

ANTRO
PO
LOGIA
Portuguesa

Vol. 2 • 1984

Instituto de Antropologia — Universidade de Coimbra

Estudo genético das enzimas G6PD, AcP₁ e TO numa população portuguesa de recém-nascidos

PAULA M. VASCONCELLOS MORAIS

Resumo:

Foram determinadas as frequências genéticas das enzimas G6PD, AcP₁, TO e Hemoglobinas, em gel de poliacrilamida, para uma amostra de 198 crianças, cujo sangue foi colectado pelo Hospital Pediátrico de Coimbra. Foram detectadas as seguintes variantes da G6PD: G^{med} (0.02), G^A (0.01) e G^{A-} (0.01), confirmando a presença de alelos típicos da população negra além do característico da região mediterrânea. Para a enzima AcP₁ as frequências encontradas foram P^a (0.407), P^b (0.509) e P^c (0.084), que diferem das referidas noutros estudos para uma população semelhante. A enzima TO apresentou-se monomórfica. Foi detectado um indivíduo Hb S.

Palavras-chave:

Frequências genéticas; Enzimas — G6PD, AcP₁, TO; Portugal.

Abstract:

Gene frequencies of the enzymes G6PD, AcP₁, TO and Hemoglobins have been determined, in polyacrylamide gel. 198 child have been tested. The blood was collected in the «Hospital Pediátrico de Coimbra». The detected frequencies of G6PD variants — G^{med} (0.02), G^A (0.01) and G^{A-} (0.01) — have confirmed the presence of negro alleles besides the mediterranean allele. AcP₁ frequencies were P^a (0.407), P^b (0.509) and P^c (0.084). These results differ from those obtained in other studies in a similar population. Any variant of the TO enzyme hasn't been observed. One Hb S child has been detected.

Key words:

Gene frequencies; Enzymes — G6PD, AcP₁, TO; Portugal.

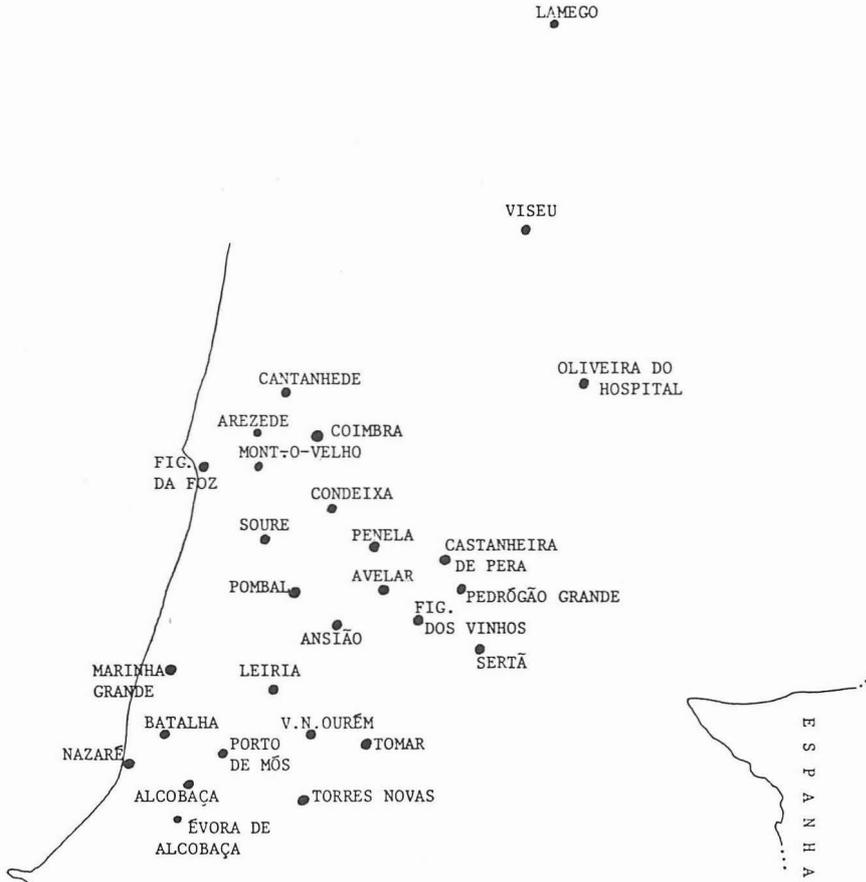


FIGURA 1 — Proveniência das amostras sanguíneas

INTRODUÇÃO

O trabalho teve por objectivo a caracterização electromórfica de polimorfismos de um pequeno número de enzimas do sangue, na população portuguesa, escolhidas pelo seu interesse genético e clínico.

