MUTAÇÕES GENÉTICAS HUMANAS E FLUXOS POPULACIONAIS – PORTUGAL E O MEDITERRÂNEO

por

Leonor Osório Almeida*

Resumo: Este trabalho apresenta uma compilação dos resultados obtidos por vários grupos de investigação na identificação de mutações β talassémicas em Portugal e em Marrocos e compara as associações mutação/ /haplotipo em ambos os países, situando-os num contexto mediterrânico. Encontra padrões genéticos que permitem formular hipóteses sobre a introdução dos genes β talassémicos em Portugal, à luz da história remota e recente dos povos do Mediterrâneo, da Península Ibérica e de Portugal.

Palavras-chave: β talassémia; genes; história.

Abstract: This study presents a compilation of results from the mutational analysis of β thalassemia in Portugal and in Morocco and compares the mutation/haplotype associations in both countries. We use the β thal mutations and haplotypes as genetic markers to address the question of the origin and spread of β thal mutations into the Iberian Peninsula and Portugal

Keywords: β thalassemia; genes; history.

INTRODUÇÃO

Talassémia

A talassémia foi uma das primeiras doenças hereditarias humanas a ser compreendida a nivel molecular.

A palavra talassemia, composta de *thalassa* (grego) = mar e emia (grego) – sangue, foi cunhada pelo pediatra norte americano Thomas Cooley em 1925, quando observou as primeiras crianças com uma anemia grave, filhas de imigrantes originários de paises da Bacia Mediterranica (Itália, Grécia, e ilhas do Mediterraneo).

* * *

* Laboratório de Genética Molecular Depto. Ciências da Vida, e (CIGMH) Centro de Investigação de Genética Molecular Humana) – Polo 1, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal. Email: mlo@fct.unl.pt

Posteriormente, a análise molecular do ADN mostrou que a talassémia faz parte de um grupo de desordens genéticas que resultam de anomalias na sintese das cadeias proteicas constituintes da molécula de hemoglobina. Sendo esta molécula constituida por duas cadeias de alfa globina e duas cadeias de beta globina, se existe redução, sintese anómala ou mesmo ausência na produção de uma das cadeias alfa ou beta constituintes da hemoglobina não há suficientes cadeias globinicas para ligar o ferro. De um modo simplificado pode descrever-se o processo fisiológico como uma precipitação, no glóbulo vermelho ou nos seus precursores, do ferro livre e das cadeias globínicas em excesso, levando a uma destruição do glóbulo vermelho. O organismo reage com a produção de glóbulos vermelhos imaturos conduzindo, no fim deste processo fisiológico anómalo, a uma situação de anemia.

Consoante a alteração no DNA que dá origem às cadeias anómalas do tipo alfa ou do tipo beta constituintes da hemoglobina, designamos este defeito genético por alfa talassemia ou beta talassemia.

A transmissão desta anemia é hereditária, com uma distribuição mundial que acompanha a rota da malária, estendendo-se não só aos países da bacia do Mediterrâneo como à África, Índia e Ásia do Sudeste. Em Portugal, a alfa talassémia é rara, sendo predominante a beta talassemia (β tal). A frequencia do gene β tal é muito superior nas bacias dos rios Tejo, Sado e Mondego onde a malaria foi endémica até meados do séc. XX, do que no interior do pais onde não existiu malaria.

No entanto, a prevalencia de portadores de β talassémia não ultrapassa 1.06% no Sul do pais (Martins, M. C. et al. 1993) com algumas bolsas no Sudoeste do Algarve e na bacia do rio Mira onde a prevalencia. pode atingir os 5% (Inez, F. et al, 1993). No Litoral Centro atinge 0.43% de portadores (Faustino, P. et al, 1999). e no Norte reduz-se a 0.03% (Cabeda et al, 1999) sendo nula no Nordeste transmontano.

Genes e mutações beta talassémicas em Portugal

O estudo das mutações em genes humanos e do seu "ambiente cromossómico" aqui definido por um conjunto de polimorfismos nucleares na vizinhança do gene – o haplotipo – constitui uma contribuição valiosa para a compreensão de movimentos demográficos e reconstituição da geografia genética humana.

