como

consequência a difícil comparação entre os dados de diferentes autores.

b) Comparação entre o comprimento médio da região heterocromática e o comprimento médio do cromossoma ou da sua região eucromática (Hemming e Burns, 1979; Podugolnikova et al, 1979 a); Brown et al, 1980; Erdtmann et al, 1981; Staessen et al, 1982; Ford et al, 1983).

c) Tamanho relativo de cada região heterocromática em relação ao comprimento total das regiões heterocromáticas (1, 9, 16 e Y) (Podugolnikova et al, 1979 a) b); Podugolnikova, 1979; Podugolnikova e Korostelev, 1980).

d) Medição da área da região heterocromática e comparação com a área total do cromossoma em causa (Staessen et al, 1982; Mutchinick et al, 1986).

e) Comparação de tamanhos das regiões heterocromáticas com padrões intracelulares tais como 16p, 18p, 21q, 9p, 7, 1-h e 1q-h (Madan e Bobrow, 1974; Müller et al, 1975; Balicek et al, 1977; Patil e Lubs, 1977 b); Verma et al, 1978; Balicek et al, 1978; Fogle et al, 1980; Ford et al, 1982; Ibraimov et al, 1982; Friedrich e Therkelsen,1982; Cohen et al., 1983; Cavalli et al.,1985; Potluri et al., 1985; Hsu et al, 1987).

f) Métodos densitométricos (Sumner, 1977; Benyush et al, 1977; Mason et al, 1978; Ray et al, 1984; Green

et al, 1984; Harris et al, 1986; Trask et al, 1989).

O comprimento das regiões heterocromáticas, postas em evidência pela técnica de bandas C, varia com o grau de condensação dos cromossomas metafásicos. No entanto, esta variabilidade não é tão acentuada como a verificada nas regiões eucromáticas (Schmiady e Sperling, 1976; Balicek et al, 1977). Consequentemente, para obtermos uma classificação normalizada devemos ter em conta o grau de condensação do cromossoma ou, alternativamente, proceder à escolha de um padrão intracelular.

2.3. Capacidade reprodutiva em portadores

É bem conhecido o debate que ainda subsiste sobre a influência dos polimorfismos cromossómicos das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9, 16 e Y na capacidade reprodutiva dos seus portadores.

A associação entre o desperdício fetal e polimorfismos cromossómicos tem sido observado por diversos investigadores (Patil e Lubs, 1974; Holbeck et al, 1974; Boué et al, 1975; Jacobs et al, 1975; Tsenghi et al, 1976; Nordensen, 1981; Tho et al, 1982; Brecevic e Kern, 1986; Tavares-Cummings, 1990).

Contrariamente, outros trabalhos não revelam

qualquer aumento na frequência de abortamentos espontâneos de repetição em casais em que um dos membros é portador de um polimorfismo das regiões heterocromáticas (Hemming e Burns, 1979; Carothers et al, 1982; Mulcahy, 1982; Blumberg et al, 1982; Pantzar et al, 1984; Rodriguez-Gómez et al, 1987).

No que respeita à inversão pericêntrica da região heterocromática do cromossoma 9, Moorhead (1976) e Ward et al(1980) consideram a sua associação com a diminuição de capacidade reprodutiva como fortuita e, De la Chapelle et al (1974), após a análise de segregação e da taxa de desperdício fetal, não detectaram qualquer efeito selectivo deste tipo de variante. Concomitantemente, numerosos investigadores estabelecem uma relação directa entre a ocorrência daquele tipo de variante e a incapacidade reprodutiva (Pescia et al, 1977; Ford et al, 1982; 1983; Lyberatou-Moraitou et al, 1983; Fryns et al, 1985).

A associação entre as variações de tamanho da região heterocromática do cromossoma Y e a diminuição da capacidade reprodutiva é defendida por diversos autores (Patil e Lubs, 1977 a); Nielsen, 1978; Genest, 1979; Diklic et al, 1981; Genest e Genest, 1985; Chandley et al, 1989).

A relação entre a incidência de polimorfismos e a infertilidade masculina tem sido, também, investigada em larga escala. Assim, segundo Chandley (1983) a frequência de

polimorfismos cromossómicos é semelhante na população masculina infértil e na população geral. A realização do cariótipo de linfócitos em 404 homens inférteis conduziu à observação de 4,2% de polimorfismos cromossómicos (9qh+:3,2% ; 1qh+, micro Y, Yq+ e 15s+ : cada um com a frequência de 0,2%) (Barros, 1989). Segundo a opinião deste autor, se os polimorfismos cromossómicos têm alguma influência no processo reprodutivo, não será na produção de espermatozóides mas, eventualmente, a outros níveis como a formação aneuploide de gâmetas por interferência na separação anafásica dos cromossomas. Opinião análoga é defendida por Ford et al (1983) e Tyrkus et al (1985).

O aumento da região heterocromática justacentromérica do cromossoma 9 está também, segundo Nielsen et al (1974), Ford e Lester (1978) e Wang e Hamerton (1979), relacionado com a tendência para não-disjunções cromossómicas, o que poderá explicar, em parte, alguns resultados relacionados com o desperdício fetal.

2.4. Segregação

De uma maneira geral, os estudos realizados em famílias nucleares sobre a segregação dos polimorfismos das regiões heterocromáticas, demonstram um modo de transmissão do tipo mendeliano (Craig-Holmes et al, 1973;1975; Mckenzie e

Lubs, 1975; Ray et al, 1984), inclusivamente em casos de inversão pericêntrica da região heterocromática do cromossoma 9 (De la Chapelle et al, 1974; Mayer et al, 1978).

No entanto, estão descritas neste capítulo algumas excepções, nomeadamente a segregação preferencial em heterozigóticos para um aumento acentuado da região heterocromática justacentromérica do cromossoma 9 (Carnevale et al, 1976; Robinson et al, 1976) e inversão pericêntrica do mesmo cromossoma (Kaiser, 1984); a ocorrência de 1,96% de variantes das regiões heterocromáticas em indivíduos cujos pais não eram portadores dessas mesmas variantes, é referido por Simi e Tursi (1982) que apontam o entrecruzamento como causa provável de tal facto.

O estudo da transmissão de um polimorfismo 9qh+ numa família de três gerações, revelou distúrbios na segregação, dado que a referida família apresentava um excesso de portadores (cerca de 2:1) daquele polimorfismo, tendo sido aventada como possível explicação para tal facto, a ocorrência de um efeito adverso provocado pelo cromossoma com o aumento da região heterocromática sobre a replicação ou segregação do homólogo (Fitzgerald, 1973). Tal distorção na segregação, se efectiva, seria responsável por um rápido aumento da frequência do polimorfismo.

Dados contraditórios foram também observados em

estudos de pares de gémeos. Enquanto Dike et al (1977) não observaram qualquer diferença nas regiões heterocromáticas em pares de gémeos monozigóticos, Viegas e Salzano (1978) referem valores de concordância abaixo da unidade, apontando como possíveis causas a ocorrência de variações metodológicas, entrecruzamentos mitóticos desiguais e variações intercelulares.

2.5. Ligação factorial

Embora o estudo da segregação de um polimorfismo das regiões heterocromáticas tenha sido o responsável pela primeira localização de um locus (Duffy) num cromossoma específico (cromossoma 1) (Donahue et al, 1968), são relativamente escassos os estudos de ligação factorial entre as regiões heterocromáticas e outros loci.

Os valores de "lod scores" provenientes da análise da ligação entre as regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9 e 16 existentes na bibliografia serão apresentados sob forma condensada no capítulo V (Discussão), permitindo assim uma mais fácil comparação com os resultados obtidos neste trabalho.

Infelizmente, não estão referenciados no "Human Gene Mapping" os resultados dos estudos sobre ligação factorial entre as regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9 e

16 e *loci* situados nesses mesmos cromossomas, o que proporcionaria uma mais eficiente comparação com os nossos resultados.

2.6. Associação a situações patológicas

A associação entre a ocorrência de polimorfismos cromossómicos e situações patológicas é uma questão que permanece em aberto em diversos pontos.

Uma relação directa entre a presença deste tipo de polimorfismo e a tendência para a ocorrência de um determinado tipo de neoplasia é indicada por alguns investigadores, nomeadamente carcinomas do ovário (Atkin e Picktall, 1977; Atkin e Baker, 1977), da mama (Berger *et al*, 1985), do testículo (Robson *et al*, 1981), do cólon e do recto (Shabtai *et al*, 1985; Heim *et al*, 1985), da pele (Atkin e Brito-Babapulle, 1985) e sarcomas (Berger *et al*, 1983). Resultados não concordantes com os anteriores são referidos por Kivi e Mikelsaar (1980), Schulze *et al* (1984), Kristoffersson (1985) e Verma (1985).

A redução da quantidade de heterocromatina poderá afectar os processos morfogenéticos (Podugolnikova e Blumina, 1983; Halbrecht e Shabtay, 1976), estando também descrita uma relação directa entre a variabilidade da quantidade de heterocromatina e características antropométricas, tais como

altura, peso e diâmetro escapular (Podugolnikova et al, 1984).Inversamente, Buys et al (1979) relataram dois casos de deficiência completa da região heterocromática do cromossoma 9 sem acarretar qualquer modificação a nível fenotípico.

A um aumento significativo na frequência de polimorfismos 9qh+ e 16qh- em crianças com atraso mental, referido por Swarna et al (1986), contrapõem-se as observações de Tharapel e Summitt (1978) e Wang e Hamerton (1979) que verificaram a não existência de diferenças significativas num estudo realizado em crianças em tal situação.

A instabilidade das regiões heterocromáticas justacentroméricas dos cromossomas 1, 9 e 16 encontra-se associada a imunodeficiência (diminuição acentuada dos níveis de IgG, IgA, IgM e IgE) conduzindo à formação de imagens mitóticas características tais como diversos tipos de associações de cromossomas com múltiplos braços (Fryns et al, 1981; Howard et al, 1985; Haas, 1990). Esta situação pode também estar associada a atraso psicomotor (Tiepolo et al, 1979), dismorfismo facial (Maraschio et al, 1988; Turleau et al, 1989) e atraso mental (Valkova et al, 1986; 1987).

As associações entre a ocorrência de heteromorfismos e alguns tipos de doenças revelam, na maior parte dos casos, uma significância estatística marginal. Para além disso,

limitações tais como a diversidade dos métodos de análise e ainda a casuística restrita tornam as conclusões reservadas.

2.7. Investigação das relações de parentesco

A investigação das relações de parentesco baseia-se usualmente na fenotipagem de proteínas plasmáticas, enzimas eritrocitárias e leucocitárias, antigénios eritrocitários, polimorfismos do DNA, bem como HLA.

O estudo dos polimorfismos das regiões heterocromáticas reveste-se de grande interesse em investigação da filiação biológica (Jonasson et al, 1972; Balicek et al, 1978; Olson et al, 1986; Shiono et al, 1985; Gürtler e Niebuhr, 1986; Kamenev et al, 1986; Almeida e Amorim, 1990; Almeida et al, 1989), principalmente nos casos em que o conjunto dos exames efectuados no trio mãe, filho, pretenso pai não conduza a qualquer tipo de exclusão, sendo os valores de probabilidade ou índice de paternidade insuficientes segundo a metodologia utilizada actualmente, isto é, quando não é atingido o limite mínimo requerido para o reconhecimento de uma forte indicação da paternidade.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. DEFINIÇÃO DAS AMOSTRAS

A. Adultos

Esta amostra, da qual fazem parte cento e quarenta indivíduos do sexo masculino e cento e cinquenta e dois do sexo feminino, é constituída por indivíduos residentes no distrito do Porto. Além de dadores voluntários, estão também incluídos indivíduos envolvidos em exames de investigação de filiação biológica realizados no Instituto de Antropologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

As colheitas de sangue foram efectuadas no Instituto de Antropologia e em trabalhos de campo realizados no distrito do Porto.

Foram registados o nome, idade, local de nascimento e residência de cada dador; realizou-se também um pequeno inquérito sobre a história individual e familiar de cada dador, com a finalidade de eliminar parentescos não declarados e detectar afecções hereditárias, incidindo especialmente na capacidade reprodutiva e na ocorrência de abortamentos espontâneos.

B. Recém-nascidos

Esta amostra é constituída por indivíduos nascidos nos serviços de obstetrícia dos Hospitais de S. João, Santo António, Barcelos, Famalicão e Maternidade de Júlio Dinis, e é composta por cento e cinquenta e dois indivíduos do sexo masculino e cento e sessenta e cinco do sexo feminino.

Foram registados a data e local de nascimento bem como o número de código associado a cada recém-nascido pelas instituições referidas.

2. OBTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

O sangue foi o único tipo de amostra biológica utilizado neste trabalho, sendo colhido por punção venosa antecubital na amostra da população adulta e a partir do cordão umbilical nos recém-nascidos. As colheitas foram realizadas assepticamente, tendo sido usado como anticoagulante a heparina estéril (Liquémine Roche).

A amostra de sangue (10 a 12 ml) foi separada em duas fracções distintas. A destinada a cultura de linfócitos foi utilizada no máximo vinte e quatro horas após a colheita. A outra alíquota, destinada às fenotipagens serológicas, por electroforese de zona ou focagem isoeléctrica foi também utilizada imediatamente ou após conservação a -20° C; o tratamento e conservação foi realizado segundo o método descrito por Siebert et al (1979).

3. CULTURA DE LINFÓCITOS E OBTENÇÃO DE METAFASES

As culturas de linfócitos foram executadas segundo a técnica em rotina no Serviço de Genética Médica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Foi utilizado um meio de cultura com a seguinte constituição : meio RPMI (Sigma), 20% de soro fetal de vitela

(Gibco), 100 U.I./ml de penicilina (Gibco), 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco) e 1% de fitohemaglutinina (Gibco).

A 5ml de meio de cultura foram adicionados 0,8ml de sangue total. O desenvolvimento da cultura efectuou-se em estufa a 37° C durante 72 horas.

Duas horas antes do términus foram adicionados à cultura 50 µl de uma solução de colquicina (Gibco) 200µg/ml.

Após centrifugação (1200 rpm) durante 10 minutos e rejeição do sobrenadante, a cultura foi submetida a um choque hipotónico com uma solução de KCl 0,075M a 37° C durante 10 minutos.

O sedimento resultante da centrifugação igual à do ponto anterior foi fixado com uma mistura de metanol e ácido acético (3:1) preparada na altura e à temperatura de 4° C.

Depois de três lavagens com a referida mistura, a suspensão foi estendida em lâmina limpa e previamente colocada em metanol.

4. TÉCNICA DE BANDAS CBG

Foi utilizada a técnica de bandas CBG descrita por

Sumner (1972) à qual foram introduzidas algumas modificações.

As preparações com idade compreendida entre 15 e 20 dias foram submetidas a um tratamento com ácido clorídico 0,1N durante 30 minutos à temperatura ambiente, sendo depois lavadas com água desionizada.

Numa solução saturada e filtrada de hidróxido de bário, preparada na altura, colocaram-se as preparações durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Depois de abundante lavagem com água desionizada, as lâminas foram incubadas durante 1 hora à temperatura de 60° C em 2xSSC (0,3M de cloreto de sódio e 0,03M de citrato de sódio; pH = 7,2).

A coloração foi efectuada numa solução de Giemsa (Merck) 4% em tampão Sorensen durante 15 minutos.

Depois de lavadas com água desionizada e secas, as preparações foram montadas com Entalan (Merck).

5. QUANTIFICAÇÃO

A quantificação das regiões heterocromáticas

justacentroméricas dos cromossomas 1, 9, 16 e do segmento distal do braço longo do cromossoma Y foi efectuada por comparação do comprimento daquelas regiões com o comprimento do braço curto do cromossoma 16 da mesma mitose (Patil e Lubs, 1977 b) mediante o estabelecimento de cinco níveis discretos: <0,5 x k (nível 1), >0,5 - 1 x k (nível 2), > 1 - 1,5 x k (nível 3), >1,5-2 x k (nível 4), > 2 x k (nível 5), em que k representa o comprimento do braço curto do cromossoma 16 (Figura 1). Os polimorfismos cuja quantificação recaía na zona de transição entre dois níveis diferentes, foram classificados como pertencentes ao nível superior.

Foram observadas oito a quinze metafases de boa qualidade por indivíduo; a quantificação foi realizada por dois observadores de uma forma independente.

6. MARCADORES BIOQUÍMICOS

Os fenótipos dos marcadores bioquímicos dos cromossomas 1 (PGD, RH, FUCA 1, UMPK, PGM 1, AMY 2, FY e PEPC), 9 (GALT, ORM 1, ALAD, ABO, AK 1) e 16 (PGP, GOT 2, HP) (nomenclatura dos loci de acordo com "Human Gene Mapping 10", 1989) utilizados no estudo de ligação factorial, foram obtidos após consulta do ficheiro informático existente no Instituto de Antropologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Este ficheiro foi também utilizado na confirmação, apoiada na bateria de marcadores genéticos bioquímicos utilizados nas provas de investigação do parentesco, das exclusões de paternidade observadas após o estudo dos polimorfismos das regiões heterocromáticas em famílias nucleares.

