



2023
número
33
2ª série

Lisboa_INSA, IP

publicação quadrimestral_janeiro-abril

ISSN: 2183-8873 (online)

Observações

Boletim Epidemiológico

sumário_

_Editorial

Estratégia Nacional para a Medicina Genómica (PT_MedGen) p 03

Portuguese Strategy for Genomic Medicine (PT_MedGen)

Astrid Moura Vicente, Coordenadora da Comissão para o planeamento e implementação da Estratégia Nacional para a Medicina Genómica

_Artigos breves

_Doenças genéticas e hereditárias

1_ Recomendações para a Implementação da medicina genómica nos sistemas de saúde: principais conclusões das Country Exchange Visits ao Reino Unido, Estónia e Finlândia p 06

Key issues for implementation of genomic medicine into healthcare: recommendations from Country Exchange Visits to the United Kingdom, Estonia and Finland

Alexandra Costa, Maria Luís Cardoso, Maria Fátima Lopes, Astrid Vicente; em nome da equipa do projeto *Beyond 1 Million Genomes - Delivering Personalised Medicine cross borders: Implementation in healthcare systems and societal impact* (WP5)

2_ Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (1999-2021): relação fenótipo-genótipo p 13

Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study (1999-2021): phenotype-genotype characterization

Ana Margarida Medeiros, Ana Catarina Alves, Joana Rita Chora, Beatriz Miranda, Mafalda Bourbon, em nome dos investigadores do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

3_ Análise bioquímica do líquido cefalorraquidiano para o diagnóstico de doenças hereditárias dos neurotransmissores: casuística e experiência laboratorial p 21

Biochemical analysis of cerebrospinal fluid for the diagnosis of hereditary neurotransmitter diseases: case series and laboratory experience

M. Rosário Rodrigues

4_ Influência de variantes farmacogenéticas na utilização de fármacos: importância do gene DPYD enquanto marcador preditivo de toxicidade às fluoropirimidinas p 27

Influence of pharmacogenetic variants on drug use: importance of the DPYD gene as a predictive marker of fluoropyrimidine toxicity

Diana Alves, Filipa Ferreira, Célia Nogueira, Altina Lopes, Cristina Pereira, Laura Vilarinho

_Doenças infecciosas e vacinação

5_ Motivos para a não adesão à toma da vacina antigripal na época 2020/2021 na população portuguesa com 65 e mais anos p 38

Reasons for non-adherence to taking the influenza vaccine in the 2020/2021 season in the Portuguese population aged 65 and over

Ana João Santos, Irina Kislaya, Ausenda Machado, Carlos Matias Dias

6_ Distribuição temporal e geográfica da leptospirose humana diagnosticada em indivíduos residentes no norte de Portugal, 2014-2019 p 42

Temporal and spatial distribution of human leptospirosis in the north of Portugal, 2014-2019

Sofia Moura, Carla Rio, Susana Gomes, Anabela Santos Silva

7_ Perfis serológicos atípicos no diagnóstico laboratorial da infeção pelo vírus Epstein-Barr, 2015-2022 p 48

Atypical patterns in serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection, 2015-2022

Sofia Moura, Carla Rio, Laura Almeida, Maria Gabriela Figueiredo, Luísa Cavaleiro, Anabela Santos Silva

_Saúde ambiental

8_ Impacto da mineração de lítio na saúde: resultados preliminares do projeto ILiFOOD p 54

Health impact of lithium mining: preliminary results of the ILiFOOD project

Susana Jesus, Marta Ventura, Diogo Miranda, Inês Delgado, Andreia Rego, Sandra Gueifão, Mariana Ribeiro, Ricardo Assunção, Isabel Castanheira, Orquídia Neves, Inês Coelho

_Anomalias congénitas e paralisia cerebral

9_ A dor nos adolescentes com paralisia cerebral: dados preliminares do Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral p 60

Pain in adolescents with cerebral palsy: preliminary data from the Cerebral Palsy Portuguese Surveillance Program

Teresa Folha, Ana João Santos, Joaquim Alvarelhão, Ana Cadete, Inês Vicente, Cândida Cancelinha, Daniel Virella; em nome da equipa do projeto Reavaliação de Adolescentes do Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral





10_ Perceções parentais sobre a prática da investigação em crianças com anomalias congénitas ou paralisia cerebral: entre o que preocupa as famílias e a prática p 67

Parental perceptions of research agenda in children with congenital anomalies or cerebral palsy: between families concerns and research practice

Ana João Santos, Paula Braz, Ausenda Machado, Teresa Folha, Carlos Matias Dias

_ Alimentação e nutrição

11_ Avaliação dos aspetos nutricionais de bolachas infantis disponíveis no mercado português p71

Evaluation of nutritional aspects of children's biscuits available in the Portuguese market

Rita Santos, Miguel Godinho, Helena S. Costa, Paula Pereira, Tânia Gonçalves Albuquerque

12_ Escolhas alimentares sustentáveis: o contributo do projeto ALTERNATIVA enquanto ferramenta para a escolha de fontes alternativas de proteína p78

Sustainable dietary choices: the contribution of the ALTERNATIVA project as a tool for selecting alternative protein sources

Ana Serôdio, Beatrice Biasini, Géraldine Boué, Isabel Castanheira, Elena Cozzi, Michel Federighi, Lea Jakobsen, Carla Martins, Davide Menozzi, Carla Motta, Androniki Naska, katerina Niforou, Marta Pavel, Sara Pires, Morten Poulsen, Ricardo Assunção

Estratégia Nacional para a Medicina Genómica (PT_MedGen)

Portuguese Strategy for Genomic Medicine (PT_MedGen)

A Medicina Genómica utiliza a informação contida no DNA de cada indivíduo para informar os seus cuidados de saúde, contribuindo para diagnósticos mais precisos e atempados, para ajustar a terapêutica certa para cada indivíduo e para estimar a sua predisposição a determinadas doenças, potenciando a sua prevenção. É assim um componente-chave da Medicina Personalizada (1) (figura 1).

A nível global, existem múltiplas iniciativas destinadas a gerar novos conhecimentos e avanços na medicina genómica, mas também à sua implementação atempa-

da e alargada na prática médica. Na Europa, a Iniciativa 1 Million Genomes (1+MG) (<https://digital-strategy.ec.europa.eu/en/policies/1-million-genomes>), promovida pela Comissão Europeia no âmbito da sua estratégia digital, conta no presente com 26 países participantes que têm a ambição de criar uma rede europeia de coleções de dados genómicos e de saúde associados. Esta iniciativa contribui assim, de forma muito relevante, para a investigação clínica e em saúde pública, e para a inovação e qualidade na prática médica. A iniciativa 1+MG tem um papel fulcral na progressão das estratégias nacionais para a medicina genómica ao nível europeu, quer porque os países aderentes assumiram formalmente um compromisso através da assinatura de uma declaração de cooperação, quer porque existe um alinhamento de conhecimentos e boas práticas para a sua implementação (<https://b1mg-project.eu/>).

Figura 1: Exemplos de benefícios da Medicina Genómica.



Melhoria do diagnóstico de doenças raras, reduzindo a “odisseia diagnóstica”



Estimativa do perfil de risco genético para prevenção de algumas doenças crónicas



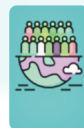
Tratamento mais preciso de doenças oncológicas através do perfil genético do tumor e/ou do paciente



Matching de estudos clínicos com os doentes que mais destes podem beneficiar



Prescrição do fármaco certo, na dose certa para o doente certo: maior eficácia dos tratamentos e menos reações adversas a medicamentos



Promoção da equidade nos cuidados de saúde através da administração de tratamentos adequados a pessoas de etnias diferentes

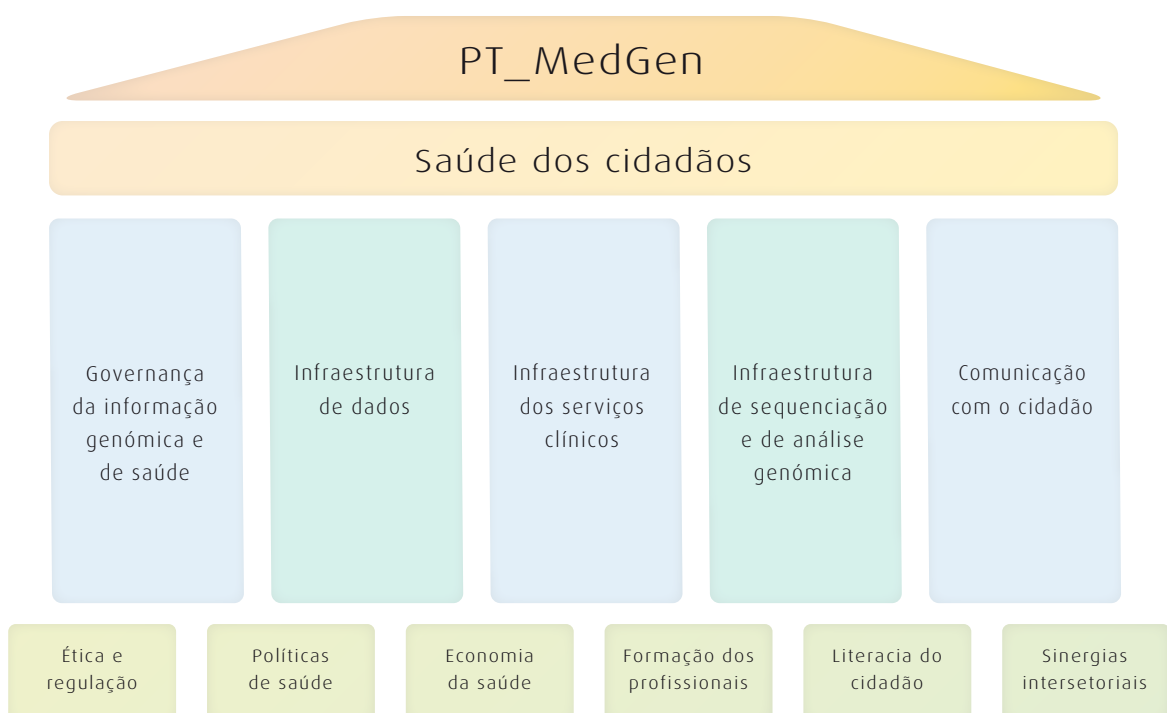
A informação genómica é uma parte integrante da medicina personalizada, com enorme potencial para melhorar os cuidados de saúde e a prevenção de patologias com contribuição genética significativa, incluindo as doenças raras, mas também as doenças complexas de elevada prevalência, nomeadamente as oncológicas, as cardiovasculares e as neurodegenerativas.



Em Portugal, o desenvolvimento de uma Estratégia Nacional para a Medicina Genómica (PT_MedGen) está agora em curso, numa iniciativa governada pela Comissão PT_MedGen e liderada pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), por nomeação do Ministério da Saúde (2). Portugal reúne atualmente capacidade e competências para a implementação da medicina genómica a nível nacional, através de parcerias entre o INSA e outras entidades do Serviço Nacional de Saúde (SNS), como os Serviços Partilhados do Ministério da Saúde (SPMS) e os serviços hospitalares, a Agência de Investigação Clínica e Inovação Biomédica (AICIB), várias infraestruturas do Roteiro Nacional de Infraestruturas de investigação de Interesse estratégico (RNIE), como o GenomePT e o BioData.pt, instituições públicas e privadas de investigação e inovação, as academias e a indústria. É necessária, no entanto, uma estratégia agregadora que permita tirar partido da capacidade instalada, e de investimento dedicado para atingir este objetivo.

Num documento de conceito para a estratégia PT_MedGen (3) foram identificados os principais desafios para dotar o país da regulamentação, infraestruturas, processos e recursos para a implementação da medicina genómica. Estes incluem, como pilares de suporte, a governança da informação genómica e de saúde; as infraestruturas para gestão de dados, para a geração e análise de dados genómicos e para a articulação com os serviços clínicos; e a comunicação com os cidadãos. Domínios transversais a estes pilares são também cruciais, nomeadamente as questões éticas e legais, as políticas de saúde, as questões relativas aos modelos económicos para a medicina personalizada, bem como a formação dos profissionais, a literacia em saúde do cidadão, e ainda as sinergias intersectoriais entre a prática clínica, a investigação e a inovação em saúde (figura 2).

Figura 2: O conceito da estratégia PT_MedGen assenta a saúde dos cidadãos, em termos de medicina genómica, em cinco pilares principais, alicerçados em domínios transversais.





Com o apoio da CE, nomeadamente da Direção-Geral do Apoio às Reformas Estruturais (DG REFORM), o desenvolvimento da estratégia PT_MedGen em detalhe está agora em curso, focando as áreas mais importantes que permitirão alicerçar a implementação da medicina genómica em Portugal:

1. **Um contexto ético e legal** alinhado com os avanços científicos e tecnológicos recentes e de acordo com o Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados;
2. **A promoção da literacia dos cidadãos** através de comunicação aberta e participativa, assegurando que os cidadãos, os doentes e os decisores políticos são bem informados e estão empenhados na implementação da medicina genómica;
3. **A criação de um modelo de governança** para a informação genómica e de saúde, incluindo os fluxos de informação entre as entidades nacionais de relevância;
4. **A criação de uma infraestrutura central para gestão e partilha segura de dados genómicos** e de saúde, cumprindo com requisitos internacionais de segurança, qualidade e acesso, e a implementação de uma rede federada para acesso a dados genómicos e de saúde ao nível nacional e europeu;
5. **Uma estratégia para a organização eficiente dos serviços clínicos**, incluindo gestão e partilha segura de dados genómicos e clínicos, equipas multidisciplinares, redes clínicas e integração com a investigação;
6. **A modernização das infraestruturas para sequenciação genómica** e implementação de infraestrutura computacional adequada para processamento de dados genómicos;
7. **A geração de valor e promoção da sustentabilidade** através de sinergias entre a clínica, a investigação e a indústria.

A estratégia PT_MedGen tem assim como missão criar condições para a implementação alargada da medicina personalizada através da caracterização genómica dos indivíduos, para a prevenção das doenças e para um diagnóstico e tratamento mais precisos, promovendo o bem-estar da população, a criação de conhecimento e valor significativos na área da saúde, a qualificação de recursos humanos, a inovação, a criação de valor económico em Portugal e permitindo a internacionalização desta área.

Astrid Moura Vicente

Coordenadora da Comissão para o planeamento e implementação da Estratégia Nacional para a Medicina Genómica

Investigadora, Coordenadora do Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, INSA

Referências bibliográficas:

- (1) Vicente AM, Ballensiefen W, Jönsson JJ. How personalised medicine will transform healthcare by 2030: the ICPeMed vision. *J Transl Med.* 2020 Apr 28;18(1):180. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02316-w>
- (2) Portugal. Ministério da Saúde. Despacho n.º 5135/2021, de 13 de maio. DRE n.º 98, 2.ª Série (2021-05-20):107-08. Cria e determina a composição de uma comissão à qual compete a definição de roadmap para o planeamento e implementação da Estratégia Nacional para a Medicina Genómica, que apoiará a contribuição de Portugal na iniciativa 1+MG. <https://dre.pt/dre/detalhe/despacho/5135-2021-163697407>
- (3) Comissão para o planeamento e implementação da Estratégia Nacional para a Medicina Genómica. Estratégia Nacional para a Medicina Genómica PT_MedGen: desafios e prioridades. Lisboa, mar. 2022. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/8259>

Recomendações para a implementação da medicina genómica nos sistemas de saúde: principais conclusões das *Country Exchange Visits* ao Reino Unido, Estónia e Finlândia

Key issues for implementation of genomic medicine into healthcare: recommendations from Country Exchange Visits to the United Kingdom, Estonia and Finland

Alexandra Costa¹, Maria Luís Cardoso^{1,2}, Maria de Fátima Lopes¹, Astrid Vicente^{1,2}; em nome da equipa do projeto *Beyond 1 Million Genomes – Delivering Personalised Medicine cross borders: Implementation in healthcare systems and societal impact* (WP5)

astrid.vicente@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Instituto de Biosistemas e Ciências Integrativas. Faculdade de Ciência, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Resumo

Para que todos os cidadãos europeus possam vir a beneficiar da medicina genómica de forma equitativa, é essencial colmatar as assimetrias existentes na Europa na implementação das análises genómicas nos cuidados de saúde. Promover o diálogo e a cooperação entre países, contribuindo para a sua capacitação e partilha de boas práticas, é essencial para o avanço da medicina genómica a nível nacional e europeu. Nesse sentido, o projeto *Beyond 1 Million Genomes* (B1MG) organizou três *Country Exchange Visits* (CEVs) a países europeus com estratégias genómicas avançadas, nomeadamente o Reino Unido, a Estónia e a Finlândia. Estas visitas promoveram uma discussão aberta sobre os pontos-chave para a implementação sustentável da medicina genómica nos serviços de saúde. Profissionais de saúde e investigadores dos países signatários da iniciativa europeia de 1 Milhão de Genomas (1+MG) participaram nesses eventos, alguns dos quais apresentaram as respetivas iniciativas nacionais para a medicina genómica. Com base nas boas práticas apresentadas, e em exemplos reais dos países anfitriões, foram propostas recomendações em áreas essenciais à implementação sustentável da medicina genómica nos sistemas de saúde europeus, nomeadamente: (i) o envolvimento dos cidadãos e dos doentes; (ii) o investimento em infraestruturas e a regulamentação na prática clínica; (iii) a formação e capacitação de profissionais de saúde; (iv) a construção de um ecossistema sustentável baseado em sinergias entre sistemas de saúde, investigação e indústria.

Abstract

For genomic medicine to become accessible to all European citizens, it is essential to bridge the current gaps across European countries regarding the maturity of genomics use in health care. Promoting dialogue and cooperation between countries, contributing to capacity building and sharing best practices is thus essential for the advancement of genomic medicine at national and European levels. The Beyond 1 Million Genomes (B1MG) project is a Coordination and Support Action funded by the European Commission, to assist the

1+ Million Genomes Initiative. The 1+MG Initiative engages 26 European countries in the development of a framework for genomic and health data access across borders, to facilitate research and personalised medicine in Europe. To improve cooperation across European health systems, the B1MG project organized three Country Exchange Visits (CEVs) to countries with well advanced genomic strategies, namely the United Kingdom, Estonia and Finland, to discuss the critical factors for the sustainable implementation of national strategies for genomic medicine. Researchers and health professionals involved in the 1+MG Initiative participated in these events, and 13 countries presented the status of their genomic medicine strategies. Based on the presentations and discussions, a set of recommendations for the successful implementation of genomic medicine in European health systems were proposed in four key areas: patient and citizen engagement; infrastructure and regulation for implementation of genomics into clinical practice; workforce education and training; and building a sustainable ecosystem based on synergies between clinical practice, research and industry.

Introdução

A implementação da medicina genómica nos sistemas de saúde pode ajudar a tornar a medicina personalizada uma realidade, com enormes benefícios para os cidadãos e para os sistemas de saúde. A possibilidade de diagnósticos mais precisos e atempados, um tratamento personalizado ao perfil individual do doente e a adoção de abordagens preventivas dirigidas ao indivíduo contribuem para a eficiência dos sistemas de saúde e melhoram a qualidade de vida dos cidadãos. A informação disponibilizada pela sequencia-



ção do genoma humano, bem como o acesso seguro a dados genómicos e fenotípicos em grande escala, têm o potencial de produzir avanços importantes na implementação da medicina personalizada nos sistemas de saúde. Este reconhecimento levou a União Europeia a lançar, em 2018, a iniciativa europeia de 1 Milhão de Genomas (1+MG) ⁽¹⁾, formalizada através da assinatura da Declaração de Cooperação *Towards access to at least 1 Million Genomes in the EU by 2022*. Atualmente existem 26 países signatários, da UE, Reino Unido e Noruega. Esta iniciativa pretende definir a estrutura e o quadro jurídico que permitirá o acesso transfronteiriço a dados genómicos associados a outros dados de saúde, fomentando o desenvolvimento de estratégias de medicina genómica para a prática clínica e para a investigação e desenvolvimento.

Ao nível europeu, o sucesso da implementação da medicina genómica requer que todos os países atinjam níveis de maturidade semelhantes em termos da sua capacidade de utilização de informação genómica nos sistemas de saúde. No entanto, sabemos que os países estão em níveis variáveis de implementação quanto a infraestruturas, processos e regulamentação.

No sentido de colmatar estas diferenças, o projeto *Beyond 1 Million Genomes* (B1MG) ⁽²⁾, uma ação de coordenação e suporte à iniciativa 1+MG financiada pela Comissão Europeia, e mais concretamente o *Workpackage 5: Delivering Personalised Medicine cross-borders: Implementation in Healthcare Systems and Societal Impact*, coordenado pelo Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, organizou três *Country Exchange Visits* (CEVs) virtuais. Estas CEVs serviram como um fórum de discussão das dimensões mais críticas para a implementação da medicina genómica nos sistemas de saúde, dos principais desafios e lacunas entre países, e ainda para identificação de boas práticas. As áreas debatidas foram: o envolvimento, a literacia e a confiança de cidadãos e pacientes; as necessidades

de infraestrutura para a implementação da genómica na prática clínica; as questões éticas e legais associadas; as sinergias entre os serviços de saúde, a investigação e a indústria; a formação dos profissionais de saúde.

Para promover e orientar uma implementação bem-sucedida da genómica nos sistemas de saúde europeus, potenciando também a partilha de dados transfronteiriços, as CEVs ao Reino Unido, Estónia e Finlândia tiveram como objetivos principais:

- 1) Promover o diálogo e a cooperação entre os países, partilhando boas práticas e exemplos reais de sucesso na implementação da genómica nos sistemas de saúde;
- 2) Produzir um conjunto de recomendações para a implementação sustentável da medicina genómica.

Em cada visita foram abordados temas mais específicos relacionados com o país anfitrião, nomeadamente:

1. A visita ao Reino Unido foi subordinada ao tema *Research to Clinical practice: from Genomics England to NHS*;
2. Na visita à Estónia, o tema foi *Genomics Towards Prevention*;
3. A visita à Finlândia centrou-se no tema *Regulating the Unknown*.

Objetivos

Este trabalho pretende divulgar as principais conclusões de três *Country Exchange Visits* ao Reino Unido, Estónia e Finlândia, realizadas no âmbito do projeto *Beyond 1 Million Genomes* (B1MG), para a produção de recomendações para a implementação da medicina genómica nos sistemas de saúde europeus.



_Material e métodos

Entre março e junho de 2023, realizaram-se três *Country Exchange Visits* (CEVs) virtuais ao Reino Unido, Estónia e Finlândia, países identificados como detentores de estratégias genómicas bem estabelecidas, das quais outros países poderiam retirar orientações. As apresentações e discussão subsequentes foram analisadas e a informação compilada sob a forma de relatório (3) e um *Policy Brief* (4). As apresentações em cada CEV incluíram aspetos globais, mas também temas mais específicos característicos da abordagem estratégica de cada país anfitrião na implementação da genómica na prática clínica, como acima referido.

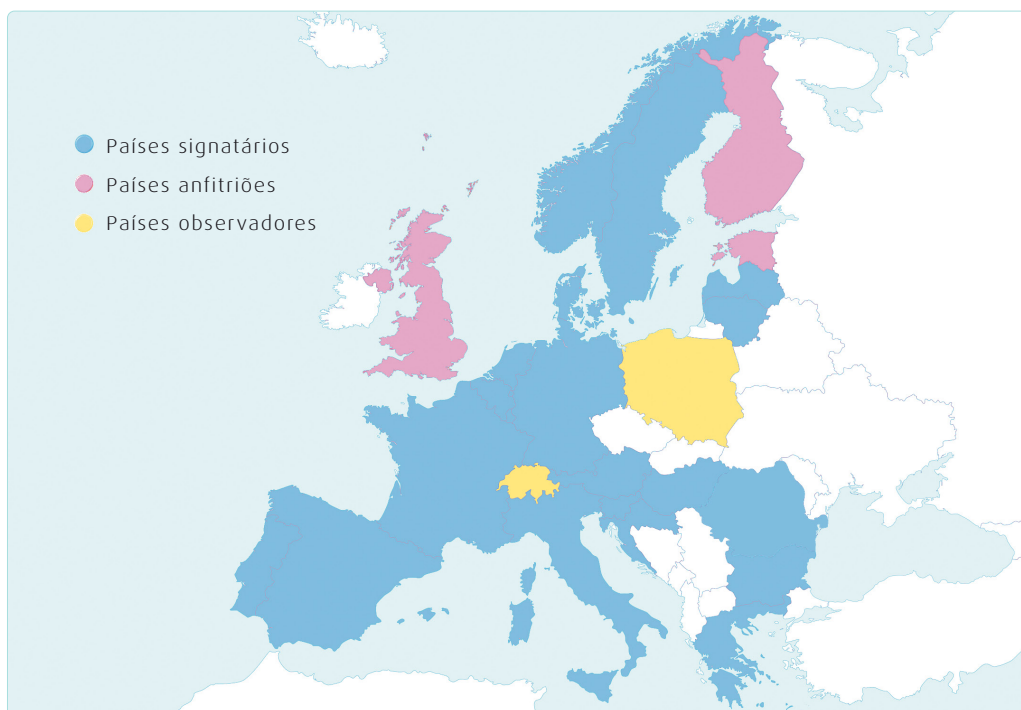
Durante as três CEVs, 13 países europeus (Alemanha, Bélgica, Bulgária, Dinamarca, Espanha, Hungria, Itália, Letónia, Lituânia, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Suécia) apresentaram também o progresso das respetivas iniciativas nacionais de medicina genómica.

As CEVs tiveram uma participação média de cerca de 80 participantes de 24 países.

_Resultados e discussão

Com base nas abordagens estratégicas dos anfitriões (figura 1), respetivos exemplos de sucesso, e tendo em consideração os desafios sentidos pelos demais países participantes, identificaram-se quatro áreas-chave para o desenvolvimento de uma estratégia para a medicina genómica: (i) o envolvimento dos cidadãos e em particular dos doentes; (ii) os aspetos relacionados com a infraestrutura técnica e regulamentação necessários para a implementação da genómica na prática clínica; (iii) a formação e capacitação de profissionais de saúde; e (iv) a construção de um ecossistema envolvendo sinergias entre a prática clínica, investigação e indústria. Alguns exemplos de práticas de sucesso em cada uma destas áreas são mostrados na tabela 1.

Figura 1: Mapa representativo dos países signatários da Declaração de Cooperação da Iniciativa europeia 1 Million Genomes.



A rosa assinalam-se os países signatários anfitriões das *Country Exchange Visits*, nomeadamente Reino Unido, Estónia e Finlândia.



Tabela 1: Exemplos de práticas de sucesso nas áreas-chave para a implementação da genómica nos cuidados de saúde, no Reino Unido, Estónia e Finlândia.

