

MESA REDONDA: HEMOGLOBINOPATÍAS

Epidemiología da drepanocitose em Portugal. Alguns dados***

MARIA DO CARMO MARTINS* y JOÃO LAVINHA**

INTRODUÇÃO. OBJECTIVO

A nosa abordagem para o estudo da epidemiologia da drepanocitose em Portugal baseou-se, até aqui, na determinação da prevalência de genes β^S na população autoctone e em grupos de imigrados das antigas colónias, nomeadamente caboverdeanos; uma outra abordagem, a partir dos doentes existentes, será em breve efectuada de forma mais sistemática, embora aqui tenhamos hoje oportunidade de tirar ilacções de caracter epidemiológico a partir de dados da análise molecular a nível de 49 cromossomas com a mutação β^S .

O presente trabalho decorre em ligação com o Programa Nacional de Controle das Hemoglobinopatías (PNCH) (Cooperação Portugal Organização Mundial de Saúde) que, no seu grupo executivo envolve Técnicos do Sistema de Cuidados de Saúde, Primários e Diferenciados, a assegurarem a coordenação e o impulso para quanto vem sendo desenvolvido no âmbito da prevenção, do tratamento dos doentes e da investigação. O PNCH sedia-se no Instituto Nacional de Saúde e este trabalho envolveu dois dos seus laboratórios, o de Química Clínica. Hematologia e o de Genética Humana.

Como objetivo pretendemos mostrar-vos:

— Os dados da prevalência de genes β^S na população autoctone e na população de imigrados das antigas colónias;

— Que os haplotipos ligados à mutação β^S em alguns dos doentes drepanocíticos já estudados são os que se encontram na África e que, por certo a drepanocitose veio para Portugal, fundamentalmente, após os descobrimentos portugueses, embora aqui tenha encontrado condições de ambiente favoráveis à sua disseminação;

— Que os nossos estudos da drepanocitose a nível molecular, inserindo-se em estudo de colaboração com outros países, procuram coadjuvar no contributo que se procura para a compreensão da marcada heterogeneidade clínica e biológica de que a doença se reveste em relação com uma única lesão molecular.

OS GENES β^S NA POPULAÇÃO PORTUGUESA E EM GRUPOS DE IMIGRADOS DAS ANTIGAS COLÓNIAS

Sabemos, por numerosos trabalhos anteriormente publicados, que os genes β^S

* Laboratório de Química Clínica e Hematologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

** Laboratório de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

*** IV Reunión de las Sociedades de Pediatría de Portugal, Galicia, Asturias, Cantabria, Castilla y León. Salamanca 10-11 noviembre, 1989.

existem na população portuguesa autoctone e na população proveniente das colónias, em extensão até há pouco desconhecida. (1), (2), (3), (4), (5).

Na população autoctone é evidente a influência dos dois factores condicionantes seguintes:

— O paludismo que os seleccionou uma vez que os seus portadores a eles são resistentes (6);

— As imigrações nomeadamente as verificadas após os descobrimentos portugueses que, da África tropical e da Índia, trouxeram os genes da drepanocitose para o território português.

Na população das antigas colónias, nomeadamente de Cabo Verde, a mais numerosa comunidade de imigrantes, a proveniência dos genes é da África, e neste caso das regiões em frente destas ilhas, onde se situam o Senegal, a Guiné Bissau, a Guiné Conakry e a Mauritània, coincidentes com a mancha da mais alta prevalência para a drepanocitose naquele continente (7) e de onde são originárias a maior parte das gentes que colonizaram aquele arquipélago de Cabo Verde, deserto quando ali chegaram os portugueses, no Século XV.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra populacional

Amostra da população autoctone. Para obtenção de amostra aleatória e representativa da população efectuámos colheitas aos mancebos a incorporar no serviço militar (obrigatório em Portugal) e nos 3 centros de recrutamento a tal destinados, total de 16.191 jovens, todos nascidos em território português.