7. MÉTODOS DE CÁLCULO

a. Frequências

A estimativa das frequências de cada classe definida no ponto 5. foi feita por contagem directa. Cada uma das classes foi tratada formalmente como um gene codominante.

Nos casos em que a amostragem o permitiu, postulou-se a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando para tal o teste de X^2.

b. Ligação factorial

Os valores de "lod score" foram obtidos segundo a metodologia descrita por Maynard-Smith et al (1961).

c. Eficiência de exclusão e média da probabilidade de paternidade entre verdadeiros pais.

A eficiência de exclusão ou probabilidade de exclusão a priori (PE) foi determinada segundo Chakraborty et al. (1974); a média da probabilidade de paternidade entre verdadeiros pais (WF) foi calculada segundo a metodologia de Essen-Moller (Rocha, 1988).

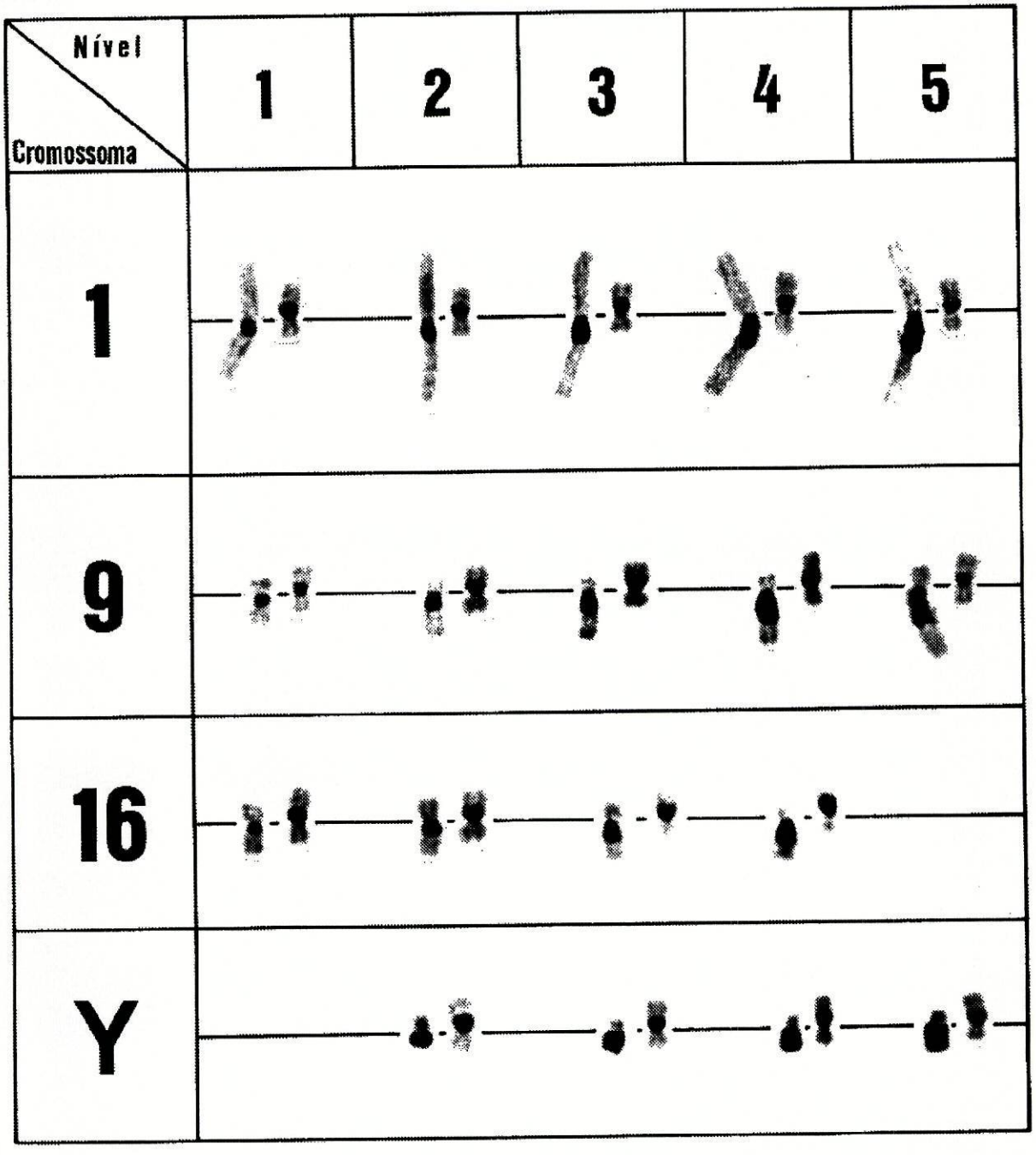

Figura 1. Níveis de quantificação das regiões heterocromáticas

IV. RESULTADOS

Os polimorfismos das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9, 16 e Y foram, neste capítulo, apresentados isoladamente, isto é, por cromossoma.

1. Genética populacional

A distribuição por sexos e resultados esperados segundo o formalismo de Hardy-Weinberg são apresentados nas tabelas 1-4 e 5-8, relativas respectivamente às amostras das populações de adultos e recém-nascidos do Norte de Portugal.

TABELA 1.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1: distribuição por sexos e resultados esperados segundo o formalismo de Hardy-Weinberg em uma amostra da população de adultos do Norte de Portugal.

	fenótipos								
	53	43	42	33	32	31	22	outros	T
m	-	5 (5,48)	1 (0,28)	124 (121,61)	8 (12,27)	-	2 (0,31)	- (0,05)	140
f	1 (0,80)	10 (10,46)	2 (0,87)	120 (118,24)	16 (19,57)	1 (0,80)	2 (0,81)	- (0,45)	152
T	1 (1,06)	15 (15,87)	3 (1,05)	244 (239,68)	24 (31,75)	1 (1,06)	4 (1,05)	- (0,48)	292

$\bar{3} = 0{,}906 \pm 0{,}012$
$\bar{2} = 0{,}060 \pm 0{,}010$
$\bar{4} = 0{,}030 \pm 0{,}007$
$\bar{5} = 0{,}002 \pm 0{,}002$
$\bar{1} = 0{,}002 \pm 0{,}002$

$\bar{3}\,m = 0{,}932 \pm 0{,}015$
$\bar{2}\,m = 0{,}047 \pm 0{,}013$
$\bar{4}\,m = 0{,}021 \pm 0{,}009$

$\bar{3}\,f = 0{,}882 \pm 0{,}019$
$\bar{2}\,f = 0{,}073 \pm 0{,}015$
$\bar{4}\,f = 0{,}039 \pm 0{,}011$
$\bar{5}\,f = 0{,}003 \pm 0{,}003$
$\bar{1}\,f = 0{,}003 \pm 0{,}003$

TABELA 2.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 9: distribuição por sexos e resultados esperados segundo o formalismo de Hardy-Weinberg em uma amostra da população de adultos do Norte de Portugal.

	fenótipos								
	53	52	43	42	33	32	22	outros	T
m	2 (2,68)	1 (0,25)	10 (8,78)	-	111 (106,21)	10 (20,00)	6 (0,94)	- (1,14)	140
f	-	-	7 (8,81)	3 (0,89)	126 (117,17)	8 (23,76)	8 (1,20)	- (0,17)	152
T	2 (2,56)	1 (0,25)	17 (17,37)	3 (1,71)	237 (223,56)	18 (43,95)	14 (2,16)	- (0,44)	292

$\bar{3} = 0,875 \pm 0,014$ $\quad \bar{3}\,m = 0,871 \pm 0,020$ $\quad \bar{3}\,f = 0,878 \pm 0,019$

$\bar{2} = 0,086 \pm 0,012$ $\quad \bar{2}\,m = 0,082 \pm 0,016$ $\quad \bar{2}\,f = 0,089 \pm 0,016$

$\bar{4} = 0,034 \pm 0,008$ $\quad \bar{4}\,m = 0,036 \pm 0,011$ $\quad \bar{4}\,f = 0,033 \pm 0,010$

$\bar{5} = 0,005 \pm 0,003$ $\quad \bar{5}\,m = 0,011 \pm 0,006$

TABELA 3.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 16 : distribuição por sexos e resultados esperados segundo o formalismo de Hardy-Weinberg em uma amostra da população de adultos do Norte de Portugal.

	fenótipos						
	33	32	22	21	11	outros	T
m	1 (0,31)	11 (12,17)	121 (119,79)	6 (7,25)	1 (0,11)	- (0,26)	140
f	1 (0,20)	9 (10,27)	137 (133,74)	2 (7,41)	3 (0,10)	- (0,28)	152
T	2 (0,49)	20 (22,32)	258 (253,64)	8 (14,70)	4 (0,21)	- (0,43)	292

$\bar{2} = 0,932 \pm 0,010$ $\quad \bar{2}\,m = 0,925 \pm 0,026$ $\quad \bar{2}\,f = 0,938 \pm 0,014$

$\bar{3} = 0,041 \pm 0,008$ $\quad \bar{3}\,m = 0,047 \pm 0,013$ $\quad \bar{3}\,f = 0,036 \pm 0,011$

$\bar{1} = 0,027 \pm 0,007$ $\quad \bar{1}\,m = 0,028 \pm 0,010$ $\quad \bar{1}\,f = 0,026 \pm 0,009$

TABELA 4.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma Y: distribuição em uma amostra da população de adultos do Norte de Portugal.

	fenótipos					
	5	4	3	2	outros	T
T	1	9	122	4	-	136

$\bar{3}$ = 0,897 ± 0,026

$\bar{4}$ = 0,067 ± 0,021

$\bar{2}$ = 0,029 ± 0,015

$\bar{5}$ = 0,007 ± 0,007

TABELA 5.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1: distribuição por sexos e resultados esperados segundo o formalismo de Hardy-Weinberg em uma amostra de recém-nascidos do Norte de Portugal.

	fenótipos									
	53	44	43	42	33	32	31	22	outros	T
m	1 (0,78)	1 (0,23)	7 (10,18)	3 (1,14)	117 (112,16)	18 (25,07)	1 (0,78)	4 (1,40)	- (0,26)	152
f	-	2 (0,21)	7 (10,41)	1 (1,01)	131 (126,62)	19 (24,57)	1 (0,87)	4 (1,19)	- (0,12)	165
T	1 (1,10)	3 (0,46)	14 (20,91)	4 (2,14)	248 (238,83)	37 (48,98)	2 (1,65)	8 (2,51)	- (0,42)	317

$\bar{3} = 0,868 \pm 0,014$ $\quad \bar{3}\,m = 0,859 \pm 0,020$ $\quad \bar{3}\,f = 0,876 \pm 0,018$

$\bar{2} = 0,089 \pm 0,011$ $\quad \bar{2}\,m = 0,096 \pm 0,017$ $\quad \bar{2}\,f = 0,085 \pm 0,015$

$\bar{4} = 0,038 \pm 0,008$ $\quad \bar{4}\,m = 0,039 \pm 0,011$ $\quad \bar{4}\,f = 0,036 \pm 0,010$

$\bar{1} = 0,003 \pm 0,002$ $\quad \bar{1}\,m = 0,003 \pm 0,003$ $\quad \bar{3}\,f = 0,003 \pm 0,003$

$\bar{5} = 0,002 \pm 0,002$ $\quad \bar{5}\,m = 0,003 \pm 0,003$

TABELA 6.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 9: distribuição por sexos e resultados esperados segundo o formalismo de Hardy-Weinberg em uma amostra de recém-nascidos do Norte de Portugal.

	fenótipos							
	43	42	33	32	31	22	outros	T
m	7 (6,76)	1 (0,94)	119 (111,12)	15 (30,93)	-	10 (2,15)	- (0,10)	152
f	12 (11,24)	1 (1,09)	131 (125,75)	13 (24,49)	1 (0,86)	7 (1,19)	- (0,38)	165
T	19 (18,08)	2 (2,11)	250 (236,64)	28 (55,33)	1 (1,10)	17 (3,23)	- (0,51)	317

$\bar{3} = 0,864 \pm 0,014$
$\bar{2} = 0,101 \pm 0,012$
$\bar{4} = 0,033 \pm 0,007$
$\bar{1} = 0,002 \pm 0,002$

$\bar{3}\,m = 0,855 \pm 0,020$
$\bar{2}\,m = 0,119 \pm 0,019$
$\bar{4}\,m = 0,026 \pm 0,009$

$\bar{3}\,f = 0,873 \pm 0,018$
$\bar{2}\,f = 0,085 \pm 0,015$
$\bar{4}\,f = 0,039 \pm 0,011$
$\bar{1}\,f = 0,003 \pm 0,003$

TABELA 7.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 16: distribuição por sexos e resultados esperados segundo o formalismo de Hardy-Weinberg em uma amostra de recém-nascidos do Norte de Portugal.

	fenótipos								
	42	33	32	31	22	21	11	outros	T
m	1 (0,86)	1 (0,08)	5 (6,56)	– (0,25)	136 (133,74)	7 (10,27)	2 (0,20)	– (0,04)	152
f	2 (1,79)	2 (0,18)	6 (9,83)	1 (0,63)	140 (134,54)	10 (17,28)	4 (0,56)	– (0,19)	165
T	3 (2,92)	3 (0,25)	11 (16,33)	1 (0,83)	276 (268,31)	17 (27,41)	6 (0,70)	– (0,25)	317

$\bar{2} = 0,920 \pm 0,011$ $\quad \bar{2}\,m = 0,938 \pm 0,057$ $\quad \bar{2}\,f = 0,903 \pm 0,016$

$\bar{1} = 0,047 \pm 0,008$ $\quad \bar{1}\,m = 0,036 \pm 0,011$ $\quad \bar{1}\,f = 0,058 \pm 0,013$

$\bar{3} = 0,028 \pm 0,007$ $\quad \bar{3}\,m = 0,023 \pm 0,009$ $\quad \bar{3}\,f = 0,033 \pm 0,010$

$\bar{4} = 0,005 \pm 0,003$ $\quad \bar{4}\,m = 0,003 \pm 0,003$ $\quad \bar{4}\,f = 0,006 \pm 0,004$

TABELA 8.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma Y: distribuição em uma amostra da população de recém-nascidos do Norte de Portugal.

	fenótipos				
	4	3	2	outros	T
T	7	144	1	-	152

$\bar{3} = 0,947 \pm 0,018$

$\bar{4} = 0,046 \pm 0,017$

$\bar{2} = 0,007 \pm 0,007$

A análise estatística revelou uma diferença não significativa na comparação das distribuições fenotípicas dos diferentes polimorfismos cromossómicos entre as amostras das populações de adultos e recém-nascidos, quer tomadas na sua totalidade, quer separando os sexos, excepto no polimorfismo do cromossoma 1 da amostra da população masculina ($0,050>P>0,025$) (tabela 15).

Por sua vez, a comparação das distribuições fenotípicas dos polimorfismos das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9 e 16 entre os sexos masculino e feminino (Tabela 16), também não revelou diferenças significativas, quer a nível da amostra da população de adultos quer na de recém-nascidos.

As frequências dos polimorfismos das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9, 16 e Y observadas nas amostras das populações de adultos e recém-nascidos encontram-se descritas nas tabelas 9-12. Em todos estes cromossomas verifica-se uma elevada frequência de variantes, sendo de referir, no entanto, o facto de no cromossoma 16 não se ter observado, em ambas as amostras, o nível de classificação 5 (região heterocromática >2x16p), bem como o nível de classificação 1 (região heterocromática <0,5x16p) no cromossoma Y.

TABELA 9.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1: frequências nas amostras de adultos e recém-nascidos.

AMOSTRA		N	1	2	3	4	5
RECÉM-NASCIDOS	m	152	0,003 (±0,003)	0,096 (±0,017)	0,859 (±0,020)	0,039 (±0,011)	0,003 (±0,003)
	f	165	0,003 (±0,003)	0,085 (±0,015)	0,876 (±0,018)	0,036 (±0,010)	-
	T	317	0,003 (±0,002)	0,089 (±0,011)	0,868 (±0,014)	0,038 (±0,014)	0,002 (±0,002)
ADULTOS	m	140	-	0,047 (±0,013)	0,932 (±0,015)	0,021 (±0,009)	-
	f	152	0,003 (±0,003)	0,073 (±0,015)	0,882 (±0,019)	0,039 (±0,011)	0,003 (±0,003)
	T	292	0,002 (±0,002)	0,060 (±0,010)	0,906 (±0,012)	0,030 (±0,007)	0,002 (±0,002)

TABELA 10.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 9:
frequências nas amostras de adultos e recém-nascidos.