Área	Exemplos dos países anfitriões
Confiança e envolvimento de cidadãos e doentes	<p>A Estónia investiu durante décadas no envolvimento dos cidadãos com publicidade, campanhas de comunicação envolvendo figuras públicas, e fazendo referência à genómica em novelas e filmes, tendo conseguido alcançar uma taxa de 75% de aceitação por parte do público.</p> <p>No Reino Unido, o <i>National Health Service</i> (NHS) envolve os doentes ou seus representantes, na sua estrutura de governança e tem um Fórum de Pessoas e Comunidades (<i>NHS People and Communities Forum</i>) no Serviço de Medicina Genómica (<i>NHS Genomic Service</i>).</p> <p>Na Finlândia, a Lei do Genoma (<i>Genome Act</i>), que constituirá a base legal para o centro nacional de genómica e o banco de dados genómicos centralizados, envolveu desde o início os cidadãos e os doentes.</p>
Infraestrutura e regulamentação para implementação da genómica na prática clínica	<p>No Reino Unido, a <i>Genomics England</i> e o NHS definiram claramente as políticas de acesso e partilha de dados. O <i>Genomics England Data Center</i> é uma infraestrutura segura localizada dentro da <i>firewall</i> do NHS, que armazena dados genómicos e outros dados relativos aos doentes.</p> <p>Na Finlândia, o <i>Genome National Centre</i> é a autoridade pública central responsável pela gestão da base de dados do genoma da população finlandesa e pela promoção da equidade e da utilização responsável dos dados genómicos. A <i>Findata</i> ⁽⁵⁾, a autoridade que gere a permissão de acesso a dados, é responsável pela implementação da Lei sobre Uso Secundário de Dados Sociais e de Saúde (<i>Act on Secondary Use of Health and Social Data</i>).</p> <p>Na Estónia, a Lei de Investigação de Genes Humanos (<i>Human Genes Research Act</i>) remonta ao ano 2000, quando o Biobanco nacional, hoje com representação de mais de 20% dos cidadãos deste país, foi estabelecido.</p> <p>A infraestrutura genómica do Reino Unido associada ao NHS opera de acordo com padrões nacionais comuns através de um pipeline "de-ponta-a-ponta" acreditado por normas ISO.</p> <p>O NHS e a <i>Genomics England</i> estão a desenvolver ferramentas robustas para a análise de custo-benefício da genómica, que podem depois ser usadas para formular políticas públicas para implementar os testes genómicos na área da saúde e promover o acesso amplo e equitativo pelos cidadãos.</p> <p>Na Finlândia, a Estratégia de Crescimento do Setor da Saúde da Finlândia (<i>Health Sector Growth Strategy</i>) envolve o Ministério da Educação e Cultura, o Ministério da Economia e do Emprego, o Ministério da Segurança Social e da Saúde, a <i>Academia Finland</i>, a <i>Business Finland</i> e a Agência de Financiamento da Inovação da Finlândia (<i>Innovation Funding Agency</i>).</p>
Formação e capacitação de profissionais de saúde	<p>O Reino Unido criou o Programa de Educação Genómica (<i>Genomics Education Program</i>) ⁽⁶⁾ para profissionais de saúde e desenvolveu um guia de boas práticas para apoiar indivíduos e organizações que pretendam melhorar as suas competências em medicina genómica ⁽⁷⁾. Reconhece também novas profissões para lidar com a rápida inovação na medicina genómica, por exemplo, cientistas clínicos e informáticos clínicos.</p> <p>A comunicação dos riscos, recomendações farmacogenómicas e o aconselhamento genético devem ser compreensíveis e acessíveis aos doentes. A Finlândia estabeleceu várias iniciativas para melhorar as competências dos profissionais de saúde na comunicação com os doentes.</p>
Sinergias entre prática clínica, investigação e indústria	<p>A <i>Genomics England</i> e o NHS desenvolveram o conceito de um <i>infinity-loop</i> para estimular continuamente novas descobertas a partir de dados clínicos e a adoção de novos conhecimentos no diagnóstico, tratamento e prevenção no sistema de saúde. Desta forma promove uma estreita colaboração entre investigação e sistemas de saúde: o NHS fornece dados de doentes para projetos de investigação, que, por sua vez, fornecem ao NHS conhecimento e soluções inovadoras para a prática clínica.</p> <p>Na Finlândia, a indústria colabora ativamente com o sistema de saúde. Por exemplo, o <i>FinnGen</i> ⁽⁸⁾ é uma parceria público-privada, com diversos parceiros dos setores público e privado, incluindo a cooperativa de Biobancos <i>FINBB</i> ⁽⁹⁾ e 12 empresas farmacêuticas.</p> <p>Na Estónia, a recém-lançada Agenda Digital Nacional 2030 (<i>National Digital Agenda 2030</i>) estabelece a estratégia para envolver o setor privado e quais as estruturas legais, técnicas, de governança, financeiras, de partilha de dados e de infraestrutura adequadas para fazê-lo de forma a garantir a confiança do público e a melhorar a medicina personalizada.</p>



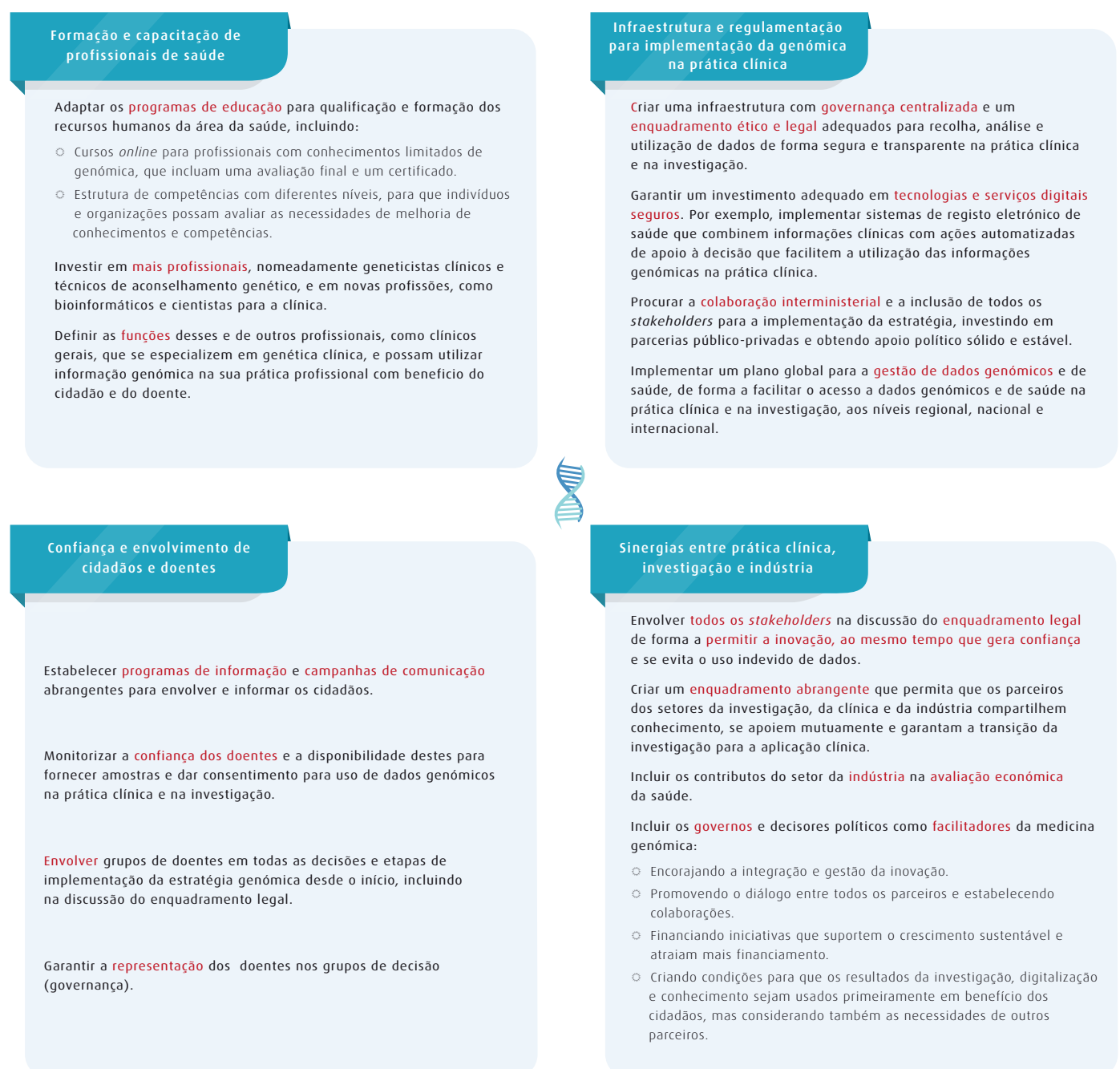
Para a implementação sustentável da genómica nos sistemas de saúde, foi considerado essencial:

- ✓ O envolvimento dos cidadãos, e em particular dos doentes, que devem ser o foco central da medicina personalizada. Para isso é fundamental que detenham uma compreensão sobre o que é a genómica e a sua utilização na medicina, confiança no sistema de saúde e uma melhor capacidade de participar nas decisões sobre a sua saúde. O consentimento informado para o uso e partilha de dados e o apoio às políticas de medicina genómica só são possíveis com o envolvimento e a aceitação do público.
- ✓ A recolha, a gestão e a utilização de dados de saúde e genómicos em ambiente seguro, através de uma infraestrutura segura para a gestão de informação, com uma governança centralizada e planos robustos de gestão de dados.
- ✓ A uniformização e padronização de procedimentos que garantam o controlo de qualidade, a interoperabilidade e a partilha transfronteiriça de dados, para fins clínicos e de investigação, a nível regional, nacional e internacional.
- ✓ O envolvimento dos decisores políticos para um compromisso político constante, associado a financiamento sustentado, e envolvendo cooperação interministerial, para apoiar a implementação sustentável da medicina genómica.
- ✓ O desenvolvimento de modelos económicos específicos para a medicina genómica, que incluem os benefícios para os sistemas de saúde, mas também benefícios de ordem social para doentes e seus familiares.
- ✓ Recursos humanos especializados, empenhados e capacitados. Os profissionais de saúde devem, a qualquer momento das suas carreiras, poder desenvolver e melhorar as competências necessárias para a utilização de informação genómica nas suas práticas.
- ✓ Sinergias entre o setor da saúde, a investigação e a indústria. Uma colaboração bem-sucedida entre a prática clínica, a investigação e a indústria beneficia os cidadãos, os serviços de saúde, a economia da saúde e a sociedade em geral. A parceria entre a investigação e a prática clínica é fundamental para criar um ecossistema de aprendizagem em saúde e proporcionar sustentabilidade. A medicina genómica requer atualizações constantes de conhecimento e tecnologia, o que faz do setor privado um parceiro essencial pois contribui para gerar novas soluções mais rapidamente.



Como resultado destas CEVs foi desenvolvido um conjunto de recomendações para o progresso dessas áreas de forma concertada nos países envolvidos na iniciativa 1+MG (figura 2) (3-4).

Figura 2: ⚡ Recomendações para o desenvolvimento concertado de quatro áreas essenciais à implementação da genómica nos serviços de saúde.





Conclusão

Para que todos os cidadãos europeus beneficiem equitativamente dos avanços proporcionados pela genómica na medicina, a colaboração internacional e o acesso transfronteiriço a dados genómicos é essencial, e os países precisam de alinhar estratégias e abordar de forma uniforme questões comuns. Nesse sentido, o objetivo destas CEVs de envolver os *stakeholders* europeus mais relevantes no debate de questões relacionadas com a implementação da medicina genómica nos sistemas de saúde foi muito bem-sucedido.

A Iniciativa 1+MG, com o apoio da Comissão Europeia, tem tido como mérito aproximar os países da Europa no sentido de uniformizar as abordagens genómicas na saúde, com o objetivo de beneficiar todos os cidadãos europeus.

Referências bibliográficas:

- (1) European Commission. European “1+ Million Genomes” Initiative. Shaping Europe’s Digital Future [online]. [consult. 23/1/2023]. https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/europe-fit-digital-age/shaping-europes-digital-future_en7
- (2) Beyond One Million Genomes (B1MG) project [online]. [consult. 23/1/2023]. <https://b1mg-project.eu/>
- (3) B1MG project. Report: B1MG Country Exchange Visits. <https://b1mg-project.eu/images/pdf/B1MG%20WP5%20Country%20Exchange%20Visit%20Report.docx.pdf>
- (4) B1MG project. Genomics in healthcare: Key issues for implementation. https://b1mg-project.eu/images/pdf/Policy_Brief_Genomics_in_Healthcare_2022.pdf
- (5) Findata – Finnish Social and Health Data Permit Authority Findata [online]. Disponível em: <https://findata.fi/en/>
- (6) Health Education England: Genomics Education Programme [online]. Disponível em: <https://www.hee.nhs.uk/our-work/genomics-education>
- (7) Health Education England: Genomics Education Programme. Facilitating genomic testing: A competency framework. <https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/wp-content/uploads/2021/06/Facilitating-genomic-testing-competencies-final.pdf>
- (8) FinnGen genomics research project [online]. Finland. Disponível em: <https://www.finnngen.fi/en>
- (9) Finnish Biobank Cooperative – FINBB [online]. Disponível em: <https://finbb.fi/en/>

Vídeos das apresentações e debates que tiveram lugar nas CEVs:

CEV ao Reino Unido (<https://www.youtube.com/playlist?list=PLweO8RYcVPDOWDmFxrHdEGINsMEubMK5k>);

CEV à Estónia (https://www.youtube.com/playlist?list=PLweO8RYcVPDMTY_Xi0nLSOtD67jeydJJ7);

CEV à Finlândia (<https://www.youtube.com/playlist?list=PLweO8RYcVPDM5ydsVQuQ07WBpkZm8dycy>);

Outras iniciativas nacionais (https://www.youtube.com/playlist?list=PLweO8RYcVPDM9Bo_safKw9bQDWueEx6ZA).

_Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (1999-2021): relação fenótipo-genótipo

Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study (1999-2021): phenotype-genotype characterization

Ana Margarida Medeiros^{1,2}, Ana Catarina Alves^{1,2}, Joana Rita Chora^{1,2}, Beatriz Miranda^{1,2}, Mafalda Bourbon^{1,2}; em nome dos investigadores do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

mafalda.bourbon@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de I&D. Grupo de Investigação Cardiovascular. Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal;

(2) Biosystems & Integrative Sciences Institute. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

A Hipercolesterolemia Familiar (FH) é uma condição genética comum do metabolismo dos lípidos, que se encontra subdiagnosticada. Existem três genes primários associados à FH (*LDLR*, *APOB* e *PCSK9*) e 5 genes fenocópias (*LDLRAP1*, *LIPA*, *ABCG5*, *ABCG8* e *APOE*), que conferem um fenótipo semelhante à FH. Neste trabalho pretende-se apresentar a relação fenótipo-genótipo dos indivíduos com critérios clínicos de FH referenciados ao Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar. Até ao fim de 2021 foram estudados molecularmente 1005 indivíduos com critérios clínicos de FH. Destes, foram confirmados geneticamente com FH (FH positivos), 417 casos-index (408 heterozigotos e 9 homozigotos). Com os estudos familiares identificaram-se adicionalmente 581 heterozigotos e 2 homozigotos. De entre os FH positivos, os casos-index com variantes de alelo nulo apresentam um fenótipo mais severo do que os casos-index com variantes de alelo defeituoso. Cerca de 1% dos casos-index foram diagnosticados com outras causas monogénicas. Dos FH negativos, 34% apresenta hiper-Lp(a), 18% tem uma hipercolesterolemia de causa poligénica e 1% possui uma variante patogénica em heterozigotia nos genes fenocópias da FH. As diferentes causas genéticas contribuem para uma variedade de fenótipos que requerem diferentes formas de gestão da doença, terapias específicas e têm implicações na estratificação do risco cardiovascular e no rastreio dos familiares, sendo por esta razão essencial que seja identificada a etiologia da hipercolesterolemia o mais precocemente possível para melhorar o prognóstico dos indivíduos com FH.

_Abstract

Familial Hypercholesterolemia (FH) is a common genetic condition of lipid metabolism that is underdiagnosed. There are three primary genes associated with FH (LDLR, APOB and PCSK9) and 5 phenocopy genes (LDLRAP1, LIPA, ABCG5, ABCG8 and APOE), which confer a phenotype FH-like. In this work, we present the phenotype - genotype characterization of individuals with clinical criteria of FH referred to the Portuguese FH Study. Until the end of 2021, 1005 individuals with clinical diagnosis of FH were molecularly studied. Of these, 417 index cases (408 heterozygotes and 9 homozygotes) were genetically confirmed with FH (FH positive). Cascade screening also identi-

fied 581 heterozygotes and 2 homozygotes. Among the FH positives, the index cases with null allele variants show a more severe phenotype than the index cases with defective allele variants. About 1% of the index cases were diagnosed with other monogenic causes. Of the FH negatives, 34% have hyper-Lp(a), 18% have a polygenic hypercholesterolemia and 1% have a pathogenic variant in heterozygosity in a FH phenocopy genes. The different genetic causes contribute to a variety of phenotypes that require different forms of disease management, specific therapies and have implications for cardiovascular risk stratification and family screening. Therefore, it is essential that the etiology of hypercholesterolemia is identified as early as possible to improve the prognosis of individuals with FH.

_Introdução

A Hipercolesterolemia Familiar (FH) é uma condição genética do metabolismo dos lípidos associada a um elevado risco cardiovascular (1). É uma das condições genéticas mais comuns com uma prevalência de 1:300 na população em geral e uma prevalência ainda maior entre os doentes com doença cardiovascular (DCV) (2). O diagnóstico clínico de FH é realizado segundo critérios específicos, no entanto, apenas o estudo molecular pode estabelecer, ou confirmar, um diagnóstico definitivo de FH (3).

Existem três genes primários associados à FH: *LDLR*, *APOB* e *PCSK9* (4). As variantes no gene *LDLR* podem ser divididas, relativamente à atividade do recetor das LDL, em variantes de alelo nulo e variantes de alelo defeituoso, quando existe, respetivamente, uma perda total de função (<2% de atividade) ou apenas parcial (2-80% de atividade) (5).



No entanto, e apesar dos avanços tecnológicos no diagnóstico genético, a FH encontra-se subdiagnosticada na maioria dos países e é diagnosticada tardiamente, em média aos 46 anos de idade (1,6). Apenas 40-60% dos indivíduos diagnosticados clinicamente são identificados com uma variante patogénica num dos 3 genes primários da FH (3), sendo provável que os restantes indivíduos possam ter outra causa genética, monogénica ou poligénica, que contribua para os seus níveis elevados de colesterol LDL (c-LDL).

A tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS) permite uma pesquisa rápida de variantes em diversos genes em simultâneo. Para o diagnóstico genético da FH recomenda-se a utilização de um painel de genes que contenha os 3 genes primários da FH, e adicionalmente 5 genes fenocópias da FH (*LDLRAP1*, *LIPA*, *ACBG5*, *ABCG8* e *APOE*). Os genes fenocópias da FH estão relacionados com condições que conferem um fenótipo de hipercolesterolemia semelhante à FH (3). A hiper-Lp(a) também tem sido referenciada como uma fenocópia da FH, mas por enquanto a sua caracterização é apenas bioquímica (7-10).

_Objetivos

Neste trabalho pretende-se apresentar a relação fenótipo-genótipo dos indivíduos com critérios clínicos de hipercolesterolemia familiar referenciados ao Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar entre 1999 e 2021.

_Material e métodos

O Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar é um projeto de investigação, coordenado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge desde 1999, gratuito para os seus participantes e instituições de saúde colaboradoras (Bourbon and Rato, 2006; Bourbon *et al.*, 2008). No DPS-INSA foi realizado um perfil bioquímico com determinação de colesterol total (CT), c-LDL direto, colesterol HDL (c-HDL), triglicéridos (TG),

apolipoproteína A1 (apoA1), apolipoproteína B (apoB), e lipoproteína(a) (Lp(a)), por métodos enzimáticos colorimétricos e imunoturbidimétricos.

Desde 2017, o estudo molecular é realizado através de um painel de NGS que contém 8 genes (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *APOE*, *LIPA*, *ABCG5* e *ABCG8*). Para os casos recebidos entre 1999 e 2016, o estudo molecular envolveu o estudo dos genes *LDLR*, *APOB* (apenas fragmentos de 2 exões) e *PCSK9*, através das metodologias de sequenciação de Sanger e de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), para determinação de grandes deleções no gene *LDLR* (11). Em alguns casos selecionados foi realizada uma re-sequenciação por painel de NGS. Todas as variantes encontradas por NGS foram validadas por sequenciação de Sanger, e o estudo foi alargado aos familiares, sempre que possível, para identificação de familiares em risco e para a análise da co-segregação de variantes. A classificação das variantes foi realizada utilizando as recomendações do painel de peritos do *Clinical Genome Resource* (ClinGen) *Familial Hypercholesterolemia Variant Curation Expert Panel* (FH VCEP) para o gene *LDLR* (12) e do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (13) para os restantes genes.

_Resultados

Até ao fim de 2021 foram estudados 1005 indivíduos com critérios clínicos de FH (casos-índice). Destes, foram confirmados geneticamente com FH, 417 casos-índice: 408 heterozigotos e 9 homozigotos (3 homozigotos verdadeiros e 6 heterozigotos compostos), que apresentam variantes patogénicas ou provavelmente patogénicas nos 3 genes primários da FH (FH positivos). Nos FH heterozigotos, 94% (n=381) foram identificados com variantes no gene *LDLR*, e em menor frequência com variantes nos genes *APOB* (n=22; 5%) e *PCSK9* (n=6; 1%). Adicionalmente, em 2% dos casos-índice (n=24) foi identificada uma variante de significado incerto (VUS) no gene *LDLR*.



Nos indivíduos com variantes patogénicas ou provavelmente patogénicas no gene *LDLR*, 53% (n=203) apresentam variantes de alelo defeituoso, 33% (n=127) possuem variantes de alelo nulo, e os restantes 14% apresentam variantes cujo tipo de alelo não é possível de determinar devido à falta de estudos funcionais. Tanto na coorte de crianças como na coorte de adultos verificou-se uma associação, estatisticamente significativa, de níveis de c-LDL mais elevados em indivíduos com variantes de alelo nulo quando comparados com indivíduos com variantes de alelo defeituoso (crianças: 231.9±49.4 vs. 209.2±51.3 mg/dL, $p=0.001$; adultos: 290.4±96.2 vs. 257.2±94.7 mg/dL, $p=0.022$).

O estudo de familiares realizado nas 417 famílias com FH permitiu a identificação de mais 583 indivíduos: 581 FH heterozigotos e 2 homozigotos (1 heterozigoto composto e uma dupla heterozigotia nos genes *LDLR-APOB*).

Outras causas de hipercolesterolemia monogénica, como deficiência de lipase ácida lisossomal (LALD), sitosterolemia, analbuminemia congénita e disbetalipoproteinemia, foram identificadas em 7 casos-índice da presente coorte (**gráfico 1A**).

Os restantes casos-índice (n=557), em que não foi identificada qualquer variante patogénica ou provavelmente patogénica nos genes primários da FH, constituem o grupo de FH negativos que correspondem a 56% da coorte.

Na **tabela 1** encontram-se as características demográficas, clínicas e perfil lipídico da coorte portuguesa (casos-índice), separada em FH positivos e FH negativos. Para esta análise foram excluídos os casos-índice portadores de VUS no gene *LDLR* e com outras causas monogénicas.

Um terço dos indivíduos FH negativos (31%) apresenta níveis de Lp(a) acima de 50 mg/dl (125 nmol/L), 16% possuem uma maior probabilidade de ter uma hipercolesterolemia de causa poligénica e 2% possui uma

variante patogénica em heterozigotia nos genes *ABCG5*, *ABCG8* ou *APOE*. Adicionalmente, 9% foram identificados com VUS nos genes *APOB* e *PCSK9* e outros 5% possuem VUS, em heterozigotia, nos genes *ABCG5*, *ABCG8*, *APOE* e *LIPA*. Não foram identificadas variantes raras no gene *LDLRAP1*. Nos restantes indivíduos (34%) a causa para a sua hipercolesterolemia permanece desconhecida (**gráfico 1B**).

Os portadores de variantes nos genes *ABCG5/8* possuem níveis de c-LDL estatisticamente mais baixos comparando com indivíduos com FH, que foi observado tanto no grupo de crianças (175.8±25.8 mg/dL vs. 217.1±49.7 mg/dL, $p<0.001$), como no grupo de adultos (223,8±67,6 mg/dL vs. 268,2±96,6 mg/dL, $p=0.025$).

No grupo dos adultos, a presença de DCV apresentou-se estatisticamente mais elevada nos indivíduos com hiper-Lp(a) comparando com indivíduos com níveis normais de Lp(a) (28,5% vs. 16,3%, $p<0,001$). A presença de DCV manteve-se estatisticamente mais elevada nos FH negativos com hiper-Lp(a) (27,3% vs. 16,7%, $p=0,038$) e nos FH positivos com hiper-Lp(a) (31,5% vs. 13,6%, $p=0,005$) comparando com indivíduos com níveis normais de Lp(a).



Tabela 1: Características demográficas, clínicas e perfil lipídico da coorte do Estudo Português de FH.

	Coorte pediátrica (n=426)				Coorte adulta (n= 579)			
	Total	FH positivos	FH negativos	P-value	Total	FH positivos	FH negativos	P-value
N (%)	–	193 (47,3)	215 (52,7)	–	–	213 (38,2)	344 (61,8)	–
Masculino N (%)	191 (44,8)	97 (50,3)	87 (40,5)	0,058	251 (43,4)	86 (40,4)	155 (45,1)	0,292
Idade	10,2±3,7	10,2±3,8	10,2±3,6	0,796	45,0±13,9	43,3±14,9	46,0±13,1	0,014
IMC	19,6±4,0	19,2±4,0	20,0±4,2	0,045	26,0±4,4	26,1±4,7	26,0±4,2	0,587
Presença de DCV‡ prematura N (%)	0 (0)	–	–	–	106 (18,3)	36 (16,9)	62 (18)	0,819
Idade do 1º evento (anos)	0 (0)	–	–	–	43,9±9,2	42,8±9,8	44,3±8,2	0,431
Xantomas tendinosos N (%)	2 (0,5)	1 (0,5)	0 (0)	–	30 (5,2)	21 (9,9)	7 (2)	<0,001*
Terapêutica hipolipemiante N (%)	113 (26,5)	64 (69,6)	42 (51,2)	0,019*	443 (91,7)	166 (94,3)	261 (89,7)	0,090
Com perfil lipídico† N	379	181	198	–	499	191	308	–
CT (mg/dL)	260,5±53,8	279,5±47,1	238,0±41,6	0,000*	305,5±81,3	334,5±91,3	284,5±64,8	<0,001*
c-LDL (mg/dL)	191,3±57,4	217,1±49,7	162,1±38,8	0,000*	232,4±86,8	268,2±96,6	206,8±66,8	<0,001*
c-HDL (mg/dL)	55,3±15,3	51,1±12,4	59,2±16,9	<0,001*	55,3±17,0	54,7±14,3	55,9±17,1	0,253
TG (mg/dL)	87,5±46,2	77,3±35,1	95,1±49,7	<0,001*	136,8±73,7	121,4±79,4	146,6±69,4	<0,001*
apoB (mg/dL)	116,9±33,7	127,3±28,3	104,5±26,3	<0,001*	131,2±46,9	149,7±52,4	118,3±38,4	<0,001*
apoA1 (mg/dL)	143,9±29,9	133,4±22,2	153,6±30,7	<0,001*	154,8±35,1	147,6±34,8	160,2±34,7	<0,001*
apoB/apoA1 (mg/dL)	0,85±0,33	0,98±0,29	0,71±0,26	0,000*	0,90±0,44	1,08±0,52	0,78±0,34	<0,001*
Lp(a) (mg/dL)	49,9±58,1	40,6±42,8	57,2±64,9	0,084	54,1±57,7	54,2±55,3	53,7±60,2	0,347
hiper-Lp(a)‡ N (%)	134 (34,0)	46 (25,4)	83 (41,9)	<0,001*	193 (37,2)	73 (38,2)	110 (35,7)	0,319

Os dados são expressos em média ± desvio padrão, salvo indicação em contrário.

FH, Hipercolesterolemia Familiar; DCV, doença cardiovascular; CT, colesterol total; c-LDL, colesterol LDL; c-HDL, colesterol HDL; TG, triglicéridos; apoB, apolipoproteína B; apoA1, apolipoproteína A1; Lp(a), lipoproteína (a)

‡ DCV definido se ocorreu algum dos eventos: angina, enfarte do miocárdio, angioplastia coronária transluminal percutânea ou cirurgia de revascularização do miocárdio; DCV prematura indica se o evento ocorreu <55 anos de idade nos homens e <65 anos de idade nas mulheres.

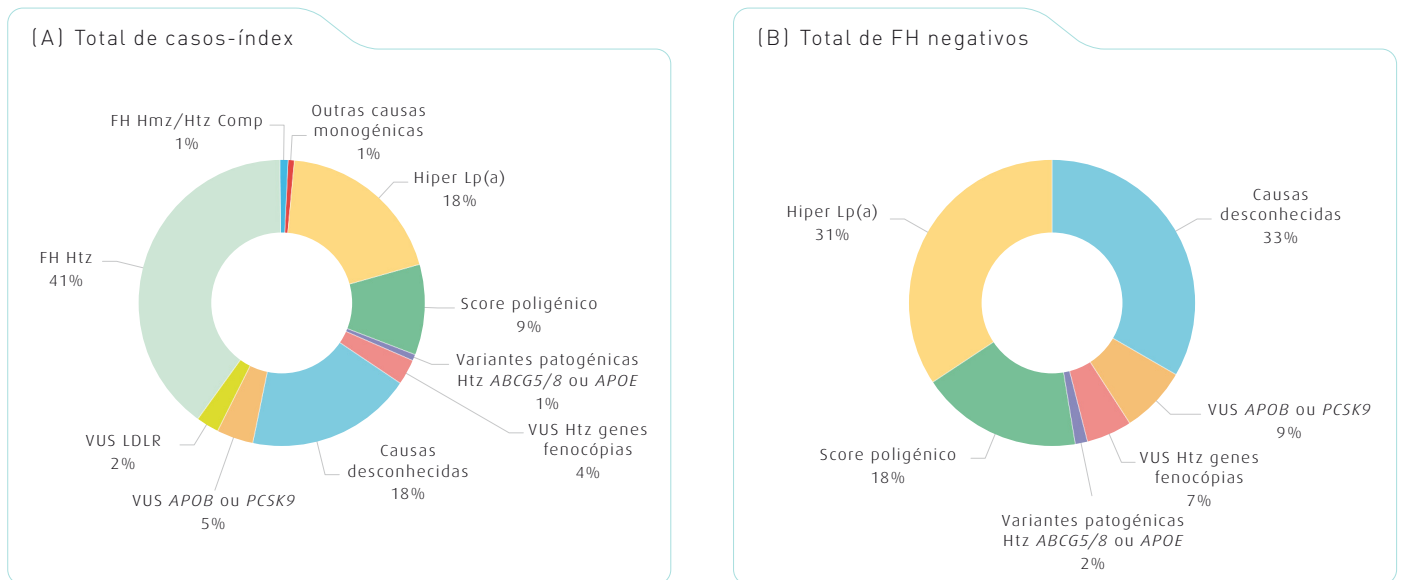
† Perfil lipídico determinado no INSA no momento da entrada no Estudo português de FH. Em caso de ausência de valores não tratados, foram aplicados fatores de correção de 0,8 e 0,7 aos valores TC ou c-LDL, respetivamente, para os indivíduos em tratamento (12).