Amostra da população caboverdiana. Efectuámos sensibilização prévia da população caboverdiana para o problema

da drepanocitose, com auxílio da Associação Caboverdiana e por distribuição de folhetos alusivos. Até ao momento colheimos sangue, nos residentes da área de 3 centros de Saúde em Lisboa, a 636 indivíduos que, voluntariamente, acorreram aos centros de colheitas para tal montados.

Para os estudos a nível molecular usámos DNA extraído de doentes SS e S/ β th, como tal perfeitamente caracterizados.

Métodos laboratoriais

Determinações hematológicas e electroforeses. As determinações hematológicas foram efectuadas em aparelho Coulter S 8 - 90.

Como exame preliminar para detecção de hemoglobina S usámos electroforese em acetato de celulose pH = 8,4; nos casos suspeitos de hemoglobina S efectuámos a confirmação por electroforese em citrato agar, pH = 6,2, realizámos estudo de insolubilidade e observação do fenómeno de falciformação.

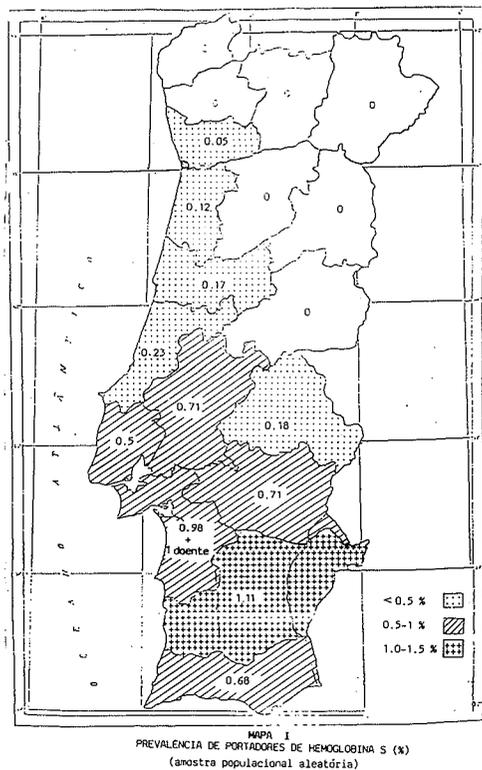
Separação das cadeias. Efectuada segundo Baudin e Wajcman (8) no laboratório deste último, em Paris.

Determinação dos haplotipos e genotipo β globina. O DNA do sangue periférico (9, 10) foi digerido com as enzimas de restrição Apa I, Ava II, Bal I, Bam HI, Bgl II, Hinc II, Hind III e Rsa I nas condições recomendadas pelo fabricante. Os fragmentos resultantes foram separados por electroforese em gel de agarose e transferidos para membrana de nylon (11, 12).

Foram usadas sondas moleculares marcadas com ^{32}P específicas dos genes da α , β , δ , ψ , β , γ , ϵ e ζ globinas e o resultado da hibridação visualizado por autoradiografia (13).

RESULTADOS E COMENTÁRIOS

Para a população portuguesa autoctone os dados da prevalência de genes β^S constam do mapa I, sendo notório que os números mais altos se situam nos distritos de Beja, Setúbal, Évora, Santarém, Faro e Lisboa (entre 0,5 - 1,5 %). São muito baixos (< 0,5 %) nos distritos de Portalegre, Leiria, Coimbra e Porto, para serem mesmo iguais a zero nos restantes.



os dados obtidos nos estudos de prevalência para β^S mostram números idênticos nos distritos do Sul, Évora, Setúbal, Faro, Beja, acrescidos dos de Leiria, Santarém, Castelo Branco e Coimbra (0,5 - 50 %), enquanto Lisboa se junta aos distritos com prevalência < 0,5 % para ha-

ver ainda alguns outros em que esses valores são de zero. Combinando os dados referidos no mapa I, com os agora mencionados para β^S e assumindo que a amostra estudada foi aleatória, circunstância que se não verifica nos cruzamentos, o número possível de formas major de drepanocitose ou talassémia deve andar pelos 5/ano.