AMOSTRA		N	1	2	3	4	5
RECÉM-NASCIDOS	m	152	-	0,119 (±0,019)	0,855 (±0,020)	0,026 (±0,009)	-
	f	165	0,003 (±0,003)	0,085 (±0,015)	0,873 (±0,018)	0,039 (±0,011)	-
	T	317	0,002 (±0,002)	0,101 (±0,012)	0,864 (±0,014)	0,033 (±0,007)	-
ADULTOS	m	140	-	0,082 (±0,016)	0,871 (±0,020)	0,036 (±0,011)	0,011 (±0,006)
	f	152	-	0,089 (±0,016)	0,878 (±0,019)	0,033 (±0,010)	-
	T	292	-	0,086 (±0,012)	0,875 (±0,014)	0,034 (±0,008)	0,005 (0,003)

TABELA 11.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 16: frequências nas amostras de adultos e recém-nascidos.

AMOSTRA		N	1	2	3	4
RECÉM-NASCIDOS	m	152	0,036 (±0,011)	0,938 (±0,057)	0,023 (±0,009)	0,003 (±0,003)
	f	165	0,058 (±0,013)	0,903 (±0,016)	0,033 (±0,010)	0,006 (±0,004)
	T	317	0,047 (±0,008)	0,920 (±0,011)	0,028 (±0,007)	0,005 (±0,003)
ADULTOS	m	140	0,028 (±0,010)	0,925 (±0,016)	0,047 (±0,013)	-
	f	152	0,026 (±0,009)	0,938 (±0,014)	0,036 (±0,011)	-
	T	292	0,027 (±0,007)	0,932 (±0,010)	0,041 (±0,008)	-

TABELA 12.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma Y:
frequências nas amostras de adultos e recém-nascidos.

AMOSTRA		N	2	3	4	5
RECÉM-NASCIDOS	m	152	0,007 (±0,007)	0,947 (±0,018)	0,046 (±0,017)	-
ADULTOS	m	136	0,029 (±0,015)	0,897 (±0,026)	0,067 (±0,021)	0,007 (±0,007)

Na nossa amostra de recém-nascidos não foi detectado nenhum indivíduo portador de um polimorfismo de nìvel 5 relativamente às regiões heterocromáticas dos cromossomas 9 e Y.

Paralelamente, na amostra de adultos da população do Norte de Portugal não observamos qualquer portador de um cromossoma 9 com a região heterocromática de nível 1, bem como nenhum cromossoma 16 cuja região heterocromática tivesse sido classificada em um nìvel superior a 3.

As frequências das inversões pericêntricas da região heterocromática do cromossoma 9 (Tabela 13) são relativamente diminutas (0,006 na amostra da população de recém-nascidos e 0,002 na amostra da população de adultos), não atingindo o

valor mínimo classicamente referenciado na definição de polimorfismo genético.

TABELA 13.
Inversão pericêntrica da região heterocromática do cromossoma 9: frequências nas populações de adultos e recém-nascidos.

AMOSTRA	N	inv. per 9
RECÉM NASCIDOS	317	0,006 (±0,003)
ADULTOS	292	0,002 (±0,002)

Na tabela 14 é apresentada a variabilidade individual na classificação das regiões heterocromáticas nas mitoses observadas, bem como a frequência, quer de adultos quer de recém-nascidos, em que se verificou uma diferente quantificação daquelas regiões num determinado indivíduo.

TABELA 14.
Variabilidade na classificação dos polimorfismos.

	1		9		16		Y	
	Adultos	RN	Adultos	RN	Adultos	RN	Adultos	RN
Freq. de Mitoses C/ ≠ Quantificação	0,007	0,004	0,004	0,009	0,004	0,002	0,001	0,003
Freq. de Indivíduos C/ ≠ Quantificação	0,062	0,022	0,038	0,044	0,048	0,013	0,015	0,013

TABELA 15.
Comparação das distribuições dos polimorfismos das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9, 16 e Y entre adultos e recém-nascidos.

CROMOSSOMA	CLASSE	NQ G.L.	X^2	P
1	M	2	6,84	0,05>P>0,025
	F	2	0,92	0,75>P>0,50
	T	2	3,50	0,25>P>0,10
9	M	2	2,96	0,25>P>0,10
	F	2	0,63	0,75>P>0,50
	T	2	1,93	0,50>P>0,25
16	M	2	1,95	0,50>P>0,25
	F	2	3,82	0,25>P>0,10
	T	2	3,44	0,25>P>0,10
Y	M	2	3,14	0,25>P>0,10

* M = machos; F = fêmeas

TABELA 16.
Comparação das distribuições dos polimorfismos das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9 e 16 entre os sexos masculino e feminino.

CROMOSSOMA	CLASSE	Nº G.L.	X^2	P
1	A	4	6,32	0,25>P>0,010
	RN	5	1,69	0,90>P>0,75
9	A	4	3,28	0,75>P>0,50
	RN	4	1,89	0,90>P>0,75
16	A	4	3,74	0,50>P>0,25
	RN	5	2,43	0,90>P>0,75

* A = adultos; RN = recém-nascidos

2. Genética formal

2.1. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1

A segregação do polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1 observada em sessenta e uma famílias, com cento e treze filhos, oriundas do Norte de Portugal encontra-se descrita na tabela 17.

A distribuição daquele polimorfismo cromossómico observado em cento e cinquenta e dois pares mãe-filho é apresentada na tabela 18, não se tendo verificado qualquer exclusão mãe-filho.

A maior parte dos cruzamentos (68,9%) bem como dos pares mãe-filho (55,8%) observados são do tipo 33/33, o que revela uma concordância com as frequências encontradas para este polimorfismo.

2.2. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 9

Os resultados do estudo da segregação fenotípica do polimorfismo da região heterocromática deste cromossoma são apresentados na tabela 19.

TABELA 17. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1: análise da segregação em 61 famílias.

Tipo de Cruzamento		Nº Famílias	Nº Descendentes		Fenótipos da Descendência							
					f				m			
m	f		f	m	33	32	31	43	33	32	31	43
33	33	42 (41,79)	27	24	27	–	–	–	24	–	–	–
33	32	8 (5,65)	17	8	10	7	–	–	6	2	–	–
32	33	3 (5,65)	2	8	–	2	–	–	5	3	–	–
32	32	1 (0,76)	1	1	1	–	–	–	–	1	–	–
43	33	1 (2,26)	3	–	2	–	–	1	–	–	–	–
33	43	3 (2,26)	4	5	4	–	–	–	3	–	–	2
43	32	1 (0,31)	3	2	1	1	–	1	2	–	–	–
33	31	1 (0,38)	1	2	1	–	–	–	1	–	1	–
33	42	1 (0,15)	3	1	–	2	–	1	–	1	–	–
Outros		0 (1,79)										
		61										

$\bar{3}$ = 0,910 ± 0,026 $\quad\quad$ $\bar{4}$ = 0,024 ± 0,014

$\bar{2}$ = 0,062 ± 0,022 $\quad\quad$ $\bar{1}$ = 0,004 ± 0,006

TABELA 18.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1:
análise da distribuição em 52 pares mãe-filho.

	FILHOS						
	33	32	43	31	42	53	
Mães							
33	29 (25,6)	2 (4,2)	0 (1,9)	0 (0,3)	-	0 (0,3)	31
32	6 (4,2)	6 (4,9)	1 (0,3)	0 (0,1)	0 (0,3)	0 (0,1)	13
43	5 (1,9)	0 (0,3)	0 (2,1)	0 (0,02)	0 (0,3)	0 (0,02)	5
31	0 (0,3)	0 (0,1)	0 (0,02)	1 (0,3)	-	0 (0,004)	1
42	-	1 (0,3)	0 (0,3)	-	0 (0,1)	-	1
53	0 (0,3)	0 (0,1)	0 (0,02)	0 (0,004)	-	1 (0,3)	1
	40	9	1	1	0	1	52

$\bar{3} = 0,79$ $\bar{4} = 0,06$ $\bar{5} = 0,01$

$\bar{2} = 0,13$ $\bar{1} = 0,01$

TABELA 19. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 9: análise da segregação em 61 famílias.

Tipo de Cruzamento		Nº Famílias	Nº Descendentes		Fenótipos da Descendência					
					f			m		
m	f		f	m	33	32	43	33	32	43
33	33	33 (31,00)	26	27	26	–	–	27	–	–
32	33	6 (6,92)	11	6	8	3	–	5	1	–
33	32	4 (6,92)	11	10	8	3	–	5	5	–
43	33	5 (4,21)	5	3	3	–	2	1	–	2
33	43	3 (4,21)	2	4	–	–	2	3	–	1
33	22	3 (0,39)	–	–	–	–	–	–	–	–
22	33	1 (0,39)	–	–	–	–	–	–	–	–
33	42	2 (0,47)	3	–	–	3	–	–	–	–
43	43	1 (0,57)	2	–	–	–	2	–	–	–
43	32	1 (0,94)	2	1	1	1	–	1	–	–
22	43	1 (0,05)	–	–	–	–	–	–	–	–
53	33	1 (0,30)	–	–	–	–	–	–	–	–
Outros		0 (4,63)								
		61								

$\bar{3}$ = 0,844 ± 0,033 $\bar{2}$ = 0,094 ± 0,027 $\bar{4}$ = 0,058 ± 0,021 $\bar{5}$ = 0,004 ± 0,006

Na tabela 20 encontra-se descrita a distribuição em pares mãe-filho.

Tal como no ponto anterior, não se verificaram exclusões mãe-filho, e a maior parte dos cruzamentos (54,1%) e dos pares mãe-filho (73,1%) são do tipo 33/33.

TABELA 20.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 9: distribuição em 52 pares mãe-filho

	FILHOS				
	33	32	42	43	
Mães					
33	38 (35,44)	0 (2,82)	-	3 (2,01)	41
32	2 (2,82)	3 (3,04)	0 (0,16)	0 (0,16)	5
42	-	2 (0,16)	0 (0,02)	0 (0,16)	2
43	1 (2,01)	0 (0,16)	0 (0,16)	3 (2,13)	4
	41	5	0	6	52

$\bar{3} = 0,88$ $\bar{2} = 0,07$ $\bar{4} = 0,05$

2.3. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 16

A segregação do polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 16 encontra-se descrita na tabela 21.

TABELA 21. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 16: análise da segregação em 61 famílias.

Tipo de Cruzamento		Nº Famílias	Nº Descendentes		Fenótipos da Descendência					
					f			m		
m	f		f	m	22	32	21	22	32	21
22	22	48 (47,32)	43	39	43	-	-	39	-	-
22	32	4 (4,13)	4	8	2	2	-	4	4	-
32	22	4 (4,13)	9	2	6	3	-	1	1	-
22	21	2 (2,07)	2	-	1	-	1	-	-	-
21	22	1 (2,07)	-	-	-	-	-	-	-	-
22	11	1 (0,02)	-	-	-	-	-	-	-	-
32	32	1 (0,36)	4	3	3	1	-	-	3	-
Outros		0 (0,90)								
		61								

$\bar{2} = 0,939 \pm 0,022$

$\bar{3} = 0,041 \pm 0,018$

$\bar{1} = 0,020 \pm 0,013$

Os resultados do estudo da distribuição em pares mãe-filho são apresentados na tabela 22; não se verificaram, também neste caso, exclusões mãe-filho.

TABELA 22.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 16: distribuição em 52 pares mãe-filho.

	FILHOS			
	22	32	21	
Mães				
22	47 (44,58)	0 (1,88)	0 (0,47)	47
32	1 (1,88)	3 (1,96)	0 (0,02)	4
21	1 (0,47)	0 (0,02)	0 (0,47)	1
	49	3	0	52
	$\bar{2} = 0,95$	$\bar{3} = 0,04$	$\bar{1} = 0,01$	

Contrariamente ao observado nos polimorfismos dos cromossomas 1 e 9, a larga maioria dos cruzamentos (78,7%) e dos pares mãe-filho (90,4%) são do tipo 22/22.

2.4. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma Y.

A distribuição em 51 pares pai-filho é

apresentada na tabela 23; não se observou qualquer exclusão pai-filho.

TABELA 23.
Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma Y: distribuição em 51 pares pai-filho

Pares Pai/Filho	2/2	3/3	4/4	5/5	TOTAL
	1	46	2	2	51

$\bar{3} = 0,90$

$\bar{4} = 0,04$

$\bar{5} = 0,04$

$\bar{2} = 0,02$

2.5. Análise da segregação por sexos

A análise deste tipo de segregação não revelou distorção nos três tipos de polimorfismos autossómicos estudados ($0,50>P>0,25$ no cromossoma 1, $0,90>P>0,75$ no cromossoma 9 e $0,25>P>0,10$ no cromossoma 16). Os resultados do estudo da segregação por sexos encontram-se descriminados nas tabelas 24, 25 e 26, respectivamente correspondentes aos polimorfismos das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9 e 16.

TABELA 24.
Análise da segregação por sexos do polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1.

Filhos	33	32	31	43	total
Masc.	41 (42,23)	7 (5,66)	1 (0,37)	2 (2,32)	51
Fem.	46 (50,51)	12 (6,77)	0 (0,44)	3 (2,78)	61
Total	87	19	1	5	112

$\bar{3} = 0,910 \pm 0,026$

$\bar{2} = 0,061 \pm 0,022$

$\bar{4} = 0,025 \pm 0,014$

$\bar{1} = 0,004 \pm 0,006$

X^2 (7 g.l.) = 6,37 $0,50 > P > 0,25$

TABELA 25.
Análise da segregação por sexos do polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 9.

Filhos	33	32	43	total
Masc.	42 (36,33)	6 (8,18)	3 (4,91)	51
Fem.	46 (44,16)	10 (9,94)	6 (5,97)	62
Total	88	16	9	113

$\bar{3} = 0,844 \pm 0,033$

$\bar{2} = 0,095 \pm 0,027$

$\bar{4} = 0,057 \pm 0,021$

$\bar{5} = 0,004 \pm 0,006$

X^2 (5 g.l.) = 2,29 $0,90 > P > 0,75$

TABELA 26.
Análise da segregação por sexos do polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 16.

Filhos	22	32	21	total
Masc.	44 (45,85)	8 (3,91)	0 (2,05)	52
Fem.	55 (54,67)	6 (4,66)	1 (2,45)	62
Total	99	14	1	114

$\bar{2} = 0,939 \pm 0,022$

$\bar{3} = 0,040 \pm 0,018$ $\quad X^2 (5 \text{ g.l.}) = 7,65 \quad 0,25>P>0,10$

$\bar{1} = 0,021 \pm 0,013$

Na tabela 27 são apresentados os valores observados da distribuição por sexos dos filhos de portadores de polimorfismos da região heterocromática do cromossoma Y.

TABELA 27.
Distribuição por sexos dos filhos de portadores de polimorfismos da região heterocrocromática do cromossoma Y em seis famílias nucleares.

PAI	FILHOS			
	Sexo masculino		Sexo feminino	
NÍVEL QUANT. CR Y	Nº	Nível quant. cr.Y	Nº	TOTAL FILHOS
4	2	4	-	2
5	4	5	1	5
5	2	-	1	3
2	1	2	2	3
4	4	-	3	7
4	-	-	1	1
total	13		8	21

3. Investigação da filiação biológica

Apresenta-se na tabela 28, para além das frequências dos polimorfismos dos cromossomas 1, 9 e 16 observados na amostra de adultos, a probabilidade de exclusão a priori (PE) e a média da probabilidade de paternidade entre verdadeiros pais (WF), por cromossoma e total.

TABELA 28.
Polimorfismos cromossómicos em investigação da filiação biológica: probabilidade de exclusão a priori (PE) e média da probabilidade de paternidade entre verdadeiros pais (WF).

Cromossoma	Nível	Frequência	PE	WF
1	1	0,002	0,089	0,545
	2	0,060		
	3	0,906		
	4	0,030		
	5	0,002		
9	2	0,086	0,115	0,555
	3	0,875		
	4	0,034		
	5	0,005		
16	1	0,027	0,065	0,534
	2	0,932		
	3	0,041		
TOTAL			0,246	0,631

De referir também o facto de terem sido detectados na nossa amostra dois casos de exclusão de paternidade

envolvendo ambos a região heterocromática do cromossoma 9; estas exclusões foram depois confirmadas por marcadores genéticos bioquímicos.

4. Ligação factorial

O estudo das relações de ligação entre os polimorfimos das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9 e 16 e quinze sistemas genéticos foi realizado em dezoito famílias informativas.

Os "lod scores" obtidos são apresentados nas tabelas 29, 30 e 31, bem como em anexo (tabelas 40 e 41).

TABELA 29.
Análise da ligação entre o polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1 e os sistemas genéticos AMY2 e FY.