As doenças hereditárias da hemoglobina, estando restringidas a certas regiões do mundo, em parte devido a factores ambientais como é o caso da pressão selectiva da malária, permitem analisar populações geneticamente homogéneas, definidas com uma probabilidade estatística significante, pelo seu haplotipo β globínico. (Antonarakis, S. et al. 1985, Flint, J. et al 1993).

Embora existam muitos dados sobre mutações β talassemicas nos países da orla mediterrânica, há poucos estudos epidemiológicos que permitam entender a origem e a distribuição dessas mutações nesta região do mundo.

Neste trabalho efectuámos uma comparação entre os dados de associação mutação/ /haplotipo obtidos para Portugal e Marrocos, com os dos países da orla mediterrânica, colocando estes dois países no contexto geográfico e histórico da Europa, Norte de África e área mediterrânica.

Portugal, como parte integrante da Península Ibérica (PI), situado entre a Europa e a Africa, teve a oportunidade de receber durante milénios, várias civilizações e genes

provenientes de África, Médio Oriente e Europa do Norte e Centro. O padrão e a frequencia de genes mutantes actuais são a resultante da sua posição geográfica e da sua história.

Portugal foi fundado no terrritório onde Fenícios estabeleceram feitorias e colónias, Iberos e Celtas se misturaram, e ocupações duradouras como a dos Romanos, Visigodos e Árabes deixaram a sua cultura e os seus genes.

É neste contexto que faz sentido analisar a distribuição geográfica dos genes beta talassémicos e sua prevalencia no Norte, Centro e Sul de Portugal, relacionando-a com a história próxima e remota e com a existência de malária.

As bacias do Mondego, Tejo e Sado, tradicionalmente áreas de cultura do arroz, foram locais de fixação de populações que, a partir do seculo XVI, eram essencialmente constituidas por escravos africanos. Aí se concentraram os genes que conferem resistencia ao parasita da malária e é nesses focos de malária que encontramos a maior prevalencia de doenças hereditárias da hemoglobina como: a anemia das células falciformes, a beta talassémia e a hemoglobina Lepore. Os seus portadores apresentam uma maior resistencia à penetração nos globulos vermelhos, do parasita da malária. Os genes mórbidos mantêm-se assim nessas regiões, por selecção darwiniana.

População estudada

Os dados de Portugal incluem 561 cromossomas β talassémicos (Faustino, P. et al, 1999). Os dados de Marrocos incluem 187 cromossomas β talassémicos (Lemsadekk, W. et al, 2004).

As associações mutação/haplotipo foram feitas em 70 cromossomas β talassémicos de Portugal (Faustino, P. et al. 1992 e Gonçalves, I. et al. 1998) e em 187 cromossomas β talassémicos de Marrocos (Lemsadekk, W. et al, 2004).

Resultados

Mutações beta talassémicas em Portugal e em Marrocos

Em Portugal a prevalência de β talassémia apresenta um valor intermédio quando comparado com o dos países da orla mediterrânica. O espectro de mutações é concordante com o padrão mediterrânico em que se observa um gradiente decrescente da mutação IVS1-110 do Leste para o Oeste e um aumento da mutação CD 39 do Leste para o Oeste da bacia do Mediterrâneo (Fig. 1).

As mutações β talassémicas predominantes são quatro: CD 39, IVS 1-1, IVS1-6 e IVS1-110 representando 93% do total da variedade de mutações encontradas (Faustino, P. et al. 1999) (Fig. 2). A sua distribuição geográfica não é homogénea, sendo predominantes no Sul as mutações CD 39 e IVS 1-1, no litoral centro a mutação IVS1-6, e a mutação IVS1-110 igualmente distribuida pelas três regiões (Fig. 2). Outras mutações de menor prevalencia são CD 15 (no Centro) e FSCD 6 com uma presença exclusiva no Norte (Cabeda, J. M., et al, 99).