‡ hiper-Lp(a) definido para valores de Lp(a) >50mg/dl ou >125nmol/L.

* p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo entre FH positivos versus FH negativos.



Gráfico 1: Caracterização genética dos indivíduos do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar com critérios clínicos de FH: (A) frequência por total de casos-índice (B) frequência por total de FH negativos.



FH Hmz – indivíduos homocigotos verdadeiros; Htz Comp – heterocigotos compostos; VUS – variantes de significado incerto.

Discussão

A FH foi geneticamente confirmada em 42% dos casos-índice com diagnóstico clínico de FH (incluindo 1% em homocigotia) referenciados ao Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar, por apresentarem variantes patogénicas ou provavelmente patogénicas nos genes primários da FH. No entanto, existe ainda uma pequena fração de casos-índice onde foi identificada uma variante de significado incerto (VUS) nos genes *LDLR*, *APOB* ou *PCSK9*, havendo a necessidade de realizar estudos funcionais para confirmar o efeito da variante na atividade do recetor e verificar se a sua classificação altera para patogénica ou provavelmente patogénica.

A maior parte dos FH heterocigotos (94%) possui uma variante patogénica ou provavelmente patogénica no gene *LDLR*. Tanto na coorte de crianças como na coorte de adultos, verificou-se que indivíduos com variantes de alelo nulo apresentavam níveis mais elevados de c-LDL quando comparados com indivíduos com variantes de alelo defeituoso. Esta associação de variantes de alelo nulo a um fenótipo mais severo já havia sido

reportada anteriormente noutros estudos (5,14-16), e foi também associada a uma menor resposta ao tratamento (17,18).

Tal como observado noutros países (19-21), em mais de metade dos casos-índice da nossa coorte não foi identificada uma variante patogénica ou provavelmente patogénica nos genes primários (FH negativos). Estes FH negativos apresentam um fenótipo menos severo com níveis de CT, c-LDL, apoB e apoB/apoA1, em média, mais baixos quando comparados com os casos-índice confirmados geneticamente com FH (FH positivos) (tabela 1). Estas diferenças foram observadas tanto na coorte pediátrica como na coorte de adultos.

Os dados apresentados sugerem que a presença de variantes raras nos genes fenocópias da FH tem um impacto nos níveis de c-LDL, levando a um fenótipo de hipercolesterolemia grave. Estudos recentes revelaram que os indivíduos portadores de variantes em heterocigotia nos genes *ABCG5/ABCG8* apresentam níveis de c-LDL mais elevados que o geral da população, mas inferiores aos dos indivíduos com FH hetero-



zigótica, tal como observado neste trabalho.. Por isso a presença de variantes patogénicas nestes genes tem sido amplamente associada ao fenótipo de FH (22-24).

Embora os valores médios de Lp(a) sejam semelhantes entre indivíduos FH positivos e FH negativos, a frequência de indivíduos com hiper-Lp(a) foi estatisticamente mais elevada ($p=0,035$) nos FH negativos, mantendo-se mais elevada na coorte pediátrica. Um estudo recente realizado numa grande coorte de crianças com suspeita de FH observou resultados semelhantes (25). A presença de DCV nos adultos com hiper-Lp(a) foi estatisticamente mais elevada ($p<0,001$) quando comparada com adultos com níveis normais de Lp(a). Mesmo estratificando os resultados com base na presença ou ausência de variantes patogénicas nos genes primários de FH, a prevalência de DCV permanece estatisticamente mais elevada nos indivíduos com hiper-Lp(a) quando comparados com indivíduos com níveis normais de Lp(a). Isto significa que a Lp(a) elevada poderá ser também um modelador importante do fenótipo de FH, contribuindo para o agravamento do mesmo e para o aumento do risco de doença coronária prematura (26,27).

Observamos ainda que a hiper-Lp(a) pode ser a causa do fenótipo de hipercolesterolemia num elevado número de FH negativos, especialmente nas crianças, reforçando a importância de quantificar a Lp(a) em todos os indivíduos com diagnóstico clínico de FH, de modo a esclarecer a causa do seu fenótipo e identificar aqueles em maior risco.

Conclusões

Atualmente, o diagnóstico bioquímico e genético de indivíduos com suspeita clínica de hipercolesterolemia familiar (FH) permite identificar diferentes causas para a hipercolesterolemia grave, apresentada por estes indivíduos, tornando possível uma medicina cada vez mais personalizada na FH.

As diferentes causas contribuem para uma variedade de fenótipos que requerem a aplicação de diferentes abordagens, quer na gestão da doença e da aplicação de terapias específicas, como tem também implicações na estratificação do risco e no rastreio dos familiares.

Por esta razão, é essencial que os indivíduos com suspeita clínica de FH sejam identificados, e selecionados para estudo molecular, o mais precocemente possível para melhorar o prognóstico da sua condição.

Agradecimentos:

A todos os participantes do estudo de investigação Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar; A colaboração das unidades UDR/DPS e UTI na determinação do perfil lipídico e nas corridas de sequenciação, respetivamente.

Investigadores do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar: ARS Lisboa e Vale do Tejo – C.S. Unhos, Dra. Alda Egipto; C.H. Algarve – Faro, Dr. Márcio de Moura; C.H. de Entre o Douro e Vouga, EPE – H.S. Sebastião, EPE, Dra. Luísa Moreira, Dr. Miguel Costa; C.H. de Trás-os-Montes e Alto Douro, EPE, Dra. Natalina Miguel, Dra. Vânia Martins, Dr. António Trindade, Dra. Sandra Pereira; C.H. do Porto, EPE – H. Sto. António, Dra. Helena Mansilha, Dra. Ermelinda Santos Silva, Dra. Carla Laranjeira; C.H. e Univ. do Porto – Maternidade Júlio Dinis, Dra. Cláudia Falcão Reis; C.H. e Univ. do Porto, EPE – H. Sto. António, Dra. Isabel Palma, Dra. Liliana Fonseca; C.H. Leiria Pombal, EPE – H. Sto. André, Dr. António Cruz, Dr. Pascoal Moleiro, Dra. Maria do Rosário Barroso, Dr. Pedro Soares, Dra. Vera Frazão Vieira; C.H. Lisboa Norte, EPE – H. Sta. Maria, Dra. Patrícia Almeida Dias, Dra. Ana Gaspar, Dra. Oana Moldovan, Dra. Isabel Cordeiro, Dra. Patrícia Janeiro, Dra. Cláudia Costa, Dra. Patrícia Lipari Pinto, Dr. André Travessa, Dra. Inês Colaço, Dra. Tânia Vassalo, Dra. Rita Jotta de Oliveira, Dr. Patrício Aguiar, Dra. Raquel Gouveia da Silva; C.H. Oeste – H. Torres Vedras, Dra. Fabiana Pimentel; C.H. Póvoa Varzim – Vila do Conde, Dra. Cristina Marques; C.H. Setúbal, Dra. Quitéria Rato, Dra. Sara Gonçalves, Dra. Joana Silva Ferreira; C.H. Tondela – Viseu, Dra. Ana Margarida Marques; C.S. Bragança, Dra. Clementina Fernandes; C.S. de Lagoa, Dra. Lucinda Santos; C.S. de Meda, Dr. António Leitão; C.S. do Seixal, Dr. José Manuel Feliz;



C.S. Proença-a-Nova, Dr. Jorge Pintado Alves; C.H. da Cova da Beira, EPE – Covilhã, Dra. Sofia Ferreira, Dra. Margarida Ascensão; C.H. do Algarve – Faro, Dra. Guida Gama, Dra. Maria João Virtuoso, Dr. Nuno Marques; Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE, Dr. José Manuel Silva, Dr. José Pereira de Moura, Dr. Rogério Ferreira, Dr. Hugo Clemente, Dra. Elsa Gaspar, Dr. João Porto, Dr. Diana Gonçalves, Dra. Maja Petrova, Dra. Patrícia Afonso Mendes, Dra. Lelita Santos; Centro Materno Infantil do Norte, Dra. Mónica Tavares; Clínica CUF Miraflores, Dra. Inês Batista Gomes; Clínica Missão Saúde, Dra. Raquel Ribeiro; CUF Belém Clínica, Dra. Dina Martins Neves; CUF Descobertas, Dra. Carolina Neves; Faculdade Ciências Médicas, UNL, Dra. Graça Morais; H Beatriz Ângelo, Dra. Vanessa Mendonça; H Cascais, Dr. Diogo Cruz, Dra. Sara Martins; H Cruz Vermelha, Dra. Cláudia Fernandes; H Curry Cabral, Dra. Ana Paula Bogalho, Dr. José Silva Nunes; H.D. Estefânia, Dra. Sílvia Sequeira, Dra. Leonor Sasseti, Dra. Ana Cristina Ferreira, Dra. Catarina Limbert, Dra. Patrícia Gaspar Silva; H. de Braga, Dra. Henedina Antunes; H de Dia de Pediatria – H Nossa Senhora do Rosário – C.H. do Barreiro Montijo, EPE, Dra. Susana Correia, Dra. Patrícia Pais, Dra. Sofia Vidal Castro; H. Prof. Doutor Fernando Fonseca EPE, Dra. Piedade Lemos, Dra. Maria de Lurdes Torre, Dra. Raquel Coelho, Dra. Patrícia Vasconcelos; H. de Santiago, Dr. Duarte Gouveia; H. Dr. Nélio Mendonça – Funchal, Dr. Hugo de Mendonça Café, Dr. Francisco Silva; H. Egas Moniz, Dr. João Sequeira Duarte, Dr. Carlos Vasconcelos, Dra. Clotilde Gouveia Limbert, Dra. Maria Manuela Oliveira, Dr. Ricardo Fonseca, Dr. Carlos Tavares Bello, Dr. Bernardo Marques; H. Garcia da Orta, EPE, Dr. Mário Amaro, Dra. Ana Catarina Gomes, Dra. Otilia Simões, Dra. Rita Calé Theotónio, Dra. Sofia Alegria, Dra. Ana Rita Pereira, Dra. Ana Isabel Costa; H. Litoral Alentejano, Dra. Maria Luísa Gonçalves, Dr. Fernando Simões, Dr. Armindo Ribeiro; H. Lusíadas Lisboa, Dr. Francisco Araújo; H. Militar, Dr. Evangelista Rocha; H. Pediátrico Carmona da Mota, Dra. Lina Cardoso Ramos, Dra. Paula Garcia, Dra. Paula Martins, Dra. Margarida Venâncio, Dra. Luísa Diogo Matos, Dra. Sofia Maia, Dra. Ana Maria Garabal, Dr. Pedro Louro, Dr. Cláudio Henriques; H. Pedro Hispano, Dr. António Furtado, Dra. Ana Sofia Correia; H. Pulido Valente, Dra. Teresa Mota; H. S. João, EPE, Dr. António Guerra, Dra. Elisabete Martins, Dra. Cecília Frutuoso, Dra. Ana Rita Godinho, Dr. Roberto Pinto, Dra. Sofia Cardoso Torres, Dra. Alzira Nunes; H. Santarém, Dra. Ana Filipa Almeida; H. Sta. Luzia De Elvas, Dr. José Eduardo Aguiar; H. Sta. Maria Maior, EPE, Dra. Goreti Lobarinhas, Dra. Conceição Ferreira; H. Sta. Marta, Dr. Pedro Marques da Silva, Dr. Miguel Toscano Rico, Dr. Sérgio Laranjo, Dra. Filipa Paramés, Dr. Tiago Pack, Dr. Guilherme Lourenço, Dr. André Conchinha; H. CUF Descobertas, Dra. Luísa Pires; H. da Luz, Dr. Nuno Cardim, Dr. Daniel Ferreira, Dra. Anabela Raimundo; H. da Luz – Linhas de Torres, Dr. Alberto Mello e Silva; H. da Luz Arrábida, Dr. Vânia Ribeiro; H. Da Senhora Da Oliveira – Guimarães, EPE, Dra. Olga Azevedo, Dra. Bebiãna Faria, Dr. José Miguel Salgado, Dra. Carla Bilhoto, Dra. Andreia Lopes, Dra. Helena Ferreira; H. de Santa Cruz, Dra. Isabel Gaspar, Dra. Renata Rossi, Dra. Margarida Bruges, Dr. Miguel Mendes, Dr. Carlos Aguiar; H. de Vila Franca de Xira, Dra. Patrícia Ferreira; H. Divino Espírito Santo de Ponta Delgada, Dr. João Anselmo, Dra. Catarina Senra Moniz, Dr. Bernardo Dias Pereira, Dra. Cláudia Rodrigues, Dr. António Xavier Fontes, H. dos Marmeleiros, Dra. Isabel Azevedo; H. Lusíadas Lisboa, Dra. Margarida Lobo Antunes; H. Rainha Santa Isabel – Torres Novas, Dra. Ana Leonor Gonçalves; Instituto do Coração, Dr. Ricardo Seabra Gomes; Instituto Nacional de Cardiologia Preventiva Professor Fernando de Pádua, Dra. Heloísa Santos; UCSP Guarda – Extensão S. Miguel, Dra. Adriana Gonçalves; Unidade Saúde Local do Nordeste, Dra. Luís Ribeiro; USF das Conchas, Dr. Pedro Alves; USF Linha de Algés, Dr. Francisco Carvalho; USF Tejo, Dra. Fátima Cruz.

Referências bibliográficas:

- (1) EAS Familial Hypercholesterolaemia Studies Collaboration (FHSC). Global perspective of familial hypercholesterolaemia: a cross-sectional study from the EAS Familial Hypercholesterolaemia Studies Collaboration (FHSC). *Lancet*. 2021 Nov 6;398(10312):1713-25. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)01122-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)01122-3)
- (2) Beheshti SO, Madsen CM, Varbo A, et al. Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia: Meta-Analyses of 11 Million Subjects. *J Am Coll Cardiol*. 2020 May 26;75(20):2553-66. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.03.057>
- (3) Sturm AC, Knowles JW, Gidding SS, et al.; Convened by the Familial Hypercholesterolemia Foundation. Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Aug 7;72(6):662-80. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.044>
- (4) Iacocca MA, Hegele RA. Recent advances in genetic testing for familial hypercholesterolemia. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017 Jul;17(7):641-51. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1332997>
- (5) Bourbon M, Alves AC, Alonso R, et al. Mutational analysis and genotype-phenotype relation in familial hypercholesterolemia: The SAFEHEART registry. *Atherosclerosis*. 2017 Jul;262:8-13. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.04.002>
- (6) Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 2013 Dec;34(45):3478-90a. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehc273>
- (7) Ellis KL, Pang J, Chan DC, et al. Familial combined hyperlipidemia and hyperlipoprotein(a) as phenotypic mimics of familial hypercholesterolemia: Frequencies, associations and predictions. *J Clin Lipidol*. 2016 Nov-Dec;10(6):1329-37.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.08.011>
- (8) Langsted A, Kamstrup PR, Benn M, et al. High lipoprotein(a) as a possible cause of clinical familial hypercholesterolaemia: a prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016 Jul;4(7):577-87. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30042-0](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30042-0)
- (9) Coassin S, Kronenberg F. Lipoprotein(a) beyond the kringle IV repeat polymorphism: The complexity of genetic variation in the LPA gene. *Atherosclerosis*. 2022 May;349:17-35. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2022.04.003>
- (10) Kronenberg F, Mora S, Stroes ESG, et al. Lipoprotein(a) in atherosclerotic cardiovascular disease and aortic stenosis: a European Atherosclerosis Society consensus statement. *Eur Heart J*. 2022 Oct 14;43(39):3925-46. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac361>
- (11) Medeiros AM, Alves AC, Bourbon M. Mutational analysis of a cohort with clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia: considerations for genetic diagnosis improvement. *Genet Med*. 2016 Apr;18(4):316-24. Epub 2015 May 28. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.71>
- (12) Chora JR, Iacocca MA, Tichý L, et al.; ClinGen Familial Hypercholesterolemia Expert Panel. The Clinical Genome Resource (ClinGen) Familial Hypercholesterolemia Variant Curation Expert Panel consensus guidelines for LDLR variant classification. *Genet Med*. 2022 Feb;24(2):293-306. Epub 2021 Nov 30. <https://doi.org/10.1016/j.gim.2021.09.012>
- (13) Richards S, Aziz N, Bale S, et al; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- (14) Etxebarría A, Benito-Vicente A, Palacios L, et al. Functional characterization and classification of frequent low-density lipoprotein receptor variants. *Hum Mutat*. 2015 Jan;36(1):129-41. Epub 2014 Nov 27. <https://doi.org/10.1002/humu.22721>
- (15) Alonso R, Mata N, Castillo S, et al; Spanish Familial Hypercholesterolaemia Group. Cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: influence of low-density lipoprotein receptor mutation type and classic risk factors. *Atherosclerosis*. 2008 Oct;200(2):315-21. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.024>



artigos breves_ n. 2

- (16) Graça R, Alves AC, Zimon M, et al. Functional profiling of LDLR variants: Important evidence for variant classification: Functional profiling of LDLR variants. *J Clin Lipidol*. 2022 Jul-Aug;16(4):516-24. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2022.04.005>
- (17) Santos PC, Morgan AC, Jannes CE, et al. Presence and type of low density lipoprotein receptor (LDLR) mutation influences the lipid profile and response to lipid-lowering therapy in Brazilian patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2014 Mar;233(1):206-10. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.028>
- (18) Perez de Isla L, Alonso R, Watts GF, et al.; SAFEHEART Investigators. Attainment of LDL-Cholesterol Treatment Goals in Patients With Familial Hypercholesterolemia: 5-Year SAFEHEART Registry Follow-Up. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Mar 22;67(11):1278-85. doi: 10.1016/j.jacc.2016.01.008
- (19) Jannes CE, Santos RD, de Souza Silva PR, et al. Familial hypercholesterolemia in Brazil: cascade screening program, clinical and genetic aspects. *Atherosclerosis*. 2015 Jan;238(1):101-7. Epub 2014 Nov 14. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.11.009>
- (20) Dron JS, Wang J, McIntyre AD, et al. Six years' experience with LipidSeq: clinical and research learnings from a hybrid, targeted sequencing panel for dyslipidemias. *BMC Med Genomics*. 2020 Feb 10;13(1):23. <https://doi.org/10.1186/s12920-020-0669-2>
- (21) Reeskamp LF, Tromp TR, Defesche JC, et al. Next-generation sequencing to confirm clinical familial hypercholesterolemia. *Eur J Prev Cardiol*. 2021 Jul 23;28(8):875-83. <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwaa451>
- (22) Tada H, Okada H, Nomura A, et al. Rare and Deleterious Mutations in ABCG5/ABCG8 Genes Contribute to Mimicking and Worsening of Familial Hypercholesterolemia Phenotype. *Circ J*. 2019 Aug 23;83(9):1917-24. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-19-0317>
- (23) Tada MT, Rocha VZ, Lima IR, et al. Screening of ABCG5 and ABCG8 Genes for Sitossterolemia in a Familial Hypercholesterolemia Cascade Screening Program. *Circ Genom Precis Med*. 2022 Jun;15(3):e003390. <https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.121.003390>
- (24) Reeskamp LF, Volta A, Zuurbier L, et al. ABCG5 and ABCG8 genetic variants in familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol*. 2020 Mar-Apr;14(2):207-17.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2020.01.007>
- (25) de Boer LM, Hutten BA, Zwinderman AH, et al. Lipoprotein(a) levels in children with suspected familial hypercholesterolaemia: a cross-sectional study. *Eur Heart J*. 2023 Apr 21;44(16):1421-28. Epub 2022 Nov 16. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac660>. Erratum in: *Eur Heart J*. 2023 Feb 21;44(8):679
- (26) Ellis KL, Pérez de Isla L, Alonso R, et al. Value of Measuring Lipoprotein(a) During Cascade Testing for Familial Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 2019 Mar 12;73(9):1029-39. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.12.037>
- (27) Trinder M, Uddin MM, Finneran P, et al. Clinical Utility of Lipoprotein(a) and LPA Genetic Risk Score in Risk Prediction of Incident Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *JAMA Cardiol*. 2020 Oct 6;6(3):1-9. Epub 2020 Oct 6. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.5398>

Análise bioquímica do líquido cefalorraquidiano para o diagnóstico de doenças hereditárias dos neurotransmissores: casuística e experiência laboratorial

Biochemical analysis of cerebrospinal fluid for the diagnosis of hereditary neurotransmitter diseases: case series and laboratory experience

M. Rosário Rodrigues

m.rosario.rodrigues@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Patologia Clínica. Laboratório de Bioquímica Genética/Endocrinologia Especial, Hospital Dona Estefânia, CHLC, Lisboa, Portugal

(3) Biosystems & Integrative Sciences Institute. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Resumo

As doenças genéticas relacionadas com o metabolismo dos neurotransmissores são um grupo de doenças neurometabólicas em expansão. Este artigo apresenta a revisão da análise de biomarcadores no líquido cefalorraquidiano (LCR) para o diagnóstico de doenças hereditárias dos neurotransmissores (DHN). Fez-se um levantamento retrospectivo dos doentes submetidos a análise bioquímica dos neurotransmissores (NT), por apresentarem suspeita de DHN, com uma variabilidade de apresentações neurológicas e com idades que variavam entre a idade neonatal, pediátrica e adulta. O estudo foi efetuado no Laboratório de Bioquímica Genética/Endocrinologia Especial do Hospital Dona Estefânia (HDE), CHULC, Lisboa, num período compreendido entre 2015-2021. Dos 277 casos levantados 107 (38,6%) apresentavam concentração de metabolitos dentro dos valores de referência. Dos restantes 170 pacientes que apresentavam alterações, três (1,08%) apresentaram um perfil bioquímico compatível com défice primário dos NT, confirmado por diagnóstico molecular; em 165 dos casos (59,6%) concluiu-se que as alterações dos metabolitos estavam relacionadas com alterações secundárias. Os restantes dois casos (0,72%) correspondiam a distonias sensíveis à dopa, e permaneceram sem confirmação molecular. Tentamos explorar a correlação de alterações secundárias dos neurotransmissores major com as manifestações clínicas. Com este trabalho preliminar pretendemos divulgar e evidenciar a importância destes diagnósticos, que permitem excluir alterações primárias de secundárias e, ainda, partilhar a experiência e a casuística que servirá de base a um futuro artigo de investigação mais completo.

Abstract

Genetic alterations related to neurotransmitter metabolism are an expanding group of neurometabolic diseases. In this article, we review the analysis of biomarkers in cerebrospinal fluids (CSF) for the diagnosis of Hereditary Neurotransmitter Disorders (HND). A retrospective survey was carried out on patients submitted to biochemical analysis of neurotransmitters, due to suspicion of HDN, with variable neurological presentations, and ages ranging from neonatal, to pediatric and adult. The study was carried out at the Laboratory of Biochemical Genetics/Special Endocrinology at the Hospital

Dona Estefania (HDE), Lisbon, between 2015-2021. Of the 277 cases surveyed, 107 (38.6%) had concentrations of metabolites within the reference values. Of the remaining 170 patients with alterations, 3 cases (1.08%) had a biochemical profile compatible with a primary deficit with confirmed molecular diagnosis, 165 cases (59.6%) were considered related to secondary alterations, and the remaining 2 cases (0.72%) corresponding to dopa-reponsive dystonias, remained without molecular confirmation. We attempted to explore the correlation of minor changes in major neurotransmitters with clinical manifestations. With this preliminary article, we intend to disseminate and highlight the importance of these diagnoses, which allow excluding primary and secondary alterations, as well as to share the experience and reasoning, serving as a basis for ongoing research.

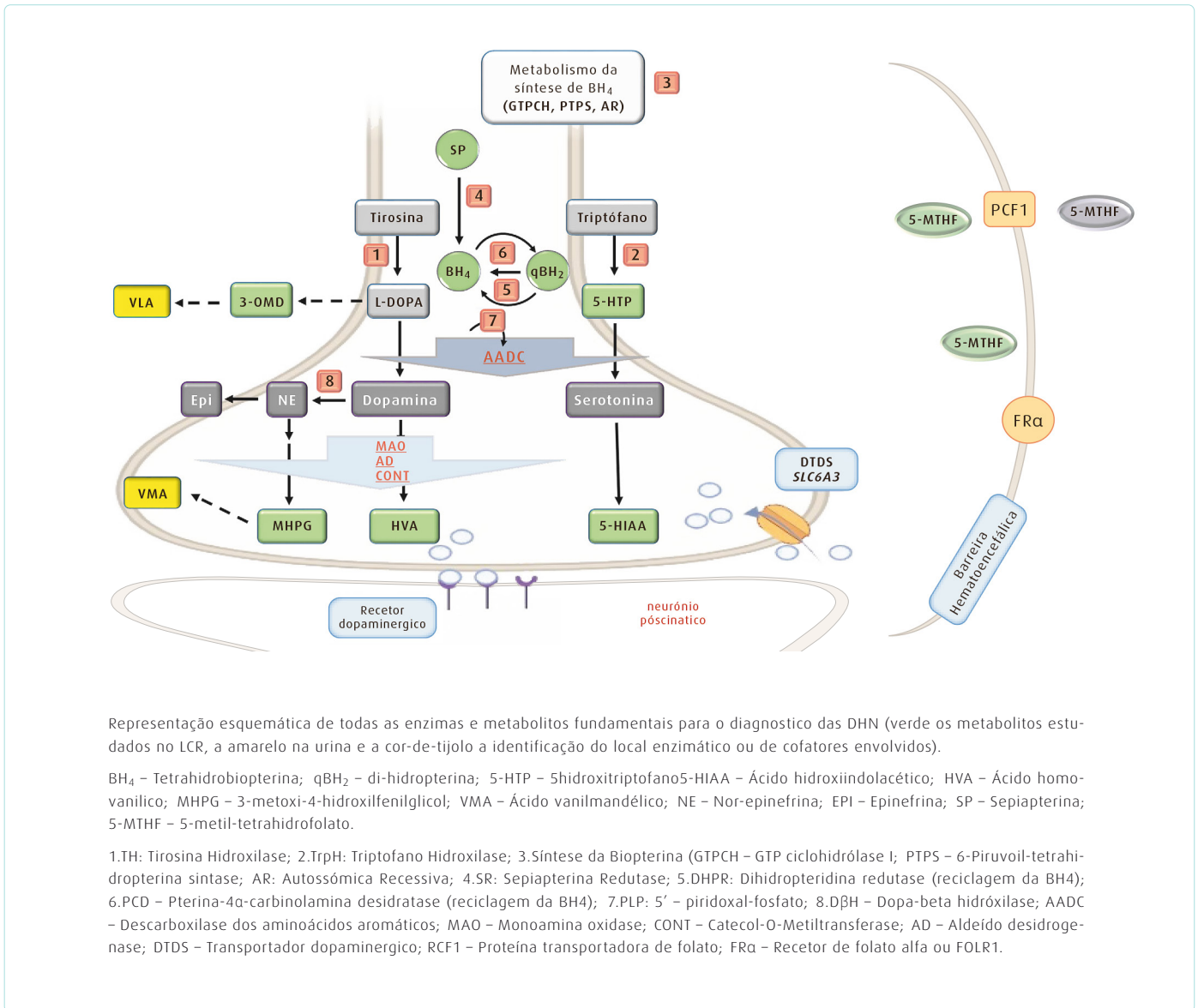
Introdução

As doenças hereditárias dos neurotransmissores (DHN) são um grupo de doenças neurometabólicas que resultam de alterações nas enzimas envolvidas na síntese, degradação e transporte dos neurotransmissores (aminas biogénicas) bem como no metabolismo dos cofatores que ativam essas enzimas, como o fosfato piridoxal (PLP) e a tetrahydrobiopterina (BH₄) e ainda no défice em folato cerebral (5-metil-tetrahidrofolato; 5-MTHF) (1-3) (figura 1).

A maioria das DHN manifesta-se na idade neonatal e infância, embora algumas formas possam surgir na adolescência ou mesmo idade adulta e apresentam variados fenótipos clínicos. Os sintomas clínicos estão estritamente relacionados aos efeitos no défice de dopamina e serotonina, o que permite ajudar a carac-



Figura 1: Esquema das vias metabólicas de síntese, degradação e transporte dos neurotransmissores (NT) e regeneração/síntese dos compostos pterínicos.



terizar a doença. Os sinais de deficiência dopaminérgica incluem parkinsonismo, distonia, coreia, crise oculogírica, ptose, hipersalivação e epilepsia mioclónica. As manifestações de alteração na serotonina são menos bem definidas e incluem instabilidade térmica, sudorese, comportamento agressivo e alteração do sono. Globalmente envolvem várias combinações de manifestações neurológicas, podendo mesmo mimetizar paralisia cerebral (3,4).