Os fenómenos migratórios do passado já referidos, explicam, perfeitamente, os dados obtidos respeitando a maior prevalência na região Sul do País e mesmo nos distritos de Santarém, Lisboa, Coimbra, Leiria e Castelo Branco. Nesta região se fixaram predominantemente os gregos, os romanos, os árabes (que certamente veicularam genes de β^S) e mais tarde, após os descobrimentos, os escravos negros que, face ao paludismo que entre nós grassou com especial incidência nos vales dos Rios Sado, Guadiana, Tejo e Mondego, melhor resistiam às fainas agrícolas relacionadas com a cultura do arroz, entretanto aí introduzida.

Mas no passado como no presente novos genes β^S continuam a entrar no País oriundos sobretudo, de regiões da África onde a drepanocitose atinge altas frequências. Como referi a comunidade caboverdiana é a mais numerosa e diferentes de todas as outras vindas das antigas colónias. Calcula-se em cerca de 60.000 os indivíduos que trabalham em Portugal e daqui se encaminham para outros Países europeus. Os resultados nesta comunidade, tomada como exemplo das que nos vêm da África, encontram-se no mapa II (Tabla I) e podemos ver que é alta a frequência de genes β^S , 7,86 %.

O n.º previsível de doentes/ano, (SS), nesta comunidade é de 2, o que, com os 5 previstos para drepanocitose e talassémia na população autoctone, significaria um gasto correspondente a 180.000 contos pa-

ra uma esperança de vida média de 35 anos, assumindo, de acordo com dados internacionais, que o tratamento de 1 talassémia major custa 1.300 contos e o de um doente com drepanocitose 420 contos por ano. Se juntarmos a estes dados os problemas psicológicos, familiares e sociais que cada doente representa e não são quantificáveis em escudos, facilmente compreendemos que, nas regiões do País citadas e na comunidade de imigrantes de África, tem justificação o Programa instituído para o controle das mais importantes hemoglobinopatias, talassémia e drepanocitose.

TABLE I. RASTREIO DE HEMOGLOBINOPATIAS. GENOTIPOS EM 636 INDIVÍDUOS CABOVERDIANOS RESIDENTES EM LISBOA (1988)

GENOTIPO	NÚMERO	(%)
A A	581	(91.36)
A S	50	(7.86)
A J	2	(0.31)
J S	2	(0.31)
S S	1	(0.16)

Os dados da prevalência de genes β^S na população portuguesa autoctone e nos grupos de imigrados dos países africanos de expressão oficial portuguesa, na justificação histórica e de condições ambientais em Portugal desde o Século XV, são hoje comprovados pela Biologia Molecular que mostra, nos nossos doentes, polimorfismos semelhantes aos que ocorrem em África.

Dado importante, sem dúvida, como interesse epidemiológico, histórico, e antropológico a significar que a drepanocitose em Portugal chegou fundamentalmente por via marítima após os descobrimentos

portugueses. Para lá desta achega estamos ainda a procurar contribuir, com o estudo já efectuado de alguns dos nossos doentes, para ajudar a esclarecer a variabilidade clínica e de prognóstico na drepanocitose onde uma única mutação a nível da posição 6 da cadeia β da globina com substituição de um aminoácido polar, o glutâmico, por um não polar, a valina, arrasta, dramaticamente, os fenómenos de insolubilidade que conhecemos, quando em hipóxia.

Decorrem os trabalhos segundo esta linha em ligação com a Dr.^a D. Labie da Unidade N.^o 15 do INSERM, Hospital Cochin Port Royal em Paris, impondo-se, todavia, a análise de grande número de casos para correlacionar os achados laboratoriais, hematológicos e da Biologia Molecular, com os da clínica, para o que existe o denominado dossier de vigilância da criança drepanocítica (colaboração com a França, Grécia, Argélia e outros na região mediterrânica). Na verdade, dentre os factores capazes de modelarem beneficemente a lesão drepanocítica os dois seguintes parecem sobressair (14, 15, 16):

— Acção epistática devida a genes ligados aos das cadeias da β globina, no cromossoma 11 ou dos que comandam a síntese da α globina, no cromossoma 16, sendo relativamente frequentes as α talassémias nas regiões onde grassa a drepanocitose e cujo efeito benéfico provirá de uma diminuição da concentração da hemoglobina intraerocitária;

— Acção da hemoglobina fetal que intervem, admite-se, como diluidor e portanto com certa acção de inibição da polimerização, e da falciformação e em que as cadeias γ G, quando em maior proporção nessa hemoglobina fetal, teriam papel de melhor prognóstico.