Sistemas Genéticos	Número		Informação da Segregação	"Lod Scores" para θ					
	Famíl.	Descend.		0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
AMY2	2	9	M	-1,918	-0,628	-0,167	0,129	0,146	0,059
FY	3	8	M	-0,521	0,072	0,236	0,258	0,159	0,049

* M = materna

TABELA 30.
Análise da ligação entre o polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 9 e os marcadores electroforéticos GALT e ORM1.

Sistemas Genéticos	Número		Informação da Segregação	"Lod Scores" para θ					
	Famíl.	Descend.		0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
GALT	1	4	P	-1,109	-0,463	-0,229	-0,060	0,011	0,001
ORM1	3	9	M	-3,913	-1,905	-1,116	-0,448	-0,163	0,036

*P = paterna; M = materna

TABELA 31.
Análise da ligação entre o polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 16 e os marcadores electroforéticos PGP e HP.

Sistemas Genéticos	Número		Informação da Segregação	"Lod Scores" para θ					
	Famíl.	Descend.		0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
PGP	3	11	P	-5,315	-2,626	-1,559	-0,641	-0,238	-0,054
HP	2	9	M	-1,922	-0,650	-0,207	0,064	0,083	0,031
HP	3	8	P	-3,913	-1,905	-1,116	-0,448	-0,163	0,036

*P = paterna; M = materna

V. DISCUSSÃO

Um dos primeiros propósitos por nós estabelecido aquando do início deste trabalho foi a escolha de um método de quantificação objectivo que permitisse, tanto quanto possível, uma classificação normalizada das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9, 16 e Y.

Uma análise quantitativa será o método mais eficiente de avaliação da variabilidade das regiões heterocromáticas. No entanto, no caso das bandas C, parte desta variabilidade é devida a factores metodológicos tais como condições da

cultura, coloração, idade das lâminas no momento da execução da técnica de bandas, bem como do estado de compactação dos cromossomas. A influência destes factores sobre a variabilidade das bandas C é claramente evidenciada nos trabalhos publicados por Balicek et al (1977), Podugolnikova et al (1979 a), Beltran et al (1979) e Erdtmann (1982).

Em face do que acabamos de referir, pensamos ser condição essencial para a ultrapassagem destas variações causadas por factores intrínsecos e extrínsecos à divisão celular, proceder à escolha de um padrão intracelular. A selecção do braço curto do cromossoma 16, utilizado, aliás, neste trabalho, como referência intracelular revela algumas vantagens. Na realidade, o comprimento do braço curto daquele cromossoma não varia apreciavelmente com o grau de compactação dos cromossomas em metafase (Patil e Lubs, 1977 b), o que permite o emprego de uma referência relativamente estável em mitoses cujos cromossomas metafásicos apresentem diversos graus de estiramento. Uma outra vantagem que apresenta a escolha desta referência intracelular é o seu tamanho intermédio relativamente às regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9, 16 e Y; além disso, o cromossoma 16, bem como o seu centrómero, são facilmente identificáveis em metafases submetidas à técnica de bandas C, por oposição a outros padrões intracelulares utilizados por outros investigadores, como por exemplo o braço curto do cromossoma

18 ou o braço longo do cromossoma 21.

Os estudos realizados em diversas populações humanas revelam, de uma forma geral, uma incidência elevada relativamente à variabilidade do comprimento das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9, 16 e Y. Não é do nosso conhecimento a existência de qualquer outro estudo sobre este tipo de polimorfismos cromossómicos, tendo como base a quantificação utilizada neste trabalho, na população do Norte de Portugal.

1. Genética populacional

Dado o elevado número de resultados existentes sobre o estudo de polimorfismos das regiões heterocromáticas em diferentes populações humanas, optamos por fazer a sua apresentação sob forma condensada e por cromossoma, com o intuito de simplificar o confronto com os resultados obtidos neste trabalho.

1.1. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1

Relativamente a este polimorfismo cromossómico, nos

dois escalões etários e em ambos os sexos, o nível de classificação 3 é aquele que apresenta a frequência mais elevada (tabela 9).

Na nossa amostra, a frequência daquele nível de classificação é francamente superior às referidas em outras populações, como se pode observar na tabela 32. Concomitantemente, a maioria daquelas amostras evidencia, também, maior incidência do referido nível de classificação, exceptuando as amostras das populações negra dos EUA (Fogle et al, 1980; Verma et al, 1981), de Itália (Simi e Tursi, 1982) e Mongólia (Ibraimov et al, 1982) nas quais o nível de classificação 2 é o mais frequente.

As distribuições observadas nas amostras das populações de recém-nascidos e adultos, bem como nos sexos masculino e feminino, não divergem significativamente das esperadas segundo o formalismo de Hardy-Weinberg, o que, aliás, corrobora os resultados obtidos por Müller et al (1975) e Buckton et al (1976).

A comparação das distribuições entre as amostras das populações de adultos e recém-nascidos não revelou diferenças significativas em relação às esperadas entre as fracções femininas das duas amostras ($0,75>P>0,50$), bem como entre o total das amostras de adultos e recém-nascidos, isto é, não atendendo à distribuição por sexos ($0,25>P>0,10$).

TABELA 32. Polimorfismo das regiões heterocromáticas do cromossoma 1: frequências.

Amostra	N	NÍVEL 1	2	3	4	5	Referências
EUA (pop.caucasiana)	80	0,100	0,438	0,450	0,012	-	Verma et al (1978)
Itália	469	0,111	0,752	0,137	-	-	Simi e Tursi (1982)
Índia	200	0,012	0,380	0,525	0,078	0,005	Potluri et al (1985)
Mongólia	447	0,058	0,772	0,162	0,008	0	Ibraimov et al (1982)
EUA (pop.negra)	28	0,036	0,893	0,071	-	-	Fogle et al (1980)
EUA (pop.negra)	80	0,100	0,594	0,300	0,006	-	Verma et al (1981)
EUA (pop.caucasiana)	2334	-	-	0,991		0,009	Hsu et al (1987)
EUA (pop.negra)	1795	-	-	0,994		0.006	idem
EUA (pop.hispânica)	1737	-	-	0,998		0,002	idem
EUA (pop.asiática)	384	-	-	1,000		0	idem
Escócia (a)	967	0,028		0,932	0,038	0,002	Buckton et al (1976)
EUA (pop.caucasiana)	182	0,052		0,932	0,016		Tharapel e Summit (1978)
Colorado	77	0,045		0,916	0,039		Mckenzie e Lubs (1975)
Dinamarca	11148	-		0,999	0,001		Nielsen e Sillesen (1975)
Escócia	2270	-		0,995	0,005		Ferguson-Smith (1974)
Índia	30	-		0,833	0,167		Ghosh e Sing (1976)

(a) Classificação usada pelos autores: very large, large, medium e small

Contrariamente, o mesmo tipo de comparação envolvendo as fracções masculinas das duas amostras revelou um desvio apreciável (0,05>P>0,25) em relação à distribuição esperada. Este desvio dever-se-á, muito provavelmente, ao facto de a frequência das variantes polimórficas verificada na amostra da população de recém-nascidos ser mais elevada que na amostra da população de adultos, situação, aliás, já relatada anteriormente por Craig-Holmes (1977).

A comparação das distribuições deste polimorfismo entre os sexos masculino e feminino não revelou diferenças significativas na amostra da população de recém-nascidos (0,90>P>0,75) nem na amostra da população de adultos (0,25>P>0,10).

1.2. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 9

Tal como no ponto anterior, o nível de classificação 3 é o mais frequente em ambos os sexos e nas amostras das populações de adultos e recém-nascidos (tabela 10). Na amostra de recém-nascidos não foi observado qualquer indivíduo portador de uma variante polimórfica de nível de classificação 5.

De referir, no entanto, o facto de as frequências

calculadas não se enquadrarem nas previamente descritas em trabalhos baseados no mesmo tipo de classificação. Efectivamente, as frequências descritas em agregados populacionais bem diferenciados apontam para valores bastante superiores relativamente à variante polimórfica de nível de classificação 2 (Tabela 33).

Os desvios entre os valores fenotípicos observados nas amostras por nós estudados e os esperados não são significativos.

A análise estatística revelou também, uma diferença não significativa na comparação das distribuições entre as amostras das populações de adultos e recém-nascidos, nomeadamente no sexo masculino ($0,25>P>0,10$), feminino ($0,75>P>0,50$) e total ($0,50>P>0,25$).

A distribuição por sexos, tal como no polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1, não apresenta desvios significativos relativamente às proporções esperadas, quer na amostra das populações de adultos ($0,75>P>0,50$) quer na de recém-nascidos ($0,90>P>0,75$).

TABELA 33. Polimorfismo das regiões heterocromáticas do cromossoma 9: frequências

Amostra	N	NÍVEL 1	2	3	4	5	Referências
EUA (pop.caucasiana)	80	0,138	0,700	0,144	0,018	-	Verma et al (1981)
Itália	469	0,356	0,573	0,045	-	-	Simi e Tursi (1982)
Índia	200	-	0,605	0,385	0,010	-	Potluri et al (1985)
Mongólia	447	0,101	0,870	0,029	0	-	Ibraimov et al (1982)
EUA (pop.negra)	28	0,080	0,800	0,120	-	-	Fogle et al (1980)
EUA (pop.negra)	80	0,138	0,700	0,144	0,018	-	Verma et al (1981)
EUA (pop.caucasiana)	2334	-	-	0,997		0,003	Hsu et al (1987)
EUA (pop.negra)	1795	-	-	0,997		0,003	idem
EUA (pop.hispânica)	1737	-	-	0,996		0,004	idem
EUA (pop.asiática)	384	-	-	1,000		-	idem
Escócia (a)	967	0,050		0,921	0,024	0,005	Buckton et al (1976)
EUA (pop.caucasiana)	182	0,027		0,888	0,085		Tharapel e Summit (1978)
Colorado	77	0,045		0,884	0,071		Mckenzie e Lubs (1975)
Dinamarca	11148	0		1,000	-		Nielsen e Sillesen (1975)
Escócia	2270	-		0,988	0,012		Ferguson-Smith (1974)
Índia	30	-		0,783	0,262		Ghosh e Sing (1976)

(a) Classificação usada pelos autores: very large, large, medium e small

1.3. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 16

Este sistema genético é o único dos estudados neste trabalho em que não foi referenciado qualquer portador de um heteromorfismo de nível de classificação 5. De realçar também o facto de, relativamente ao nível de classificação 4, não ter sido observado qualquer portador na amostra de adultos.

Contrariamente ao observado nos polimorfismos dos cromossomas 1 e 9, o nível de classificação 2 é o que apresenta maior incidência nos dois escalões etários e em ambos os sexos (Tabela 11).

A frequência deste nível de classificação na amostra da população do Norte de Portugal é bastante elevada (0,920 na amostra de recém-nascidos e 0,932 na amostra de adultos), inversamente ao observado em outros agregados populacionais (Tabela 34), nos quais se observa uma maior dispersão de valores em relação às frequências dos diferentes níveis de classificação.

Tal como já apontado nos pontos respeitantes aos polimorfismos dos cromossomas 1 e 9, as distribuições observadas nas duas amostras não diferem significativamente das esperadas segundo o formalismo de Hardy-Weinberg.

TABELA 34. Polimorfismo das regiões heterocromáticas do cromossoma 16: frequências

Amostra	N	NÍVEL 1	2	3	4	5	Referências
EUA (pop.caucasiana)	80	0,481	0,444	0,075	-	-	Verma et al (1978)
Itália	469	0,771	0,229	-	-	-	Simi e Tursi (1982)
Índia	200	0,015	0,718	0,267	-	-	Potluri et al (1985)
Mongólia	447	0,878	0,122	0	-	-	Ibraimov et al (1982)
EUA (pop.negra)	28	0,893	0,107	0	-	-	Fogle et al (1980)
EUA (pop.negra)	80	0,400	0,531	0,050	0,013	0,006	Verma et al (1981)
EUA (pop.caucasiana)	2334	-		0,996		0,004	Hsu et al (1987)
EUA (pop.negra)	1795	-		0,999		0.001	idem
EUA (pop.hispânica)	1737	-		0,997		0,003	idem
EUA (pop.asiática)	384	-		1,000		0	idem
Escócia (a)	967	0,034	0,942	0,023	0,001		Buckton et al (1976)
EUA (pop.caucasiana)	182	0,065	0,913		0,022		Tharapel e Summit (1978)
Colorado	77	0,117	0,831		0,052		Mckenzie e Lubs (1975)
Dinamarca	11148	-	0,999		0,001		Nielsen e Sillesen (1975)
Escócia	2270	-	0,991		0,009		Ferguson-Smith (1974)
Índia	30	-	0,809		0,191		Ghosh e Sing (1976)

(a) Classificação usada pelos autores: very large, large, medium e small

A comparação das distribuições entre as amostras das populações de recém-nascidos e adultos não revelou diferenças significativamente divergentes em relação às esperadas, nomeadamente nas fracções masculina (0,50>P>0,25) e feminina (0,25>P>0,10), bem como no total da amostra (0,25>P>0,10).

A distribuição por sexos, de igual forma ao observado nos polimorfismos das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1 e 9, não apresenta desvios significativos em relação às proporções esperadas, nomeadamente nas amostras das populações de adultos (0,50>P>0,25) e recém-nascidos (0,90>P>0,75). Resultados sobreponíveis, relativamente aos polimorfismos cromossómicos dos autossomas estudados neste trabalho, têm sido observados por diversos autores, dos quais salientamos Craig-Holmes (1977), Verma et al (1978), Podugolnikova et al (1979 b), Potluri et al (1985), Cavalli et al (1985) e Tavares-Cummings (1990).

1.4. Polimorfismo da região heterocromática do cromossoma Y

Neste sistema genético, o nível de classificação 3 é o que apresenta maior incidência nas amostras das populações de adultos e recém-nascidos (Tabela 12), não tendo sido

referenciado nenhum recém-nascido do sexo masculino portador da variante de nível de classificação 5, nem qualquer indivíduo cuja região heterocromática do cromossoma Y tivesse sido incluída no nível de classificação 1.

A comparação entre as frequências observadas na nossa amostra e noutras populações é dificultada devido ao facto de, nestas últimas, terem sido utilizadas diferentes metodologias na classificação da região distal do braço longo do cromossoma Y (tabela 35). No entanto, partindo do princípio de que a classificação Yq é equivalente ao nível 3, de que Yq+ engloba os níveis 4 e 5 e de que Yq- corresponde ao nível de classificação 2 , podemos concluir que as frequências por nós observadas se enquadram nas descritas em outras populações (Tabela 35). Deverá todavia salientar-se o facto de que uma variação significativa no tamanho da região heterocromática do cromossoma Y entre diferentes grupos raciais foi detectada por Matsuura et al (1979), nomeadamente um aumento apreciável daquela região distal do braço longo do cromossoma Y em orientais e filipinos relativamente a polinésios e caucasianos.

O estudo comparativo das distribuições entre as amostras das populações de adultos e recém-nascidos não revelou diferenças significativas ($0,25>P>0,10$) relativamente às esperadas (Tabela 15).

1.5. Inversões pericêntricas das regiões heterocromáticas

Este tipo de heteromorfismo foi observado apenas no cromossoma 9, envolvendo sempre a globalidade da região heterocromática justacentromérica, isto é, não foi detectada qualquer inversão parcial.

Neste tipo de inversão, as frequências observadas nas amostras das populações de adultos e recém-nascidos são relativamente diminutas (Tabela 13), não atingindo o valor mínimo classicamente referenciado na definição de polimorfismo genético.

Concomitantemente, podemos afirmar que a incidência de inversões pericêntricas da região heterocromática do cromossoma 9 se enquadra nas frequências descritas em diversas populações caucasianas e asiáticas (Tabela 36), divergindo significativamente das frequências observadas na população hispânica dos EUA (Hsu e Benn, 1984) e em diversas populações negras (Lubs e Ruddle, 1971; Lubs et al, 1977; Verma et al, 1981; Hsu e Benn, 1984; Hsu, 1987).

TABELA 35. Polimorfismo das regiões heterocromáticas do cromossoma Y: frequências.