Foram estudadas as enzimas Fosfatase Ácida (AcP₁), Desidrogenase da Glucose-6-Fosfato (G6PD) e a Oxidase do Tetrazólio (TO).

A enzima G6PD, presente em todos os tecidos, é uma das proteínas enzimáticas mais estudadas e melhor conhecidas. A existência de alelos de baixa actividade ou mesmo nula (G^{med}) é responsável quer por acidentes hemolíticos agudos provocados por agentes exógenos, quer pela anemia hemolítica crónica não esférica — daí o grande interesse clínico da enzima (CLARKE, 1972).

A única frequência, referente a esta enzima, determinada para Portugal é estabelecida num estudo de 1962 (Hailes, 1962).

O sistema AcP₁ é um dos mais informativos no estudo da individualidade biológica e genética da população devido à grande variabilidade de frequências electromórficas e à variação em actividade (HOPKINSON & HARRIS, 1969; SENSABAUGH, 1973). Têm sido feitos estudos sobre este polimorfismo em várias populações de Portugal (AMORIM, 1979, 1983; CRUZ et al., 1973).

Não se possui conhecimento de qualquer estudo realizado na população portuguesa para a enzima TO. No entanto, sabe-se que este locus é muito estável na população mundial (BREWER, 1967).

Por serem de fácil visualização, foram também considerados os fenótipos A, F e S da Hemoglobina.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostragem constou de 198 indivíduos, quase todos recém-nascidos e crianças até um ano de idade, algumas mães e alguns adolescentes, cujas amostras sanguíneas foram fornecidas pelo Hospital Pediátrico de Coimbra durante 8 meses.

As amostras sanguíneas foram guardadas a 4°C em EDTA ⁽¹⁾ (potássio) até à sua utilização. Na preparação dos hemolizados foi seguida uma metodologia semelhante à descrita em W. H. O. (1967): duas lavagens numa solução 0.9% de NaCl para isolamento dos glóbulos vermelhos colocando-se seguidamente 0.05 ml de glóbulos lavados em 1 ml de solução de hemolizante constituída de 7 ou 15 mM de β-mercaptoetanol e 10 μM de NADP⁺ numa solução 2.7 mM de EDTA pH 7.0. A mistura era centrifugada a 30 000 g. O sobrenadante (a parte usada) pode ser guardado à temperatura de 4°C durante 48 horas.

⁽¹⁾ Ethylenediaminetetraacetic acid.

Na electroforese utilizaram-se geles de poliacrilamida em sistema vertical. Construíram-se dois sistemas:

— Sistema A, formado por 3 geles sobrepostos sendo o superior o menos concentrado (4%) e o inferior o mais concentrado (10%), método descrito por JACOBS & SCHWIND (1975). A electroforese efectuou-se em ambiente refrigerado (4°C) sendo a diferença de potencial aplicada de 150V na primeira hora e de 250V na hora e meia seguinte. Este sistema foi usado para detecção dos fenótipos da enzima AcP₁;

— Sistema B, constituído por 2 geles, o superior menos concentrado (4%) e o inferior mais concentrado (8 a 9%) (adaptado de ORNSTEIN & DAVIS, 1964). A electroforese foi conduzida a 150V na primeira hora e a 250V nas 4 horas seguintes, a 4°C e pH 8.9 (tampão do gel: 0.2M Tris⁽²⁾, 1.57M Glicina a pH 8.9; tampão das pontes: 0.049M Tris, 0.384M Glicina a pH 8.3, diluindo-se para uso 10% em solução aquosa). Utilizou-se para a detecção das enzimas G6PD e TO. Foi também neste sistema que se observaram os fenótipos da Hemoglobina.

Os geles feitos na véspera da sua utilização, eram colocados em ambiente refrigerado até serem usados (LAM et al., 1978). As placas foram fixadas numa solução de metanol a 15% e ácido acético glacial a 7.5%.