Em Marrocos a heterogeneidade de mutações é maior, mas existe um predomínio de seis mutações representando 75,7% dos alelos mutantes: CD39, IVS1-6, FSCD6, FSCD8, IVS1-1 e CD-29. (Lemsadekk, W. et al 2004). Observou-se uma predominancia regional

da mutação IVS1-6 nas regiões ocidental e do Gharb. O espectro mutacional e a associação mutação/haplotipo são semelhantes em Portugal e em Marrocos, contrastando com as de outros países da bacia do Mediterrâneo. (Tabela 1)

Discussão

A prevalência de doenças hereditárias da hemoglobina entre as quais as mais significativas em Portugal são a anemia falciforme, a β talassémia, e a Hb Lepore, e a heterogeneidade regional das mutações β talassémicas em Portugal estão certamente relacionadas com a sua geografia e história. A longa cadeia montanhosa da cordilheira central atravessa a meseta ibérica entrando em Portugal a norte do rio Tejo, de Leste para Oeste criando uma barreira natural entre o Norte/Centro e o Sul de Portugal. O Sul é atravessado pelos rios Tejo, Sado e Guadiana onde existiram focos de malária até meados do século XX.

No território português instalaram-se vários povos e civilizações. A sua população resulta da miscigenação genética e cultural trazida por fenícios, celtas, romanos, mouros, judeus e negros trazidos de África como escravos. A fixação destes últimos na segunda metade do século XV, nas zonas húmidas de arrozais nos rios Mondego, Tejo, Sado e Guadiana, regiões endémicas de malária como referimos, trouxe um gene de resistencia (da anemia falciforme, gene β S) razão suficiente para encontrarmos, hoje, a maior prevalência de portadores . O mesmo aconteceu com o gene β tal tendo este possivelmente chegado em diversas épocas e contextos históricos.

Os dados históricos e arqueológicos da Idade do Ferro em Portugal são escassos e fragmentários mas permitem, pelo menos, constatar uma influencia orientalizante ligada à navegação e colonização fenícias que subiu até aos rios Tejo e Mondego (Varela Gomes, M. 1993, Tavares, A. A. 1993, Varela Gomes, M. 2010, comun.pessoal).

Cerca de 700aC os Gregos da Fócida retiraram aos Fenícios a hegemonia do comércio com o sul da Península Ibérica. De acordo com dados arqueológicos os Gregos fundaram colónias na costa Nordeste da PI mas não existem registos arqueológicos ou escritos da presença grega em Portugal (Fabião, C. 1992).

Tabela 1. Associação mutação/haplotipo para as principais mutações β tal no Mediterrâneo

	PAÍS (REF.)					
	Marrocos	**Argélia**	**Tunisia**	**Egipto**	**Portugal**	**Itália**
Mutação	(1)	(2, 3)	(4)	(5)	(6, 7)	(8-10)
CD 39	I; II	I; II; B	I; II; A; 5[a]	II	I; II	I; II; VII[a]; IX
IVS-1-6	VI; VII	VI; D	VI	VI	VI; VII	VI; VII[a] IX[a]
IVS-1-110	I; II	I; II	I	I; II	I	I; II[b]; IX[a]
FSC 8	IV; VI; VII	–	–	–	–	–
FSC 6	III; IX; A	I; IX; A	IX; A	Va	E	I[b]; IX[b]
IVS 1-1	IV; V; IX	I, III, V, IX, A	Va	Va	III; V; IX	II[a]; V

[a] Haplotipo na Sicilia; [b] Haplotipo na Sardenha; 1. Lemsadekk et al.2004; 2. Bennani et al.1994; 3. Rouabhi et al.1988; 4. Chibani et al.1988; 5. Waye et al.1999; 6. Faustino et al. 1992; 7. Cabeda et al.1999; 8. Pirastu et al.1988; 9. Schiliro et al.1995; 10. Rosatelli et al.1987.

Durante a Idade do Ferro a PI absorveu progressivamente a cultura mediterrânica, primeiramente com Fenícios e Cartagineses, posteriormente com a cultura grega, bem localizada, e mais tarde (secs VIII a VI aC) com a invasão de povos migrantes célticos (provavelmente de origem indoeuropeia, de acordo com os rituais de incineração, Fabião, C. 1992) assentaram nas terras da meseta Norte e central deixando intocados os povos indigenas da idade do Bronze da parte mais a Sul do Algarve (os Cinetes), os Tartessicos (Andaluzia) e os Iberos (Sudeste PI) (Enc. Brit., 1969). Dados históricos mostram que se misturaram com os povos locais na zona do Alentejo e até ao Algarve (Fabião, C. 1992) Após a segunda guerra púnica, os cartagineses foram expulsos da PI (206aC) e os romanos iniciaram a ocupação que durou quatro séculos.