Demostro-se que existem 3 tipos importantes de haplotipos ligados à hemoglobina S em África e um quarto na Índia

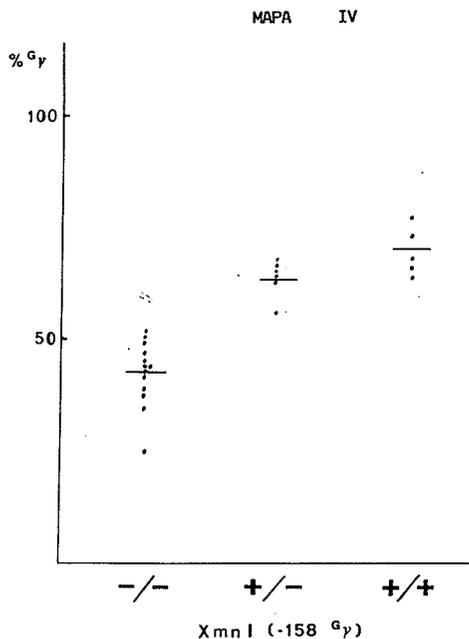
e no Golfo Pérsico (17). Os africanos têm o nome da região onde são dominantes: Senegal, Benim, Bantos.

Estes haplotipos correspondem a 11 sítios de polimorfismos e 2 são particularmente importantes: um, XmnI, na posição - 158 em 5' do gene γ G e um outro sítio, Taq I, entre os genes γ G e γ A.

Este último parece ter interesse antropológico pois se encontra associado exclusivamente ao tipo Benim, enquanto o XmnI está relacionado com a expressão da hemoglobina fetal e um aumento quantitativo em resposta ao estímulo eritropoiético da anemia, com predomínio das cadeias γ G sobre as γ A encontra-se nos haplotipos do Senegal e da Índia, onde a relação γ G/ γ A é do tipo neonatal (3/1), de melhor prognóstico; nos outros haplotipos, Benim e dos Bantos, a proporção é a comum nos adultos (γ G/ γ A de 2/3).

Com base nestes conhecimentos o estudo dos polimorfismos de restrição em 49 cromosomas distribuídos por Portugal, Cabo Verde, S. Tomé e Príncipe, e Angola, provenientes de doentes SS ou β^S / β^{th} , verificou-se (mapas II e III); (Tablas I y II).

— Que os doentes angolanos, n = 23, são homozigotos para o haplotipo Banto, XmnI -/- e apresentam níveis de γ G globina compreendidos entre 35 e 50 %;



— Que os caboverdianos, n = 10, são homozigotos para haplotipo do Senegal

TABLA II. DATOS DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y ASOCIACIÓN CON α TALASEMIA

POBLACIÓN	N.º DE CROMOSOMAS ESTUDIADOS	B ^S HAPLOTIPOS			α TALASEMIA	
		SENEGAL	BENIN	BANTU	N.º DE CROMOSOMAS ESTUDIADOS	- $\alpha^{3,7}$, TIPO I
Portugal	10	2	—	8	12	1
Cabo Verde	10	8	2	—	10	1
S. Tomé	6	—	2	4	6	2
Angola	23	—	—	23	24	3
TOTAL	49	10	4	35	52	7
%	100	20	8	71	100	13

ou compostos Senegal/Benim e apresentam 63 a 73 % de γ G globina;

— Que os santomenses são homo ou heterozigotos para os tipos Banto e Benim (γ G idêntica aos angolanos, XmnI -/-);

— Que nos portugueses apareceram, até agora, os haplotipos dos Bantos e Senegal.