Para todas as enzimas, utilizaram-se métodos de coloração já descritos nos quais se introduziram alterações. Para a detecção da enzima AcP₁ (adaptado de HOPKINSON et al., 1963) usou-se uma solução de 26 mg de fosfato de fenolfetaleína dissódica em 30 ml de tampão acetato 0.05M, pH 4.8. Os geles foram incubados duas horas na solução após serem lavados em solução de acetato 0.1M, pH 4.8. A visualização das zonas de actividade da enzima (de cor rosa) só era possível após adição ao gel de uma solução alcalinizante (amónia ou hidróxido de sódio). A fenolfetaleína libertada dissipa-se rapidamente. A detecção das zonas de actividade da enzima G6PD foi feita com a utilização do método de coloração recomendado pela W. H. O. (1967), composta por 4 mg de PMS, 8 mg de MTT, 8 mg de NADP em 50 ml de solução tampão Tris-HCl 0.2M, pH 8.4. Bandas azul-violeta apareciam após incubação dos geles a 37°C durante uma hora ao abrigo da luz. A identificação dos fenótipos da enzima TO fez-se nos geles corados para a detecção da G6PD. As zonas de actividade apareciam como zonas claras em fundo escuro quando os geles eram expostos à luz. A identificação de alguns fenótipos de Hemoglobina foi feita antes das placas serem colocadas nas soluções de coloração, sem a utilização de qualquer corante.

A identificação e separação das muitas variantes da G6PD exige a utilização de métodos bioquímicos variados, padronizados pela W. H. O., o que não foi feito. Por isso, o estudo apenas electroforético que só permite a detecção da mobilidade electroforética e da quantidade de enzima de uma forma qualitativa (a

(2) Tris (hydroxymethyl) methylamine.

QUADRO I

VARIÁVEL		ESTADO	ESTADO	ESTADO	ESTADO	ESTADO	ESTADO
Nº	NOME/CÓDIGO	1	2	3	4	5	0
1	SEXO <hr/> SEXO	feminino	mascul.	—	—	—	—
2	NATURALIDADE <hr/> NATUR	de Coimbra	de fora de Coimbra	—	—	—	—
3	GRUPO SANGUÍNEO DA MÃE <hr/> GRUP-M	grupo O	grupo A	grupo B	grupo AB	—	não determinado
4	GRUPO SANGUÍNEO DO FILHO <hr/> GRUP-F	grupo O	grupo A	grupo B	grupo AB	—	não determinado
5	Rh DA MÃE <hr/> Rh - M	Rh positivo	Rh negativo	—	—	—	não determinado
6	Rh DO FILHO <hr/> Rh - F	Rh positivo	Rh negativo	—	—	—	não determinado
7	QUANT. DE HEMOGLOBINA NO SANGUE (g/dl) <hr/> % Hb	alterada Hb > 21 Hb < 17	não alterada Hb=19 [±] 2	—	—	—	não determinado
8	NÚMERO DE ERITRÓCITOS NO SANGUE (10 ¹² /l) <hr/> % ERIT	alterado Erit < 4.5 Erit > 5.5	não alterado Erit=5 [±] .5	—	—	—	não determinado

QUADRO I (cont.)

VARIÁVEL		ESTADO	ESTADO	ESTADO	ESTADO	ESTADO	ESTADO
Nº	NOME/CÓDIGO	1	2	3	4	5	6
9	QUANT. DE BILIRRUBINA NO SANGUE (mg) BILI	mais de 20mg	entre 10 e 20mg	menos de 10mg	—	—	não determinado
10	PERIODO EM QUE A BILIRRUBINA ESTEVE ALTERADA PERVAR	mais de 2 dias	menos de 2 dias	não esteve alterada	—	—	não determinado
11	FENÓTIPOS DA G6PD FEN - G6PD	G ^B 100% act 100% mig	G ^B >100% act 100% mig	G ^{med} 0-7% act 100% mig	G ^A ± 100% act 110% mig	G ^{A-} 30% act 110% mig	—
12	FENÓTIPOS DA AcP FEN - AcP	fen. AB	fen. BC	fen. B	fen. A	fen. AC	não determinado
13	DADO CLÍNICO CITADO NO PEDIDO DE HEMOGRAMA RAZ HEM	ictérico	não ictérico	—	—	—	não fornecido
14	ÓBITO MORTE	morreu	não morreu	—	—	—	—
15	RAÇA RAÇA	branca	negra ou mestiça de negra	—	—	—	—

apreciação comparativa da actividade da enzima na placa de gel foi tomada como índice qualitativo da quantidade de enzima), leva a uma classificação pouco segura das variedades encontradas. No intuito de minimizar os erros experimentais na apreciação da actividade da enzima, testou-se a diluição do hemolizado.