O estudo bioquímico destas patologias assenta na quantificação dos biomarcadores (**tabela 1**) através da análise cromatográfica do um perfil metabólico no líquido cefalorraquidiano (LCR) característico, uma vez que marcadores periféricos no sangue ou na urina geralmente não são informativos. O diagnóstico compreende esta análise e a sua interligação com a clínica detalhada. A confirmação de diagnóstico é feita através de estudos genéticos moleculares.

A análise dos NT no LCR deve ser feita num laboratório especialista em DHN com experiência em análise e interpretação (3) de modo a identificar as alterações secundárias que podem estar muitas vezes associadas a outras doenças genéticas, associadas com epilepsia e encefalopatia, com medicação ou mesmo com alterações de padrão de neuro-imagem (5,7,8). A análise destes metabolitos deve ser criteriosa e detalhada de modo a acautelar erros de diagnóstico, permitindo distinguir alterações primárias de secundárias. No entanto, a dificuldade no diagnóstico das DHN pode, muitas vezes, estar relacionada logo à partida, com a punção e colheita do LCR (fase pré analítica), com as técnicas especializadas usadas na análise e quantificação dos metabolitos, bem como, com a experiência na integração e interpretação dos resultados (análise dos perfis

bioquímicos), uma vez que inúmeras outras patologias alteram a concentração destes metabolitos no LCR (1). Daí que a implementação de um protocolo de colheitas em Portugal, à semelhança de outros centros europeus tenha sido crucial, pois veio permitir uniformizar a colheita da amostra e o fluxo até ao laboratório, de modo a reduzir os erros inerentes à punção e acondicionamento das frações do LCR (6).

Desde 2016, está disponível um esquema de Controlo de Qualidade Externo (EQA) estabelecido pela ERN-DIM (*European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism*). O esquema avalia o desempenho quantitativo e avalia a capacidade dos laboratórios em diagnosticar as DHN. O tratamento é geralmente baseado na administração terapêutica de fármacos, cujos mecanismos assentam em reverter as alterações da síntese e/ou degradação dos metabolitos *major* dos NT (5HIAA e HVA), e ainda restaurando os cofatores de ativação enzimática através de suplementação dos mesmos. Nos últimos anos, o conhecimento e descobertas sobre este conjunto de doenças raras aumentou. No entanto, a difícil tarefa de integrar sintomas clínicos e valores laboratoriais torna muitas vezes difícil um diagnóstico precoce e a consequente instituição de um tratamento adequado (9).

Tabela 1: **Doenças Hereditárias dos Neurotransmissores – Painel dos biomarcadores determinados no líquido cefalorraquidiano.**

Metabolitos estudados	Abreviatura
Ácido 5-hidroxiindolacético	5-HIAA
Ácido homovanílico	HVA
3-metoxi-4-hidroxifenilglicol	MHPG
3-orto-metildopa	3-OMD
5-hidroxitriptofano	5-OHTrp
Neopterina	NEO
Biopterina	BIO
Sepiapterina	SP
5-metiltetrahidrofolato	5-MTHF

Material e métodos

A base de dados foi elaborada através do levantamento retrospectivo dos estudos de análises no LCR correspondentes a 277 doentes com alterações neurológicas de etiologia desconhecida, principalmente encefalopatias epiléticas graves e doenças do movimento, análises estas efetuadas no Laboratório de Bioquímica Genética/Endocrinologia Especial do Hospital Dona Estefânia em Lisboa, num período compreendido entre 2015-2021. Estes doentes eram provenientes de várias consultas e internamento em diferentes hospitais do Continente e Ilhas, e apresentavam outros estudos bioquímicos genéticos normais.



As amostras foram obtidas e estudadas com consentimento informado e seguindo as normas da Comissão de Ética do HDE.

A escolha da amostra teve por base como método inclusivo: alterações neurológicas sem componente infecciosa, colheita de acordo com o protocolo e informação clínica detalhada, bem como informação terapêutica ou suspensão da mesma com vista à punção lombar.

As amostras foram colhidas em estreita coadjuvação com o laboratório obedecendo a um protocolo de colheita standard elaborado de acordo com o descrito por Hyland (6) e disponibilizado pelos hospitais. As amostras permaneceram a -70° C até ao momento da análise. O painel completo do estudo dos NT compreendeu a determinação das aminas biogénicas, os compostos pterínicos e o 5-MTHF. De acordo com o padrão dos NT e da clínica, a análise da sepiapterina no LCR foi considerada, mesmo que o resultado de biopterina estivesse dentro dos valores de referência. (10,11).

Realizou-se a deteção e determinação quantitativa de marcadores bioquímicos de diagnóstico recorrendo a métodos cromatográficos de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) acoplado a três diferentes detetores (eletroquímico, *diode array* e de fluorescência), previamente descrito (12).

A análise estatística incluiu análise de variância unidirecional e para o estudo da associação de variáveis o teste de qui-quadrado e uma tabela de contingência bidirecional.

_Resultados e discussão

Neste estudo fez-se um levantamento retrospectivo dos casos submetidos ao painel de estudos dos neurotransmissores (tabela 1), com um grupo de doentes em idade pediátrica e adulta (tabela 2) a quem foi pedido o estudo completo por apresentarem suspeita de DHN.

Considerou-se a existência de alterações nos valores dos neurotransmissores sempre que os níveis dos metabolitos estudados estavam acima ou abaixo do valor de referência. Dos 277 casos levantados, 107 (38,6%) apresentavam a concentração de metabolitos normal. Entre os restantes 170 casos com alteração no perfil bioquímico, 165 (59,6%) concluiu-se como causalidade uma alteração secundária, 3 (1,08%) apresentavam perfil bioquímico compatível com défice primário que foi confirmado através de diagnóstico molecular e, ainda, 2 casos (0,72%) bioquímica e clinicamente correspondentes a distonias sensíveis à dopa cujo diagnóstico molecular não confirmou, um deles por falecimento antes do diagnóstico final.

Tabela 2: Doenças Hereditárias dos Neurotransmissores - Total de casos estudados entre 2015-2021, por idade e sexo (n=277).

Idade/anos	N.º casos	Feminino	Feminino
RN	22	10	12
< 1	83	40	43
1 - 2	64	33	31
3 - 6	48	23	25
7 - 14	38	19	19
> 14	22	11	11
Total	277	136	141



Fez-se uma análise da distribuição dos diferentes fenótipos clínicos divididos por sete grupos (**tabela 3 e gráfico 1**), de acordo com as alterações clínicas apresentadas, independentemente do resultado analítico. Alguns casos sobrepõem-se por apresentarem clínica em mais do que um dos grupos.

Foi investigado, também, a correlação entre os perfis bioquímicos e os fenótipos clínicos, para o grupo de alterações secundárias nos diferentes parâmetros analíticos. Apurou-se ainda, a partir dos dados que este

estudo permitiu levantar e, considerando as alterações encontrada nos NT major (HVA e 5-HIAA) e a terapêutica administrada, uma associação entre as alterações dos NT e o tipo de medicamento anti convulsivante ministrado (dados não apresentados). Com o objetivo de uma futura compreensão da relação entre epilepsia e neurotransmissores e foco na melhoria dos tratamentos e efeitos nos pacientes, será importante explorar esta variável.

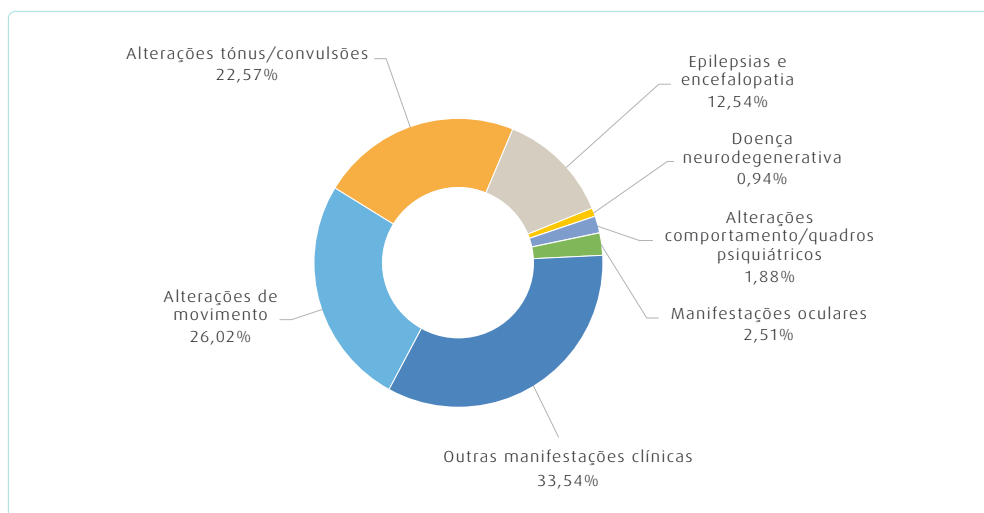
Encontrou-se uma associação significativa entre a concentração baixa de HVA e do 5HIAA e os doentes pertencentes ao grupo 3 (com manifestações clínicas de epilepsias e encefalopatia). Relativamente à correlação existente entre este grupo (epilepsia e encefalopatia) e a diminuição da concentração dos NT *major*, esta está de acordo com o descrito na literatura e pode estar relacionada com a manifestação própria da epilepsia ou, mesmo, dever-se ao tratamento instituído (13).

Neste estudo preliminar e em termos de alterações primárias com confirmação genética, foi diagnosticado uma percentagem de 1,08, que é superior aos achados em algumas publicações com uma amostra semelhante à deste estudo (15), mas é inferior em percentagem em artigo com uma coorte mais representativa (14).

Tabela 3: ⚡ Doenças Hereditárias dos Neurotransmissores – Distribuição dos fenótipos clínicos por grupos de acordo com as manifestações clínicas.

Grupo	Manifestações clínicas
Grupo 1	Alterações de movimento
Grupo 2	Alterações tónus/convulsões
Grupo 3	Epilepsias e encefalopatia
Grupo 4	Doença neurodegenerativa
Grupo 5	Alterações comportamento/quadros psiquiátricos
Grupo 6	Manifestações oculares
Grupo 7	Outras manifestações clínicas

Gráfico 1: ⚡ Distribuição da frequência dos fenótipos clínicos dos doentes submetidos ao estudo bioquímico dos neurotransmissores.





Conclusões

A análise de amostras do líquido cefalorraquidiano (LCR) continua a ser a análise *"golden standard"* para o diagnóstico bioquímico das Doenças Hereditárias dos Neurotransmissores (DHN). É também de salientar a importância do estudo de um painel completo dos metabolitos no LCR, num mesmo laboratório, facilitando a análise e integração dos resultados. A análise e interpretação desta investigação bioquímica no LCR é extremamente exigente e apenas está disponível em centros de referência.

No caso de DHN como em outras alterações metabólicas, o diagnóstico precoce e atempado destas doenças hereditárias reveste-se de uma grande importância, uma vez que após a sua identificação e caracterização, pode recorrer-se a uma rápida aplicação de medidas terapêuticas e dietas, que evitam sequelas maiores e promovem uma boa qualidade de vida.

Futuramente, pretende-se completar o presente trabalho fazendo a correlação das alterações secundárias *versus* medicação (15) e outras abordagens estatísticas mais aprofundadas.

Em conclusão, uma estreita colaboração entre especialistas de laboratório e médicos é fundamental para a interpretação e compreensão dos níveis de neurotransmissores no LCR, o que impulsiona no sentido de uma contínua procura do conhecimento e formação específica na área assistencial e de investigação.

Agradecimentos:

A todos os neuropediatras das unidades de neurologia dos Hospitais (H): H. de Dona Estefânia, CHULC Lisboa; CMIM do CHU Porto; H. de Santa Maria, CHLN, Lisboa; H. Amadora-Sintra; H. do Barreiro; H. Divino Espírito Santo, Ponta Delgada e Terceira; CH Algarve; H. Fernando da Fonseca, Lisboa; Ao Dr. Carlos Flores, Diretor do Serviço de Patologia Clínica do CHULC, Lisboa.

Referências bibliográficas:

- (1) Pearl PL, Capp PK, Novotny EJ, et al. Inherited disorders of neurotransmitters in children and adults. *Clin Biochem*. 2005 Dec;38(12):1051-8. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.09.012>
- (2) Ng J, Papandreou A, Heales SJ, Kurian MA. Monoamine neurotransmitter disorders-clinical advances and future perspectives. *Nat Rev Neurol*. 2015 Oct;11(10):567-84. Epub 2015 Sep 22. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2015.172>
- (3) Kurian MA, Gissen P, Smith M, et al. The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes. *Lancet Neurol*. 2011 Aug;10(8):721-33. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70141-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70141-7)
- (4) García-Cazorla A, Ormazábal A, Artuch R, et al. Errores congénitos de los neurotransmissores en Neuropediatría. *Rev Neurol*. 2005 Jul 16-31;41(2):99-108. <https://neurologia.com/articulo/2004377>
- (5) chenne B, Roubertie A, Leydet J, et al. Monoamine metabolism study in severe, early-onset epilepsy in childhood. *Epileptic Disord*. 2008 Jun;10(2):130-5. <https://doi.org/10.1684/epd.2008.0181>
- (6) Hyland, K. The lumbar puncture for diagnosis of pediatric neurotransmitter diseases. *Ann Neurol* 2003;54(suppl 6):S13-S17. <https://doi.org/10.1002/ana.10627>
- (7) Molero-Luis M, Serrano M, Ormazábal A, et al.; Neurotransmitter Working Group. Homovanillic acid in cerebrospinal fluid of 1388 children with neurological disorders. *Dev Med Child Neurol*. 2013 Jun;55(6):559-66. Epub 2013 Mar 11. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12116>
- (8) Burlina AB, Celato A, Polo G, et al. The Utility of CSF for the Diagnosis of Primary and Secondary Monoamine Neurotransmitter Deficiencies. *EJIFCC*. 2017 Mar 8;28(1):64-76. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5387700/>
- (9) Brennenstuhl H, Jung-Klawitter S, Assmann B, et al. Inherited Disorders of Neurotransmitters: Classification and Practical Approaches for Diagnosis and Treatment. *Neuropediatrics*. 2019 Feb;50(1):2-14. Epub 2018 Oct 29. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1673630>
- (10) Malek N, Fletcher N, Newman E. Diagnosing dopamine-responsive dystonias. *Pract Neurol*. 2015 Oct;15(5):340-5. E pub 2015 Jun 4. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2015-001101>
- (11) Hoffmann FG, Blau N (eds). Congenital neurotransmitter disorders: a clinical approach. Huppauge, NY: Nova Publishers. Inc, 2014.
- (12) Ormazabal A, García-Cazorla A, Fernández Y, et al. HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins. *J Neurosci Methods*. 2005 Mar 15;142(1):153-8. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.08.007>
- (13) García-Cazorla A, Serrano M, Pérez-Dueñas B, et al. Secondary abnormalities of neurotransmitters in infants with neurological disorders. *Dev Med Child Neurol*. 2007 Oct;49(10):740-4. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2007.00740.x>
- (14) Kuster A, Arnoux JB, Barth M, et al.; Individual contributors who contributed to this work. Diagnostic approach to neurotransmitter monoamine disorders: experience from clinical, biochemical, and genetic profiles. *J Inherit Metab Dis*. 2018 Jan;41(1):129-39. Epub 2017 Sep 18. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0079-6>
- (15) van Karnebeek CDM, Dunbar M, Egri C, et al. Secondary Abnormal CSF Neurotransmitter Metabolite Profiles in a Pediatric Tertiary Care Centre. *Can J Neurol Sci*. 2018 Mar;45(2):206-13. <https://doi.org/10.1017/cjn.2017.271>

_Influência de variantes farmacogenéticas na utilização de fármacos: importância do gene *DPYD* enquanto marcador preditivo de toxicidade às fluoropirimidinas

*Influence of pharmacogenetic variants on drug use: importance of the *DPYD* gene as a predictive marker of fluoropyrimidine toxicity*

Diana Alves¹, Filipa Ferreira², Célia Nogueira³, Altina Lopes², Cristina Pereira², Laura Vilarinho^{2,3}

diana.alves@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Ciências Médicas, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

(2) Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

(3) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

_Resumo

A presença de determinadas variantes em genes responsáveis pela codificação de proteínas com função de transportadores ou recetores envolvidos em vias de metabolização de xenobióticos, pode condicionar a resposta individual a determinados fármacos, comprometendo a resposta terapêutica e o prognóstico clínico. Desta forma, a farmacogenética é, nos tempos atuais, uma ferramenta essencial na medicina personalizada, uma vez que estudos genéticos permitem ao clínico prever a probabilidade de eficácia e de toxicidade de determinados fármacos, podendo assim individualizar o tratamento e melhorar a segurança dos doentes. A título de exemplo, podemos referir as variantes associadas ao gene *FMO3* (Trimetilaminúria) que condicionarão a eficácia do tratamento com Sulindac, variantes no gene *CBS* (Homocistinúria clássica) que influenciarão a resposta dos doentes à terapia com Piridoxina (vitamina B6) bem como as variantes no gene *DPYD* (deficiência em dihidropirimidina desidrogenase) que originarão diferentes manifestações fenotípicas em indivíduos tratados com fluoropirimidinas (5-Fluorouracil, Capecitabina e Tegafur). O objetivo deste trabalho é alertar para a necessidade do estudo genético de indivíduos em tratamento com fármacos que sofram metabolização hepática. Pretende-se avaliar a importância de variantes já identificadas no gene *DPYD*, bem como de outras potencialmente relevantes, enquanto marcadores preditivos de toxicidade associada às fluoropirimidinas. Este estudo também contribuirá para alargar o espectro mutacional associado ao gene *DPYD*, para além das variantes incluídas nos *kits* comerciais do gene, que podem também influenciar a terapêutica/toxicidade com fluoropirimidinas.

_Abstract

The presence of certain variants in genes responsible for encoding transporters or receptors involved in xenobiotic metabolism pathways can influence an individual's response to certain drugs, compromising therapeutic efficacy and clinical prognosis. Therefore, pharmacogenetics is currently an essential tool in personalized medicine, as genetic studies allow clinicians to predict the likelihood of efficacy and toxicity of specific drugs, enabling individualized treatment and

*improving patient safety. As an example, we can mention variants associated with the *FMO3* gene (Trimethylaminuria) that affect the effectiveness of Sulindac treatment, variants in the *CBS* gene (Classical homocystinuria) that influence patients' response to Pyridoxine (vitamin B6) therapy, as well as variants in the *DPYD* gene (dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency) that result in different phenotypic manifestations in individuals treated with fluoropyrimidines (5-Fluorouracil, Capecitabine, and Tegafur). The aim of this study is to highlight the need for genetic testing of individuals undergoing treatment with drugs that undergo hepatic metabolism. Additionally, we intend to evaluate the importance of already identified variants in the *DPYD* gene, as well as other potentially relevant ones, as predictive markers for fluoropyrimidine-associated toxicity. Furthermore, we also aim to contribute to expanding the mutational spectrum associated with the *DPYD* gene, beyond the variants included in commercial gene kits, which could also influence the therapy/toxicity of fluoropyrimidines.*

_Introdução

A farmacogenética define-se como sendo a área da genética que estuda as variações genéticas presentes em cada indivíduo e o efeito dessa variabilidade na resposta a tratamentos farmacológicos (1). Associada a esta área, emerge a medicina personalizada visto que ambos os conceitos têm como principal finalidade orientar decisões clínicas na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças com base no perfil genético de um indivíduo (2). Apesar de vários fatores poderem interferir no metabolismo dos fármacos, alguns autores defendem que 20 a 95% das alterações interindividuais na resposta a fármacos são justificadas



por fatores genéticos. Assim, a análise de variantes num determinado gene, responsável pela codificação de uma proteína envolvida na metabolização de um fármaco, terá grande utilidade, uma vez que auxiliará o clínico a otimizar a eficácia e segurança desse fármaco e, conseqüentemente, da terapia medicamentosa adotada (3,4). Atualmente, vários polimorfismos genéticos (*Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs*), associados a doenças hereditárias do metabolismo, são utilizados como biomarcadores de suscetibilidade de resposta a fármacos. Exemplos disso são os polimorfismos já estudados no gene que codifica a enzima hepática flavina mono-oxigenase 3 (*FMO3*), associados ao fenótipo da trimetilaminúria (TMAu, OMIM: 602079), no gene que codifica a enzima cistationina beta-sintase (*CBS*), associado à homocistinúria clássica (HCU, OMIM: 236200) e no gene que codifica a enzima dihidropirimidina desidrogenase (*DYPD*), associado à deficiência da dihidropirimidina desidrogenase (OMIM: 274270).

No caso do gene *FMO3*, verificou-se que doentes com os polimorfismos responsáveis pela doença hereditária autossômica recessiva TMAu em homozigotia, nomeadamente os SNPs c.472G>A (p.Glu158Lys) e c.923A>G (p.Glu308Gly), não desenvolviam pólipos, o principal efeito tóxico do Sulindac, fármaco anti-inflamatório não esteroide, indicado no tratamento de doentes com polipose adenomatosa familiar (PAF) (5-8). Estes polimorfismos, ao diminuírem a atividade catalítica da enzima *FMO3*, têm assim um efeito protetor no tratamento da PAF, pela redução dos efeitos secundários tóxicos do fármaco e servem de biomarcadores relativamente à resposta terapêutica ao mesmo. Os doentes diagnosticados com homocistinúria clássica são normalmente classificados com base na resposta do indivíduo ao tratamento com a piridoxina, vulgarmente conhecida como vitamina B6. Algumas variantes presentes em homozigotia, nomeadamente a c.833T>C (p.Ile278Thr), conferem ao doente uma resposta à vitamina B6 tornando possível atingir níveis normais de homocisteína total com doses reduzidas, levando a um tipo leve de

deficiência de CBS (9). Contrariamente, demonstrou-se que a variante c.572C>T (p.Thr191Met), quando presente em homozigotia na população portuguesa, espanhola e sul-americana, causa uma forma grave da doença que não responde à piridoxina (10,11). Outro exemplo são as variantes no gene *DPYD*, que codifica a enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD), responsáveis pela deficiência de DPD, caracterizada como uma doença autossômica recessiva do metabolismo das pirimidinas. No entanto, estão descritos vários SNPs neste gene que originam uma atividade enzimática reduzida, e que, em indivíduos tratados com fluoropirimidinas (5-Fluorouracil, Capecitabina e Tegafur), levam a que estes deixem de ter a capacidade de metabolizar adequadamente estes fármacos, originando uma toxicidade grave pela acumulação de compostos citotóxicos no sangue.

Desta forma, a farmacogenética é, nos tempos atuais, uma ferramenta essencial na medicina personalizada, nomeadamente para o diagnóstico e tratamento de diversos cancros. Os estudos genéticos permitem ao clínico prever a probabilidade de eficácia e de toxicidade de determinados fármacos, podendo assim individualizar o tratamento e melhorar a segurança dos doentes.

Objetivos

Este trabalho tem como objetivos alertar para a necessidade do estudo genético de indivíduos cujos fármacos utilizados na terapêutica sejam de metabolização hepática e avaliar a importância de variantes já identificadas no gene *DPYD*, bem como de outras que poderão ter impacto enquanto marcadores preditivos de toxicidade às fluoropirimidinas. Pretende-se também contribuir para alargar o espectro mutacional associado ao gene *DPYD*, para além das variantes incluídas nos kits comerciais do gene *DPYD*, que poderão também condicionar a terapêutica/toxicidade com fluoropirimidinas.



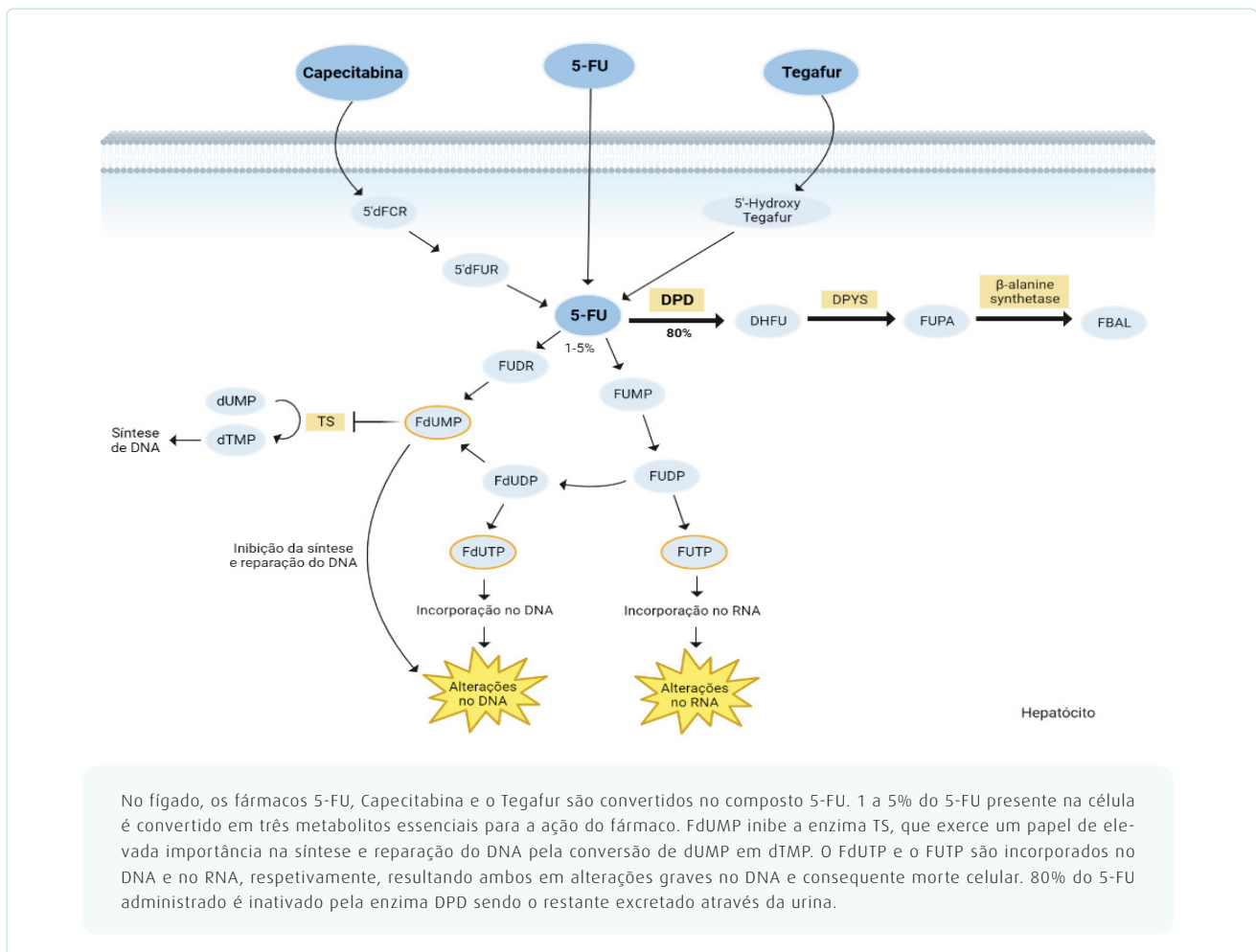
Metabolismo das fluoropirimidinas

O 5-fluorouracil (5-FU), é uma fluoropirimidina que é convertida intracelularmente para que haja formação de metabolitos citotóxicos com efeitos antitumorais. O seu principal composto ativo é o monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), que é responsável pela inibição da enzima timidilato sintetase (TS) e, conseqüentemente, inibição do processo de síntese e reparação do DNA (12,13). No entanto, grande parte do 5-FU é degradado pela via catabólica na qual a enzima DPD é responsável pelo primeiro passo e é

um fator limitante nesta via (14-16). A reduzida atividade desta enzima aumenta o risco de toxicidade às fluoropirimidinas uma vez que leva à acumulação de compostos com atividade citotóxica no sangue (17,18) (figura 1).

A enzima DPD é expressa principalmente nos hepatócitos e linfócitos (19-21). O gene *DPYD*, localizado no cromossoma 1p21.3, possui 23 exões e codifica uma proteína de 1025 aminoácidos, a enzima DPD. (22). Este gene é altamente polimórfico e, até à data, foram reportadas mais de 7600 variantes genéticas (23). Algu-

Figura 1: Representação esquemática do metabolismo das fluoropirimidinas.



DPD – Dihidropirimidina desidrogenase; DHFU – Dihidrofluorouracilo; DPYS – Dihidropirimidinase; FUPA – Ácido α-fluoroureidopropiônico; FBAL – α-fluor-β alanina; 5'dFCR – 5'-desoxi-5-fluorocitidina; 5'dFUR – 5'-desoxi-5-fluorouridina; FUDR – Fluorodeoxiuridina; FdUMP – Monofosfato de fluorodeoxiuridina; TS – enzima timidilato sintetase; dUMP – monofosfato de desoxiuridina; dTMP – monofosfato de desoxitimidina; FdUDP – Difosfato de fluorodeoxiuridina; FdUTP – Trifosfato de fluorodeoxiuridina; FUMP – Monofosfato de fluorouridina; FUDP – Difosfato de fluorouridina; FUTP – Trifosfato de fluorouridina.



mas destas variantes provocam alterações na atividade enzimática da DPD e, conseqüentemente, influenciarão a resposta metabólica do doente às fluoropirimidinas. Vários estudos têm vindo a associar variantes genéticas com efeitos de deficiência/toxicidade grave e preocupantes do ponto de vista clínico. Logo, tendo em conta o número significativo de doentes a quem são prescritos os fármacos abordados anteriormente, em termos de prognóstico e segurança, a avaliação de SNPs é crucial.