Amostra	N	Yq+	Yq	Yq-	Referências
EUA (pop.caucasiana)	1139	0,005	0,991	0,004	Hsu et al (1987)
EUA (pop.caucasiana)	102	0,118	0,862	0,020	Tharapel e Summitt (1978)
Dinamarca	11148	0,090	0,986	0,004	Nielsen e Sillesen (1975)
Itália	237	0,105	0,814	0,080	Simi e Tursi (1982)
EUA (pop.hispânica)	877	0,006	0,984	0,010	Hsu et al (1987)
EUA (pop.asiática)	208	0,019	0,971	0,010	idem
Índia	200	0,040	0,960	-	Ghosh e Sing (1975)
EUA (pop.negra)	909	0,007	0,992	0,001	Hsu et al (1987)

TABELA 36. Inversão pericêntrica do cromossoma 9: frequências

Amostra	N	inv.per9	Referências
EUA (pop.caucaesiana)	2334	0,007	Hsu e Benn (1984)
Colorado	77	0,039	Mckenzie e Lubs (1975)
EUA (pop.caucasiana)	3084	0,007	Lubs et al (1977)
Itália	469	0,007	Simi e Tursi (1982)
EUA (pop.hispânica)	1737	0,021	Hsu e Benn (1984)
MONGÓLIA	447	0,022	Ibraimov et al (1982)
EUA (pop.asiática)	384	0,003	Hsu e Benn (1984)
EUA (pop.negra)	807	0,012	Lubs e Ruddle (1971)
EUA (pop.negra)	1780	0,015	Lubs et al (1977)
EUA (pop.negra)	1795	0,032	Hsu e Benn (1984)

1.6. Variabilidade na classificação

Na amostra populacional estudada, constituída por 609 indivíduos (292 adultos e 317 recém-nascidos), foi observada, embora raramente, variabilidade intraindividual na classificação das regiões heterocromáticas (Tabela 14).

Segundo Craig-Holmes (1975) e Hoehn e Kurnit (1985), esta variabilidade pode ser encarada como uma situação de mosaicismo, devido a entrecruzamentos mitóticos desiguais. Contrariamente à opinião daqueles autores, defendemos como causa mais provável de tal facto, a dificuldade que por vezes se coloca ao observador numa determinada classificação em que o comprimento da região heterocromática se situa entre os limites de dois níveis contíguos.

Efectivamente, embora os valores desta variabilidade se possam considerar diminutos, a frequência de mitoses com diferente quantificação é significativamente inferior à frequência de indivíduos em que foi detectada tal variabilidade. Isto expressa com clareza que, pontualmente foi observada uma ou outra metafase com diferente quantificação em determinado indivíduo e não uma forte concentração de mitoses com classificação variável num número restrito de indivíduos, o que por sua vez contraria a hipótese da ocorrência de mosaicismo.

2. Genética formal

A maior parte dos estudos de segregação das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9, 16 e Y realizados até à data, têm tido por base a análise da transmissão daqueles polimorfismos em famílias isoladas. Paralelamente, tais estudos demonstram um modo de transmissão do tipo mendeliano, apenas com raras excepções.

A confirmação do modelo genético proposto neste trabalho foi investigada em relação a todos os polimorfismos estudados. No que respeita à segregação dos polimorfismos das regiões heterocromáticas dos autossomas, a nossa investigação incidiu sobre 52 pares mãe-filho e 61 famílias do Norte de Portugal; relativamente ao cromossoma Y, foi também analisada a segregação em 51 pares pai-filho.

Os resultados da segregação obtida em cada polimorfismo estão de acordo com o modelo mendeliano de codominância proposto por Craig-Holmes et al (1973; 1975), Mckenzie e Lubs (1975) e Ray et al (1984), mesmo quando houve necessidade de associar as classes fenotípicas cujo quantitativo não permitia realizar qualquer teste de significância. Assim, a análise estatística da segregação do polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1 em

pares mãe-filho evidenciou um valor de $X^2=4,14$, sendo $0,25>P>0,10$ com dois graus de liberdade. Relativamente à mesma análise no cromossoma 9, verificamos um valor de $X^2=0$ com o mesmo número de graus de liberdade ($P>0,995$). Finalmente, a análise de segregação do polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 16 em 52 pares mãe-filho revelou um valor de $X^2=0,54$ com um grau de liberdade ($0,90>P>0,75$).

De referir, entretanto, que no caso dos polimorfismos das regiões heterocromáticas dos autossomas não se verificou qualquer exclusão mãe-filho.

Os resultados da segregação do polimorfismo da região heterocromática do cromossoma Y estão, também, de acordo com o modelo proposto, não tendo sido observado qualquer caso de exclusão pai-filho.

A comparação entre o número de descendentes de casais em que um dos membros era portador de uma variante das regiões heterocromáticas e o número de filhos de casais em que nenhum dos membros apresentava qualquer polimorfismo não revelou diferenças significativas ($0,50>P>0,25$; $X^2=0,61$ com um grau de liberdade).

Paralelamente, a análise da segregação por sexos não revelou distorção nos polimorfismos dos cromossomas 1, 9 e 16 (respectivamente $0,50>P>0,25$ no cromossoma 1, $0,90>P>0,75$ no cromossoma 9 e $0,25>P>0,10$ no cromossoma 16).

A distribuição por sexos na descendência de portadores de polimorfismos da região heterocromática do cromossoma Y não revelou, igualmente, desvios que apontassem no sentido de uma menor viabilidade dos gâmetas ou dos indivíduos portadores dos referidos polimorfismos.

A relação entre a incidência dos polimorfismos cromossómicos nos dois escalões etários da população que serviu de base a este trabalho é um parâmetro que nos permite avaliar a manutenção das frequências dos referidos polimorfismos. De facto, para além dos resultados apresentados sobre a segregação dos polimorfismos e distribuição do número de filhos de portadores e não portadores de uma determinada variante das regiões heterocromáticas, a distribuição populacional em adultos e recém-nascidos pode ser considerada como mais um indício da neutralidade selectiva deste tipo de polimorfismos.

Face ao exposto, se na realidade existe uma associação entre aspectos deletérios e os polimorfismos estudados neste trabalho, tornar-se-á então, de difícil explicação a sua elevada frequência. De facto, todas as populações até hoje estudadas apresentam uma apreciável incidência de polimorfismos das regiões heterocromáticas,o que sugere uma estabilidade no que concerne à evolução da sua

distribuição. Se aceitarmos o facto de que aquela variabilidade está hoje em equilíbrio, então, as variantes eventualmente perdidas por selecção teriam de ser repostas por mutação, recombinação desigual, ou ainda segregação preferencial. Porém, embora a taxa de mutação não tenha sido ainda determinada com segurança, parece ser bastante reduzida (Balicek et al, 1978) e a segregação preferencial foi observada apenas em casos pontuais (Robinson et al, 1976; Magenis et al, 1977).

Não tendo sido objectivo deste trabalho o estudo da relação entre a ocorrência de polimorfismos das regiões heterocromáticas e situações patológicas, não queríamos deixar de referir e comentar os resultados, ainda que estes se apresentem como um produto lateral deste trabalho, obtidos a partir de um inquérito sumário sobre a história individual e familiar que foi realizado por rotina a cada dador voluntário, com a finalidade de eliminar parentescos não declarados e detectar afecções hereditárias, incidindo especialmente na capacidade reprodutiva e na ocorrência de abortamentos espontâneos. Efectivamente, não querendo extrair qualquer conclusão que pudesse enfermar devido à escassa base de observação, e apoiados no inquérito realizado a todos os indivíduos adultos que constituem a nossa amostra populacional, bem como nas famílias em que um dos membros da F1 era portador de determinado polimorfismo das regiões

heterocromáticas, foi detectado apenas um indivíduo do sexo feminino que manifestou diminuição da capacidade reprodutiva, cuja etiologia está clinicamente caracterizada , não sendo directamente atribuível a qualquer causa genética. Para além deste caso, não foi detectada qualquer relação directa entre a ocorrência de afecções, incluindo naturalmente a diminuição da capacidade reprodutiva e a ocorrência de abortamentos espontâneos, em portadores daquele tipo de polimorfismo. De facto, relativamente à capacidade reprodutiva, estes dados vêm apoiar a opinião formulada por Barros (1989) ao concluir que se os polimorfismos têm alguma influência no processo reprodutivo, não será na produção de espermatozoides mas, eventualmente a outros níveis como a formação aneuploide de gâmetas por interferência na separação anafásica dos cromossomas.

3. INVESTIGAÇÃO DAS RELAÇÕES DE PARENTESCO

A utilização dos polimorfismos cromossómicos em investigação das relações de parentesco pode considerar-se rara quando comparada com a fenotipagem de proteínas plasmáticas, enzimas eritrocitárias e leucocitárias, antigénios eritrocitários ou mesmo polimorfismos do DNA e HLA.

Uma vantagem da aplicação dos polimorfismos das

regiões heterocromáticas em investigação da filiação biológica é o facto de estes não constituirem o resultado de uma sucessão mais ou menos complexa de reacções entre as diversas fases que medeiam até à formação do produto final resultante da acção de um determinado gene. Não existem, obviamente, "alelos silenciosos" e, todas as exclusões se revestem da segurança atribuível às classicamente consideradas "exclusões de primeira ordem".

Neste contexto, o método de quantificação utilizado neste trabalho permitiu detectar, no conjunto amostral constituido por sessenta e duas famílias, dois casos de exclusão de paternidade, envolvendo ambos a região heterocromática do cromossoma 9; estas exclusões foram posteriormente confirmadas por marcadores genéticos bioquímicos.

Apesar da informatividade destes polimorfismos cromossómicos considerados isoladamente não ser muito elevada (Tabela 28), podem no entanto ser úteis como marcadores auxiliares. De facto, existem dois tipos de situações que tornam propícia a utilização destes polimorfismos: casos em que o acusado, não tendo sido excluído após a utilização da bateria de testes usual, apresenta uma baixa probabilidade de paternidade e, nos casos em que se encontram disponíveis metafases ou cariótipos, nomeadamente provenientes de prévios estudos clínicos, de indivíduos já falecidos

e posteriormente envolvidos numa determinada investigação de relações de parentesco.

Além da utilidade naquele tipo de investigação, a análise da variabilidade das regiões heterocromáticas pode também ser aplicada no estudo da origem de anomalias cromossómicas que envolvam os cromossomas em causa; isto é especialmente verdade em situações em que há necessidade de identificar o progenitor em que ocorreu uma determinada não-disjunção observada na descendência, bem como na detecção de contaminação por células maternas em culturas de líquido amniótico ou de vilosidades coriónicas.

4. LIGAÇÃO FACTORIAL

De acordo com um dos objectivos definidos para este trabalho e dado que os estudos sobre a análise da ligação factorial entre as regiões heterocromáticas e outros loci são relativamente diminutos, procedemos ao estudo das relações de ligação entre as regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9 e 16 e marcadores genéticos bioquímicos situados naqueles cromossomas; de notar ainda que alguns destes marcadores ainda se encontram numa situação de localização regional provisória.

Apesar de se ter procedido ao estudo da ligação

factorial entre as regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9 e 16 e os marcadores genéticos bioquímicos descritos naqueles autossomas e em rotina no laboratório do Instituto de Antropologia da Universidade do Porto (Tabelas 40 e 41 - em anexo), focalizamos a nossa atenção nos resultados obtidos a partir da análise da ligação entre os referidos polimorfismos cromossómicos e os dois sistemas genéticos de localização mais próxima do centrómero, respectivamente nos braços curto e longo (Tabelas 29, 30 e 31).

Os valores de "lod scores" positivos não permitiram, nos casos em que foram observados, aventar a ligação entre as regiões heterocromáticas e qualquer dos loci estudados. Contudo, os valores de "lod scores" verificados relativamente à análise de ligação ORM1 / polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 9 permitem, no sexo feminino, excluir ligação para valores de $\theta \leq 0,01$.

Paralelamente, no que respeita ao polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 16, foi possível excluir no sexo masculino a ligação factorial para valores de $\theta \leq 0,05$ relativamente ao locus da fosfatase fosfoglicólica (PGP), assim como para valores de $\theta \leq 0,01$ em relação ao locus da haptoglobina (HP).

A combinação dos resultados obtidos neste trabalho e em outros previamente publicados relativamente à ligação entre FY e a região heterocromática do cromossoma 1, permitiu a

obtenção de valores máximos de "lod scores" de 4,91 para $\theta=0,10$ no sexo feminino e de 2,63 para o mesmo valor de θ no sexo masculino. O mesmo tipo de análise possibilitou, também, em relação ao sexo feminino, a exclusão de ligação para valores de $\theta \leq 0,05$ relativamente aos sistemas genéticos AMY2 e UMPK, bem como para valores de $\theta \leq 0,20$ em relação aos sistemas PGM1 e RH (Tabela 37).

Por sua vez, a combinação dos resultados obtidos neste e noutros trabalhos possibilitou a exclusão de ligação factorial entre a região heterocromática do cromossoma 9 e os sistemas genéticos AK1 (com $\theta \leq 0,05$ no sexo feminino e $\theta \leq 0,10$ no sexo masculino) e ABO (com $\theta \leq 0,20$ em ambos os sexos) (Tabela 38).

Finalmente, o mesmo tipo de análise envolvendo a região heterocromática do cromossoma 16 permitiu, também em ambos os sexos, a exclusão de ligação entre a referida região e os marcadores electroforéticos PGP (com $\theta \leq 0,10$) e HP (com $\theta \leq 0,20$) (Tabela 39).

O incremento, a breve trecho, do número de famílias em que um dos progenitores seja portador de um polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1, poderá prestar, conjuntamente com outros loci situados no braço longo daquele cromossoma, um considerável contributo na análise da ligação e determinação da localização do locus da peptidase C (PEPC).

TABELA 37. Análise da ligação entre o polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1 e os marcadores FY, Rh, PGM1, AMY2 e UMPK.

Sistemas Genéticos	Informação da Segregação	"Lod Scores" para θ 0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	Referências
Fy	M	0,26	0,22	0,14	0,07	0,02	Cook et al (1974)
		1,80	1,71	1,30	0,76	0,24	Donahue et al (1968)
		1,09	0,95	0,65	0,37	0,14	Ying e Ives (1968)
		1,56	1,79	1,60	1,10	0,50	Rivas et al (1975)
		0,07	0,24	0,26	0,16	0,05	esta investigação
		4,78	4,91	3,95	2,46	0,95	
	P	0,07	0,26	0,34	0,29	0,17	Cook et al (1974)
		0,99	0,98	0,75	0,43	0,15	Donahue et al (1968)
		0,81	0,69	0,45	0,23	0,06	Ying e Ives (1968)
		0,61	0,70	0,57	0,31	0,06	Rivas et al (1975)
		2,48	2,63	2,11	1,26	0,44	
	TOTAL	7,26	7,54	6,06	3,72	1,39	
Rh	M	-9,40	-5,11	-2,21	-0,88	-0,24	Rivas et al (1975)
		-5,51	-3,33	-1,42	-0,54	-0,13	esta investigação
		-14,91	-8,44	-3,63	-1,42	-0,37	
P		-1,21	-0,71	-0,33	-0,17	-0,08	Rivas et al (1975)
		-0,46	-0,23	-0,06	-0,01	-0,00	esta investigação
		-1,67	-0,94	-0,39	-0,18	-0,08	
	TOTAL	-16,58	-9,38	-4,02	-1,60	-0,45	

TABELA 37. (continuação)

Sistemas Genéticos	Inform. da Segregação	"Lod Scoles" para θ 0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	Referências
PGM1	M	-3,91	-2,52	-1,26	-0,65	-0,28	Rivas et al (1975)
		-5,23	-3,08	-1,23	-0,44	-0,09	esta investigação
		-9,14	-5,60	-2,49	-1,09	-0,37	
	P	0,12	0,32	0,42	0,36	0,22	Rivas et al (1975)
	M+P	-	-1,77	-0,77	-0,31	-0,07	Fogle et al (1980)
	TOTAL	-9,02	-7,05	-2,84	-1,04	-0,22	
AMY2	M	0,24	0,20	0,12	0,06	0,02	Kamaryt et al (1971)
		-2,89	-1,78	-0,78	-0,30	-0,07	Rivas et al (1975)
		-0,63	-0,17	0,13	0,15	0,06	esta investigação
		-3,28	-1,75	-0,53	-0,09	0,01	
	P	0,81	0,74	0,59	0,42	0,22	Kamaryt et al (1971)
		-1,19	-0,67	-0,25	-0,09	-0,02	Rivas et al (1975)
		-0,38	0,07	0,34	0,33	0,20	
	TOTAL	-3,66	-1,68	-0,45	-0,06	0,09	
UMPK	M	-2,63	-1,56	-0,64	-0,24	0,05	esta investigação
	P	-	-	-	-	-	
	M+P	-	-0,89	-0,39	-0,15	-0,40	Fogle et al (1980)
	TOTAL	-2,63	-2,45	-1,03	-0,39	-0,09	

*P=paterna; M=materna

TABELA 38. Análise da ligação entre o polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 9 e os marcadores GALT, ABO e AK1.