Para a análise estatística utilizaram-se os métodos Regressão Múltipla e «Multidimensional Scaling» (MDS), ambos de análise multivariada. A regressão múltipla feita pelo método de «Stepwise Multiple Regression», selecciona o grupo de K variáveis (independentes) que melhor explica o comportamento de uma determinada variável (dependente). Para tal, adiciona ou subtrai variáveis à equação de regressão, de acordo com a sua contribuição para a soma dos quadrados na equação da regressão, que deve ser minimizada (MATHER, 1976). O critério usado na admissão de novas variáveis foi o teste t, de hipótese nula, considerando nulo o valor do coeficiente de regressão parcial na população. O «Multidimensional Scaling» tem por objectivo encontrar uma representação geométrica compacta que reflecta com precisão suficiente uma relação de ordem que possa ser estabelecida entre as distâncias, semelhanças ou associações, da matriz original e as distâncias euclidianas entre os pontos no modelo MDS⁽³⁾.

As variáveis podem ser divididas em dois grupos: aspectos clínicos, possivelmente relacionados com a deficiência de G6PD e factores com os quais se quiseram relacionar os fenótipos de G6PD e AcP₁. Devido à natureza descontínua dos dados (variáveis discretas) a interpretação dos processos de análise é sujeito a reservas. Por falta de dados, apenas 38 dos 198 indivíduos testados electroforeticamente, foram analisados estatisticamente.

RESULTADOS

AcP₁

Observaram-se 5 fenótipos diferentes para esta enzima baseados na diferença de migração, presença ou ausência das três bandas detectadas e na variação quantitativa de cada uma delas. A definição das bandas era deficiente. O padrão encontrado diferiu do usualmente descrito para esta enzima (HOPKINSON & HARRIS, 1969).

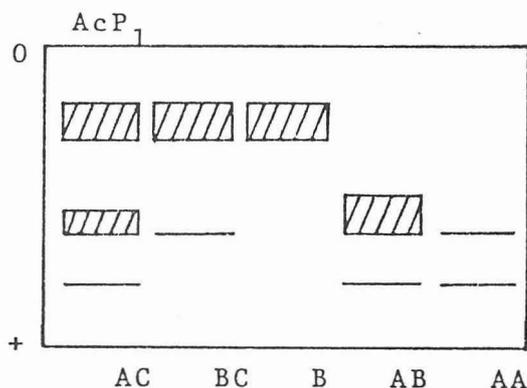


FIGURA 2 — Fosfatase ácida: os cinco fenótipos encontrados em gel de acrilamida

⁽³⁾ Todas as adaptações aos programas originais de MATHER (1976) foram efectuados pelo Dr. HORST ENGELS.

FENÓTIPOS	OBTIDOS		ESPERADOS	
	NÚMERO	%	NÚMERO	%
A	21	19.6	17.60	16.4
AB	39	36.4	44.2	41.3
B	29	27.1	27.7	25.9
CA	6	5.6	7.2	6.7
CB	12	11.2	9.1	8.5
C	0	0	0.75	0.75
TOTAL	107	100	107	100

QUADRO II — Distribuição fenotípica da enzima AcP₁ e acordo com os resultados esperados segundo a lei de HARDY-WEINBERG

$$X^2 = 3.5 \quad G.L. = 3$$

$$0.20 < P < 0.50$$

G6PD

Os padrões encontrados dependeram da concentração de acrilamida do gel separador, da concentração de β -mercaptoetanol no tampão hemolizante e do tempo de armazenamento da amostra. Quando a concentração de acrilamida e de β -mercaptoetanol eram aumentadas simultaneamente, cada banda subdividia-se em 3 bandas. O aumento do tempo de armazenamento da amostra teve o efeito contrário: ausência de subdivisão das bandas mesmo verificadas as condições anteriores.

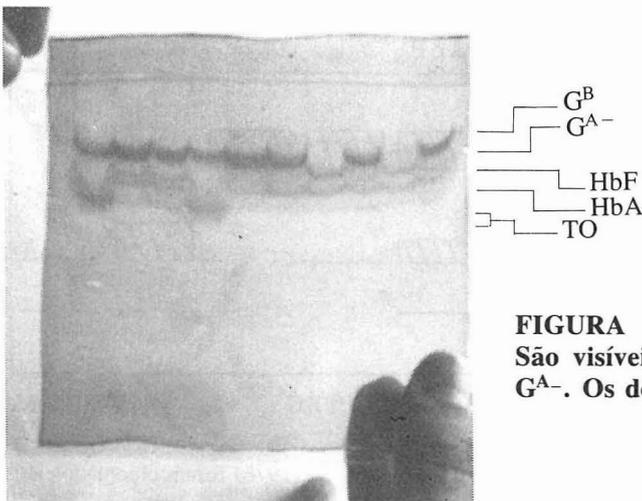
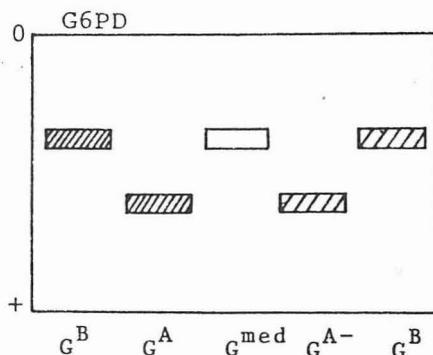