Em 400dC a PI foi invadida por tribos germânicas (Vandalos e Suevos), os Alanos das estepes russas e pouco depois os Godos (da região báltica). O reino visigótico reinou durante 300 anos em quase todo o território da PI até 711dC, quando da islamização da PI. (Serrão, J. 1981). A permanência do Islão durou até à Reconquista em 1000dC. Em 1094 os Almoravidas conquistaram Lisboa e em 1249 todo o território do Portugal actual foi conquistado aos Mouros.

Esta breve incursão na história da PI e do território de Portugal é importante para tentar entender a heterogeneidade na distribuição geográfica da β talassémia em Portugal.

Os cromossomas β talassemicos são particularmente bons marcadores genéticos para traçar movimentos de populações por duas razões: estão em abundância significativamente superior nas regiões de malária e o seu espectro mutacional é característico da cada população. Para além desta particularidade, existe nos cromossomas β talassémicos uma variação haplotipica reduzida quando comparamos com a dos cromossomas normais o que permite inferir sobre se a sua difusão resulta de um processo continuo, ou resultante de recorrência da mutação em diversos locais. Os estudos feitos nos indivíduos provenientes de países da orla mediterrânica mostraram que em cerca de 80% dos casos existe uma associação estreita entre uma dada mutação e um de nove haplotipos (I a IX, segundo Orkin et al, 1982).

Quanto aos dados comparativos de Portugal e de Marrocos, uma analise detalhada da associação mutação/haplotipo mostra que quatro mutações β tal CD 39, IVS 1-1, IVS1-6 e IVS1-110 são comuns aos dois países e encontram-se associadas aos mesmos haplotipos (Tabela 1). Estes dados poderão estar relacionados com os movimentos populacionais durante o domínio mouro de 500 anos em Portugal (Torres, C. 1992). Nos outros países da orla mediterrânica temos uma maior variabilidade na associação mutação/haplotipo.

Torna-se interessante analisar cada mutação de *per se* começando pela mais abundante no sul de Portugal – CD39. Esta mutação foi encontrada em paises da bacia do mediterrâneo em 14 haplotipos diferentes. (Flint, J. et al. 1992) Uma mutação em diferentes haplotipos é sugestiva de um acontecimento mutacional antigo que, de acordo com alguns autores, poderá ter ocorrido na expansão fenícia (Cao, A. 1989). A frequência relativa de 42% para esta mutação no Sul de Portugal, muito superior ao resto do pais, pode sustentar a hipótese.

Admitindo uma origem próximo oriental para a doença β talassémia, e dado que não existe presença judaica no Sul de Portugal a partir do sec. XVI, teremos que postular uma origem anterior. O único fenómeno de interacção com populações semitas terá tido lugar na protohistória quando da colonização fenícia que cada vez mais em Portugal está a surgir no registo arqueológico. (Tavira, Almaraz, Lisboa, Santarém, Alcácer do Sal-Abul, Setúbal. (M. Varela Gomes, comun. pessoal).

A mutação **IVS1-1** também comum noutros paises da bacia mediterrânica, apresenta um máximo de frequencia no Sul de Portugal (34%) e uma associação típica com o haplotipo V, como nos paises do Norte de África e mediterrânicos .No entanto observa-se uma associação atípica com os haplotipos III e IX, como acontece em Marrocos (Lemsaddek, 03) e em berberes argelinos (Bennani et al. 1994). A alta Estremadura e o Sudeste espanhois têm elevada frequencia, respectivamente 60% (Ribeiro, M. L. et al, 1997), e 50% (Benito, A. 1996) mas infelizmente não existem dados de haplotipos. A diversidade de haplotipos poderá indicar um acontecimento mutacional antigo. Os estudos no cromossoma Y datam a influencia do homem africano na PI há aproximadamente 700 anos (Bosch, E. et al, 2001) mas outros autores consideram que haverá ligações do Noroeste africano desde a prehistória (Arnaiz-Villena, A. et al, 1999 e Maca-Meyer, N. et al, 2003). Neste contexto são plausíveis as hipoteses de várias entradas em diversas épocas históricas desde o Neolítico ou uma só entrada que poderá ter sido durante a longa ocupação árabe e berbere a partir do século VIII. A fim de reforçar esta asserção seria importante que existissem dados de haplotipos na população espanhola a ser completados com um estudo da ancestralidade destes cromossomas..