Polimorfismos no gene *DPYD*: impacto na farmacoterapia das fluoropirimidinas

As fluoropirimidinas, nomeadamente o 5-FU, Capecitabina e o Tegafur, são fármacos mundialmente utilizados na quimioterapia de cancros sólidos. Estima-se que 10% a 30% dos doentes desenvolvam toxicidade a estes fármacos, podendo ser evidente através de variados sintomas hematológicos, gastrointestinais e dermatológicos. O tratamento com fluoropirimidinas é fatal para cerca de 0,5% a 1% destes doentes (24-26). Fatores genéticos, principalmente a presença de certos SNPs no gene *DPYD*, que codifica a enzima DPD, podem alterar a atividade enzimática do metabolismo destes medicamentos. Assim, a manifestação fenotípica da resposta farmacológica dos doentes dependerá do défice parcial ou total desta enzima. Reações adversas a fármacos é um dos principais problemas no tratamento de tumores malignos por quimioterapia e, normalmente, implica redução de doses ou mesmo interrupção do tratamento, o que pode prejudicar a sua eficácia e o prognóstico da doença. Deste modo, estabelecer relações entre o genótipo e o fenótipo, poderá ser uma ferramenta de grande importância pois torna possível adequar o tratamento a cada doente em particular, garantindo a sua segurança.

Em 2020, o Comité de Avaliação do Risco em Farmacovigilância (PRAC) adotou a recomendação da testagem genética preventiva para a deficiência de DPD tendo por base as seguintes mutações raras no gene *DPYD*:

c.1905+1G>A (IVS14+1G>A), c.1679T>G (p.Ile560Ser), c.2846A>T (p.Asp949Val) e c.1236G>A/c.1129-5923C>G (HapB3) (27). Estas estão descritas como estando associadas a um risco acrescido de toxicidade aquando da toma das fluoropirimidinas. Nesse mesmo ano, a Agência Europeia do Medicamento (EMA) e o Infarmed (Autoridade Nacional Portuguesa de Medicamentos e Produtos de Saúde) seguiram a mesma recomendação, levando a que surgissem novas normas de segurança no uso dos fármacos 5-FU, Capecitabina e Tegafur (28).

Os SNPs anteriormente referidos [c.1905+1G>A (IVS14+1G>A), c.1679T>G (p.Ile560Ser), c.2846A>T (p.Asp949Val) e c.1236G>A/ c.1129-5923C>G (HapB3)] são, até à data, os polimorfismos mais bem estudados, estando descritos como sendo “variantes funcionalmente relevantes” (tabela 1). Na população caucasiana, os genótipos heterozigóticos destas variantes apresentam frequências de 1%, de 0,07-0,1%, de 1,1% e de 2,6-6,3%, respetivamente (27). Deste modo, indivíduos que sejam portadores destas variantes têm maior probabilidade de desenvolver reações adversas graves, à 5-FU (cerca de 1,6 a 4,4 vezes mais aumentada) e têm 25% mais probabilidade de que essas reações conduzam mesmo à mortalidade (29,30). Porém, Amstutz *et al.* (24) defendem que apenas 20% dos casos de toxicidade grave após a toma de 5-FU estará relacionada com estas variantes. Quando os polimorfismos c.1905+1G>A (IVS14+1G>A) e c.1679T>G (p.Ile560Ser) estão presentes em homozigotia, os indivíduos geralmente apresentam uma atividade enzimática da DPD nula, enquanto nos indivíduos heterozigóticos a atividade da enzima está reduzida a cerca de 50%, razão pela qual deve ser evitada a prescrição de fluoropirimidinas (31,32). Assim, neste caso, doentes que possuam estes SNPs não são capazes de metabolizar o 5-FU e, portanto, estão mais expostos ao 5-FU e aos seus compostos citotóxicos. Por sua vez, as variantes c.2846A>T (p.Asp949Val) e c.1236G>A/ c.1129-5923C>G (HapB3), levam a uma redução moderada da enzima DPD (tabela 1). Das variantes que são



Tabela 1: Caracterização de SNPs no gene *DPYD*, respetivos efeitos na atividade da DPD e fenótipo do doente.

SNP rs	cDNA	Proteína	Frequência do alelo de risco	Valor de atividade do alelo	Estado funcional do alelo	Nível de evidência	Fenótipo associado	Referências
rs3918290	c.1905+1G>A	IVS14+1G>A	0,007	0,0	Nulo	1A	Toxicidade geral	(31,32,38-41)
rs55886062	c.1679T>G	p.Ile560Ser	3×10^{-4}	0,0	Nulo	1A	Toxicidade geral	(29,31,38,42-44)
rs67376798	c.2846A>T	p.Asp949Val	0,003	0,5	Diminuído	1A	Toxicidade geral	(32,42,45)
rs75017182	c.1129-5923C>G	Variante intrónica	0,013	0,5	Diminuído	1A	Toxicidade geral	(29,33,46,47)
rs56038477	c.1236G>A	p.Glu412Glu	0,014	0,5	Diminuído	3	Toxicidade gastrointestinal e hematológica	(29)
rs115232898	c.557A>G	p.Tyr186Cys	0,002	0,5	Diminuído	1A	Neutropenia, mucosite e alopecia	(32,35,48-51)
rs72549303	c.1898del	p.Pro633fs	—	0,0	Nulo	1A	—	(37)
rs1801268	c.2983G>T	p.Val995Phe	—	0,0	Nulo	1A	—	(32)
rs78060119	c.1156G>T	p.Glu386Ter	8×10^{-6}	0,0	Nulo	1A	Leucopenia, trombocitopenia e mucosite	(32,52)
rs2297595	c.496A>G	p.Met166Val	0,085	1,0	Normal	3	Toxicidade geral	(43,53-56)
rs1801265	c.85T>C	p.Cys28Arg	0,228	1,0	Normal	3	Diarreia	(31,43,50,56-59)
rs1801159	c.1627A>G	p.Ile543Val	0,198	1,0	Normal	3	Diarreia	(31,43,59,60)
rs1801158	c.1601G>A	p.Ser534Asn	0,015	1,0	Normal	3	Toxicidade geral	(29,31,43,61)
rs17376848	c.1896T>C	p.Phe632Phe	0,051	1,0	Normal	3	Toxicidade geral	(54,62)
rs1801160	c.2194G>A	p.Val732Ile	0,048	1,0	Normal	3	Toxicidade geral	(31,32,43,47,55,63,64)

SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms*; DPD – dihidropirimidina desidrogenase.

atualmente utilizadas como preditores relevantes de toxicidade, relacionada com a administração de fluoropirimidinas, a variante intrónica c.1129-5923C>G é a variante deletéria menos grave. Este SNP foi inicialmente identificado num haplótipo, o haplótipo B3 (HapB3), e, posteriormente, foi descrito que está num forte desequilíbrio de ligação com a variante sinónima c.1236G>A (p.Glu412Glu) (33).

Tendo em conta as recomendações do Infarmed e a crescente necessidade de identificar doentes com risco aumentado de desenvolver toxicidade durante o tratamento quimioterápico com fluoropirimidinas, fo-

ram desenvolvidos *kits* laboratoriais para análise farmacogenética qualitativa com base na deteção de polimorfismos informativos no gene *DPYD*. No entanto, estes *kits* só incluem a análise das variantes referidas anteriormente [(c.1905+1G>A, c.1679T>G (p.Ile560Ser), c.2846A>T (p.Asp949Val) e c.1236G>A/c.1129-5923C>G (HapB3)].

Presentemente, os SNPs acima referidos têm um nível de evidência e de utilidade clínica bem estabelecido. Para além destes SNPs, associados à redução de atividade da DPD e à toxicidade por 5-FU, a PharmGKB classifica o nível destas associações com anotações clíni-



cas de nível 1A¹ para outros SNPs: c.557A>G (p.Tyr186-Cys), c.1898del (p.Pro633fs), c.2983G>T (p.Val995Phe) e c.1156G>T (p.Glu386Ter). Deste último conjunto de polimorfismos, todos os alelos mutantes estão designados como sendo não funcionais (**tabela 1**). A variante c.557A>G (p.Tyr186Cys) é considerada uma variante de risco aumentado para a toxicidade ao 5-FU, pela *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC) (35), sendo neste caso, mais prevalente na população africana. O mesmo acontece para a deleção c.1898del, uma vez que esta foi detetada em 46% dos doentes que desenvolveram toxicidade grave às fluoropirimidinas, mesmo com redução inicial de dose (36). Em alguns países, nomeadamente no Brasil, para além das variantes já referidas [c.1905+1G>A, c.1679-T>Gp.Ile560Ser), c.2846A>T (p.Asp949Val) e c.1236-G>A/c.1129-5923C>G (HapB3)], as variantes c.557A>G e c.1898del já se encontram incluídas nos *kits* comerciais utilizados na rotina clínica para a deteção de polimorfismos no gene *DPYD*. Porém, existem outras variantes, não incluídas nos *kits* comerciais, que levam igualmente ao desenvolvimento de toxicidade grave às fluoropirimidinas. São exemplo as variantes c.2983G>T (p.Val995Phe) e c.1156G>T (p.Glu386Ter) que levam à inativação da proteína DPD e, conseqüentemente, da atividade desta enzima (32,37).

Para além das variantes já mencionadas, outros SNPs no gene *DPYD* apresentam uma grande frequência alélica, nomeadamente, o c.496A>G (p.Met166Val), c.85-T>C (p.Cys28Arg), c.1627A>G (p.Ile543Val), c.1601G>A (p.Ser534Asn), c.1896T>C (p.Phe632Phe), c.2194G>A (p.Val732Ile), com frequências de 0,085, 0,228, 0,198, 0,015, 0,051 e 0,048, respetivamente. A PharmGKB

classifica o estado funcional dos alelos como normal, para estas SNPs, com anotações clínicas de nível de evidência 3². No entanto, ambas as bases de dados: *Human Gene Mutation Database* (HGMD) e Ensembl classificam estas variantes como sendo patogénicas associadas ao défice de DPD. Além disso, alguns autores acreditam que estas variantes poderão ter efeito tóxico ou protetor, mas ter-se-á de desenvolver mais estudos funcionais para avaliar os seus impactos nos doentes tratados com 5-FU.

Ajuste terapêutico: diretrizes de segurança

O consórcio internacional CPIC e o *Dutch Pharmacogenetics Working Group* (DPWG) desenvolveram diretrizes para ajudar a classificar o significado funcional das variantes do gene *DPYD* e seus potenciais efeitos na dosagem das fluoropirimidinas. Ambos utilizam uma escala de 0 a 2, sendo 0 – sem atividade enzimática e 2 – função normal da DPD, para prever a pontuação de atividade (PA) da DPD. Esta pontuação é a soma das atividades das duas isoformas da proteína expressas em ambos os alelos. As recomendações das doses a prescrever de acordo com o genótipo e fenótipo do indivíduo estão indicadas na **tabela 2**.

Recentemente, vários estudos têm sido feitos de modo a demonstrar o custo-benefício dos estudos moleculares do gene *DPYD* dos doentes que vão iniciar o tratamento com 5-FU e o custo dos tratamentos hospitalares daqueles que apresentam sintomas de intoxicação medicamentosa à dose padrão do 5-FU. Na Irlanda, Murphy *et al.* concluíram que o rastreio dos polimorfismos no gene *DPYD* na rotina clínica revelou ser economicamente mais rentável, sendo, por isso, de

¹ As anotações clínicas de nível 1A descrevem combinações de variantes-fármacos para as quais há orientações de prescrição específicas disponíveis em diretrizes clínicas ou em rótulos de medicamentos com orientação de prescrição específica de variantes, aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA). As anotações clínicas de nível 1A também devem ser apoiadas por, pelo menos, uma publicação científica. O nível 1A é o nível mais alto de anotações clínicas (34).

² As anotações clínicas de nível 3 descrevem combinações de variantes-fármacos com baixo nível de evidência a suportar as associações estabelecidas. Essas associações podem ser baseadas num único estudo ou em estudos que falharam em replicar determinada associação. A anotação também pode ser baseada em evidências preliminares, como por exemplo, um relatório médico, estudo não significativo ou evidência de um ensaio *in vitro*, molecular ou funcional. O nível 3 é considerado um baixo nível de anotações clínicas (34).



Tabela 2: Atribuição do fenótipo com base no genótipo dos doentes, respetivo risco de toxicidade e recomendação terapêutica.

Fenótipo	Genótipo	PA da DPD	Risco de toxicidade ao 5-FU	Recomendações de dose das fluoropirimidinas
Metabolizador normal	Doente sem variantes associadas à disfunção reduzida ou completa da DPD.	2	Baixo	Não é necessário o ajuste de doses para medicamentos que são metabolizados pela DPD.
Metabolizador intermediário	Doente com uma variante associada à função normal da DPD e outra associada à funcionalidade reduzida da enzima.	1,5	Alto	É aconselhada a redução de 25% a 50% da dose padrão das fluoropirimidinas.
Metabolizador intermediário	Doente com duas variantes associadas à funcionalidade reduzida da DPD ou com uma variante associada à função normal e outra associada à não função da enzima.	1	Alto	É aconselhada a redução de 50% da dose padrão das fluoropirimidinas.
Metabolizador pobre	Doente com uma variante associada a uma funcionalidade reduzida da DPD e uma variante associada à não função da enzima.	0,5	Alto	É aconselhada a redução de 50% da dose padrão de fluoropirimidinas ou o uso de uma alternativa terapêutica.
Metabolizador pobre	Doente com duas variantes associadas com atividade de DPD totalmente disfuncional.	0	Alto	É aconselhado o uso de uma alternativa terapêutica à fluoropirimidina.

SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms; DPD – dihidropirimidina desidrogenase.

todo o interesse a caracterização genética prévia de cada doente que inicie a quimioterapia com fluoropirimidinas (65).

Em Portugal

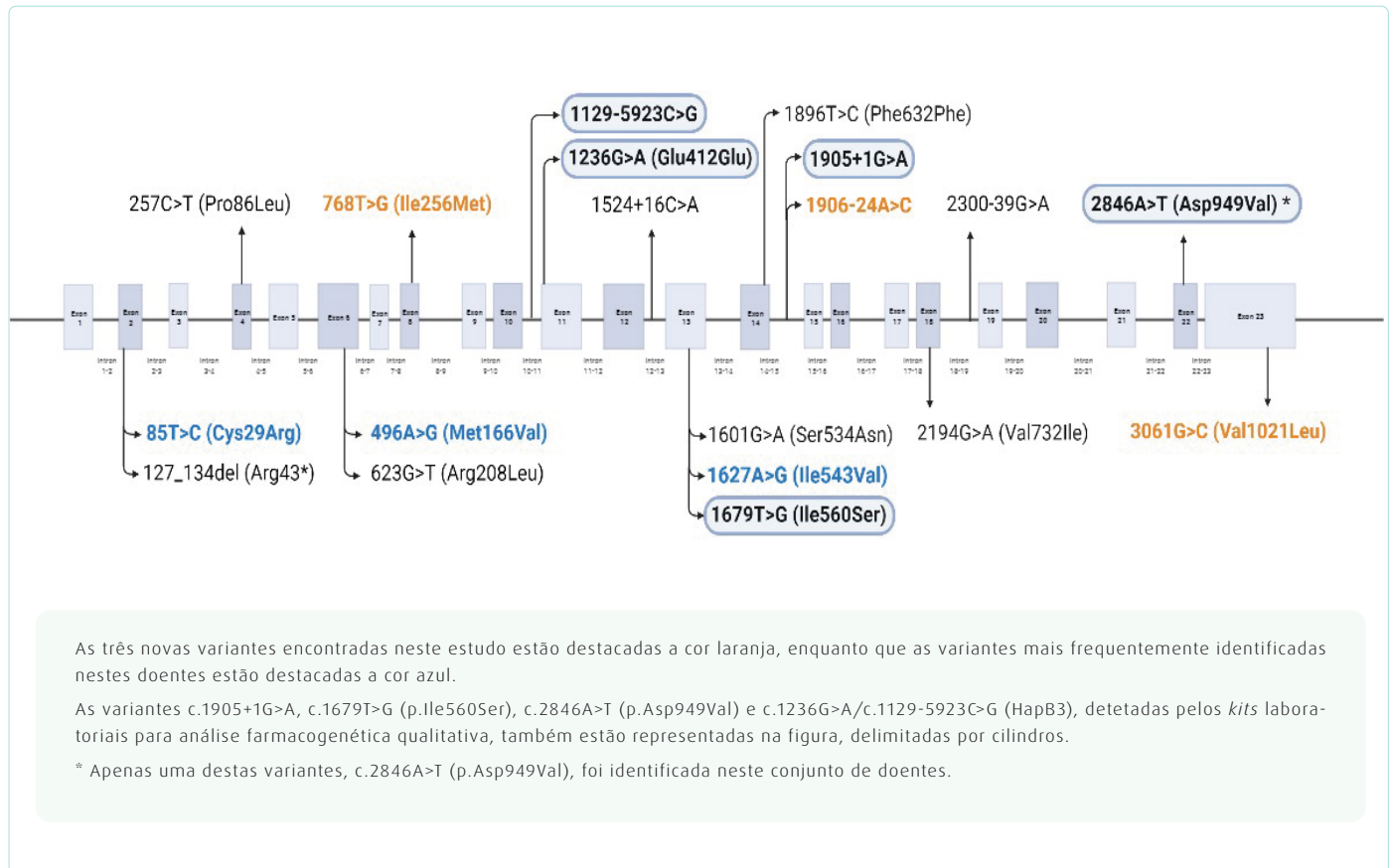
A introdução da tecnologia de sequenciação de nova geração (*Next Generation Sequencing* – NGS) para o diagnóstico de rotina na Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, no Porto, permitiu a realização de estudos do gene *DPYD*, úteis no rastreio destes SNPs, dando com rapidez uma resposta utilizada na terapêutica dos doentes tratados com 5-FU. 43 doentes foram caracterizados para o gene *DPYD*, dos quais 26% apresentaram um risco acrescido de toxicidade às fluoropirimidinas pela presença de duas ou mais variantes descritas como polimorfismos associados ao défice de DPD (*Human Gene Mutation Database*-HGMD e *Ensembl*). Os resultados do estudo molecular dos doentes analisados estão representados na **figura 2**.

Neste estudo, foram identificadas 3 novas variantes, desconhecendo-se, no entanto, o seu impacto na atividade catalítica da enzima. Poderá ser interessante realizar estudos enzimáticos de modo a perceber o impacto destas mutações na atividade enzimática da DPD e, consequentemente, no fenótipo dos doentes e na previsão da eficácia terapêutica. As mutações c.1524+16C>A, c.127_134del (p.Arg43*), c.257C>T (p.Pro86Leu) e c.2846A>T (p.Asp949Val), todas descritas com frequências alélicas inferiores a 0,01, e o SNP c.2300-39G>A, com frequência alélica de 0,09, encontram-se associadas ao défice de DPD (HGMD e *Ensembl*) (66-68). Deste modo, a presença destas variantes em homozigotia ou heterozigotia composta, com outra variante associada ao défice parcial ou total da atividade enzimática da DPD, tornará o doente suscetível à toxicidade das fluoropirimidinas devendo, por esta razão, o clínico necessitar de ajustar a dose do fármaco.

Nos 43 doentes estudados, as variantes c.1627A>G (p.Ile543Val), c.85T>C (p.Cys28Arg) e c.496A>G (p.Met166Val) foram as mais prevalentes, estando



Figura 2: Representação esquemática das 14 variantes identificadas nos 43 doentes estudados para a deficiência da DPD no gene *DPYD*.



presentes em 28%, 23% e 14% dos doentes, respetivamente, o que vai de encontro aos resultados esperados uma vez que estes SNPs são os que apresentam valores mais elevados da frequência alélica no gene *DPYD* (tabela 1). Vários casos clínicos reportam estes polimorfismos genéticos como estando associados a reações adversas graves ao 5-FU. No entanto, na comunidade científica há divergência de opiniões e falta de evidências conclusivas sobre as consequências metabólicas para o indivíduo (31,43,50,53-60).

Discussão

Diversos estudos populacionais demonstraram que cerca de 3% a 5% da população apresenta níveis reduzidos de atividade enzimática da DPD, pela existência de SNPs ou mutações no gene *DPYD*, apresentando assim um fator de risco acrescido para desenvolver toxicidade aquando da toma de um fármaco com 5-FU (69,70). A causa mais conhecida de intolerância às fluoropirimidinas é a deficiência de DPD, que pode resultar de polimorfismos deletérios no gene que a codifica. Deste modo, é fundamental o estudo prévio do gene *DPYD* para que o clínico possa adequar o tratamento, com o objetivo de aumentar o seu sucesso e a segurança do doente.

As variantes c.1905+1G>A (IVS14+1G>A), c.1679T>G (p.Ile560Ser), c.2846A>T (p.Asp949Val) e c.1236G>A/c.1129-5923C>G (HapB3) são as mais comumente



associadas ao fenótipo de deficiência de DPD pela severidade das reações adversas que causam no tratamento com 5-FU, razão pela qual, atualmente, estão disponíveis *kits* para a deteção precoce destes SNPs no gene *DPYD* na prática clínica. No entanto, como referido ao longo deste trabalho, encontram-se descritas na literatura outros SNPs e variantes capazes de afetar o sucesso do tratamento, uma vez que estão associados a efeitos tóxicos causados pela administração de fluoropirimidinas, devendo também ser utilizados como marcadores preditivos de toxicidade. Do nosso ponto de vista, de acordo com a revisão bibliográfica e mesmo com os dados preliminares que já dispomos, é nosso entender que para além das variantes mais conhecidas, há outras com um impacto igualmente prejudicial na atividade catalítica da enzima DPD, inclusive com frequências alélicas superiores na população portuguesa, fator que se deveria ter em conta na escolha do tratamento.

Uma vez que os *kits* comerciais não asseguram a ausência de efeitos tóxicos face ao tratamento com fluoropirimidinas pelo pequeno número de polimorfismos detetados, esta desvantagem seria ultrapassada pelo estudo completo do gene *DPYD*, evitando gastos no internamento dos doentes que venham a desenvolver toxicidade grave durante a toma da medicação. Por outro lado, a genotipagem completa do gene *DPYD* por NGS permite sequenciar rapidamente este gene e compreender os fenótipos observados durante a toma do 5-FU ou dos seus pró-fármacos, e estabelecer correlações genótipo-fenótipo essenciais na prática clínica.

Conclusão

Para doentes cujo tratamento oncológico seja a quimioterapia à base de fluoropirimidinas, a funcionalidade catalítica da enzima DPD deve ser determinada antes do início da terapia de modo a identificar doentes com maior probabilidade de desenvolverem toxicidade grave ou fatal.

O estudo molecular do gene *DPYD* é uma técnica promissora para a individualização do tratamento dos doentes, nomeadamente no ajuste de doses do 5-FU, uma vez que já há diretrizes de segurança disponíveis para muitas das variantes que afetam a DPD (16,36).

Por outro lado, o estudo do espectro da população portuguesa para o gene *DPYD* permitirá avaliar se as variantes presentemente disponíveis em *kits* comerciais são suficientes para uma prescrição terapêutica segura.

Referências bibliográficas:

- (1) Karczewski KJ, Daneshjou R, Altman RB. Chapter 7: Pharmacogenomics. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(12):e1002817. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002817>. Epub 2012 Dec 27
- (2) Brito M. A farmacogenética e a medicina personalizada. *Saúde & Tecnologia.* 2015 Nov 1;14:5-10. <https://doi.org/10.25758/set.1214>
- (3) Belle DJ, Singh H. Genetic factors in drug metabolism. *Am Fam Physician.* 2008 Jun 1;77(11):1553-60. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2008/0601/p1553.html>
- (4) Chang MT, McCarthy JJ, Shin J. Clinical application of pharmacogenetics: focusing on practical issues. *Pharmacogenomics.* 2015;16(15):1733-41. <https://doi.org/10.2217/pgs.15.112>
- (5) Cashman JR. Human flavin-containing monooxygenase (form 3): polymorphisms and variations in chemical metabolism. *Pharmacogenomics.* 2002 May;3(3):325-39. <https://doi.org/10.1517/14622416.3.3.3250>
- (6) Motika MS, Zhang J, Cashman JR. Flavin-containing monooxygenase 3 and human disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2007 Dec;3(6):831-45. <https://doi.org/10.1517/17425255.3.6.831>
- (7) Hisamuddin IM, Wehbi MA, Chao A, et al. Genetic polymorphisms of human flavin monooxygenase 3 in sulindac-mediated primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis. *Clin Cancer Res.* 2004 Dec 15;10(24):8357-62. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1073>
- (8) Hisamuddin IM, Wehbi MA, Schmotzer B, et al. Genetic polymorphisms of flavin monooxygenase 3 in sulindac-induced regression of colorectal adenomas in familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Oct;14(10):2366-9. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0312>
- (9) Skovby F, Gaustadnes M, Mudd SH. A revisit to the natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2010 Jan;99(1):1-3. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.09.009>
- (10) Cozar M, Urreiziti R, Vilarinho L, et al. Identification and functional analyses of CBS alleles in Spanish and Argentinian homocystinuric patients. *Hum Mutat.* 2011 Jul;32(7):835-42. <https://doi.org/10.1002/humu.21514>
- (11) Alcaide P, Krijt J, Ruiz-Sala P, et al. Enzymatic diagnosis of homocystinuria by determination of cystathionine-β-synthase activity in plasma using LC-MS/MS. *Clin Chim Acta.* 2015 Jan 1;438:261-5. Epub 2014 Sep 16. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.09.009>
- (12) Thorn CF, Marsh S, Carrillo MW, et al. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenet Genomics.* 2011 Apr;21(4):237-42. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833c6107>
- (13) Wigmore PM, Mustafa S, El-Beltagy M, et al. Effects of 5-FU. *Adv Exp Med Biol.* 2010;678:157-64. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6306-2_20