FIGURA 3 — Zimograma da G6PD. São visíveis na placa os fenótipos G^B e G^{A-}. Os dois indivíduos G^{A-} são gémeos univitelíneos

FIGURA 4 — Desidrogenase da Glucose-6-Fosfato: os cinco fenótipos encontrados em gel de acrilamida



A determinação das frequências genéticas é feita considerando apenas os indivíduos do sexo masculino (107 dos 198 testados) uma vez que o locus da enzima se encontra no cromossoma X.

FENÓTIPOS	N	%
G^B	102	96
G^{med}	2	2
G^A	1	1
G^{A-}	1	1
TOTAL	106 (*)	100

QUADRO III — Distribuição fenotípica da enzima G6PD

(*) Foi considerado apenas um dos gémeos univitelinos de genótipo G^{A-} .

TO

Não foram encontradas variantes na população estudada. A enzima apresentou duas bandas acrómicas.

HB

Uma vez que o trabalho foi elaborado com crianças recém-nascidas, a hemoglobina mais frequente foi a do tipo F seguida pela do tipo A. Foi identificado apenas um indivíduo do tipo S.

Na análise estatística apenas se relacionaram os fenótipos das enzimas AcP₁ e G6PD com outros dados.

QUADRO IV — Resultados do «Stepwise» para a variável dependente G6PD

Iteração	Variável adicionada	% da variância explic.	Soma dos quadrados expl.	Desvio padrão	F / G.L.
1	MORTE	48.4	10.0	0.55	32.8 / 1;35
2	GRUP-F	52.1	10.8	0.54	18.5 / 2;34
3	Rh-M	55.0	11.4	0.53	13.4 / 3;33
4	FEN-AcP	56.9	11.8	0.52	10.5 / 4;32
5	NATUR	59.8	12.5	0.51	9.2 / 5;31
6	PERVAR	61.1	12.7	0.51	7.8 / 6;30
7	BILI	61.4	12.8	0.52	6.6 / 7;29
8	GRUP-M	61.9	12.9	0.53	5.7 / 8;28
9	Rh-F	62.2	12.9	0.54	4.93 / 9;27
10	RAÇA	62.3	13.0	0.55	4.34 / 10;26

À 11.^a iteração, a variável «SEXO» foi adicionada mas o valor do F parcial foi não significativo ($p > 0.05$). Esta variável não foi aceite e o processo foi terminado (o valor de F serve apenas como critério de admissão, não sendo as probabilidades correctas).

QUADRO V — Resultados do «Stepwise» para a variável dependente AcP₁

Iteração	Variável adicionada	% da variância explic.	Soma dos quadrados expl.	Desvio padrão	F / G.L.
1	NATUR	9.38	10.02	1.66	3.62 / 1;35
2	FEN-G6PD	16.28	17.39	1.62	3.3 / 2;34
3	GRUP-F	19.15	20.45	1.62	2.6 / 3;33
4	GRUP-M	21.01	22.44	1.62	2.1 / 4;32
5	MORTE	22.45	23.55	1.63	1.8 / 5.31
6	PERVAR	23.36	24.96	1.65	1.7 / 6;30
7	Rh-M	24.12	25.75	1.67	1.5 / 7;29
8	%ERIT	25.32	26.98	1.69	1.3 / 8;28
9	%Hb	28.11	30.02	1.69	1.2 / 9;27
10	BILI	28.42	30.36	1.70	1.0 / 10;26
11	Rh-F	29.03	31.01	1.74	0.9 / 11;25

À 12.^a iteração, a variável «SEXO» foi adicionada mas como não possuía um valor de F parcial significativo foi, seguidamente, retirada. O processo terminou aqui (tal como foi dito na tabela anterior, o valor de F serve apenas como critério de admissão).

Os resultados da análise por «Multidimensional Scaling» não permitiram uma análise coerente. O «stress» calculado foi muito elevado, mostrando haver grande distorção nos dados representados a três dimensões. Por este motivo, não se justifica referir mais detalhadamente os resultados deste método.