Em relação com os haplotipos β^S citados encontraram-se 7 casos de α talassémia deleccional direita de 3,7 Kh, a que, efectivamente corresponde melhor prognóstico.

CONCLUSÕES

A prevalência de genes β^S na população portuguesa autoctone não é muito grande embora tenha valores significativos em certos distritos do Sul do País em relação ali, principalmente, com as mais altas frequências de paludismo no

passado (vales dos Rios Sado, e Guadiana) e com o estabelecimento de escravos negros. Estes, embora se tenham disperso pelo País, estabeleceram-se principalmente a Sul do Rio Tejo, (única excepção: Leiria).

Os polimorfismos β^S encontrados nos drepanocíticos portugueses mostram que eles estão em relação com os existentes em África, admitindo-se que após os descobrimentos portugueses se tenha verificado o afluxo de genes da drepanocitose.

A drepanocitose como problema de minorias oriundas de África, existe em Portugal como o atestam os dados referidos para a comunidade caboverdiana.

Os resultados até aqui encontrados para a relação γ G/ γ A e a presença de α talassémia estão em relação com os achados internacionais que o consideram como indicadores válidos de prognóstico da doenças.

BIBLIOGRAFIA

1. RIBEIRO DO ROSÁRIO, M., *et al.*: *Nosografia da Hemoglobina S em Portugal Continental*, Gazeta Médica Portuguesa, 1958; 5: 541-554.
2. MELO, J. M.: *Comentários acerca de la difusión de la hemoglobina S in Portugal y probablemente en la Península*. Sangre, 1966; 11: 383-394.
3. MELO, J. M., TRINÇÃO, C.: *«L'anémie a cellules falciformes au Portugal. Resultats d'une enquête faite sur 3 communes du district de Beja. Comunicazione presentata alle Giornale di studio sulla microcitemia. Ferrara 23-24 Ottobre 1965.*
4. CRUZ, J. M. *et al.*: *Genetic studies in Cabo Verde Archipelago.*
5. VALADAS PRETO, R., GRAÇA, F. *et al.*: *Estudo sobre a anemia de Drepanocitose 2.º Prémio Pfizer*, 1980.
6. GRAHAM, R., SERJEANT: *Sickle Cell disease*. pp. 16-18, Oxford University Press 1985.
7. *Community Control of hereditary anaemias: memorandum from a WHO meeting-Bulletin of the World Health Organization*, 1983; 61: 63-80.
8. BAUDIN, V., WAJEMAN, J.: *Rapid high performance liquid chromatography for the separation of these types γ chains in human fetal hemoglobin*. J. Chromatogr: 1984; 299: 495-7.
9. GROSS-BELLARD, M. *et al.*: *Eur J. Biochem*, 1973; 36: 32.
10. MILLER, S.A. *et al.* *Nucl Ac. Res.* 1988; 16: 1215.
11. SOUTHERN, E. M. J. *Molec Biol.* 1975; 98: 503.
12. REED, KC & MANN, D. A. *Nucl. Acid. Res.* 1985; 13: 720.
13. FEINBERG, A. P. *et al.*: *Anal Biochem* 1983; 136: 6.
14. LABIE, D.: *Sickle Cell disease - prognostic indicators - working paper presente à 2.ª reunião do Grupo da WHO, europeu-mediterrânico de Hemoglobinopatias*. Paris, 1987.

15. RONALD, L., NAGEL..., D. LABIE: *Hematologically and genetically distinct forms of Sickle cell anemia in Africa - the Senegal type and the Benin type*, N. Engl. J. Med. 1985; 312: 880-4.
16. RONALD L. NEGEL..., D. LABIE: *The hematologic characteristics of Sickle cell anemia bearing Ban-tu haplotype: the relationship between G γ and HbF level*. Blood, 1987; 69: 1.026-1.030.
17. A. E. KULOSIK: *Geographical survey of β^S globin gene haplotypse: evidence for an independent asian origin of the sickle - cell mutation*. AM. J. Hum. Genet 1986; 39: 239-244.