A mutação **IVS1-6** é a terceira mais frequente em Portugal apresentando um maximo de 30% no litoral centro, valor significativamente distinto, estatisticamente, do Centro e Sul do pais. Na Galiza atinge 50% de prevalencia embora a amostra estudada fosse pequena.

A sua associação com os haplotipos VI e VII é identica em Marrocos. Alguns autores sugerem uma origem na peninsula itálica, subsequentemente difundida pelo Império Romano. A sua predominancia no centro de Portugal e na Galiza, regiões que tiveram em comum a mesma influencia de Celtas, Romanos, Suevos e Visigodos, não invalida esta hipótese.

A mutação **CD 6(-A)** foi exclusivamente descrita no Norte de Portugal (Cabeda, J. et al, 1999). É frequente no Norte de Africa e no Mediterraneo mas em associação com haplotipos bem diversos do de Portugal (haplotipo E). Dado o diferente contexto genético, os autores sugerem a possibilidade de uma origem independente em Portugal, Africa e resto da Europa.

A única mutação com uma distribuição regular por todo o pais é **IVS1-110.** A sua frequencia em Portugal está de acordo com o gradiente decrescente Este/Oeste na bacia mediterrânica. Apresenta-se em associação exclusiva com o haplotipo I. Alguns autores sugerem que terá aparecido nos seculos VIII-VII a. C. na população grega e seguido a sua civilização através do mar mediterrâneo (Cao, A. e 1989). Esta hipótese não condiz com os dados históricos e arqueológicos publicados sobre Portugal. Os gregos fundaram colónias no Leste da PI mas não existem vestígios arqueológicos de colonização grega em Portugal. Cavalli Sforza at al argumentam que terá sido transportada por Fenícios Cartagineses e nos séculos XII e XIII aC. Na hipótese de ser uma mutação tão antiga como a CD 39, não encontramos tantos haplotipos como para esta última mutação nem a encontramos em Marrocos com uma frequência semelhante a CD 39.

As duvidas suscitadas pelos resultados aqui descritos no estudo da β talassémia em Portugal e em Marrocos mostram como se torna necessário fazer um estudo da ancestralidade destes cromossomas e combinar com registos arqueológicos e dados históricos. O cruzamento de ambos os tipos de resultados poderá contribuir para a compreensão das frequências genicas encontradas e sua relação com a estrutura das populações.

Bibliografia

Arnaiz-Villena, A. *et al*, Iberia: population genetics, anthropology and linguistics. Hum. Biol. 1999; 71: 725-743.

Benito, A., β thalassemia in south-western Spain: high frequency of IVS I-1 (G → A) mutation. Br. J. Haematol. 1996, 92: 336-338.

Bennani C. *et al.*, Anthropological approach to the heterogeneity of β talassemia mutations in northern Africa. Hum. Biol. 1994; 66(3): 369-382.

Bosch, E. *et al.*, High resolution analysis of human Y chromosome variation shows a sharp discontinuity and limited gene flow between northwestern Africa and the Iberian Peninsula. Am. J. Hum. Gen. 2001; 68: 019-1029.

Cabeda J. M. *et al.*, Unexpected pattern of β globin mutations in β-thalassaemia patients from northern Portugal. Br J Haematol. 1999; 105(1): 68-74.

Cambournac Cao A, β thalassaemia mutations in Mediterranean populations. Br. J. Haematol. 1989: 309-312.

Cavalli Sforza *et al* 1993 Science, 259: 639-646.

Dicionário de História de Portugal, dir. Joel Serrão, vol. II e vol. IV, Livraria Figueirinhas, Porto, 1981. Encyclopaedia Britannica vol. 21, William Benton Publisher, USA, 1969, p. 364.

Fabião, C. "O passado protohistórico e romano" in: História de Portugal, dir. J. Matoso vol. I, ed. Circulo de Leitores, 1992, pp. 79-167.

Faustino, P. *et al*, The geographic pattern of β thalassaemia mutations in the Portuguese population. Br. J. Haemathol 1999; 107(4): 903-904.

Faustino, P. *et al.*, Novel promoter and splice junction defects add to the genetic, clinical or geographic heterogeneity of β thalassemia in the Portuguese population.; 1992: Hum. Genet. 89: 573-576.