DISCUSSÃO

Apesar do padrão electroforético da enzima AcP₁ não corresponder ao normalmente encontrado em gel de amido, os electromorfos detectados coraram com o substracto específico para a enzima e o seu padrão repetiu-se ao longo de

todo o trabalho ⁽⁴⁾. No entanto, não se poderão realizar comparações rigorosas com outros estudos, invariavelmente executados em gel de amido (AMORIM, 1983; BOTTINI & MODIANO, 1965). Para o padrão encontrado poderá ter contribuído tanto o gradiente de três geles como o tampão básico (escolhidos por serem os únicos onde foi possível visualizar os electromorfos). As dificuldades encontradas na identificação dos fenótipos da AcP₁ pouco diferem das referidas por outros autores citados por SORENSEN em 1973 ⁽⁵⁾.

De referir a difícil impressão fotográfica, consequência da cor rosa das bandas. Como resultado das dificuldades técnicas, é possível que alguns indivíduos classificados como sendo do tipo A (coloração pouco intensa), sejam do tipo AB, cuja banda se situa ao mesmo nível, mas apresentando maior actividade. No sentido de minorar estes problemas, os trabalhos mais recentes utilizam preferencialmente 4-metilumberiferil, sendo a visualização feita à luz ultravioleta (AMORIM, 1983). As frequências fenotípicas de AC e de B são concordantes com as esperadas segundo a lei de HARDY-WEINBERG, enquanto que as frequências referentes aos fenótipos A e AB estão alteradas (possivelmente consequência da deficiente leitura).

QUADRO VI — Frequências genéticas da enzima AcP₁

Amostra	N	P _a	P _b	P _c	Referência
Vide mapa A	107	0.407	0.509	0.084	—
Distritos de Aveiro, Coimbra e Leiria	82	0.238	0.707	0.055	AMORIM, 1983

As frequências genótípicas estão de acordo com as esperadas mas diferem significativamente das encontradas por AMORIM (1983) para uma região semelhante (na comparação dos dados utilizou-se o método estatístico de «Maximum Likelihood» num programa de MACCLUER, 1976 ⁽⁶⁾).

⁽⁴⁾ Houve indivíduos testados várias vezes ao longo do trabalho, apresentando sempre o mesmo padrão.

⁽⁵⁾ «GIBLETT e SCOTT (1965), dizem poder ser o fenótipo AB interpretado como fenótipo do tipo A, uma vez que a única diferença entre estes dois fenótipos é uma zona de baixa actividade entre duas bandas, encontrada no fenótipo AB. HOPKINSON et al. (1963) refere que esta zona de baixa actividade pode aparecer ocasionalmente, no fenótipo A. BRINKMAN e REICH (1967) observaram que a tênue isoenzima do fenótipo AB, pode não ser detectada caso o hemolizado seja muito diluído, resultando uma classificação errada (o fenótipo AB é classificado como sendo do tipo A). FIEDLER (1967) refere ainda que uma incubação mais longa pode resultar numa intensificação das zonas mais ténues dos fenótipos B e C, de tal modo que eles podem ser classificados como sendo do tipo CB».

⁽⁶⁾ Adaptado por A. ABADE.

QUADRO VII — Frequências genéticas da enzima G6PD

Amostra	N	G ^B (*)	G ^{med}	G ^A	G ^{A-} (**)
Vide mapa A	198	0.96	0.02	0.01	0.01

(*) Estão incluídos os indivíduos B com menos enzima.

(**) Para o cálculo das frequências foi apenas considerado um dos gémeos.