Sistemas Genéticos	Inform. da Segregação	" Lod Scores" para θ 0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	Referências
GALT	P	-0,46	-0,23	-0,06	0,01	0,00	esta investigação
	M	-	-	-	-	-	
	P+M	-	3,06	2,40	1,68	0,89	Sparkes et al (1980)
	TOTAL	-0,46	2,83	2,34	1,69	0,89	
ABO	P	-2,16	-1,33	-0,06	-0,23	-0,05	esta investigação
		-19,40	-11,37	-4,66	-1,75	-0,43	Robson et al (1977)
		-21,56	-12,70	-4,72	-1,98	-0,48	
	M	-2,23	-0,99	-0,05	0,20	0,12	esta investigação
		-18,52	-10,73	-4,16	-1,43	-0,27	Robson et al (1977)
		-20,75	-11,72	-4,21	-1,23	-0,15	
	P+M	-	-0,65	-0,24	-0,08	-0,02	Sparkes et al (1980)
	TOTAL	-42,31	-25,07	-9,69	-3,29	-0,65	
AK1	M	-1,35	-0,61	-0,06	0,07	0,04	esta investigação
		-2,60	-0,94	0,22	0,43	0,24	Robson et al. (1977)
		-3,95	-1,55	0,16	0,50	0,28	
	P	-4,68	-2,58	-0,82	-0,14	0,06	Robson et al (1977)
	TOTAL	-8,63	-4,13	-0,66	0,36	0,34	

*P=paterna; M=Materna

TABELA 39. Análise da ligação entre o polimorfismo da região heterocrómática do cromossoma 16 e os marcadores PGP e HP.

Sistemas Genéticos	Inform. da Segregação	"Lod Scores" para θ 0,05	0,01	0,2	0,3	0,4	Referências
PGP	M	-7,88	-4,68	-1,93	-0,72	-0,16	Jeremiah et al (1982)
	P	-2,87	-0,96	0,27	0,43	0,22	idem
		-2,63	-1,56	-0,64	-0,24	-0,05	esta investigação
		-5,50	-2,52	-0,37	0,19	0,17	
	TOTAL	-13,38	-7,20	-2,30	-0,53	0,01	
HP	M	-17,83	-10,83	-4,59	-1,89	-0,60	Jeremiah et al (1982)
		-0,65	-0,21	0,06	0,08	0,03	esta investigação
		-18,48	-11,04	-4,53	-1,81	-0,57	
	P	-3,54	-0,14	-1,72	1,70	0,82	Jeremiah et al (1982)
		-1,91	-1,12	-0,45	-0,16	0,04	esta investigação
		-5,45	-1,26	-2,17	1,54	0,86	
	TOTAL	-23,93	-12,30	-7,12	-0,43	0,29	

*P=paterna; M=materna

VI. CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos neste trabalho, entendemos poder formular, de uma forma sintética, as seguintes conclusões sobre os polimorfismos das regiões heterocromáticas na espécie humana:

GENÉTICA POPULACIONAL

- A elaboração de uma classificação objectiva e padronizada das regiões heterocromáticas que permita uma mais correcta comparação de resultados provenientes de diferentes laboratórios deve ser fomentada a breve trecho.

- Os níveis de classificação mais frequentes em ambos os escalões etários são, respectivamente, o nível 3 nos cromossomas 1, 9 e Y e o nível de classificação 2 no cromossoma 16.

- As distribuições dos polimorfismos das regiões heterocromáticas dos cromossomas 1, 9 e 16 observadas nas amostras das populações de recém-nascidos e adultos, bem como nos sexos masculino e feminino, não divergem significativamente das esperadas segundo o

formalismo de Hardy-Weinberg.

- A comparação das distribuições entre as amostras das populações de adultos e recém-nascidos, quer tomadas na sua totalidade quer separando os sexos, não revelou diferenças significativas; exceptua-se, no entanto, a comparação entre as fracções masculinas dos dois escalões etários em relação ao polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1.

- Paralelamente, o estudo comparativo da distribuição dos diferentes níveis de classificação nos três pares de autossomas estudados entre os sexos masculino e feminino não revelou diferenças significativas nas amostras de ambos os escalões etários.

- Nas amostras estudadas, a frequência de inversões pericêntricas da região heterocromática do cromossoma 9 é relativamente diminuta, enquadrando-se nas frequências observadas em diversas populações caucasianas.

GENÉTICA FORMAL

- Os resultados do estudo da segregação das regiões heterocromáticas, realizado em 52 pares mãe-filho, 51 pares pai-filho e em 61 famílias nucleares do Norte de Portugal, estão de acordo com o modelo

mendeliano de codominância.

- A comparação entre o número de descendentes de casais em que um dos membros era portador de uma variante das regiões heterocromáticas e o número de filhos de casais em que nenhum dos membros apresentava qualquer polimorfismo não apresentou diferenças significativas.

- A análise da segregação por sexos não revelou distorção nos polimorfismos dos autossomas estudados. Além disso, a distribuição por sexos na descendência de portadores de polimorfismos da região heterocromática do cromossoma Y não expressou, igualmente, desvios que apontassem no sentido de uma menor viabilidade dos gâmetas ou dos indivíduos portadores dos referidos polimorfismos. O estudo de configurações meióticas e complexos sinaptonémicos em portadores daqueles tipos de polimorfismos cromossómicos poderá, na nossa perspectiva, revestir-se de bastante importância neste capítulo.

INVESTIGAÇÃO DAS RELAÇÕES DE PARENTESCO

- Apesar da informatividade destes polimorfismos cromossómicos considerados isoladamente não ser muito elevada, o seu estudo em investigação das relações de parentesco poderá revestir-se de grande utilidade em dois tipos de situações: casos em que o

acusado, não tendo sido excluído após a utilização da bateria de testes usual, apresenta uma baixa probabilidade de paternidade, bem como nos casos em que se encontram disponíveis metafases ou cariótipos, nomeadamente provenientes de prévios estudos clínicos, de indivíduos já falecidos e posteriormente envolvidos numa determinada investigação de relações de parentesco.

LIGAÇÃO FACTORIAL E CARTOGRAFIA GENÉTICA

- Os valores de "lod scores" verificados relativamente à análise de ligação ORM1 / polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 9 permitiram, no sexo feminino, excluir ligação para valores de $\theta \leq 0,01$. No que respeita ao polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 16, foi possível excluir ligação para valores de $\theta \leq 0,05$, no sexo masculino, relativamente ao <u>locus</u> da fosfatase fosfoglicólica, assim como para valores de $\theta \leq 0,01$ em relação ao <u>locus</u> da haptoglobina.

- A combinação dos resultados obtidos neste trabalho com análises de ligação previamente publicadas permitiu:

a) obtenção de valores máximos de "lod scores" de 4,91 para $\theta=0,10$ no sexo feminino e de 2,63 para o mesmo valor de θ no sexo masculino, em relação à ligação entre FY e a região

heterocromática do cromossoma 1;

b) exclusão de ligação entre aquela região heterocromática e o sistema genético AMY2, no sexo feminino, para valores de $\theta \leq 0,05$;

c) exclusão de ligação entre a região heterocromática do cromossoma 16 e os sistemas genéticos PGP (com $\theta \leq 0,10$) e HP (com $\theta \leq 0,20$).

- O incremento do número de famílias estudadas em que um dos progenitores seja portador de um polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1 poderá prestar um considerável contributo na análise de ligação e determinação da localização do locus da peptidase C (PEPC).

VII. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Reproductive capacity, either in a broad sense or in specific aspects, is a good measure for evaluating the selective pressure on a given genetical polymorphism.

Recently, there is an open discussion on the relationship between the presence of chromosomal polymorphisms and the decrease in reproductive capacity or the increase in the risk for repeated spontaneous abortions. In fact, reviewing the literature on this matter a succession of antagonistic conclusions can be observed and, therefore, the discussion remains.

In the field of formal genetics, it is highly pertinent to perform the analysis of eventual segregation distortion for a given chromosomal polymorphism in heterozygous individuals, as well as the sex ratio determination on the descendent carriers, namely in the nuclear families in which the male progenitor is a carrier for a polymorphism of the heterocromatic region in the Y chromosome.

The evaluation of linkage relationships between polymorphic regions and other genetic markers is of great importance, because it allows a better definition of the chromosomal region where a certain locus lies, and permits the establishment of the hereditary transmission of chromosomal variants.

In addition, chromosomal polymorphisms have been recently used in parentage testing, particularly on those cases where the overall results do not lead to sufficiently high probability values, that is, in cases that do not reach the probabilistic level corresponding to the verbal predicate "practically proven".

In this work, it is our purpose to contribute to deepen the knowledge on the heterochromatic polymorphisms on chromosomes 1, 9, 16 and Y, namely by:

1. estimation and comparison of chromosomal polymorphism frequencies in populations of
   - individuals in reproductive age
   - new-borns

   from the Northern Portugal;

2. study of segregation where at least one of the progenitors is a carrier for a polymorphism of C-band heterochromatin;

3. study of possible linkage between

polymorphic regions and biochemical genetic markers;

4. application of the study of this kind of polymorphisms to parentage testing.

Based on the data obtained from this work, we can formulate, in a synthetic manner, the following conclusions about human heterochromatic polymorphisms:

POPULATION GENETICS

- the elaboration of an objective and standardized classification of the heterochromatic regions, wich will allow a more accurate comparison of results from different laboratories, should be shortly implemented;

- the more frequent classification levels in adults and new-borns are, respectively, level 3 for chromosomes 1, 9 and Y and level 2 for chromosome 16;

- the observed polymorphism distributions of chromosomes 1, 9 and 16 heterochromatic regions from the samples of both new-born and adult populations, as well as from female and male sexes, did not deviate

significantly from Hardy-Weinberg expectations;

- distributions from adult and new-born samples, either as a whole or separating the sexes, did not reveal significative differences; the only exception was the difference found between adult and new-born distribution for chromosome 1 polymorphism;

- similarly, the comparative study between the female and male distributions from the different classification levels for the three pairs of autossomes studied did not reveal significative differences in both age groups;

- the frequency of pericentric inversions of chromosome 9 heterochromatic region on the samples analysed in this study was relatively low (0.002 in adults and 0.006 in new-borns) and fits well those reported in other caucasian populations;

FORMAL GENETICS

- the results of the heterochromatric regions segregation study, on 52 mother-chid pairs, 51 father-son pairs and on 61 nuclear families, from the Northern Portugal, are in agreement with a codominant mendelian model;

- the number of offspring from couples which one of the members was a carrier for a heterochromatic variant when compared with couples presenting no polymorphism has not shown any significative difference;

- the segregation analysis of the autossomal polymorphisms studied, done separately for female and male sexes, has not revealed any distortion. Furthermore, the sex distribution on the offspring carriers for chromosome Y heterochromatic polymorphism has not deviated from the expected proportions, and therefore no decrease in viability either for the gametes or for the carriers of the above mentioned polymorphism can be inferred. The study of meiotic configurations and synaptonemal complexes from carriers for that type of chromosomal polymorphisms may be, in our view, of great importance in this chapter;

PATERNITY INVESTIGATIONS

- though the chromosomal polymorphisms alone cannot be considered as very informative, their study in cases of disputed paternity investigations could prove very useful in two kinds of situations: those cases where the accused, not being excluded by the routine battery of genetic tests, presents a low paternity

probability, as well as in those cases where there are available metaphases or karyotypes, namely from previous clinical studies, of individuals already deceased and latter on involved in a parentage investigation;

LINKAGE AND GENE MAPPING

- the lod score values for the pair ORM1/chromosome 9 C-banding heterochromatin enabled us to exclude linkage for values of $\theta \leq 0.01$ in the female sex. As to chromosome 16 C-banding heterochromatin is concerned, it was possible to exclude linkage with the phosphoglycolate phosphatase (PGP) locus for values of $\theta \leq 0.01$ in the male sex;

- the combination of the results obtained in this work with previously published linkage analysis allowed:

a) to reach maximum lod score values equal to 4.91 for $\theta = 0.10$ in the female sex and 2.63 for $\theta = 0.10$ in the male sex considering the linkage between chromosome 1 heterochromatic region and FY;

b) linkage exclusion between the above mentioned heterochromatic region and AMY2, for values of $\theta \leq 0.05$ in the female sex;

c) linkage exclusion between chromosome 16

heterochromatic region and both the PGP (for $\theta \leq 0.10$) and HP (for $\theta \leq 0.20$);

- the increase in the number of families under study with one of the progenitors being a carrier for a polymorphism of the chromosome 1 heterochromatic region will give a considerable contribution to the linkage analysis and localization of the peptidase C (PEPC) locus.

VIII. BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA V M, AMORIM A (1990) Chromosome polymorphisms in paternity investigations. Advances in Forensic Haemogenetics 3, pp 366-368. H F Polesky, W R Mayr (eds) Springer-Verlag Berlin.

ALMEIDA V M, AMORIM A, GUSMÃO L (1989) Polimorfismos cromossómicos em investigação da filiação biológica. XXIV Jornadas de Genética Luso-Espanholas.

ARRIGHI F E, HSU T C (1971) Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics 10: 81-86.

ATKIN N B, BAKER M C (1977) Pericentric invertions of chromosome 1: frequency and possible association with cancer. Cytogenet. Cell Genet. 19: 180-184.

ATKIN N B, PICKTHALL V J (1977) Chromosome 1 in 14 ovarian cancers. Heterochromatin variants and structural changes. Hum. Genet. 38: 25-33.

ATKIN N B, BRITO-BABAPULLE V (1985) Chromosome 1 heterochromatin variants and cancer: a reassessment. Cancer Genet. and Cytogenet. 18: 325-331.

BALICEK P, ZIZKA J, SKALSKA H (1977) Length of human constitutive heterochromatin in relation to chromosomal contraction. Hum. Genet. 38: 189-193.

BALICEK P, ZIZKA J, SKALSKA H (1978) Variability and familial transmission of constitutive heterochromatin of human chromosomes evaluated by the method of linear measurement. Hum. Genet. 42: 257-265.

BARROS A (1989) Infertilidade masculina - Análise cromossómica e do esperma. Dissertação de Doutoramento em Medicina apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

BELTRAN I C, ROBERTSON F W, PAGE B M (1979) Human Y chromosome variation in normal and abnormal babies and their fathers. Ann. Hum. Genet. 42: 315-325.

BENYUSH P, LUCKASH V G, SHTANNIKOV A V (1977) Quantitative analysis of C bands based on optical density profiles in human chromosomes. Hum. Genet. 39: 166-175.

BERGER R, BERNHEIM A, MITELMAN F, RYDHOLM A (1983) C-band patterns in lymphocytes of patients with soft tissue sarcomas. Cancer Genet. Cytogenet. 9 :145-150.

BERGER R, BERNHEIM A, KRISTOFFERSSON U, MITELMAN F, OLSSON H (1985). C-band heteromorphism in breast cancer patients. Cancer Genet. Cytogenet. 18 : 37-42.

BLUMBERG B D, SHULKIN J D, ROTTER J I, MOHANDAS T, KABACK M M (1982) Minor chromosomal variants and major chromosomal anomalies in couples with recurrent abortion. Am. J. Hum. Genet. 34: 948-960.

BOBROW M, PEARSON P L, PIKE M C, EL-ALFI O S (1971) Length variation in the quinacrine-binding segment of human Y chromosomes of different sizes. Cytogenetics 10: 190-198.

BOUÉ J, TAILLEMITE J L, HAZAEL-MASSIEUX P, LEONARD C, BOUÉ A (1975) Association of pericentric inversion of chromosome 9 and reproductive failure in ten unrelated families. Hum. Genet. 30: 217-224.

BRANDHAM P, BHATTARAI S (1977) The effect of B chromosome number on chiasma frequency within and between individuals of Gibasis linearis (Commelinaceae). Chromosoma 64: 343-348.

BRECEVIC L, KERN J (1986) Heteromorphism of chromosomes 1, 9, 16 and Y and reproductive wastage. Proc. 7th Congress of Human Genetics.

BROWN T, ROBERTSON F W, DAWSON B M, HANLIN S J, PAGE B M (1980) Individual variation of centric heterochromatin in man. Hum. Genet. 55: 367-373.

BUCKTON K E, O'RIORDAN M L, JACOBS P A, ROBINSON J A, HILL R, EVANS H J (1976) C- and Q-band polymorphisms in the chromosomes of three human populations. Ann. Hum. Genet. 40: 99-112.

BUYS C H C M, ANDERS G J P A, BORKENT-YPMA, BLENKERS-PLATTER J A M, VEEN A Y H (1979) Familial transmission of a translocation Y/14. Human Genet. 53: 125-127.

CARNEVALE A, IBANEZ B B, CASTILLO V (1976) The segregation of C-band polymorphisms on chromosomes 1, 9 and 16. Am. J. Hum. Genet. 28: 412-416.

CAROTHERS A D, BUCKTON K E, COLLYER S, MEY R, FRACKIEWICZ A, PIPER J, SMITH L (1982) The effect of variant chromosomes on reproductive fitness in man. Clinical Genetics. 21: 280-289.