- (14) Kunicka T, Prochazka P, Krus I, et al. Molecular profile of 5-fluorouracil pathway genes in colorectal carcinoma. *BMC Cancer*. 2016 Oct 12;16(1):795. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2826-8>
- (15) Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet*. 1989 Apr;16(4):215-37. <https://doi.org/10.2165/00003088-198916040-00002>
- (16) Mattison LK, Soong R, Diasio RB. Implications of dihydropyrimidine dehydrogenase on 5-fluorouracil pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2002 Jul;3(4):485-92. <https://doi.org/10.1517/14622416.3.4.485>
- (17) Botticelli A, Borro M, Onesti CE, et al. Degradation Rate of 5-Fluorouracil in Metastatic Colorectal Cancer: A New Predictive Outcome Biomarker? *PLoS One*. 2016 Sep 22;11(9):e0163105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163105>
- (18) Beck A, Etienne MC, Chéradame S, et al. A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. *Eur J Cancer*. 1994;30A(10):1517-22. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(94\)00216-r](https://doi.org/10.1016/0959-8049(94)00216-r)
- (19) van Kuilenburg AB, van Lenthe H, van Gennip AH. Activity of pyrimidine degradation enzymes in normal tissues. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2006;25(9-11):1211-4. <https://doi.org/10.1080/15257770600894576>
- (20) Diasio RB, Lu Z. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1994 Nov;12(11):2239-42. <https://doi.org/10.1200/JCO.1994.12.11.2239>
- (21) Milano G, McLeod HL. Can dihydropyrimidine dehydrogenase impact 5-fluorouracil-based treatment? *Eur J Cancer*. 2000 Jan;36(1):37-42. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(99\)00211-7](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(99)00211-7)
- (22) Protein summary - Homo_sapiens. Ensembl genome browser 109 (online). [consult. 10/7/2023]. Disponível em: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSNG00000188641;r=1:97077743-97995000;t=ENST00000370192
- (23) Donadio MDS, Carraro DM, Torrezan GT, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) polymorphisms knocking on the door. *Ecancermedicalscience*. 2022 Jan 17;16:1344. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2022.1344>
- (24) Amstutz U, Froehlich TK, Largiadèr CR. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. *Pharmacogenomics*. 2011 Sep;12(9):1321-36. <https://doi.org/10.2217/pgs.11.72>
- (25) Mikhail SE, Sun JF, Marshall JL. Safety of capecitabine: a review. *Expert Opin Drug Saf*. 2010 Sep;9(5):831-41. <https://doi.org/10.1517/14740338.2010.511610>
- (26) Meta-Analysis Group In Cancer; Lévy E, Piedbois P, Buyse M, et al. Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: effect of administration schedule and prognostic factors. *J Clin Oncol*. 1998 Nov;16(11):3537-41. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.11.3537>
- (27) European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use. Product Information as approved by the CHMP on 30 April 2020, pending endorsement by the European Commission. Annex III - Amendments to relevant sections of the product information. (EMA/CHMP/171789/2020). https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/fluorouracil-fluorouracil-related-substances-article-31-referral-annex-iii_en.pdf
- (28) Infarmed. Circular Informativa N.º 072/CD/550.20.001, de 18/03/2020. Fluorouracilo, capecitabina, tegafur e flucitossina - novas recomendações de segurança. https://www.infarmed.pt/web/infarmed/profissionais-de-saude/-/journal_content/56/15786/3588548
- (29) Meulendijks D, Henricks LM, Sonke GS, et al. Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2015 Dec;16(16):1639-50. <https://www.infarmed.pt/documents/15786/3464134/Fluorouracilo%2C+cap+ecitabina%2C+tegafur+e+flucitossina++novas+recomenda%C3%A7%C3%B5es+de+seguran%C3%A7a/ddd03a4-bcc9-e300-c4ff-758af81944f5>
- (30) Sharma BB, Rai K, Blunt H, et al. Pathogenic DPYD Variants and Treatment-Related Mortality in Patients Receiving Fluoropyrimidine Chemotherapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oncologist*. 2021 Dec;26(12):1008-16. <https://doi.org/10.1002/onco.13967>
- (31) Offer SM, Wegner NJ, Fossum C, et al. Phenotypic profiling of DPYD variations relevant to 5-fluorouracil sensitivity using real-time cellular analysis and in vitro measurement of enzyme activity. *Cancer Res*. 2013 Mar 15;73(6):1958-68. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3858>
- (32) Offer SM, Fossum CC, Wegner NJ, et al. Comparative functional analysis of DPYD variants of potential clinical relevance to dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Cancer Res*. 2014 May 1;74(9):2545-54. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2482>
- (33) Henricks LM, Lunenburg CATC, de Man FM, et al. DPYD genotype-guided dose individualisation of fluoropyrimidine therapy in patients with cancer: a prospective safety analysis. *Lancet Oncol*. 2018 Nov;19(11):1459-67. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30686-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30686-7)
- (34) Whirl-Carrillo M, Huddart R, Gong L, et al. An Evidence-Based Framework for Evaluating Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2021 Sep;110(3):563-72. <https://doi.org/10.1002/cpt.2350>
- (35) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Guideline for Fluoropyrimidines and DPYD [online]. [consult. 25/11/2022] <https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-fluoropyrimidines-and-dpyd/>
- (36) de With M, Brufau G, van den Berg LA, et al. DPYD*7 as a Predictor of Severe Fluoropyrimidine-Related Adverse Events. *JCO Precis Oncol*. 2022 Jul;6:e2200180. <https://doi.org/10.1200/PO.22.00180>
- (37) Vreken P, Van Kuilenburg AB, Meinsma R, et al. Identification of novel point mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *J Inher Metab Dis*. 1997 Jul;20(3):335-8. <https://doi.org/10.1023/a:1005357307122>
- (38) van Kuilenburg AB, Haasjes J, Richel DJ, et al. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. *Clin Cancer Res*. 2000 Dec;6(12):4705-12. <https://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/6/12/4705/2073972/df120044705.pdf>
- (39) Van Kuilenburg AB, Vreken P, Abeling NG, et al. Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Hum Genet*. 1999 Jan;104(1):1-9. <https://doi.org/10.1007/pl00008711>
- (40) Schwab M, Zanger UM, Marx C, et al.; German 5-FU Toxicity Study Group. Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. *J Clin Oncol*. 2008 May 1;26(13):2131-8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.10.4182>
- (41) Terrazzino S, Cargnin S, Del Re M, et al. DPYD IVS14+1G>A and 2846A>T genotyping for the prediction of severe fluoropyrimidine-related toxicity: a meta-analysis. *Pharmacogenomics*. 2013 Aug;14(11):1255-72. <https://doi.org/10.2217/pgs.13.116>
- (42) Meulendijks D, Cats A, Beijnen JH, et al. Improving safety of fluoropyrimidine chemotherapy by individualizing treatment based on dihydropyrimidine dehydrogenase activity - Ready for clinical practice? *Cancer Treat Rev*. 2016 Nov;50:23-34. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.08.002>
- (43) Kleibl Z, Fidlerova J, Kleiblova P, et al. Influence of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) coding sequence variants on the development of fluoropyrimidine-related toxicity in patients with high-grade toxicity and patients with excellent tolerance of fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Neoplasma*. 2009;56(4):303-16. https://doi.org/10.4149/neo_2009_04_303
- (44) van Kuilenburg AB, Haasjes J, Meinsma R, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency: novel mutations in the DPD gene. *Adv Exp Med Biol*. 2000;486:247-50. https://doi.org/10.1007/0-306-46843-3_48
- (45) Lachetta F, Bonelli C, Romagnani A, et al. The clinical relevance of multiple DPYD polymorphisms on patients candidate for fluoropyrimidine based-chemotherapy. An Italian case-control study. *Br J Cancer*. 2019 Apr;120(8):834-39. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0423-8>
- (46) van Kuilenburg AB, Meijer J, Mul AN, et al. Intragenic deletions and a deep intronic mutation affecting pre-mRNA splicing in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene as novel mechanisms causing 5-fluorouracil toxicity. *Hum Genet*. 2010 Nov;128(5):529-38. <https://doi.org/10.1007/s00439-010-0879-3>



- (47) Nie Q, Shrestha S, Tapper EE, et al. Quantitative Contribution of rs75017182 to Dihydropyrimidine Dehydrogenase mRNA Splicing and Enzyme Activity. *Clin Pharmacol Ther.* 2017 Oct;102(4):662-70. <https://doi.org/10.1002/cpt.685>
- (48) Genome Aggregation Database (gnomAD). SNV:1-98165030-T-C(GRCh37) [online]. [consult. 25/11/2022]. https://gnomad.broadinstitute.org/variant/1-98165030-T-C?dataset=gnomad_r2_1
- (49) Zaanan A, Dumont LM, Lorient MA, et al. A case of 5-FU-related severe toxicity associated with the p.Y186C DPYD variant. *Clin Pharmacol Ther.* 2014 Feb;95(2):136. Epub 2013 Sep 13. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.183>
- (50) Saif MW, Lee AM, Offer SM, et al. A DPYD variant (Y186C) specific to individuals of African descent in a patient with life-threatening 5-FU toxic effects: potential for an individualized medicine approach. *Mayo Clin Proc.* 2014 Jan;89(1):131-36. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.09.008>
- (51) Offer SM, Diasio RB. Response to "A case of 5-FU-related severe toxicity associated with the P.Y186C DPYD variant". *Clin Pharmacol Ther.* 2014 Feb;95(2):137. Epub 2013 Oct 9. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.207>
- (52) Kouwaki M, Hamajima N, Sumi S, et al. Identification of novel mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in a Japanese patient with 5-fluorouracil toxicity. *Clin Cancer Res.* 1998 Dec;4(12):2999-3004. <https://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/4/12/2999/2069259/2999.pdf>
- (53) Gross E, Busse B, Riemenschneider M, et al. Strong association of a common dihydropyrimidine dehydrogenase gene polymorphism with fluoropyrimidine-related toxicity in cancer patients. *PLoS One.* 2008;3(12):e4003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004003>
- (54) Falvella FS, Cheli S, Martinetti A, et al. DPD and UGT1A1 deficiency in colorectal cancer patients receiving triplet chemotherapy with fluoropyrimidines, oxaliplatin and irinotecan. *Br J Clin Pharmacol.* 2015 Sep;80(3):581-8. <https://doi.org/10.1111/bcp.12631>
- (55) Božina N, Bilić I, Ganoci L, et al. DPYD polymorphisms c.496A>G, c.2194G>A and c.85T>C and risk of severe adverse drug reactions in patients treated with fluoropyrimidine-based protocols. *Br J Clin Pharmacol.* 2022 May;88(5):2190-2202. Epub 2021 Dec 6. <https://doi.org/10.1111/bcp.15144>
- (56) Cevik M, Namal E, Sener ND, et al. Investigation of DPYD, MTHFR and TYMS polymorphisms on 5-fluorouracil related toxicities in colorectal cancer. *Per Med.* 2022 Sep;19(5):435-44. <https://doi.org/10.2217/pme-2021-0047>
- (57) Vreken P, Van Kuilenburg AB, Meinsma R, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency: identification and expression of missense mutations C29R, R886H and R235W. *Hum Genet.* 1997 Dec;101(3):333-8. <https://doi.org/10.1007/s004390050637>
- (58) Khushman M, Patel GK, Hosein PJ, et al. Germline pharmacogenomics of DPYD*9A (c.85T>C) variant in patients with gastrointestinal malignancies treated with fluoropyrimidines. *J Gastrointest Oncol.* 2018 Jun;9(3):416-24. <https://doi.org/10.21037/jgo.2018.02.03>
- (59) Nie Q, Guo X, Liu H, et al. Effects of DPYD and TS gene polymorphisms on chemosensitivity of 5-FU in advanced colorectal cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2019;12(7):9380-6. <https://e-century.us/files/ijcem/12/7/ijcem0094380.pdf>
- (60) O'Donnell PH, Trubetskoy V, Nurhussein-Patterson A, et al.; Translational Breast Cancer Research Consortium (TBCRC). Clinical evaluation of germline polymorphisms associated with capecitabine toxicity in breast cancer: TBCRC-015. *Breast Cancer Res Treat.* 2020 Jun;181(3):623-33. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05603-8>
- (61) Seck K, Riemer S, Kates R, et al. Analysis of the DPYD gene implicated in 5-fluorouracil catabolism in a cohort of Caucasian individuals. *Clin Cancer Res.* 2005 Aug 15;11(16):5886-92. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1784>
- (62) Teh LK, Hamzah S, Hashim H, et al. Potential of dihydropyrimidine dehydrogenase genotypes in personalizing 5-fluorouracil therapy among colorectal cancer patients. *Ther Drug Monit.* 2013 Oct;35(5):624-30. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e318290acd2>
- (63) Kim W, Cho YA, Kim DC, et al. Elevated Risk of Fluoropyrimidine-Associated Toxicity in European Patients with DPYD Genetic Polymorphism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Pers Med.* 2022 Feb 6;12(2):225. <https://doi.org/10.3390/jpm12020225>
- (64) Zhao XQ, Cao WJ, Yang HP, et al. DPYD gene polymorphisms are associated with risk and chemotherapy prognosis in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Tumour Biol.* 2016 Aug;37(8):10393-402. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4908-2>
- (65) Murphy C, Byrne S, Ahmed G, et al. Cost Implications of Reactive Versus Prospective Testing for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency in Patients With Colorectal Cancer: A Single-Institution Experience. *Dose Response.* 2018 Oct 1;16(4):1559325818803042. <https://doi.org/10.1177/1559325818803042>
- (66) Ensembl - genome browser [online]. Disponível em: <https://www.ensembl.org/index.html>
- (67) Institute of Medical Genetics in Cardiff. The Human Gene Mutation Database (HGMD) [online]. Disponível em: <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/search.php>
- (68) De Luca O, Salerno G, De Bernardini D, et al. Predicting Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency and Related 5-Fluorouracil Toxicity: Opportunities and Challenges of DPYD Exon Sequencing and the Role of Phenotyping Assays. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 11;23(22):13923. <https://doi.org/10.3390/ijms232213923>
- (69) Lu Z, Zhang R, Diasio RB. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Res.* 1993 Nov 1;53(22):5433-38. <https://europepmc.org/article/MED/8221682>
- (70) Etienne MC, Chatelut E, Pivrot X, Lavit M, Pujol A, Canal P, Milano G. Co-variables influencing 5-fluorouracil clearance during continuous venous infusion. A NON-MEM analysis. *Eur J Cancer.* 1998 Jan;34(1):92-7. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(97\)00345-6](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(97)00345-6)

__Motivos para a não adesão à toma da vacina antigripal na época 2020/2021 na população portuguesa com 65 e mais anos

Reasons for non-adherence to taking the influenza vaccine in the 2020/2021 season in the Portuguese population aged 65 and over

Ana João Santos, Irina Kislaya, Ausenda Machado, Carlos Matias Dias

ana.carvalho@insa.min-saude.pt

Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

__Resumo

A vacinação antigripal sazonal (VAGS) constitui a principal medida de saúde pública para a redução do número de infeções pelo vírus da gripe e respetivas complicações. Anualmente, entre os grupos-alvo definidos com recomendação para a toma da VAG inclui-se a população com 65 e mais anos, para a qual a vacina é gratuita. Assim, é importante identificar os aspetos mais relevantes no comportamento de não adesão à toma desta vacina, para poder desenvolver campanhas de vacinação mais efetivas. Neste estudo utilizou-se o Modelo de Crenças em Saúde (MCS) e as suas cinco dimensões, para compreender o processo de tomada de decisão no caso da não adesão à VAGS na população portuguesa com 65 e mais anos na época 2020/2021. Com base nos dados recolhidos através do painel de famílias ECOS (Em Casa Observamos Saúde) constituído em 2018 e renovado parcialmente em dezembro de 2020, utilizaram-se as respostas a uma pergunta aberta sobre os motivos para não ter tomado a VAG na época de 2020/2021. As respostas obtidas foram organizadas em categorias através de análise de conteúdo temática e calculou-se a frequência dos diferentes motivos expressos pelos entrevistados de acordo com as dimensões do MCS: suscetibilidade, gravidade, barreiras, benefícios e pistas para a ação. Estimou-se, para população com 65 ou mais anos, na época em estudo, uma frequência de não adesão à VAGS de 33,8%. As dimensões barreiras e suscetibilidade percebidas foram as dimensões mais evocadas para a não toma da VAGS, especificamente através da perceção de efeitos adversos que podem advir da toma da vacina e da pouca suscetibilidade a contrair a doença. Estes resultados sugerem possíveis lacunas no conhecimento que a população tem acerca da vacina e da doença.

__Abstract

The seasonal influenza vaccine (IV) is the leading public health tool to reduce the number of influenza virus infections and cases of severe disease. Annually, among the target groups usually included for the immunisation against seasonal influenza, there are the adults aged 65 and older that are offered a free of charge IV. To develop effective vaccination campaigns it is important understand the most important issues in the non-uptake behaviour. Using the Health Belief Model (HBM) five dimensions as conceptual framework, this study focuses on the decision-making process to IV non-adherence by Portuguese adults aged 65 or older. Based on the data collected from the ECOS panel (At Home we Observe Health [Em Casa Obser-

vamos Saúde]) constituted in 2018 and partially renovated in 2020, we used responses to an open question about the reasons for not taking VAG in the 2020/2021. Through thematic content analysis, the responses were organized into categories and we estimated the reasons frequency, according to HBM dimensions: susceptibility, severity, barriers, benefits and clues for action. The population aged 65 years and older frequency of non-adherence to VAG was estimated at 33.8%. The perceived barriers and susceptibility dimensions were the most frequent dimensions for not taking IV, particularly by perception of adverse effects from the vaccine uptake and the low susceptibility to contracting the disease. These results suggest possible gaps in the knowledge that the population has about the vaccine and the disease.

__Introdução

A vacinação é uma das principais medidas de saúde pública para a redução do número de infeções pelo vírus da gripe e respetivas complicações pós-infeção ⁽¹⁾. Anualmente, a Direção-Geral da Saúde emite recomendações para a prescrição da vacina antigripal sazonal (VAG) gratuita a grupos-alvo prioritários, incluindo pessoas com idade igual ou superior a 65 anos ⁽²⁾. Para que esta medida possa ter o máximo impacto possível, é importante compreender o motivo pelo qual os indivíduos, para os quais a vacina é recomendada e gratuita, não aderem à sua toma.

A adoção dos comportamentos preventivos em saúde depende da interação de vários fatores, alguns modificáveis mas outros não modificáveis ⁽³⁾. Entre os vários modelos teóricos para a análise dos comportamentos em saúde, e que enfatizam a perceção do risco e as crenças em saúde, o Modelo de Crenças em Saúde (MCS) é um dos mais frequentemente utilizados no



estudo da adesão à vacinação (3-5). O MCS, desenvolvido nos anos 50, tem sido utilizado na abordagem sistemática para explicar e prever comportamentos preventivos de saúde, nomeadamente, no processo de tomada de decisão na adesão ou não adesão à VAG (3-6). O comportamento de saúde é associado à avaliação do nível de ameaça pessoal e à perceção de que determinada prática vai reduzir esse risco de forma eficaz. A perceção da ameaça individual é, por sua vez, influenciada pelos valores associados à saúde, crenças específicas acerca da vulnerabilidade a uma doença particular e crenças sobre as consequências da doença. O MCS inclui cinco domínios-chave que influenciam comportamentos de saúde: suscetibilidade, gravidade, barreiras, benefícios e pistas para a ação.

_Objetivo

O estudo, desenvolvido no âmbito do ECOS (Em casa observamos Saúde), teve como principal objetivo analisar os motivos de não adesão à vacina antigripal sazonal na época 2020/2021 nos indivíduos com 65 e mais anos, de acordo com as dimensões do Modelo de Crenças em Saúde (suscetibilidade, gravidade, barreiras, benefícios e pistas para a ação).

_Materiais e métodos

Os dados foram obtidos através de um inquérito telefónico a uma amostra aleatória de unidades de alojamento (Amostra ECOS) (7), estratificada por região NUTs II com alocação homogénea (n=1050). Os dados foram recolhidos através de um questionário estruturado via entrevista telefónica assistida por computador (julho a setembro de 2021).

Utilizando os dados dos indivíduos que constituíram a amostra do painel (indivíduos com 65 ou mais anos à data do contacto a residir em alojamentos particulares) e que reportaram numa pergunta aberta os motivos para não terem tomado a VAG, utilizou-se o método de análise de conteúdo temático para codificar e atribuir

as respostas dadas a unidades temáticas que, sempre que possível, foram incluídas numa das dimensões do MCS (8).

A análise estatística realizada focou-se no cálculo da proporção de indivíduos e sua distribuição pelos diferentes motivos reportados de não adesão à VAG. As estimativas foram ponderadas por região, sexo e grupo etário da população em 2021 (9) e são acompanhadas dos respetivos intervalos de confiança (IC) a 95%.

_Resultados

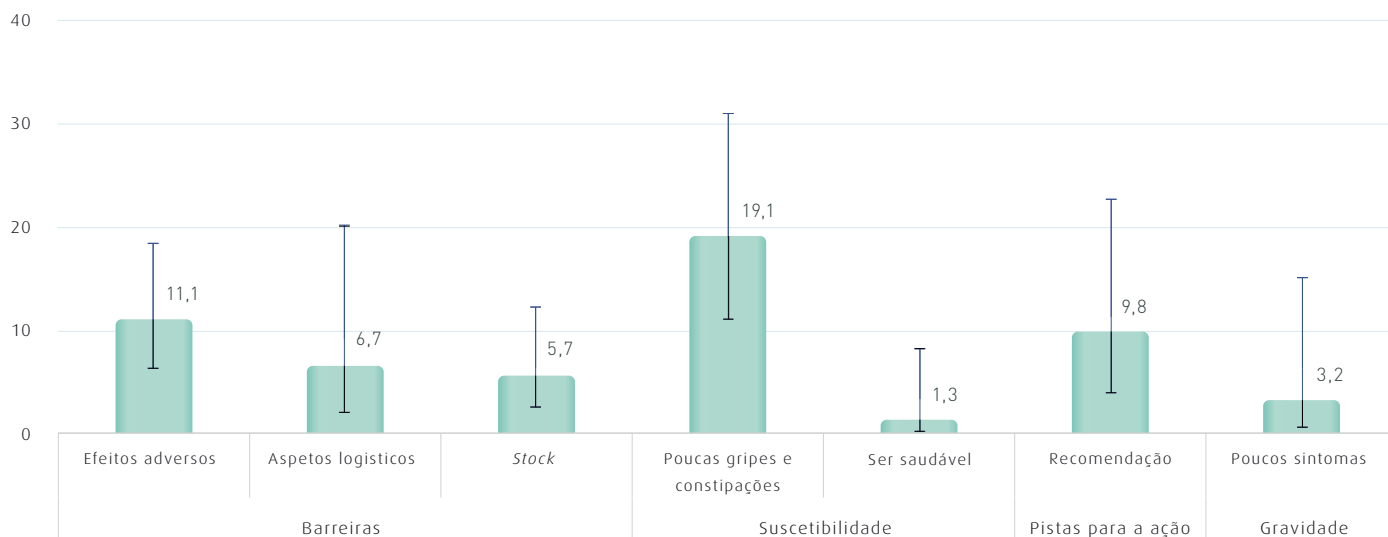
A cobertura estimada da VAG foi de 66,2% (IC95%: 60,3-71,7) para a população com 65 e mais anos. Dos 126 respondentes com 65 e mais anos, não vacinados, 117 identificaram os motivos para não adesão à VAG na época 2020/2021.

Dos principais motivos evocados pela população com 65 e mais anos para a não toma da VAG, a categoria mais frequente, denominada “Sem necessidade”, não se integrou no MCS (25,2%; IC95%: 15,5-38,3). Incluiu respostas gerais, sem especificação de razão, da qual são exemplos as repostas abertas: “*Acho que no meu caso não é necessário*” e “*Não entendo necessária*”. Outra categoria generalista, menos frequente, sem concretização de razões ou motivos, foi “Não querer” (2,4%; IC95%: 0,7-8,3), onde se integraram relatos como: “*não quero*” e “*não quis ser vacinado*”.

As outras categorias enquadraram-se nas diferentes dimensões do MCS (gráfico 1), sendo a mais frequente a dimensão “Barreiras”, que corresponde à avaliação individual sobre os obstáculos ou dificuldades na adoção de um determinado comportamento (29,2%; IC95%: 19,6-41,1). As categorias mais frequentes desta dimensão foram “Efeitos adversos” (11,0%), onde se descreveu que a vacina “*deixa a pessoa doente*”; “Aspetos logísticos”, que incluíram questões de mobilidade e deslocação aos Cuidados de Saúde Primários (6,7%) e a “Falta de *stock*” (5,7%). Outras categorias, menos frequentes, foram a “Baixa eficácia” (3,4%;



Gráfico 2: ▾ Estimativa da frequência dos motivos para a não vacinação na população portuguesa com 65 e mais anos, de acordo com as dimensões do modelo de crenças em saúde, resultantes do inquérito ECOS aplicado a uma amostra em 2021 (n=1050).



IC95%: 1,2-9,1) que incluíram relatos a questionar a eficácia (*“eficácia normalmente é baixa, acho que não se justifica tomar a vacina”*), *“Medo”* das vacinas, agulhas e, ou, dos médicos (1,3%; IC95%: 0,3-5,9) e a *“Utilização de alternativas”* (1,0%; IC95%: 0,3-3,0), que reportava à utilização de outros *“métodos”* para a proteção da gripe como, por exemplo, *“medicação que é natural”*.

A dimensão *“Suscetibilidade”*, que se refere ao julgamento do indivíduo sobre as probabilidades de contrair a doença, foi a segunda dimensão mais relevante (21,7%; IC95%: 13,2-33,6), sobretudo com a categoria *“Ter poucas gripes e constipações”* (19,1%), onde se incluíram respostas abertas como: *“nunca tive grandes gripes”* e *“não fico doente”*. Seguiram-se as categorias *“Ser saudável”* (1,3%), onde se relatou não ser necessária a vacina, pois era-se ou se praticava um *“estilo de vida saudável”*. Outras categorias menos frequentes foram *“Não ter idade”* (1,1%; IC95%: 0,2-7,5), *“Não pertencer ao grupo de risco”* (0,1%; IC95%: 0,0-0,9) e *“Estar protegido”* (0,1%; IC95%: 0,0-0,8) devido ao contexto pandémico (e.g., pela *“utilização da máscara”* e por se estar *“mais em casa”*).

Na dimensão *“Pistas para a ação”*, que inclui aspetos e indicações externas ao indivíduo para a adoção do comportamento, a única categoria integrada foi *“Recomendação”* (9,8%; IC95%: 3,9-22,8), da qual são exemplos as seguintes respostas abertas: *“a médica não manda”* e *“Não me foi recomendada”*.

A dimensão menos frequente foi a *“Gravidade”* (3,2%; IC95%: 0,6-10,1), que se refere ao julgamento do indivíduo sobre a probabilidade de ter doença grave, no caso de contrair a doença, com respostas que indicavam a perceção de que nunca se *“fica muito doente”* e geralmente tem-se *“sintomas ligeiros”*.

Discussão e conclusão

No presente estudo estimou-se para população com 65 ou mais anos residente em Portugal em 2021 uma frequência de não adesão à VAG de 33,8%, comparável com as estimativas obtidas na avaliação de adesão à VAG pela população portuguesa alvo da vacinação na época 2013/2014 (31,3%; IC95%: 24,6-39,0) (5).

As dimensões *“Barreiras”* e *“Suscetibilidade”* percebidas foram as dimensões mais evocadas para a opção pela não toma da vacina antigripal na população com



65 e mais anos, o que vai ao encontro de outros estudos, em populações alvo para a vacinação, sobretudo pela importância da Suscetibilidade (5,10). Observou-se, no presente estudo, a importância das “Barreiras”, sobretudo a percepção de efeitos adversos que podem advir da toma da vacina, bem como a percepção e crenças sobre a própria doença, considerando-se, a população com 65 e mais anos, pouco suscetível. Outros estudos sobre a VAG sugerem um peso mais significativo das dimensões “Suscetibilidade” e “Gravidade” (3,4,6,10). Contudo, a importância dos efeitos adversos (da dimensão “Barreiras”) foi já identificada em estudos conduzidos junto da população-alvo para a vacinação em Portugal (5). Adicionalmente, um estudo que analisou a relação entre a percepção do risco e adesão à VAG sugere que a dimensão “Gravidade” só se torna relevante quando há uma percepção elevada de suscetibilidade à doença, produzindo assim um nível elevado de ameaça pessoal (10). Já a baixa frequência dos motivos relacionados com a pertença ao grupo-alvo (“Idade” e “Pertença ao grupo de risco”), indicam o conhecimento por parte deste grupo populacional relativamente à recomendação para a VAG.

Tendo em conta os resultados obtidos, os portugueses com 65 e mais anos que não aderem à VAG, não pareceram fazê-lo, na época 2020/2021, por desconhecerem a recomendação, mas porque desconfiaram da vacina e não se consideraram vulneráveis a contrair gripe.

Estes resultados sugerem possíveis lacunas no conhecimento que a população tem acerca da vacina e da doença. As campanhas de vacinação poderão potenciar a sua adesão se tomarem em consideração os fatores que são mais relevantes para a população na sua tomada de decisão.

Referências bibliográficas:

- (1) Vaccines against influenza WHO position paper – November 2012. *Wkly Epidemiol Rec.* 2012 Nov 23;87(47):461-76. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/241993>
- (2) Direção Geral de Saúde. Norma nº 016/2020 de 25/09/2020. Vacinação contra a gripe. Época 2020/2021. Revogada pela Norma nº 006/2021 de 25/09/2021 (atualiz. a 14/12/2021). Vacinação contra a gripe. Época 2021/2022. Permite a administração da vacina contra a gripe e da vacina contra a COVID-19 sem qualquer intervalo de tempo. <https://www.dgs.pt/normas-orientacoes-e-informacoes/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0062021-de-25092021.aspx>
- (3) Champion VL, Skinner CS. Health belief model. In: Glanz K, Rimer BK, Viswanath K (eds). *Health behavior and health education: Theory, research, and practice*. 4th ed, San Francisco, CA: Jossey-Bass, c2008, pp. 42-65.
- (4) Evans MR, Watson PA. Why do older people not get immunised against influenza? A community survey. *Vaccine.* 2003 Jun 2;21(19-20):2421-7. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00059-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00059-8)
- (5) Santos AJ, Kislalya I, Machado A, et al. Beliefs and attitudes towards the influenza vaccine in high-risk individuals. *Epidemiol Infect.* 2017 Jul;145(9):1786-96. Epub 2017 Apr 24. <https://doi.org/10.1017/S0950268817000814>
- (6) Janz NK, Becker MH. The Health Belief Model: a decade later. *Health Educ Q.* 1984 Spring;11(1):1-47. <https://doi.org/10.1177/109019818401100101>
- (7) Observatório Nacional de Saúde. Em Casa, pelo telefone, Observamos Saúde: descrição e avaliação de uma metodologia. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2021. (Documento interno).
- (8) Flick U. *Métodos qualitativos na investigação científica*. Lisboa: Monitor, 2005.
- (9) Instituto Nacional de Estatística. Recenseamento da população e habitação – Censos 2021. População residente (N.º) por Local de residência, Sexo e Grupo etário (NUTS - 2013), Sexo e Grupo etário; Decenal. https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0008401&contexto=bd&selTab=tab2
- (10) Brewer NT, Chapman GB, Gibbons FX, et al. Meta-analysis of the relationship between risk perception and health behavior: the example of vaccination. *Health Psychol.* 2007 Mar;26(2):136-45. <https://doi.org/10.1037/0278-6133.26.2.136>

__Distribuição temporal e geográfica da leptospirose humana diagnosticada em indivíduos residentes no norte de Portugal, 2014-2019

Temporal and spatial distribution of human leptospirosis in the north of Portugal, 2014-2019

Sofia Moura, Carla Rio, Susana Gomes, Anabela Santos Silva

sofia.moura@insa.min-saude.pt

Departamento de Doenças Infecciosas. Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

__Resumo

Em Portugal, a leptospirose humana é considerada uma doença de declaração obrigatória (DDO). De acordo com o relatório DDO 2013-2016, a área geográfica de intervenção da ARS Norte é a segunda área do país com maior número de casos notificados de leptospirose em humanos. O objetivo deste estudo foi analisar a distribuição temporal e geográfica dos casos de leptospirose humana identificados em indivíduos residentes na região norte de Portugal, no período de 2014 a 2019, e que foram estudados no Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Realizou-se um estudo retrospectivo de 72 indivíduos com resultado positivo para pesquisa de anticorpos IgM para *Leptospira* spp. O maior número de casos foi registado em 2014 e o menor em 2019, 18 e 5 casos respetivamente. Em relação à distribuição por mês de diagnóstico laboratorial, verificou-se um maior número de casos diagnosticados entre os meses de junho e novembro (73,6%). Quanto à distribuição geográfica por concelho de residência, o concelho que apresentou maior número de casos foi Vila Nova de Gaia (n=8). Do total de indivíduos diagnosticados com leptospirose humana, 79,1% residiam em freguesias classificadas como predominantemente ou mediamente urbanas. Os resultados obtidos revelaram uma assimetria na distribuição dos casos de leptospirose humana, notando-se uma maior frequência nos meses de verão/outono e em áreas predominantemente/mediamente urbanas. Este estudo é mais um contributo para o conhecimento da epidemiologia e dinâmica de transmissão da leptospirose em humanos na região norte de Portugal podendo, desta forma, ser útil para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controlo da doença.