Para a enzima G6PD o padrão electroforético demonstrou a alta resolução do método utilizado. O aparecimento de três bandas em vez de uma só, corresponde à visualização de confórmeros da enzima (CROSTI & CAGIANO-MALVEZZI, 1974), dímeros com diferentes quantidades relativas de NADP. Este padrão de três bandas pode ser alterado para duas ou para uma devido à oxidação dos grupos tiol da enzima com perda de moléculas de NADP a ela ligadas (BONSIGNORE, 1970; CANCEDDA, 1973; YOSHIDA, 1970). O β -mercaptoetanol anula o efeito de oxidação dos grupos tiol provocado pelo processo de armazenamento. Por esta razão, a quantidade de β -mercaptoetanol e o período de armazenamento modificaram o padrão electroforético da enzima. A quantidade de cada confórmero no sangue pode ser diferente de indivíduo para indivíduo, no final da electroforese. No entanto, esta diferença não parece ter significado genético. O fenótipo vulgarmente detectado na população estudada foi o tipo G^B. Numa tentativa de identificação dos fenótipos encontrados, que permitisse um estudo de caracterização genética da população, foram tomados em consideração os seguintes factores: inclusão de Portugal nos países com deficiência enzimática do tipo negro (MOTULSKY, 1960); dados fornecidos pela W.H.O. (1967) que admite para Portugal 1% de deficientes do tipo G^{med}; serem estes fenótipos facilmente diferenciáveis sobre a placa electroforética (SÉGER et al., 1981). Os fenótipos encontrados, classificados considerando esta informação, são os referidos na figura 3. É possível que mulheres, consideradas como tendo o fenótipo G^B mas apresentando menor quantidade de enzima, sejam heterozigóticas para o alelo G^{med} (FERRARIS, 1981). O número e o tipo de variantes encontradas confirma a única frequência determinada para a população portuguesa: presença do alelo G^{med} (característico da população mediterrânea) e os alelos G^A e G^{A-} (característicos da população negra, relacionados com uma melhor resistência à malária — presente até há pouco na população estudada). No estudo da correlação, a variável «morte» foi a que melhor explicou a variação da «fen-G6PD» (48% da variância). A justificação parece ser a morte de dois dos três deficientes de G6PD. Estas duas variáveis apresentam correlação negativa, consequência de ter sido atribuído índice mais alto aos fenótipos deficientes de G6PD e o índice 1 à variável «morte» enquanto que ao normal foi atribuído índice 2. Outros autores tentaram já estudar a correlação existente entre a presença de determinados

QUADRO VIII — Resultados da comparação das frequências genéticas da AcP₁ encontradas em dois estudos diferentes

ALELO	PARCIAL	GRAU DE LIBERDADE	PROBABILIDADE
P ^a	10.596	1	0.001
P ^b	9.087	1	0.001
P ^c	0.288	1	0.50 < P < 0.70
TOTAL	12.899	2	0.001

O χ^2 encontrado corresponde a uma probabilidade menor que 0.001 o que quer dizer que as frequências encontradas diferem (descritas na tabela VIII).

(*) Esta tabela foi elaborada utilizando o programa «CHIFRE» (MACCLUER, 1967), adaptado por AUGUSTO ABADE.

fenótipos da G6PD e os grupos sanguíneos (LUZZATTO e ALLAN, 1968) não tendo encontrado relação. No entanto, as variáveis que se seguiram na explicação da variação dos fenótipos da G6PD foram os grupos sanguíneos dos filhos (ABO) e depois o Rh das mães. Esta correlação pode estar viciada pela atribuição do valor zero aos indivíduos sem informação. Com este grupo de variáveis, aquela que se seguiu como melhor explicativa foi a variação dos fenótipos da AcP₁, com correlação positiva (correspondência entre os fenótipos A e AC da AcP₁ e as variantes da G6PD). Esta correlação já tinha sido estudada por BOTTINI et al. (1971), tendo encontrado uma relação entre o alelo A da AcP₁ e o alelo G^{med} da G6PD. No entanto, SØRENSEN (1973) refuta esta correlação assim como a justificação dada. Os nossos dados não possibilitam uma análise segura, não nos permitindo apoiar ou refutar qualquer das duas posições.

A enzima TO não apresenta variação em toda a população, mostrando mais uma vez ser este locus bastante estável.

A presença de hemoglobina S em Portugal já é referida pela W.H.O. (1967) e justifica-se pela presença até há pouco tempo de focos de malária.

Como conclusão final, poder-se-á dizer que a incidência de deficientes em G6PD atinge um valor que justifica a sua importância clínica, e teria todo o interesse o estudo desta enzima na população. O conhecimento mais profundo da estrutura genética da população terá, por si só, interesse clínico e antropológico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Horst Engels a orientação, ao Dr. Milton Costa o apoio prestado assim como ao Dr. Euclides Pires a revisão e crítica deste trabalho. Agradeço ainda ao Hospital Pediátrico de Coimbra o fornecimento das amostras e ao Laboratório Antropológico de Coimbra a utilização das instalações e do material, bem como a todos os que contribuíram para que este trabalho fosse possível.