CAVALLI I J, MATTEVI M S, ERDTMANN B, SBALQUEIRO I J, MAIA N A (1984) Quantitative analysis of C bands in chromosomes 1, 9, 16 and Y in caucasian and japanese males. Hum. Hered. 34: 62-64.

CAVALLI I J, MATTEVI M S, ERDTMANN B, SBALQUEIRO I J, MAIA N A (1985) Equivalence of the total constitutive heterochromatin content by an interchromosomal compensation in the C band sizes of chromosomes 1, 9, 16 and Y in caucasian and japanese individuals. Hum. Hered. 35: 379-387.

CHAKRABORTY R, SHAW M, SCHULL W J (1974) Exclusion of paternity: the current state of the art. Am. J. Hum. Genet. 26: 477-488.

CHANDLEY A C (1983) Infertility and recurrent abortions. Principles and practice of medical genetics. A E H Emery, D L Rimoin (eds) Churchil Livingstone, London.

CHANDLEY A C, GOSDEN J R, HARGREAVE T B, SPOWART G, SPEED R M, McBEATH S (1989) Deleted Yq in the sterile son of a man with a satellited Y chromosome (Yqs). J. Med. Genet. 26: 145-153.

COHEN G, MANUEL A, COHEN M, FAGAN K, GRUNSTEIN H (1983) A deletion of heterochromatin only of the Y chromosome in an azoospermic male. Hum. Genet. 64: 297-300.

COMINGS D E (1971) Heterochromatin of the indian muntjac. Replication, condensation, DNA ultracentrifugation, fluorescent and heterochromatin staining. Exp Cell Res 67: 441-460.

COOK P J L, ROBSON E B, BUCKTON K E, JACOBS P A, POLANI P E (1974) Segregation of genetic markers in families with chromosome 1 polymorphisms and strutural rearrangements involving chromosome 1. Ann. Hum. Genet. 37: 261-274.

CRAIG-HOLMES A P, MOORE F B, SHAW M W (1973) Polymorphism of human C-band heterochromatin. I. Frequency of variants. Am J. Hum. Genet. 25: 181-192.

CRAIG-HOLMES A P, MOORE F B, SHAW M W (1975) Polymorphisms of human C-band heterochromatin. II. Family studies with suggestive evidence for somatic crossing over. Am. J. Hum. Genet. 27: 178-189.

CRAIG-HOLMES A P (1977) C-band polymorphism in human populations. Population Cytogenetic Studies in Humans, pp 161-177. E B Hook, I H Porter (eds). Academic Press, New York.

CROSSEN P E (1983) DNA replication and sister chromatid exchange in 9qh+. Cytogenet. Cell Genet. 35: 152-155.

DE LA CHAPELLE A, SCHÖRDER J, STENSTRAND K, FELLMAN J, HERVA R, SAARNI M, ANTTOLAINEN I, TALLILÄ I, TERVILA L, HUSA L, TALLQVIST G, ROBSON E B, COOK P J L, SANGER R (1974) Pericentric invertions of human chromosomes 9 and 10. Am. J. Hum. Genet. 26: 746-766.

DIKE D L V, PALMER C G, NANCE W E, YU P (1977) Chromosome polymorphism and twin zygosity. Am. J. Hum. Genet. 29: 431-447.

DIKLIC V, KOSANOVIC M, SULOVIC V, GARZICIC L, NIKOLIC J, LJUBA L, DUKIC S (1981) The variant Y chromosome in individuals with reproductive failures. Clinical Genet. 19: 499-500.

DONAHUE R P, BIAS W B, RENWICK J H, McKUSIK V A (1968) Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61: 949-955.

ERDTMANN B, SALZANO F M, MATTEVI M S, FLORES R Z (1981) Quantitative analysis of C bands in chromosomes 1, 9, and 16 of brazilian indians and caucasoids. Hum. Genet. 57: 58-63.

ERDTMANN B (1982) Aspects of evaluation, significance, and evolution of C-band heteromorphism. Hum. Genet. 61: 281-294.

FERGUSON-SMITH M A (1974) Autosomal polymorphism. Medical Genetics Today. D I Rimoin, R N Schinke (eds). Birth defects: original article series. New York: The National Foundation.

FITZGERALD P H (1973) The nature and inheritance of an elongated secondary constriction on chromosome 9 of man. Cytogenet. Cell Genet. 12: 404-413.

FOGLE T A, NAMBOODIRI K K, ELSTON R C, McKENZIE W H, HAMES C G (1980) Linkage relationships of biochemical markers to Q- and C-band variants in a large black kindred. Hum. Genet. 55: 353-356.

FORD J H, LESTER P (1978) Chromosomal variants and nondisjunction. Cytogenet. Cell Genet. 21: 300-303.

FORD J, CALLEN D F, JAHNKE A B, ROBERTS C G (1982) Within pair differences of human chromosome 9 C-bands associated with reproductive loss. Hum. Genet. 61: 360-363.

FORD J H, CALLEN D F, ROBERTS C G, JAHNKE A B (1983) Interactions between C-bands of chromosomes 1 and 9 in recurrent reproductive loss Hum. Genet. 63:58-62.

FRIEDRICH U, THERKELSEN A J (1982) An attempt to define 1qh+, 9qh+, and 16qh+. Hum. Genet. 60: 139-144.

FRYNS J P, AZOU M, JACKEN J, EGGERMONT E, PEDERSEN J C, BERGHE H V (1981) Centromeric instability of chromosomes 1, 9, and 16 associated with combined immunodeficiency. Hum. Genet. 57: 108-110.

FRYNS J P, KLECZKOWSKA A, LONDERS L, VAN DEN BERGHE H (1985) Unusual chromosome 9 polymorphism and reproductive failure. Ann. Gènèt. 28: 49-51.

GENEST P (1979) Chromosome variants and abnormalities detected in 51 married couples with repeated spontaneous abortions. Clinical Genetics 16: 387-389.

GENEST P, GENEST F B (1985) The influence of the length of the human Y chromosome on spontaneous abortions. A prospective study in family lines with inherited polymorphic Y chromosomes. Ann. Génét. 28: 143-148.

GHOSH P K, SINGH I P (1975) Morphological variability of the human chromosomes in two indian populations - Rajputs and Punjabis. Humangenetik 29: 67-78.

GHOSH P K e SINGH I P (1976) Morphologic variability of human chromosomes: polymorphism of constitutive heterochromatin. Hum. Genet. 32: 149-154.

GREEN D K, FANTES J A, BUCKTON K E, ELDER J K, MALLOY P, CAROTHERS A, EVANS H J (1984) Karyotyping and identification of human chromosome polymorphisms by single fluorochrome flow cytometry. Hum. Genet. 66: 143-146.

GROPP A, CITOLER P, GEISLER M (1969) Karyotypvariation und heterochromatinmuster bei igeln (Erinaceus und Hemiechinus). Chromosoma (Berl.) 27: 288-307.

GÜRTLER H, NIEBUHR E (1986) Chromosome polymorphisms in legal paternity cases. Advances in Forensic Haemogenetics I, pp 201-211. Brinkmann B, Henningsen K (eds) Springer-Verlag Berlin.

HAAF T, STEINLEIN K, SCHMID M (1986) Preferential somatic pairing between homologous heterochromatic regions of human chromosomes. Am. J. Hum. Genet. 38: 319-329.

HAAS O A (1990) Centromeric heterochromatin instability of chromosomes 1, 9, and 16 in variable immunodeficiency syndrome - a virus-induced phenomenon? Hum. Genet. 85: 244-246.

HALBRECHT I, SHABTAY F (1976) Human chromosome polymorphism and congenital malformations. Clinical Genetics 10: 113-122.

HARRIS P, BOYD E, YOUNG B D, FERGUSON-SMITH M A (1986) Determination of the DNA content of human chromosomes by flow cytometry. Cytogenet. Cell Genet. 41: 14-21.

HEIM S, BERGER R, BERNHEIM A, MITELMAN F (1985) Constitutional C-band pattern in patients with adenomatosis of the colon and rectum. Cancer Genetics and Cytogenetics 18: 31-35.

HEITZ E (1928) Das heterochromatin der moose. I. PRINGSHEIMS JB. WISS. BOT. 69: 762-818. (cit. em Kurnit, 1979)

HEMMING L, BURNS C (1979) Heterochromatic polymorphism in spontaneous abortions. J. Med. Genet. 16: 358-362.

HOEHN H, KURNIT D M (1985) Intraindividual Y-chromosome heteromorphism. Hum. Genet. 71: 278.

HOLBEK S, FRIEDRICH U, LAURITSEN J G, THERKELSEN A J (1974) Marker chromosomes in parents of spontaneous abortuses. Humangenetik 25: 61-64.

HOTTA Y, STERN H (1978) Absense of satellite DNA synthesis during meiotic prophase in mouse and human spermatocytes. Chromosoma 69: 323.

HOWARD P J, LEWIS I J, HARRIS F, WALKER S (1985) Centromeric instability of chromosomes 1 and 16 with variable immune deficiency: a new syndrome. Clinical Genetics 27: 501-505.

HSU T C (1975) A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis. Genetics 79: 137-150.

HSU L Y F, BENN P A (1984) Chromosome polymorphisms of 1, 9, 16 and Y in four major ethnic groups - A large prenatal study. Am. J. Hum. Genet. 36: 97S.

HSU L Y F (1987) Prenatal diagnosis of genetic disorders. XXIII Jornadas Luso-Espanholas de Genética.

HSU L Y F, BENN P A, TANNENBAUM H L, PERLIS T E, CARLSON A D (1987) Chromosomal polymorphisms of 1, 9, 16, and Y in 4 major ethnic groups: A large prenatal study. Am. J. Med. Genet. 26: 95-101.

HUMAN GENE MAPPING 10 (1989) Tenth international workshop on human gene mapping. Cytogenet. Cell Genet. 51: 1-1148.

IBRAIMOV A I,MIRRAKHIMOV M M, NAZARENKO S A, AXENROD E I, (1982) Human chromosomal polymorphism. II. Chromosomal C polymorphism in mongoloid populations of central Asia. Hum. Genet. 60: 8-9.

IORIO R J, WIANDT H E (1973) Quinacrine studies of sex chromatin and nucleoli in human brain. Humangenetik 20: 329-333.

ISCN (1978) An international system for Human Cytogenetic Nomenclature. Cytogenet. Cell Genet. 21: 309-404.

JACOBS A P, FRACKIEWICZ A, LAW P, HILDITCH J, MORTON N E (1975) The effect of structural aberrations of the chromosomes on reproductive fitness in man. II Results. Clinical Genetics 8: 169-178.

JEREMIAH S J, POVEY S, BURLEY M W, KIELTY C, LEE M, SPOWART G, CORNEY G, COOK P J L (1982) Mapping studies on human mitochondrial glutamate oxaloacetate transaminase. Ann. Hum. Genet. 46: 145-152.

JOHN B (1973) The cytogenetic systems of grasshopers and locusts. II. The origin and evolution of supernumerary segments. Chromosoma 44: 123-146

JONASSON J, LINDSTEN J, LUNDBORG R, KISSMEYER-NIELSEN F,LAMM L U, PETERSEN G B, THERKELSEN A J (1972) HL-A antigens and heteromorphic fluorescence characters of chromosomes in prenatal paternity investigation. Nature 236: 312-313.

KAMARYT J, ADÁMEK R, VRBA M, BRUNECKY Z (1971) Possible assigning of pancreatic amylase polymorphism AMY2 locus to chromosome nº1. Excerpta Medica Int. Congr. Ser. 233: 98. (cit. em Rivas et al, 1975)

KAISER P (1984) Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics. Hum. Genet. 68: 1-47.

KAMENEV L E, ANDRE A C, FREDERIC J L (1986) Efficiency in disputed paternity cases of a new category of markers: chromosome variants. Advances in Forensic Haemogenetics 1, pp 411-414. B Brinkmann, K Henningsen (eds). Springer-Verlag Berlin.

KANDA N (1978) Differential staining in the secondary constriction regions of human chromosomes A1, C9, and E16 by a heat-hypotonic treatment technique. Hum. Genet. 45: 19-24.

KIVI S, MIKELSAAR A-V (1980) Q- and C-band polymorphisms in patients with ovarian or breast carcinoma. Hum. Genet. 56: 111-114.

KLASTERSKA I, NATARAJAN A T, RAMEL C (1974) Heterochromatin distribution and chiasma localization in the grasshopper Bryodema tuberculata (Fabr.) (ACRIDIDAE). Chromosoma 44: 393-404.

KRISTOFFERSSON U, BERGER R, BERNHEIM A, AKERMAN M, OLSSON H, MITELMAN F (1985) C-band polymorphism in non-Hodgkin lymphoma. Hereditas 103: 85-87.

KURNIT D M (1974) DNA helical content during the C-banding procedure. Cytogenet. Cell Genet. 13: 313-329.

KURNIT D M (1979) Satellite DNA and heterochromatin variants: the case for unequal mitotic crossing over. Hum. Genet. 47: 169-186.

LIMA-DE-FARIA A (1959) Differential uptake of tritiated thymidine into hetero and euchromatin in Melanoplus and Secale. J. Biophys. Biochem. Cytol. 6: 457-466.

LIMA-DE-FARIA A, JAWORSKA H (1968) Late DNA synthesis in heterochromatin. Nature 217: 138-142.

LIN M S, ZHANG A e WILSON M G (1986) Effect of C-banded heterochromatin on centromere separation. Am. J. Hum. Genet. 39: 122.

LUBS H A, RUDDLE F H (1971) Chromosome polymorphism in american negro and white populations. Nature 233: 134-136.

LUBS H A, PATIL S A, KIMBERLING W J, BROWN J, COHEN M, GERALD P, HECHT F, MYRIANTHOPOULOS N, SUMMITT R L (1977) Q and C banding polymorphisms in 7 and 8 year old children: racial differences and clinical significance. Population Cytogenetics: studies in humans. pp. 133-159. Hook E B, Porter I H (eds) Academic Press, New York.

LYBERATOU-MORAITOU E, GRIGORI-KOSTARAKI P, RETZEPOPOULOU Z, KOSMAIDOU-ARAVIDOU Z (1983) Cytogenetics of recurrent abortions. Clin. Genet. 23:294-297.

MADAN K, BOBROW M (1974) Structural variation in chromosome nº9. Ann. Génét. 17: 81-86.

MAGENIS R E, PALMER C G, WANG L, BROWN M, CHAMBERLING J, PARKS M, MERRIT A D, RIVAS M, YU P L (1977) Heredability of chromosome banding variants. Population cytogenetics: studies in humans. pp. 179-188. Hook E B, Porter I H (eds) Academic Press, New York

MARASCHIO P, ZUFFARDI O, FIOR T D, TIEPOLO L (1988) Immunodeficiency, centromeric heterochromatin instability of chromosomes 1, 9, and 16, and facial anomalies: the ICF syndrome. J. Med. Genet. 25: 173-180.

MASON D C, LAUDER I J, SPOWART G (1978) Automated measurements on human C-band in family studies. Cytogenet. Cell Genet. 21: 251-266.

MATSUURA J S, MAYER M, JACOBS P A (1979) A cytogenetic survey of an institution for the mentally retarded. III Q-band chromosome heteromorphisms. Hum. Genet. 52: 203-210.

MAYER M, MATSUURA J, JACOBS P (1978) Inversions and other unusual heteromorphisms detected by C-banding. Hum. Genet. 45: 43-50.

MAYNARD-SMITH S, PENROSE L S, SMITH C A B (1961) Mathematical tables for research workers in human genetics. J. A. Churchil Ltd., London.

McKENZIE W H, LUBS H A (1975) Human Q and C chromosomal variations: distribution and incidence. Cytogenet. Cell Genet. 14: 97-115.

MOORHEAD P S (1976) A closer look at chromosomal inversions. Am. J. Hum. Genet. 28: 294-296.

MULCAHY M T (1982) Cytogenetic studies in recurrent fetal loss. Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaec. 22: 29-30.

MÜLLER H, KLINGER H P, GLASSER M (1975) Chromosome polymorphism in a human newborn population. II. Potentials of polymorphic chromosome variants for characterizing the idiogram of an individual. Cytogenet. Cell Genet. 15: 239-255.

MUTCHINICK O, SANCHEZ F, LISKER R, ARMENDARES S, CALOJERO, RUZ L, BUENTELLO L (1986) Distribution of C segment sizes in a sample of the mexican population. Comparison of two quantitative methods of measurements. Proc. 7th Congress of Human Genetics.

NIELSEN J, FRIEDRICH U, HREIDARSSON A B (1974) Frequency and genetic effect of 1qh+. Humangenetik 21: 193-196.

NIELSEN J, SILLESEN I (1975) Incidence of chromosome aberrations among 11148 newborn children. Humangenetik 30: 1-12.