__Abstract

*In Portugal, human leptospirosis is a mandatory notifiable infectious disease. Data from 2013 to 2016 showed that the geographical area of intervention of the ARS Norte had the second highest number of notified cases. The aim of this study was to analyze temporal and spatial distribution of human leptospirosis, identified between 2014 and 2019, in individuals living in the north region of Portugal. We reviewed 72 cases of individuals with a positive result for IgM antibodies to *Leptospira* spp., which were tested at the Public Health Centre Doutor Gonçalves Ferreira, National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge. The number of cases was higher in 2014 and lower in 2019, 18 and 5 cases respectively. Overall, 73.6% of the cases were diagnosed between June and November. Vila Nova de Gaia was the*

municipality with the highest number of cases (n=8), and 79.1% of individuals with human leptospirosis were living in predominantly and moderately urban areas. In conclusion, our results showed a seasonal pattern of human leptospirosis with most cases occurring in summer and autumn, and a geographical pattern of cases with a higher frequency in predominantly/moderately urban areas. These findings may help develop more effective strategies to prevent and control human leptospirosis.

__Introdução

A leptospirose humana é uma doença infecciosa causada por bactérias do género *Leptospira* sendo considerada uma das zoonoses mais frequentes a nível mundial (1). Estima-se que, anualmente, esta doença seja responsável por 1,03 milhões de casos e 58.900 mortes em todo o mundo (2).

Em Portugal, a leptospirose humana é uma doença de notificação obrigatória, sendo os casos classificados como prováveis ou confirmados de acordo com os critérios clínicos, laboratoriais e/ou epidemiológicos (3). O relatório epidemiológico de 2016 do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) revelou que Portugal foi o país europeu com o maior número de casos confirmados, estimando-se uma taxa de notificação de 0,98 casos confirmados de leptospirose por 100 mil habitantes (4). A nível nacional, o relatório de Doenças de Declaração Obrigatória (DDO), referente ao período de 2013-2016, mostrou que a área geográfica de intervenção da Administração Regional de Saúde (ARS) do Norte é a segunda área do país com maior número de casos notificados de leptospirose em humanos, depois da Região Autónoma dos Açores (5).



De forma a desenvolver estratégias de prevenção e controlo da leptospirose humana torna-se importante conhecer a epidemiologia e dinâmica de transmissão da doença. Neste sentido, descrever a epidemiologia da doença no espaço, no tempo e nos indivíduos é o primeiro contributo de apoio à tomada de decisão.

_Objetivo

O presente estudo teve como objetivo analisar a distribuição temporal e geográfica dos casos de leptospirose humana, identificada em indivíduos residentes na região norte de Portugal e que foram estudados no Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge entre 2014 e 2019.

_Material e métodos

Realizou-se uma análise retrospectiva dos indivíduos residentes na região norte de Portugal com suspeita clínica de infeção por *Leptospira* spp. e cujas amostras foram enviadas ao Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira (CSPGF) para estudo laboratorial entre 2014 e 2019. No presente estudo foram incluídos os indivíduos que apresentaram um resultado positivo para a pesquisa de anticorpos do tipo imunoglobulina M (IgM) para *Leptospira* spp. (n=72), indicativo de infeção recente.

A área de estudo foi definida como a área de influência direta dos hospitais que requisitaram a pesquisa de anticorpos IgM para *Leptospira* spp. Esta área está assinalada no mapa da [figura 1](#).

A pesquisa de anticorpos IgM para *Leptospira* spp. foi realizada em amostras de soro, pela técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), utilizando um kit comercial da Virion\Serion®. Para a definição de tipo de área urbana foi utilizada a Tipologia de Áreas Urbanas (TIPAU) 2014 que classifica as freguesias de Portugal em áreas predominantemente urbanas, áreas mediamente urbanas e áreas predominantemente rurais (6). Para a criação do mapa foi utilizado o programa ArcGIS® Pro 2.8 (Esri, Redlands, USA). A análise descritiva dos dados foi realizada através do programa Microsoft Excel® 2013.

_Resultados

Entre 2014 e 2019 foi realizada no CSPGF a pesquisa de anticorpos IgM para *Leptospira* spp. em amostras de soro de 540 indivíduos com um quadro clínico suspeito de leptospirose, dos quais 72 (13,3%) foram positivos. Ao longo dos seis anos de observação, a distribuição dos casos positivos variou entre 18 casos em 2014 e 5 casos em 2019, não se verificando qualquer tendência ao longo do tempo ([tabela 1](#)).

Tabela 1: ↴ Distribuição dos casos de leptospirose humana por ano de diagnóstico, 2014-2019.

Ano de diagnóstico	Total de casos suspeitos de infeção por <i>Leptospira</i> spp. analisados	Pesquisa de anticorpos IgM para <i>Leptospira</i> spp.	
		Número de casos positivos	%
2014	61	18	29,5
2015	66	7	10,6
2016	106	12	11,3
2017	157	17	10,8
2018	77	13	16,9
2019	73	5	6,8
Total	540	72	13,3



A distribuição por sexo dos 72 indivíduos com leptospirose mostrou que 44 (61,1%) pertenciam ao sexo masculino. Os indivíduos estudados apresentaram um intervalo de idades entre os 5 e 84 anos, sendo que apenas um tinha idade inferior a 18 anos. A idade média dos indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos foi de 51,5 ($\pm 17,6$) anos, a mediana de 49 anos e a moda de 48 anos.

A maior parte das infeções recentes por *Leptospira* spp. foram diagnosticadas em indivíduos com idade igual ou superior a 25 anos (67/72; 93,1%), sendo o

grupo etário entre os 45 e 64 anos o que revelou um maior número de infeções (27/72; 37,5%) (gráfico 1).

Quanto à distribuição do número de casos de leptospirose humana por mês de diagnóstico laboratorial, verificou-se um maior número de casos diagnosticados entre os meses de junho e novembro (53/72; 73,6%), conforme se pode observar no gráfico 2.

Na distribuição do número de casos de leptospirose humana por concelho de residência, destaca-se o concelho de Vila Nova de Gaia com um total de 8 casos, seguido de Amarante, Barcelos e Paredes, com

Gráfico 1: Distribuição dos casos de leptospirose humana por sexo e grupo etário, 2014-2019.

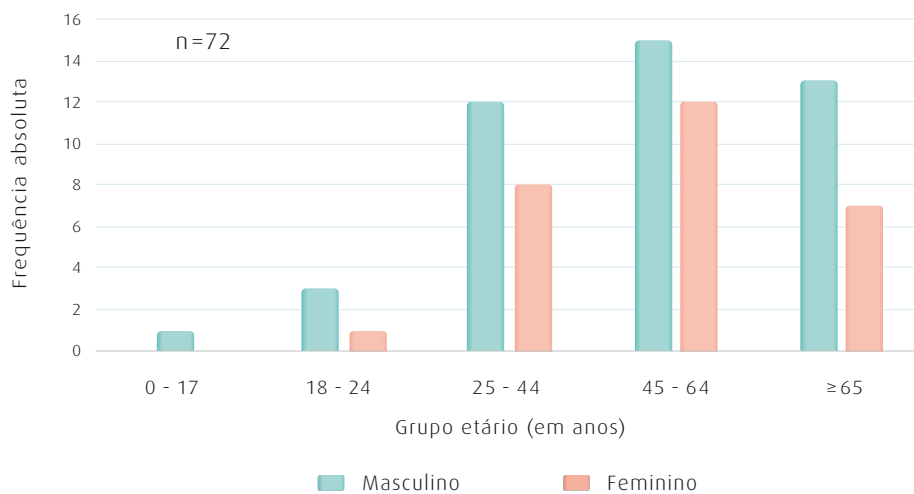
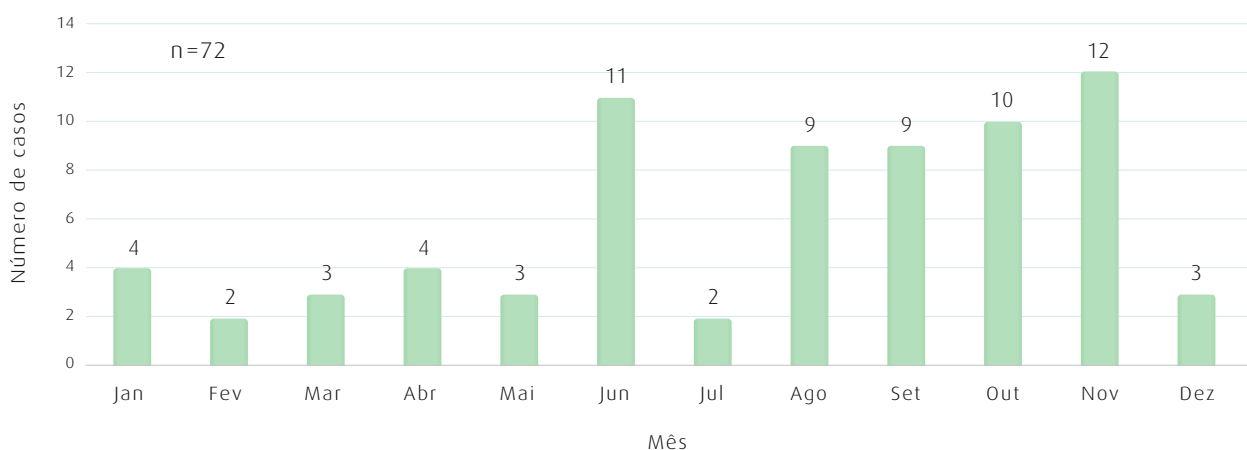


Gráfico 2: Distribuição dos casos de leptospirose humana por mês de diagnóstico laboratorial, 2014-2019.





Em 2014, 29,5% dos indivíduos estudados apresentaram um resultado positivo para infeção recente por *Leptospira* spp. Entre 2015 e 2018, a percentagem de indivíduos variou entre 10,6 e 16,9% e no ano de 2019 desceu para 6,8%. Não foi possível interpretar a frequência e distribuição dos casos ao longo dos anos por falta de informação sobre atividades profissionais, recreativas, ou outras ações que possam potenciar o aparecimento da doença.

Os resultados deste estudo apontaram para uma maior frequência dos casos de leptospirose humana entre os meses de junho e novembro (73,6%), sobretudo meses de verão e outono. Esta distribuição vai de encontro à informação disponível no relatório epidemiológico do ECDC para o ano de 2016, onde os países da União Europeia/Área Económica Europeia notificaram a ocorrência de 64% dos casos entre os meses de junho e outubro (4). Um importante fator a considerar na distribuição sazonal da leptospirose humana é o clima e os fenómenos meteorológicos. No entanto, os dados sobre esta doença deverão ser analisados numa perspetiva conjunta de vários fatores, englobando também a atividade agrícola sazonal, a flutuação da população de animais reservatório e o comportamento humano, quer seja devido à atividade profissional de risco, a desportos e atividades recreativas aquáticas ou a viagem para países endémicos (4,11).

Relativamente à distribuição geográfica da doença, o presente estudo mostrou uma maior frequência do número de casos em áreas predominantemente/mediamente urbanas. O concelho de Vila Nova de Gaia apresentou o maior número de casos por concelho de residência (8 casos) e todos em freguesias classificadas como áreas predominantemente urbanas. Nos concelhos de Amarante, Barcelos e Paredes (6 casos em cada concelho), todos os casos ocorreram em áreas predominantemente ou mediamente urbanas. Ao longo dos anos, vários estudos revelaram um aumento do número de casos de leptospirose humana em áreas

urbanas (7-10), sendo que alguns deles indicaram a presença de ratos como possível causa da doença (7,10). Neste estudo apenas tivemos acesso a informação de dois indivíduos: o primeiro guardava fruta numa cave frequentada por ratos e o segundo era trabalhador agrícola, ambos residentes em áreas classificadas como predominantemente urbanas.

Uma das limitações deste estudo foi a ausência de informação clínica dos indivíduos, o que limitou a classificação dos casos diagnosticados no CSPGF como casos confirmados, conforme definição estabelecida nas DDO em vigor no território nacional (3). Adicionalmente, a ausência de informação sobre a data de início de sintomas, não permitiu determinar a distribuição dos casos por data de início da doença, dificultando a deteção precoce de aglomerados de casos e/ou surtos. Não obstante o exposto, os resultados apresentados neste estudo são concordantes com os dados de relatórios epidemiológicos referentes à distribuição da leptospirose humana em Portugal.

Existem vários estudos sobre a distribuição da leptospirose humana a nível nacional e em determinadas regiões de Portugal (5,12-17). Contudo, este trabalho parece ser o primeiro a mostrar a distribuição geográfica a nível de concelho de residência e por tipologia de áreas urbanas da leptospirose humana em indivíduos residentes nesta área do norte de Portugal.

Conclusão

Os resultados obtidos revelaram uma assimetria na distribuição dos casos de leptospirose humana, notando-se uma maior frequência nos meses de verão/outono e em áreas predominantemente/mediamente urbanas. Estes dados são mais um contributo para o conhecimento da epidemiologia e dinâmica de transmissão da leptospirose em humanos na região norte de Portugal.



O presente estudo vem mais uma vez evidenciar a importância da partilha dos dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos entre todos os intervenientes que deles necessitam para apoiar o diagnóstico e, assim, melhor direcionar as intervenções de prevenção e controlo da doença.

Agradecimento:

Os autores agradecem à Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: WHO, 2003. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42667>
- (2) Costa F, Hagan JE, Calcagno J, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Sep 17;9(9):e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>
- (3) Saúde - Direção-Geral da Saúde. Despacho n.º 1150/2021. DR n.º 19/2021, 2ª Série, 2021-01-28, pp. 137-90. Doenças de notificação obrigatória a notificar na plataforma de apoio ao SINAVE (Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica) ou no SI-Vida (Sistema de informação VIH/SIDA). <https://dre.pt/dre/detalhe/despacho/1150-2021-155575942>
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control. Listeriosis - Annual Epidemiological Report for 2016. Stockholm: ECDC, 2021. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-2016-leptospirosis.pdf>
- (5) Direção-Geral da Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória 2013-2016, Volume II - Regiões. Lisboa: DGS, 2017. <http://hdl.handle.net/10400.26/22530>
- (6) Instituto Nacional de Estatística. Tipologia de Áreas Urbanas 2014: Relatório Técnico. <https://smi.ine.pt/Versao/Download/10129>
- (7) Socolovschi C, Angelakis E, Renvoisé A, et al. Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France. *Int J Infect Dis*. 2011 Oct;15(10):e710-5. Epub 2011 Jul 20. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.05.017>
- (8) Jansen A, Schöneberg I, Frank C, et al. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerg Infect Dis*. 2005 Jul;11(7):1048-54. <https://doi.org/10.3201/eid1107.041172>
- (9) Meites E, Jay MT, Deresinski S, et al. Reemerging leptospirosis, California. *Emerg Infect Dis*. 2004 Mar;10(3):406-12. <https://doi.org/10.3201/eid1003.030431>
- (10) Koizumi N, Muto M, Tanikawa T, et al. Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan. *J Med Microbiol*. 2009 Sep;58(Pt 9):1227-30. Epub 2009 Jun 15. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.011528-0>
- (11) Dupouey J, Faucher B, Edouard S, et al. Human leptospirosis: an emerging risk in Europe? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2014 Mar;37(2):77-83. Epub 2013 Dec 17. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.12.002>
- (12) Falcao JM, Nogueira PJ, MatiasDias C, et. Leptospirosis in Portugal: epidemiology from 1991 to 1997. *Euro Surveill*. 1999 Apr;4(4):44-7. <https://doi.org/10.2807/esm.04.04.00063-en>
- (13) Fernandes M, Vieira ML, Carreira T, et al. Sanitation workers from Portugal: Is there evidence of *Leptospira* spp? *J Infect Public Health*. 2019 Sep-Oct;12(5):738-40. Epub 2019 Feb 15. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.02.001>
- (14) Moreira PFR. Leptospirose, revisão teórica e casuística do Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, E.P.E., de 2001 a 2011. (Dissertação de Mestrado, Clínica Universitária de Doenças Infecciosas, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, 2012).
- (15) Silva A, Moniz RM, Pereirinha T, et al. Molecular diagnosis of infectious diseases in São Miguel Island (Azores, Portugal): A hospital-based descriptive study. *J Infect Dev Ctries*. 2016 Sep 30;10(9):956-67. <https://doi.org/10.3855/jidc.7906>
- (16) Vieira ML, Gama-Simões MJ, Collares-Pereira M. Human leptospirosis in Portugal: A retrospective study of eighteen years. *Int J Infect Dis*. 2006 Sep;10(5):378-86. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2005.07.006>
- (17) Speidel A, Faisca R, Fernandes C, et al. Leptospirose: casuística do Serviço de Infeciologia do Centro Hospitalar de Coimbra 1990-2007. *Rev Port Doenças Inf*. 2008;4(2):58-62. <http://hdl.handle.net/10400.4/1397>

Perfis serológicos atípicos no diagnóstico laboratorial da infeção pelo vírus Epstein-Barr, 2015-2022

Atypical patterns in serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection, 2015-2022

Sofia Moura, Carla Rio, Laura Almeida, Maria Gabriela Figueiredo, Luísa Cavaleiro, Anabela Santos Silva

sofia.moura@insa.min-saude.pt

Departamento de Doenças Infecciosas. Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

Resumo

Os testes laboratoriais de pesquisa de anticorpos específicos para o vírus Epstein-Barr são uma das ferramentas usadas para a rápida e correta identificação da infeção causada por este vírus. No entanto, existem perfis serológicos atípicos que dificultam a obtenção de um diagnóstico. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar a frequência dos perfis serológicos atípicos e caracterizar a sua distribuição em indivíduos cuja pesquisa de anticorpos foi realizada no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Foi realizada uma análise retrospectiva de 1346 indivíduos residentes em Portugal, com perfil serológico completo para o diagnóstico laboratorial da infeção pelo vírus Epstein-Barr, obtido entre 2015 e 2022. Dos indivíduos incluídos no estudo, 192 (14,2%) apresentaram um perfil serológico atípico. O perfil serológico atípico mais frequente foi a presença de anticorpos IgG VCA/EA isolados (8,3%; 112/1346), seguido da presença simultânea de anticorpos IgM VCA, IgG VCA/EA e IgG EBNA-1 (3,6%; 48/1346), depois o perfil de anticorpos IgG EBNA-1 isolados (1,6%; 22/1346) e, por último, o perfil de anticorpos IgM VCA isolados (0,7%; 10/1346). No geral, a frequência dos perfis serológicos atípicos obtida neste estudo está de acordo com a literatura. Em comparação com outro estudo realizado em Portugal, os perfis de anticorpos IgG EBNA-1 isolados e anticorpos IgM VCA isolados apresentaram uma frequência ligeiramente superior. O presente estudo demonstra a importância dos perfis atípicos no diagnóstico serológico da infeção pelo vírus Epstein-Barr e a necessidade de efetuar testes serológicos e moleculares adicionais, que variam de acordo com a especificidade de cada perfil atípico.

Abstract

Specific antibody tests are used to determine different stages of Epstein-Barr virus infection. However, the detection of atypical serological patterns may pose a diagnostic challenge. This study aims to determine the frequency and distribution of atypical patterns in individuals tested at the Portuguese National Institute of Health. We reviewed 1346 individuals with serological patterns obtained between 2015 and 2022, from individuals living in Portugal. Of those included in this study, 192 (14.2%) showed an atypical pattern. Isolated VCA IgG was the most frequent (8.3%, 112/1346), followed by the simultaneous presence of antibodies VCA IgM, VCA/EA IgG, and EBNA-1 IgG (3.6%, 48/1346), isolated EBNA-1 IgG (1.6%, 22/1346),

and finally isolated VCA IgM (0.7%, 10/1346). The frequency of atypical serological patterns obtained in this study was similar to those obtained in other studies. When comparing to another study conducted in Portugal, we found slightly higher percentages of the atypical serological patterns: isolated EBNA-1 IgG, and isolated VCA IgM. This study highlights the importance of atypical serological patterns in Epstein-Barr virus diagnosis, and the need to perform additional serologic and molecular tests to better interpret them.

Introdução

O vírus Epstein-Barr (EBV), também designado por herpesvírus humano 4, é responsável por afetar mais de 90% da população humana a nível mundial (1). Após a infeção primária, o vírus persiste no corpo humano de forma latente podendo mais tarde dar origem a doenças oncológicas (2), nomeadamente linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, carcinoma da nasofaringe, carcinoma gástrico, entre outros (1). A nível mundial estimou-se que, em 2017, a proporção atribuída à infeção pelo vírus EBV nas 4 doenças mencionadas anteriormente, tenha sido de 18% dos casos incidentes, 17% das mortes e 4,6 milhões de anos de vida perdidos por incapacidade (DALYs) (3).

O diagnóstico laboratorial de pesquisa de anticorpos específicos para o EBV é uma das ferramentas que pode auxiliar na rápida confirmação da infeção primária por este agente etiológico, bem como é também essencial para determinar um contacto prévio e posterior desenvolvimento da resposta imunológica à infeção viral (4,5). O perfil serológico em resposta à infeção por EBV pode ser avaliado através da pesquisa dos



seguintes anticorpos: imunoglobulina M (IgM) para antígenos da cápside viral (VCA), imunoglobulina G (IgG) para VCA e IgG para antígenos nucleares do vírus Epstein-Barr (EBNA-1). Adicionalmente, também se pode efetuar a pesquisa de anticorpos IgG para os antígenos precoces (EA). O resultado da pesquisa dos diferentes tipos de anticorpos permite diferenciar uma infeção primária de uma infeção passada, no entanto existem perfis serológicos, designados por atípicos, que carecem de testes serológicos adicionais (por exemplo, determinação da avidéz dos anticorpos IgG VCA) e testes moleculares (pesquisa do material genético do EBV), de forma a melhor esclarecer o diagnóstico laboratorial. Estes perfis atípicos caracterizam-se pela presença de anticorpos IgM VCA isolados; presença de anticorpos IgG VCA isolados; presença de anticorpos IgG EBNA-1 isolados; e a presença simultânea de anticorpos IgM VCA, IgG VCA e IgG EBNA-1 (6), conforme descrito na [tabela 1](#).

De forma a adequar a resposta laboratorial torna-se importante conhecer e caracterizar os diferentes perfis atípicos e, por sua vez, refletir sobre os testes adi-

cionais que podem ser utilizados para o efetivo esclarecimento do diagnóstico laboratorial da infeção por EBV. Esta reflexão foi realizada pelos autores, na seção da discussão, onde se descrevem os testes adicionais que podem ser utilizados em cada um dos perfis serológicos atípicos da infeção por EBV.

_Objetivo

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de determinar a frequência dos diferentes perfis serológicos atípicos, em indivíduos cuja pesquisa de anticorpos específicos para o vírus Epstein-Barr foi realizada no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, no período de 2015 a 2022.

_Material e métodos

Realizou-se uma análise retrospectiva dos resultados laboratoriais de serologia para o EBV em indivíduos estudados no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre 2015 e 2022. Neste estudo, foram incluídos indivíduos residentes em Portugal com um perfil serológico completo para o diagnós-

Tabela 1: Interpretação dos perfis serológicos no diagnóstico laboratorial da infeção pelo vírus Epstein-Barr.

IgM VCA	IgG VCA	IgG EBNA-1	Interpretação
-	-	-	Seronegativo
+	-	-	Perfil atípico: anticorpos IgM VCA isolados ¹
+	+	-	Infeção primária
-	+	+	Infeção passada
-	+	-	Perfil atípico: anticorpos IgG VCA isolados ²
-	-	+	Perfil atípico: anticorpos IgG EBNA-1 isolados ³
+	+	+	Perfil atípico: presença simultânea dos três anticorpos ⁴

+ positivo; - negativo.

Necessário realizar testes adicionais para esclarecer se se trata: ¹ de uma infeção primária ou de uma reação cruzada; ² de uma infeção primária ou de uma infeção passada sem desenvolvimento de anticorpos IgG EBNA-1; ³ de uma infeção passada ou de uma reação inespecífica; ⁴ de uma infeção primária ou de uma reativação.



tico laboratorial da infeção por EBV, ou seja, resultado para a pesquisa dos anticorpos IgM VCA, IgG VCA/EA e IgG EBNA-1 (n=1402). Posteriormente, excluíram-se da análise indivíduos com resultado inconclusivo na pesquisa dos anticorpos para o EBV (n=47) e indivíduos com idade inferior a 1 ano (n=9), devido à possível presença de anticorpos maternos. Desta forma, o tamanho amostral elegível para o estudo dos perfis serológicos atípicos da infeção por EBV foi de 1346 indivíduos.

A pesquisa de anticorpos específicos para o EBV foi efetuada em amostras de soro através da técnica *enzyme-linked fluorescent assay* (ELFA), usando o equipamento mini VIDAS® (bioMérieux, France). Este equipamento permite a deteção qualitativa de um painel de quatro anticorpos para o EBV através de três testes automatizados: IgM VCA, IgG VCA/EA e IgG EBNA-1.

Para a análise descritiva dos dados demográficos (sexo e grupo etário) dos indivíduos que apresentaram um perfil serológico atípico recorreu-se ao cálculo das frequências absolutas e relativas. Os dados foram analisados com o programa STATA® 15.1 (StataCorp LLC, Texas, USA).

Resultados

Dos 1346 indivíduos incluídos no estudo, 995 (74,0%) apresentaram um perfil de infeção passada, 92 (6,8%) apresentaram ausência de anticorpos para o EBV, 67 (5,0%) apresentaram um perfil de infeção primária (anticorpos IgM positivos, anticorpos IgG VCA/EA positivos e anticorpos IgG EBNA-1 negativos) e 192 (14,2%) apresentaram um perfil serológico atípico.

Relativamente aos perfis serológicos atípicos, 10 indivíduos (0,7%; 10/1346) apresentaram anticorpos IgM VCA isolados, 112 (8,3%; 112/1346) apresentaram um perfil de anticorpos IgG VCA/EA isolados, 22 (1,6%; 22/1346) apresentaram anticorpos IgG EBNA-1 isolados e 48 (3,6%; 48/1346) apresentaram simultaneamente anticorpos IgM VCA, IgG VCA/EA e IgG EBNA-1.

Anticorpos IgM VCA isolados

Os 10 indivíduos com o perfil de anticorpos IgM VCA isolados apresentaram uma idade média de 19,9 anos ($\pm 11,2$) e uma mediana de 17,5 anos, com um intervalo de idades entre 8 e 49 anos. Destes, 6 eram do sexo masculino. A distribuição dos indivíduos com perfil serológico atípico por sexo e grupo etário encontra-se na [tabela 2](#).

Anticorpos IgG VCA/EA isolados

Os 112 indivíduos com o perfil de anticorpos IgG VCA/EA isolados apresentaram uma idade média de 49,1 anos ($\pm 23,0$) e uma mediana de 53 anos, com um intervalo de idades entre 1 e 88 anos. Este perfil atípico foi mais frequente em indivíduos com idade igual ou superior a 30 anos (79,5%; 89/112) e do sexo feminino (53,6%; 60/112) ([tabela 2](#)).

Anticorpos IgG EBNA-1 isolados

Os 22 indivíduos com o perfil de anticorpos IgG EBNA-1 isolados apresentaram uma idade média de 42,0 anos ($\pm 22,7$) e uma mediana de 39,5 anos, com um intervalo de idades entre 5 e 93 anos. Este perfil atípico foi mais frequente em indivíduos com idade igual ou superior a 25 anos (77,3%; 17/22) ([tabela 2](#)).