Flint J. *et al.*, Why are some genetic diseases common?. Hum. Genet. 1993; 91: 91-117.

Inez, F., *et al.*, Contribuição do rastreio de portadores para a prevenção da b talassémia e da drepanocitose na população portuguesa: um estudo multicentrico Arquivos INSA 1993; 19: 27-31.

Lemsaddek, W. *et al.*, The β thalassemia mutation/haplotype distribution in the Moroccan population. Hemoglobin, 2004; 28(1): 25-37.

Lemsaddek, W. Mutações β talassémicas na população marroquina. Tese de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, 2005.

Maca-Meyer, N. *et al,* MitochondrialDNA transit between West Asia and North Africa inferred from U6 phylogeography BMC Genet: 4-15, 2003).

Martins, M. C., *et al* . Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance and control. J. Med. Genet., 1993; 30: 235-239.

Mata, D. R. "Los fenícios de época arcaica – siglos VIII/VII a.C. – en la Bahia de Cadiz. Estado de la cuestion" in: Estudos Orientais, vol. IV, Os Fenícios no território Português, p. 23-72, Instituto Oriental, UNL, Lisboa, 1993.

Orkin, S. H. *et al*, Linkage of β thalassemia mutations and β globin gene polymorphisms in the human β globin gene cluster. Nature 1982; 296: 627-631.

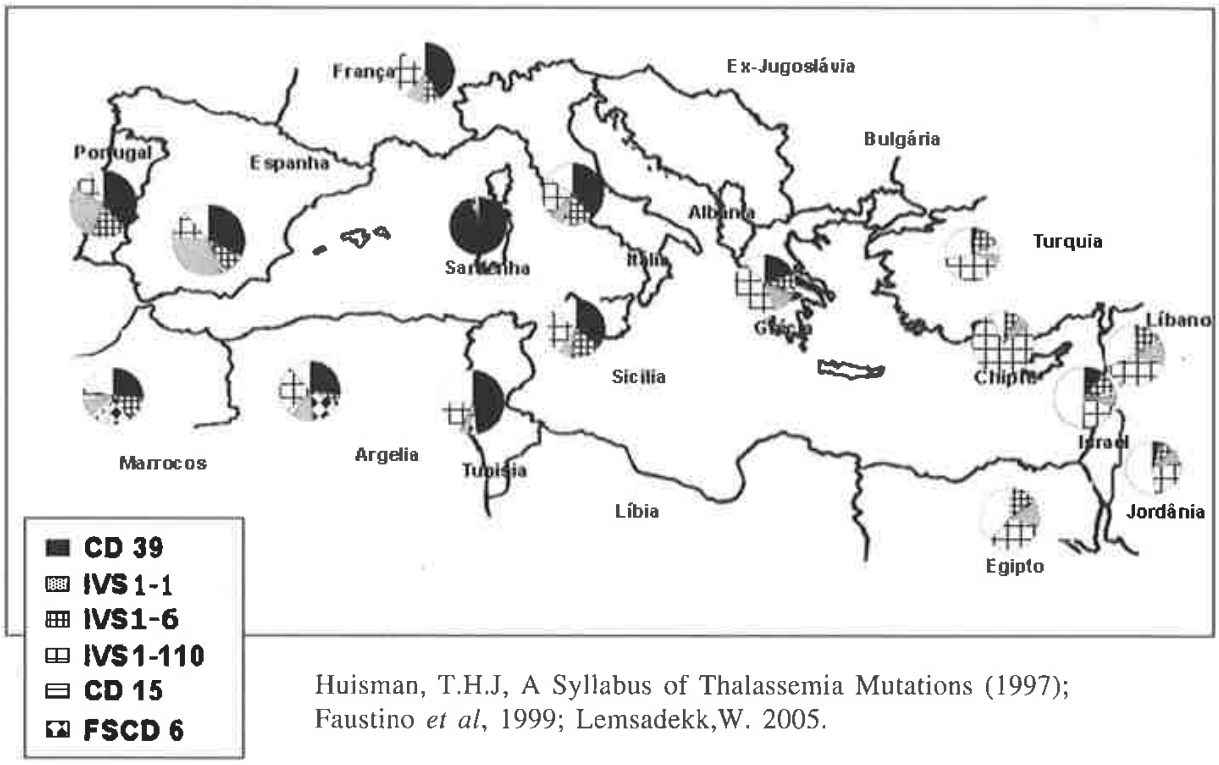
Ribeiro, M. L. *et al.*, Genetic heterogeneity of β thalassemia in populations of the Iberian Peninsula. Hemoglobin 1997; 21(3): 261-269.