NIELSEN J (1978) Large Y chromosome (Yq+) and increased risk of abortion. Clinical Genetics 13: 415-416.

NORDENSEN I (1981) Increased frequencies of chromosomal abnormalities in families with a history of fetal wastage. Clinical. Genetics. 19: 168-173.

OLSON S B, MAGENIS R E, LOVRIEN E W (1986) Human chromosome variation: the discriminatory power of Q-band heteromorphism (variant) analysis in distinguishing between individuals, with specific application to cases of questionable paternity. Am. J. Hum. Genet. 38: 235-252.

PANTZAR J T, ALLANSON J S P, KALOUSEK D K, POLAND B J (1984) Cytogenetic findings in 318 couples with repeated spontaneous abortion: a review of experience in British Columbia. Am. J. Med. Genet. 17: 615-620.

PARIS CONFERENCE (1971), SUPPLEMENT (1975): Standartization in Human Cytogenetics. Birth Defects: original article series, XI, 9. The National Foundation, New York.

PATIL S R, LUBS H A (1974) Spontaneous abortions and long Y chromosomes. Am. J. Hum. Genet. 26: 66A.

PATIL S R, LUBS H A (1977 a) A possible association of long Y chromosomes and fetal loss. Hum. Genet. 35: 233-235.

PATIL S R, LUBS H A (1977 b) Classification of qh regions in human chromosomes 1, 9, and 16 by C-banding. Hum. Genet. 38: 35-38.

PESCIA G, GAIDE A, JUILLARD E (1977) Trois familles avec inversion pericentrique du chromosome 9 (inv c 9). J. Génét. Hum. 25: 121-134.

PODUGOLNIKOVA O A, PARFENOVA I V, SUSHANLO H M, PROKOFIEVA-BELGOVSKAJA A A (1979 a) The quantitative analysis of polymorphism on human chromosomes 1, 9, 16, and Y. I. Description of individual karyotypes. Hum. Genet. 49: 243-250.

PODUGOLNIKOVA O A, SUSHANLO H M, PARFENOVA I V, PROKOFIEVA-BELGOVSKAJA A A (1979 b) The quantitative analysis of polymorphism on human chromosomes 1, 9, 16, and Y. II. Comparison of the C segments in male and female individuals (group characteristics). Hum. Genet. 49: 251-260.

PODUGOLNIKOVA O A (1979) The quantitative analysis of polymorphism on human chromosomes 1, 9, 16, and Y. III. Study of relationships of C segments' lengths in individual karyotypes. Hum. Genet. 49: 261-268.

PODUGOLNIKOVA O A, KOROSTELEV A P (1980) The quantitative analysis of polymorphism on human chromosomes 1, 9, 16, and Y. IV. Heterogeneity of a normal population. Hum. Genet. 54: 163-169.

PODUGOLNIKOVA O A, BLUMINA M G (1983) Heterochromatic regions on chromosomes 1, 9, 16, and Y in children with some disturbances ocurring during embryo development. Hum. Genet. 63: 183-188.

PODUGOLNIKOVA O A, GRIGORJEVA N M, BLUMINA M G (1984) Relationship of the variability of the heterochromatic regions of chromosomes 1, 9, 16, and Y to some anthropometric characteristics in children with embryopathies of unknown etiology and in children with Down syndrome. Hum. Genet. 68: 254-257.

POTLURI V R, SINGH I P, BHASIN M K (1985) Human chromosomal heteromorphisms in Delhi newborns. II. Analysis of C-band size heteromorphisms in chromosomes 1, 9 and 16. Hum. Hered. 35: 333-338.

RAY F A, BARTHOLDI M F, KRAEMER P M, CRAM L S (1984) Chromosome polymorphism involving heterochromatic blocks in chinese hamster chromosome 9. Cytogenet. Cell Genet. 38: 257-264.

RIVAS M L, CONNEALLY P M, HECHT F, LOVRIEN E W, MAGENIS E, MERRITT A D, MEYERS D A, PALMER C G, WANG L (1975) Linkage relationships of 1qh to Amy, Fy, PGM1, and Rh. Cytogenet. Cell Genet. 14: 409-417.

ROBINSON J A, BUCKTON K E, SPOWART G, NEWTON M, JACOBS P A,EVANS H J, HILL R (1976) The segregation of human chromosome polymorphisms. Ann. Hum. Genet. 40: 113-121.

ROBSON E B, COOK P J L, BUCKTON K E (1977) Family studies with the chromosome 9 markers ABO, AK1, ACONs and 9qh. Ann. Hum. Genet. 41: 53-60.

ROBSON H K, ANDERSON J M, GARSON O M, MATTHEWS J P e SANDEMAN T F (1981) Constitutive heterochromatin (C-banding) studies in patients with testicular malignancies. Cancer Genet. Cytogenet. 4: 319-323.

ROCHA J (1988) Análise da quantificação da informação genética em investigações da paternidade. Trabalho de síntese. Provas de aptidão pedagógica e capacidade científica. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

RODRIGUEZ-GÓMEZ M T, MARTÍN-SEMPERE M J, ABRISQUETA J A (1987) C-band lenght variability and reproductive wastage. Hum. Genet. 75: 56-61.

SCHMIADY H, SPERLING K (1976) Length of human C-bands in relation to the degree of chromosome condensation. Hum. Genet. 35: 107-111.

SCHMID M, VOGEL W, KRONE W (1975) Attraction between centric heterochromatin of human chromosomes. Cytogenet Cell Genet. 15: 66-80.

SCHULZE B, GOLINSKI C, FONATSCH C (1984) Heterochromatin and nucleolus organizer regions in cells of patients with malignant and premalignant lymphatic diseases. Hum. Genet. 67: 391-395.

SHABTAI F, ANTEBI E, KLAR D, KIMCHI D, HART J, HALBRECHT I (1985) Cytogenetic study of patients with carcinoma of the colon and rectum: particular C-band variants as possible markers for cancer proneness. Cancer Genetics and Cytogenetics 14: 235-245.

SHIONO H, AZUMI J, SAKAMOTO Y, FUJIWARA M, MORITA M (1985) Chromosome heteromorphisms and paternity testing. Am. J. Forensic Medecine and Pathology 6: 199-203.

SIEBERT G, RITTER H, KOMPF J (1979) Mitochondrial malic enzime (E. C. 1.1.1.40) in human leukocytes: formal genetics and population genetics. Hum. Genet. 51: 319-322.

SIEGER M, PERA F, SCHWARZACHER H G (1970) Genetic inactivity of heterochromatin and heteropycnosis in Microtus agrestis. Chromosoma (Berl.) 29: 349-364.

SIMI S, TURSI F (1982) Polymorphism of human chromosomes 1, 9, 16, Y: variations, segregation and mosaicism. Hum. Genet. 62: 217-220.

SPARKES R S, EPSTEIN P A, KIDD K K, KLISAK I, SPARKES M C, CRIST M, MORTON L A (1980) Probable linkage between the human Galactose-1-P Uridyl Transferase locus and 9qh. Am. J. Hum. Genet. 32: 188-193.

SPERLING K, KALSCHEUER V, MARCUS M, NANDA I, NEITZEL H (1986) Transcriptional activity of constitutive heterochromatin. Proc. 7th Congress of Human Genetics.

SPERLING K, KALSCHEUER V, NEITZEL H (1987) Transcriptional activity of constitutive heterochromatin in the mammal Microtus agrestis (Rodentia, Cricetidae). Exp. Cell Res. 173: 463-472.

STAESSEN C, KIRSCH-VOLDERS M, SUSANNE C (1982) Comparison of two measuring methods for the evaluation of C-heterochromatin in human chromosomes. Hum. Genet. 61: 68-70.

STAHL A, HARTUNG M (1981) L'hétérochromatine. Ann. Génét. 24: 69-77.

SUMNER A T (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res. 75: 304-306.

SUMNER A T (1977) Estimation of the sizes of polymorphic C-band in man by measurement of DNA content of whole chromosomes. Cytogenet. Cell Genet. 19: 250-255.

SWARNA M, UMA S T, JYOTHI A, REDDY P P (1986) C-band polymorphism in ideopathic mental retardation. Proc. 7th Congress of Human Genetics.

TAVARES-CUMMINGS (1990) O abortamento espontâneo de repetição em genética clínica. Dissertação de Doutoramento em Medicina apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

TAYLOR J H (1960) Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of chinese hamster. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7: 455-464 (cit. em Stahl e Hartung, 1981).

THARAPEL A T, SUMMITT R L (1978) Minor chromosome variations and selected heteromorphisms in 200 unclassifiable mentally retarded patients and 200 normal controls. Hum. Genet. 41: 121-130.

THELMA B K, RAO S R V (1982) In vivo sister chromatid exchanges in the euchromatin and constitutive heterochromatin of the Indian mole rat, Nesokia indica. Cytogenet. Cell Genet. 33: 319-326.

THELMA B K, JUYAL R C, TEWARI R, RAO S R V (1988) Does heterochromatin variation potentiate speciation? Cytogenet Cell Genet. 47: 204-208.

THO S P T, BYRD J R, McDONOUGH P G (1982) Chromosome polymorphism in 110 couples with reproductive failure and subsequent pregnancy outcome. Fertility and Sterility. 36: 688-694.

TIEPOLO L, MARASCHIO P, GIMELLI G, CUOCO C, GARGANI G F, ROMANO C (1979) Multibranched chromosomes 1, 9, and 16 in a patient with combined IgA and IgE deficiency. Hum. Genet. 51: 127-137.

TISHLER P V, ROSNER B, LAMBOROT-MANSUR M, ATKINS L (1974) Studies on the localization of Y fluorescent body in human interphase nuclei. Humangenetik 22: 275-286.

TRASK B, ENGH G, MAYALL B, GRAY J W (1989) Chromosome heteromorphism quantified by high-resolution bivariate flow karyotyping. Am. J. Hum. Genet. 45: 739-752.

TSENGHI C, METAXOTOU-STAVRIDAKI C, STRATAKI-BENETOU M, KALPINI-MAVROU A, MATSANIOTIS N (1976) Chromosome studies in couples with repeated spontaneous abortions. Obstetrics and Gynecology 47: 463-468.

TURLEAU C, CABANIS M, GIRAULT D, LEDEIST F, METTEY R, PUISSANT H, PRIEUR M, GROUCHY J (1989) Multibranched chromosomes in the ICF syndrome: immunodeficiency, centromeric instability, and facial anomalies. Am. J. Med. Genet. 32: 420-424.

TÜÜR S, KAOSAAR M, MIKELSAAR A V (1974) 1 q+ variants in a normal adult population (one with a pericentric inversion). Humangenetik 24: 217-220.

TYRKUS M, PIRRALLO R G, BOLLINGER R, KOPPITCH F C, EVANS M I (1985) 9qh polymorphism: determinent of aneuploidy and recurrent abortion. Am. J. Hum. Genet. 37: 353.

VALKOVA G, GHENEV E, TZANTCHEVA M (1986) Support of a new syndrome - Centromeric instability of chromosomes 1, 9 and 16 with variable immune deficiency. Proc. 7th Congress of Human Genetics.

VALKOVA G, GHENEV E, TZANCHEVA M (1987) Centromeric instability of chromosomes 1, 9 and 16 with variable immune deficiency. Support of a new syndrome. Clinical Genetics. 31: 119-124.

VERMA R S, DOSIK H, LUBS H A (1978) Sizes and pericentric inversion heteromorphisms of secondary constriction regions (h) of chromosomes 1, 9, and 16 as detected by CBG technique in caucasians: classification, frequencies, and incidence. Am. J. Med. Genet. 2: 331-339

VERMA R S, RODRIGUEZ J, DOSIK H (1981) Human chromosome heteromorphisms in american blacks: II. Higher incidence of pericentric inversions of secondary constriction regions (h). Am. J. Med. Genet. 8: 17-25.

VERMA R S (1985). Heteromorphisms of constitutive heterochromatin in patients with neoplastic diseases. Am. J. Hum. Genet. 37: A41.

VIEGAS J, SALZANO F M (1978). C-bands in chromosomes 1, 9, and 16 of twins. Hum. Genet. 45: 127-130.

VIG B K, ZINKOWSKI R P (1985). Sequence of centromere separation: influence of pericentromeric heterochromatin (repetitive DNA) in Mus. Genetica 67: 153-159.

VOGT P (1990) Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on a highly conserved "chromatin folding code". Hum. Genet. 84: 301-336.

WANG H S, HAMERTON J L (1979). C-band polymorphisms of chromosomes 1, 9, and 16 in four subgroups of mentally retarded patients and normal control population. Hum. Genet. 51: 269-275.

WARD B F, HENRY G P, ROBINSON A (1980). Cytogenetic studies in 100 couples with recurrent spontaneous abortions. Am. J. Hum. Genet. 32: 549-554.

YAMAMOTO M, MIKLOS G L G (1978) Genetic studies on heterochromatin in Drosophila melanogaster and their implications for the functions of satellite DNA. Chromosoma 66: 71-98.

YING K L, IVES E J (1968) Asymetry of chromosome number 1 pair in three generations of a phenotypically normal family. Can. J. Genet. Cytol. 10: 575-589. (cit. em Rivas et al, 1975).

YUNIS J J, ROLDAN L, YASMINEH W G, LEE J C (1971) Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes. Nature 231: 532-533.

ZANENGA R, MATTEVI M S, ERDTMANN B (1984) Smaller autosomal C band sizes in blacks than in caucasoids. Hum. Genet. 66: 286.

ZHANG A, LIN M S, WILSON M G (1987) Effect of C-banded heterochromatin on centromere separation. Hum. Hered. 37: 285-289.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Símbolos utilizados para referir "loci", seguidos da tradução, em português, do respectivo nome recomendado (segundo "Human Gene Mapping 10", 1989).

ABO	Grupo sanguíneo ABO
AK1	Cinase adenílica 1
ALAD	Desidratase delta aminolevulínica
AMY2	Alfa-amilase 2; pancreática
FY	Grupo sanguíneo Duffy
FUCA1	Fucosidase, alfa-L-1, tecidular
GALT	Galactose-1-fosfato uridiltransferase
HP	Haptoglobina
ORM1	Orosomucóide 1
PEPC	Peptidase C
PGD	Desidrogenase do fosfogluconato
PGM1	Fosfoglucomutase 1
PGP	Fosfatase fosfoglicólica
RH	Grupo sanguíneo Rhesus
UMPK	Cinase do monofosfato de uridina

APÊNDICE 2

TABELA 40. Análise da ligação entre o polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 1 e os marcadores PGD, FUCA1, Rh, UMPK, PGM1 e PEPC.

Sistemas Genéticos	Número Famil.	Inform. da Descend.	Inform. da Segregação	"Lod Scores" para θ 0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
PGD	1	4	M	-1,109	-0,463	-0,229	-0,060	-0,011	-0,001
	1	4	P	0,885	0,814	0,720	0,517	0,298	0,094
FUCA	8	14	M	-7,533	-3,553	-2,017	-0,762	-0,261	-0,055
	1	2	P	-1,402	-0,721	-0,444	-0,194	-0,076	-0,018
Rh	6	18	M	-10,921	-5,510	-3,333	-1,416	-0,541	-0,125
	1	4	P	-1,109	-0,463	-0,229	-0,060	-0,011	-0,001
UMPK	3	12	M	-5,315	-2,626	-1,559	-0,641	-0,238	-0,054
	-	-	P	-	-	-	-	-	-
PGM1	5	21	M	-10,625	-5,232	-3,083	-1,232	-0,435	-0,093
	-	-	P	-	-	-	-	-	-
PEPC	2	4	M	0,584	0,515	0,430	0,267	0,129	0,034
	2	4	P	-2,511	-1,184	-0,672	-0,254	-0,087	-0,018

*P=paterna; M=materna

APÊNDICE 2 (continuação)

TABELA 41. Análise da ligação entre o polimorfismo da região heterocromática do cromossoma 9 e os marcadores ALAD, AK1 e ABO.

Sistemas Genéticos	Número Famil	Inform. da		"Lod Scores" para θ					
		Descend.	Segregação	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
ALAD	1	3	M	-1,402	-0,721	-0,444	-0,194	-0,076	-0,018
	-	-	P	-	-	-	-	-	-
AK1	1	10	M	-3,320	-1,349	-0,611	-0,064	0,071	0,041
	-	-	P	-	-	-	-	-	-
ABO	3	17	M	-5,530	-2,233	-0,987	-0,045	0,200	0,122
	3	9	P	-4,205	-2,163	-1,331	-0,006	-0,227	-0,053

*P=paterna; M=materna

ERRATA

pag.	linha	onde se lê	deve ler-se
agradecimentos	1	consecussão	consecução
12	17	observado	observada
48	5	0,25>P>0,010	0,25>P>0,10
70	3	0,05>P>0,25	0,05>P>0,025
78	16	caucaesiana	caucasiana