BIBLIOGRAFIA

- AMORIM, et al., 1979 — *AcP₁ polymorphism in Azores*. «Trab. Inst. Antrop. Fac. Ciências Porto», 35, p. 1-5.
- AMORIM, A. M., 1983 — *Contribuição para o conhecimento da genética humana. Estudos de genética bioquímica formal e populacional e de ligação factorial*. Dissertação de doutoramento em Biologia apresentada à Fac. Ciênc. Univ. Porto.
- BONSIGNORE, A. et al., 1970 — *Distinctive patterns of NADP binding to dimeric and tetrameric G6PD from human red cells*. «Biochim. Bioph. Res. Comm.», 39, p. 142-148.
- BOTTINI, E.; MODIANO, G., 1965 — *Acid phosphatase and hemoglobin in normal and G6PD deficiency erythrocytes incubated with acetylphenylhydrazine under various conditions*. «Experientia», 21, p. 379-381.
- BOTTINI, E. et al., 1971 — *Favisme: association with erythrocyte acid phosphatase phenotype*. «Science», 171, p. 409-411.
- BREWER, G. J., 1967 — *Achromatic regions of tetrazolium stained starch gels: inherited electrophoretic variation*. «Am. J. Hum. Genet.», 19, p. 647-680.
- CANCEDDA, R. et al., 1973 — *Genetics variants of human erythrocyte G6PD; discrete conformational states stabilized by NDAP and NADPH*. «Eur. J. Biochem.», 34, p. 199-204.
- CLARKE, C. A., 1972 — *Human genetics and Medicine*. «Studies in Biology», n.º 20.
- CROSTI, N.; CAGIANO-MALVEZZI, D., 1974 — *On acrylamide disc electrophoresis pattern of human G6PD*. «Biochem. Genet.», 11(4), p. 295-300.
- CRUZ, J. et al.; 1973 — *Genetics studies of some red cell and serum protein polymorphisms in the population of Vilarinho da Furna (Portugal)*. «Trab. Inst. Antrop. Fac. Ciências Porto», 15, p. 1-15.
- FERRARIS, A. M. et al., 1981 — *2-Deoxy-G6P utilization in the study of G6PD mosaicism*. «Am. J. Hum. Genet.», 33, p. 307-313.
- HAILLES, A. M. et al., 1962 — *G6PD deficiency screenig in Madeira*. «Hum. Biology», 34, p. 206-213.
- HOPKINSON, D. A. et al., 1963 — *Red cell acid phosphatase variants: a new human polymorphism*. «Nature», 199, p. 969-971.
- HOPKINSON, D. A.; HARRIS, H., 1969 — *Red cell acid phosphatase, phosphoglucomutase and adenylate kinase, in Biochemical Methods in Red Cell Genetics* — J. J. Yunis, ed. New York, Academic Press, Inc., p. 337-353.
- JACOBS, M.; SCHWIND, F., 1975 — *Biochemical genetics of Arabidopsis acid phosphatases: polymorphism, tissue expression and genetics of AP₁, AP₂ and AP₃ loci. IV Isozymes*, in Genetics and Evolution — C. L. Markert, ed. London, Academic Press, p. 349-369.

- LAM, K. W. et al., 1978 — *Tartrate-resistant (band 5) acid phosphatase activity measured by electrophoresis on acrylamide gel.* «Clin. Chem.», 24, p. 309-312.
- LUZZATTO, L.; ALLAN, N. C., 1968 — *Relationship between the genes for G6PD and for hemoglobine in Nigerian population.* «Nature», 209, p. 1041-1042.
- MATHER, P. M., 1976 — *Computational methods of multivariate analysis in Physical Geography.* London, John Wiley & Sons, ed.
- MOTULSKY, A. G., 1960 — *Metabolic polymorphisms and the role of infections diseases in human.* «Hum. Biology», 32, p. 28-62.
- ORNESTEIN, L.; DAVIS, B., 1964 — *Disc electrophoresis.* «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 121, p. 321-349.
- SÉGER, J.; LUCOTTE, G., 1981 — *La pratique de l'électrophorèse appliquée a la détection des polymorphismes humains.* Paris, Masson, ed.
- SENSABAUGH, G. F., 1975 — *Genetic and non-genetic variation of human acid phosphatase. Isozymes I,* in *Molecular Structure* — C. L. Market, ed. New York, Academic Press, p. 367-380.
- SØRENSEN, S. A., 1973 — *Human red cell acid phosphatase polymorphism — population and family studies in Denmark.* «Human. Hered.», 23, p. 470-481.
- W.H.O. Scientific Group, 1967 — *Standardization of procedures for the study of G6PD.* «W.H.O. Reports Series», n.º 360.
- YOSHIDA, A.; HOAGLAND, V. D., 1970 — *Active molecular unit and NADP content of human G6PD.* «Biochem. Biophys. Res. Com.», 40, p. 1167-1172.