Tavares, A. A., "Fenícios e Massienos na Península Ibérica" in: Estudos Orientais, vol. IV, Os Fenícios no território Português, Instituto Oriental, UNL, Lisboa, 1993.

Torres, C. "O Gharb Al Andaluz" in: História de Portugal, dir. J. Matoso vol. I, ed. Circulo de Leitores, 1992, pp. 363-441.

Varela Gomes, M. O estabelecimento fenício-púnico do Cerro da Rocha Branca (Silves) in: Estudos Orientais, vol. IV, Os Fenícios no território Português, p. 73-107, Instituto Oriental, UNL, Lisboa, 1993.

Haplotipo – conjunto de variações no ADN em geral não separáveis por recombinação genética. (são, portanto, próximos). Apesar de a taxa de variação do ADN por mutação e recombinação para gerar novos haplotipos ser baixa, é suficiente para que populações separados no tempo tenham um conjunto de distribuições únicas de haplotipos.



Huisman, T.H.J, A Syllabus of Thalassemia Mutations (1997); Faustino *et al*, 1999; Lemsadekk,W. 2005.

Fig. 1 – Distribuição das mutações β talassémicas em países da orla mediterrânica.

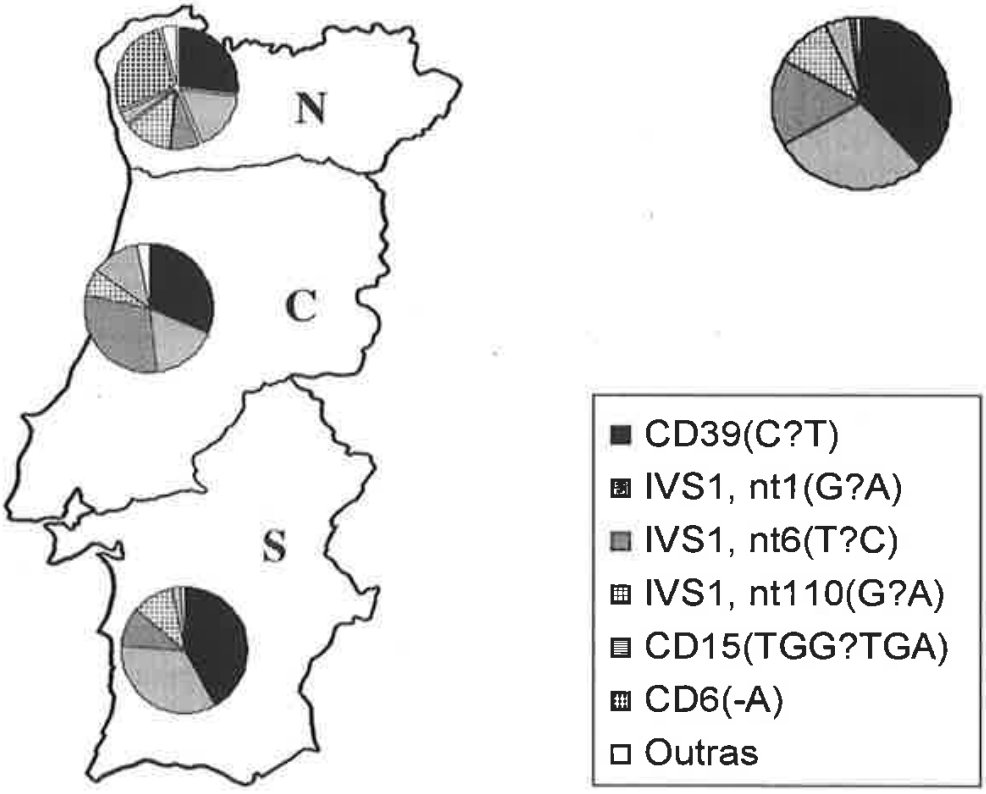


Fig. 2 – Distribuição geográfica das mutações β talassémicas em Portugal Continental.