Presença simultânea de anticorpos IgM VCA, IgG VCA/EA e IgG EBNA-1

Os 48 indivíduos com presença simultânea de anticorpos IgM VCA, IgG VCA/EA e IgG EBNA-1 apresentaram uma idade média de 32,3 anos ($\pm 21,6$) e uma mediana de 24 anos, com um intervalo de idades entre 1 e 85 anos. Este perfil atípico foi mais frequente em indivíduos do sexo feminino (58,3%; 28/48) ([tabela 2](#)).



Tabela 2: ▾ Distribuição dos indivíduos com perfil serológico atípico para o vírus Epstein-Barr, por sexo e grupo etário.

Características	IgM VCA isolados (n=10)		IgG VCA/EA isolados (n=112)		IgG EBNA-1 isolados (n=22)		IgM VCA, IgG VCA/EA, IgG EBNA-1 (n=48)		TOTAL (n=192)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Sexo										
Feminino	4	40,0	60	53,6	11	50,0	28	58,3	103	53,6
Masculino	6	60,0	52	46,4	11	50,0	20	41,7	89	46,4
Grupo etário (em anos)										
1 - 4	0	0,0	3	2,6	0	0,0	2	4,2	5	2,6
5 - 9	1	10,0	6	5,4	1	4,5	2	4,2	10	5,2
10 - 14	1	10,0	3	2,6	0	0,0	6	12,5	10	5,2
15 - 19	5	50,0	5	4,5	2	9,1	7	14,6	19	9,9
20 - 24	1	10,0	4	3,6	2	9,1	7	14,6	14	7,3
25 - 29	1	10,0	2	1,8	4	18,2	4	8,3	11	5,7
30 - 44	0	0,0	17	15,2	6	27,3	7	14,6	30	15,6
45 - 64	1	10,0	40	35,7	2	9,1	7	14,6	50	26,0
≥ 65	0	0,0	32	28,6	5	22,7	6	12,5	43	22,4

Discussão

Os testes laboratoriais de pesquisa de anticorpos específicos para o EBV são uma das ferramentas para o diagnóstico de uma infeção primária e são utilizados, também, para detetar uma resposta imunológica após contacto com o vírus. Não obstante, existem perfis serológicos desenvolvidos após a infeção por EBV que não permitem chegar a uma conclusão definitiva sobre o diagnóstico e estes designam-se por perfis atípicos (6). No presente estudo, foi encontrada uma frequência de 14,2% (192/1346) de perfis serológicos classificados como perfis atípicos. Do conhecimento dos autores apenas existe um estudo anterior dos perfis serológicos atípicos para o EBV efetuado em Portugal, realizado por Moreno (7), e que teve como população alvo os indivíduos analisados no Centro Hospitalar Cova da Beira, no período de 2015 a 2017. Os resultados encon-

trados por Moreno são semelhantes aos do presente estudo, com um total de indivíduos com perfis atípicos de 13,2%. Os valores encontrados nestes dois estudos, realizados em Portugal estão de acordo com os valores de outras populações, nomeadamente estudos realizados na Turquia e Itália, que diagnosticaram um total de indivíduos com perfis atípicos para o EBV entre 11,4% e 15,0% (8-10).

Relativamente ao perfil atípico de anticorpos IgM VCA isolados, este estudo detetou 10 indivíduos com este perfil, que corresponde a uma frequência de 0,7%. Este valor é ligeiramente superior ao obtido num estudo realizado em Portugal (0,3%) (7) e inferior ao de um estudo realizado em Itália (1,2%) (10). No presente estudo, este tipo de perfil atípico foi encontrado em 5 indivíduos com idade pediátrica (≤17 anos), em 4 jovens adultos entre os 18 e 25 anos e num indivi-



duo com 49 anos. A presença deste perfil atípico nos grupos etários mais jovens é concordante com a idade em que ocorre a infeção primária por EBV (2) e por isso pode significar a deteção precoce da infeção, não tendo ainda ocorrido o desenvolvimento de anticorpos IgG VCA/EA. Por outro lado, a pesquisa de anticorpos IgM VCA pode ser positiva devido à presença de fator reumatoide ou auto-anticorpos, ou a uma reação cruzada com anticorpos de outro agente etiológico, por exemplo parvovírus B19 e citomegalovírus (6). De forma a esclarecer o perfil atípico de anticorpos IgM VCA isolados pode-se: pesquisar a presença de fatores que levam a um resultado falso positivo; confirmar a presença de anticorpos IgM para o EBV por *immunoblotting*; ou pesquisar o material genético (ADN) do EBV (6).

A frequência do perfil de anticorpos IgG VCA/EA isolados obtida neste estudo (8,3%; 112/1346) é igual à frequência obtida noutro estudo realizado em Portugal (7). Estudos realizados noutros países detetaram este perfil entre 5,1% e 7,9% dos indivíduos estudados (8-10). Este perfil atípico pode indicar uma infeção primária em que os anticorpos IgM VCA não são produzidos, aparecem tardiamente ou desapareceram precocemente. Por outro lado, este perfil pode também sugerir uma infeção passada em que não houve produção de anticorpos IgG EBNA-1, sendo que cerca de 5% dos indivíduos infetados não desenvolve este tipo de anticorpos, ou estes são produzidos mas desapareceram com o tempo, especialmente no caso de indivíduos imunocomprometidos (6). De forma a esclarecer este perfil de anticorpos é possível efetuar testes adicionais, como por exemplo a determinação da avididade dos anticorpos IgG VCA, *immunoblotting* para anticorpos IgG ou pesquisa do material genético do EBV (6,11). No caso dos indivíduos imunocomprometidos o uso dos testes serológicos é limitado devido à disfunção na produção de anticorpos, pelo que a pesquisa de material genético do EBV torna-se mais relevante em caso de suspeita de infeção por EBV (11).

No caso do perfil de anticorpos IgG EBNA-1 isolados obtivemos uma frequência de 1,6% (22/1346), um valor ligeiramente superior ao obtido no estudo realizado noutra população de Portugal (0,5%) (7). Estudos realizados noutros países mostraram uma frequência deste perfil entre 0,8 e 2,7% (8-10). Este perfil é considerado raro devido à implausibilidade de um indivíduo ter anticorpos IgG EBNA-1 sem anticorpos IgG VCA, no entanto esta situação pode dever-se ao tipo de antigénio usado na pesquisa de anticorpos IgG VCA. Um estudo realizado, com recurso a *immunoblotting* para anticorpos IgG, detetou que os indivíduos, com um perfil atípico de anticorpos IgG EBNA-1 isolados, tinham anticorpos IgG EBNA-1 e também anticorpos IgG VCA anti-p23, ou seja, tinham um perfil compatível com infeção passada (12). Deste modo, a variabilidade encontrada na frequência deste perfil atípico pode dever-se, não só ao facto de ser um evento raro, mas também à diversidade dos alvos utilizados na pesquisa de anticorpos. A dúvida que se levanta com este perfil atípico é se o indivíduo tem uma infeção passada ou se a presença de anticorpos IgG EBNA-1 resulta de uma reação inespecífica e, por isso, continua suscetível à infeção por EBV. Em qualquer das situações, suspeita de infeção passada ou reação inespecífica, a realização do *immunoblotting* para anticorpos IgG permite esclarecer este perfil atípico de anticorpos IgG EBNA-1 isolados (6).

Por último, o perfil atípico com a presença simultânea dos anticorpos IgM VCA, IgG VCA/EA e IgG EBNA-1 foi obtido em 3,6% (48/1346) dos indivíduos incluídos neste estudo. Este valor é ligeiramente inferior à frequência obtida noutro estudo realizado em Portugal (4,2%) (7). Estudos realizados noutros países encontraram valores entre 1,6 e 5,2% (8-10). Este perfil atípico pode indicar uma infeção primária, em que os anticorpos IgM VCA persistem por vários meses após a infeção aguda, ou uma reativação do vírus, sendo esta situação considerada relevante em indivíduos imunocomprometidos. No presente estudo, 16 (33,3%) indivíduos com



este perfil atípico tinham idade pediátrica (≤ 17 anos), o que, na ausência de informação clínica, aponta para uma infeção primária. De forma a melhor esclarecer este perfil atípico, é necessário aplicar os testes mencionados no perfil atípico de anticorpos IgM VCA isolados, com o objetivo de descartar a presença de um resultado falso positivo ou de se confirmar a presença dos anticorpos IgM (6). Adicionalmente, deve-se determinar a avididade dos anticorpos IgG VCA (11). No caso de existir uma avididade baixa a infeção é considerada recente e no caso de existir uma avididade alta pode ser considerada uma infeção passada ou reativação (13,14), que em indivíduos imunocompetentes poderá não ter relevância clínica (6).

Conclusão

O presente estudo determinou a frequência dos perfis serológicos atípicos para o vírus Epstein-Barr (EBV) em indivíduos testados no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge ao longo de oito anos, 2015-2022.

A frequência dos diferentes perfis atípicos obtida neste estudo, estando de acordo com o descrito na literatura, aponta para a necessidade da realização de testes adicionais.

Através da aplicação de algoritmos de diagnóstico serológico e molecular é possível determinar o estadiamento da infeção por EBV e, desta forma, melhor esclarecer o perfil serológico atípico encontrado.

Em conclusão, os resultados deste estudo são mais um contributo para um maior conhecimento da frequência e distribuição dos perfis serológicos atípicos para o EBV em Portugal.

Agradecimento

Os autores agradecem à Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. A review of human carcinogens. Part B: Biological agents. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2012. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; v. 100B). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304348/>
- (2) Epstein MA, Rickinson AB. Infectious Mononucleosis (2010 feb 15). In: Encyclopedia of Life Sciences. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002318.pub2>
- (3) Khan G, Fitzmaurice C, Naghavi M, et al. Global and regional incidence, mortality and disability-adjusted life-years for Epstein-Barr virus-attributable malignancies, 1990-2017. *BMJ Open*. 2020 Aug 30;10(8):e037505. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-037505>
- (4) Naughton P, Healy M, Enright F, Lucey B. Infectious Mononucleosis: diagnosis and clinical interpretation. *Br J Biomed Sci*. 2021 Jul;78(3):107-16. Epub 2021 Apr 14. <https://doi.org/10.1080/09674845.2021.1903683>
- (5) Klutts JS, Ford BA, Perez NR, et al. Evidence-based approach for interpretation of Epstein-Barr virus serological patterns. *J Clin Microbiol*. 2009 Oct;47(10):3204-10. Epub 2009 Aug 5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2756947/>
- (6) De Paschale M, Clerici P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J Virol*. 2012 Feb 12;1(1):31-43. <https://doi.org/10.5501/wjv.v1.i1.31>
- (7) Moreno AC. Caracterização do perfil serológico do vírus Epstein-Barr nos doentes do CHCB. (Dissertação de mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade da Beira Interior, 2018) <http://hdl.handle.net/10400.6/8744>
- (8) Varıcı Balcı FK, Özbek ÖA, Sayiner AA. [Atypical profile problem in serological diagnosis of EBV]. *Mikrobiyol Bul*. 2017 Oct;51(4):378-86. <https://doi.org/10.5578/mb.58662>
- (9) Soyulu M, Zeytinoğlu A, Altuğlu İ. Evaluation of enzyme-linked fluorescent assay results for determining Epstein-Barr virus serology at Ege University Hospital. *F Ege J Med*. 2014;53(3): 119-23. <https://doi.org/10.19161/etd.344069>
- (10) De Paschale M, Agrappi C, Manco MT, et al. Seroepidemiology of EBV and interpretation of the "isolated VCA IgG" pattern. *J Med Virol*. 2009 Feb;81(2):325-31. <https://doi.org/10.1002/jmv.21373>
- (11) Hess RD. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. *J Clin Microbiol*. 2004 Aug;42(8):3381-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3381-3387.2004>
- (12) De Paschale M, Cagnin D, Manco MT, et al. Significance of the "isolated EBNA-1 IgG" pattern in past EBV infection. *Microbiol Med*. 2009;24(1):50-2. <https://doi.org/10.4081/mm.2009.2553>
- (13) de Ory F, Antonaya J, Fernández MV, et al. Application of low-avidity immunoglobulin G studies to diagnosis of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *J Clin Microbiol*. 1993 Jun;31(6):1669-71. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.6.1669-1671.1993>
- (14) Gray JJ. Avidity of EBV VCA-specific IgG antibodies: distinction between recent primary infection, past infection and reactivation. *J Virol Methods*. 1995 Mar; 52(1-2):95-104. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)00147-9](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)00147-9)

_Impacto da mineração de lítio na saúde: resultados preliminares do projeto ILiFOOD

Health impact of lithium mining: preliminary results of the ILiFOOD project

Susana Jesus¹, Marta Ventura^{1,2}, Diogo Miranda³, Inês Delgado^{1,4}, Andreia Rego^{1,4}, Sandra Gueifão¹, Mariana Ribeiro^{1,4}, Ricardo Assunção⁵, Isabel Castanheira², Orquídia Neves³, Inês Coelho¹

ines.coelho@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Marine and Environmental Sciences Centre. Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Costa da Caparica, Portugal

(3) Centro de Recursos Naturais e Ambiente. Departamento de Engenharia em Recursos Minerais e Energéticos, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal

(4) Departamento de Engenharia Química, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal

(5) Egas Moniz Center for Interdisciplinary Research, Egas Moniz School of Health and Science, Caparica, Portugal

_Resumo

A atividade mineira para exploração de lítio está em expansão devido à utilização de lítio em baterias de produtos eletrónicos ou veículos elétricos. Os níveis de lítio nas águas, solos e alimentos em diferentes regiões geográficas são variáveis, especialmente nas zonas próximas de explorações de lítio. O projeto exploratório ILiFOOD tem como objetivo avaliar o impacto da mineração de lítio nas explorações agrícolas/hortas familiares de locais circundantes e na ingestão alimentar das populações. A investigação contribuirá para avaliar o risco de exposição das populações locais ao lítio, e a outros elementos químicos, com base nos seus níveis em vegetais (couves e batatas) e em águas (de rega e de consumo) e solos provenientes de zonas rurais próximas e afastadas de minas ativas com recursos de lítio, localizadas nas regiões de Barroso-Alvão e Guarda. Para estimar a exposição da população, serão aplicados inquéritos sociodemográficos e de consumo alimentar aos residentes dos locais em estudo. Trata-se de um estudo inovador em Portugal que irá, pela primeira vez, explorar a relação entre a exposição alimentar e a atividade mineira da exploração de recursos litiníferos. Os resultados preliminares obtidos na envolvente da mina C57 (Guarda) revelaram teores mais elevados de Li nas couves amostradas nas hortas localizadas até 0,5 km de distância da mina.

_Abstract

Lithium mining activity is expanding due to the use of lithium in batteries for electronic products or electric vehicles. Lithium levels in the water, soils, and food vary from region to region, especially in areas within active mining lithium explorations. ILiFOOD aims to evaluate the impact of lithium mining on surrounding local farms and populations' dietary intake. This exploratory project will contribute to enlightening the risk of exposure of local populations to lithium and other chemicals elements, by evaluating its levels in vegetables (cabbages and potatoes) and in water (drinking and irrigation) and soil from rural areas close and far from active lithium mines resources, located in Barroso-Alvão and Guarda regions to assess population's exposure, socio-demographic and food consumption surveys will be applied to inhabitants of local farms. This is an innovative study in Portugal, which will for the first time; assess the relationship

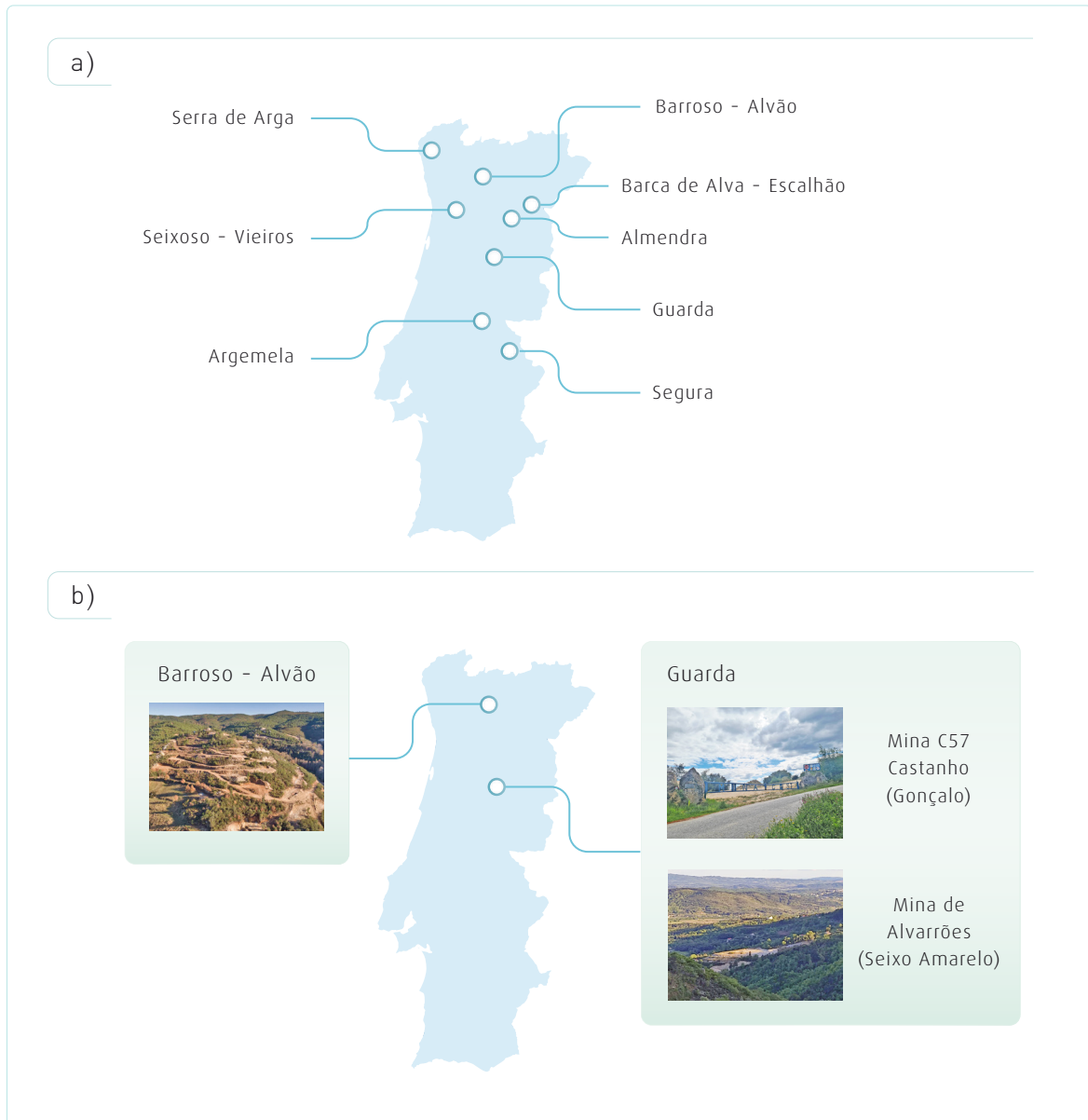
between food exposure and mining activity of lithium resources. Preliminary results obtained in the surroundings of the C57 mine (Guarda) revealed higher levels of Li in the cabbage leaves sampled in the local farms located up to 0.5 km away from the mine.

_Introdução

Nos últimos anos, o interesse pela mineralização do lítio (Li) tem vindo a aumentar a nível global (1,2). Portugal é um dos poucos países europeus com concessões mineiras com recursos litiníferos, sendo que até ao momento estão registadas oito concessões (figura 1a), estando previstas novas explorações de Li num futuro próximo (1). Se por um lado o Li é retratado como uma solução "amiga" do ambiente para substituir os combustíveis fósseis, por outro têm vindo a surgir preocupações quanto aos impactos ambientais negativos da sua mineração e transformação, bem como aos impactos sociais na saúde e segurança das populações vizinhas (3-5). De acordo com estudos científicos, os níveis deste elemento químico em solos e águas variam dependendo das características geológicas e das condições ambientais (4,6). Por conseguinte, os níveis de Li nos alimentos também podem apresentar variabilidade, principalmente em áreas próximas a minas com recursos de lítio. É importante avaliar o impacto na saúde da população envolvente associado à exposição, através da dieta, a este elemento.



Figura 1: ↴ Concessões mineiras de lítio activas em Portugal (a); Minas com recursos de lítio integradas no projeto ILiFOOD (b).



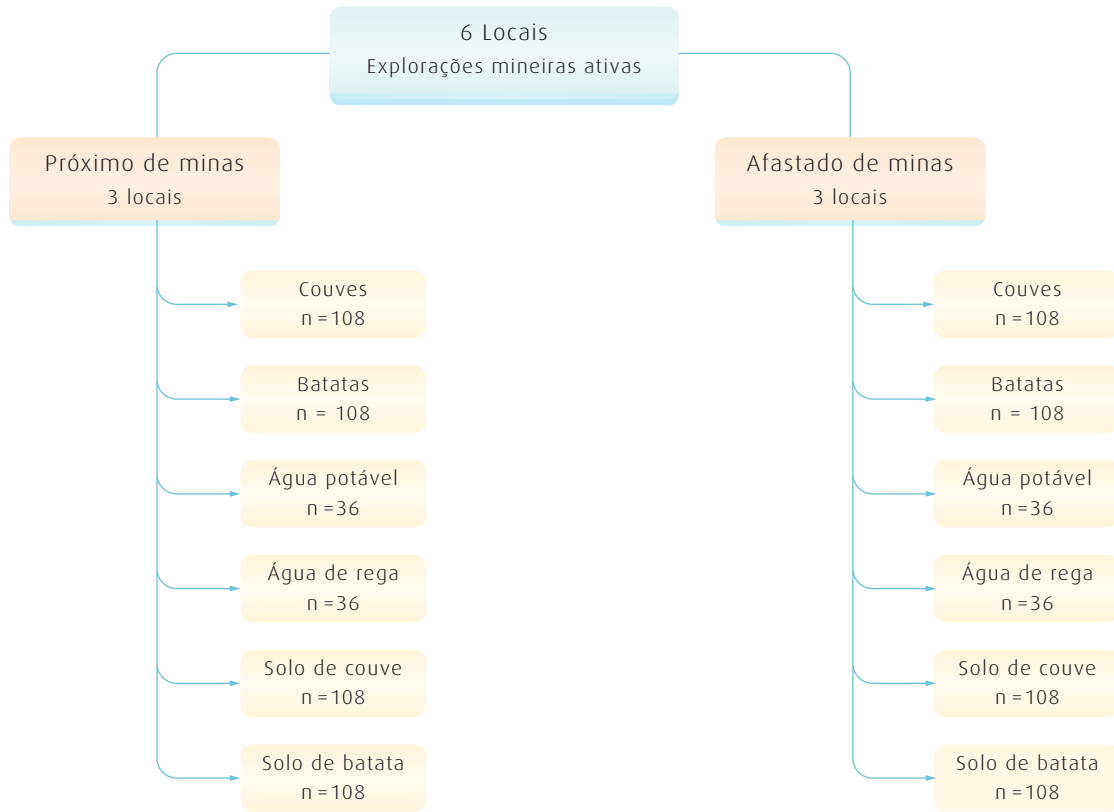
Adaptado de: Relatório do Grupo de Trabalho "Lítio" (2).

Neste contexto, encontra-se a decorrer o projeto exploratório ILiFOOD (Lítio na alimentação: o impacto das explorações mineiras de lítio) que contribuirá para avaliar o risco da exposição das populações ao Li, e a outros elementos químicos. Para tal, serão determinados e comparados os níveis de Li em vegetais (couves e batatas), em solos e em água (rega e potável) colhidos em zonas rurais próximas e afastadas de três minas ativas, que têm recursos de Li: C57 e Alvarrões

(distrito da Guarda), e Barroso (distrito de Vila Real) (figura 1b). No total serão seleccionados seis locais. O respetivo plano de amostragem encontra-se representado na figura 2. Para cada mina foi definido um local próximo da mina e um local afastado. Consideraram-se próximas das minas as hortas que se localizavam até 1,5 km e como hortas afastadas seleccionaram-se locais compreendidos entre 2 e 8,5 km da mina.



Figura 2: Plano de amostragem do projeto ILiFOOD.



A fim de estimar a exposição da população, o projeto prevê a aplicação de inquéritos sociodemográficos e de consumo alimentar aos residentes das hortas em estudo. Com este projeto será possível, pela primeira vez em Portugal, explorar a relação entre a exposição alimentar e a atividade mineira na exploração de Li.

Objetivo

O presente trabalho apresenta os dados preliminares relativos aos teores de Li em couves de dois locais em estudo, no âmbito do projeto ILiFOOD que tem como objetivos: i) estudar o impacto da exploração mineira nos alimentos (couves e batatas) cultivados em zonas circundantes de minas com recursos litiníferos bem como em águas (potável e de rega) e solos; ii) realizar uma avaliação do risco da população envolvente associado à exposição ao lítio, através da dieta.

Materiais e métodos

Estando o projeto em curso, serão apenas apresentados resultados preliminares. Assim, os dados agora publicados dizem respeito ao teor de Li em amostras de couve recolhidas em dois locais, nomeadamente próximo e afastado da mina C57 (figura 1b). Em cada local foram selecionadas doze hortas, tendo sido recolhidas três couves por horta (n=36), as quais foram analisadas laboratorialmente em doze *pools* por local. As recolhas foram realizadas entre abril e agosto de 2022.

No laboratório as couves foram lavadas com água da torneira, secas em estufa, trituradas e digeridas, por micro-ondas em vaso fechado, com uma mistura de ácido nítrico/peróxido de hidrogénio/água ultrapura, num rácio de 4:1:3, de forma a destruir a matéria orgânica.



O teor de Li foi determinado por espectrometria de massa com plasma indutivo acoplado (ICP-MS).

Os dados foram obtidos em triplicado, em condições de garantia da qualidade suportadas pelos requisitos descritos na norma ISO/IEC 17025:2017 (*General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*). A concentração encontra-se expressa, pela média de três réplicas, em μg de Li/kg de couve em peso fresco.

Para a análise estatística foi utilizado o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences, v27*). Foi aplicado o teste *t-student* para identificar as diferenças significativas entre as médias das concentrações de Li nas amostras, considerando um *p-value* de 0,05.

Resultados e discussão

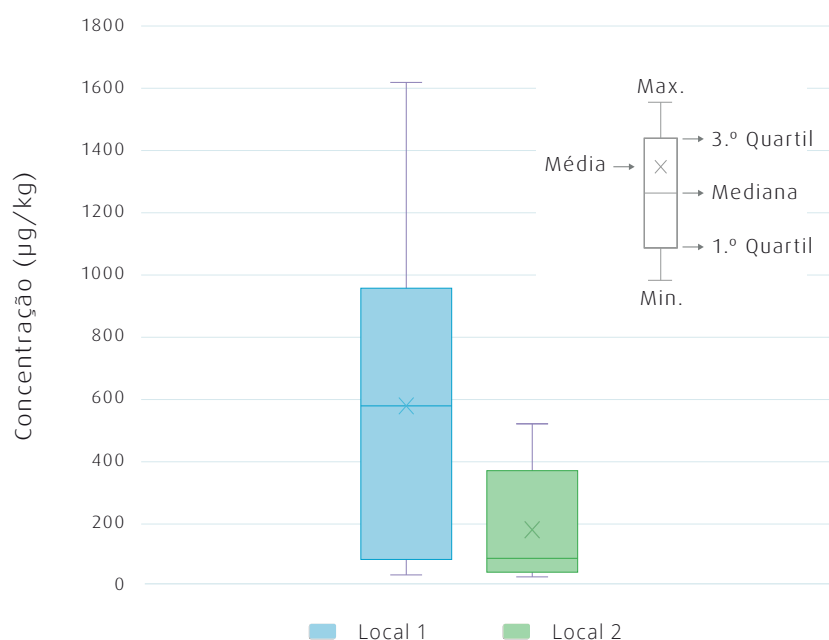
Neste trabalho apresentam-se os resultados preliminares obtidos nas amostras colhidas nas hortas na envolvente da mina C57, no distrito da Guarda. Os locais 1 e 2 correspondem às hortas situadas perto e afastadas da mina, respetivamente. As amostras dos restan-

tes locais ainda se encontram em análise. Os resultados obtidos encontram-se representados no [gráfico 1](#).

No local 1 (próximo da mina, até 1,5km), constatou-se uma grande dispersão de teores de Li, que variaram entre $44 \pm 1 \mu\text{g}/\text{kg}$ e $1627 \pm 39 \mu\text{g}/\text{kg}$ (peso fresco), com um valor de mediana de $582 \mu\text{g}/\text{kg}$. Os valores mais elevados (superiores a $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ (peso fresco)) foram observados em 3 hortas que se encontram a menos de 0,5 km da mina em estudo. Estes resultados estão de acordo com Ammari, *et al.* (2011) que obteve um valor médio de Li de $1200 \mu\text{g}/\text{kg}$ (peso fresco), em couves recolhidas em solos do Vale Jordão, uma região produtora de Li (7). Por outro lado, na horta mais afastada da mina dentro deste local, o teor de Li nas couves foi de $88,9 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (peso fresco).

Na literatura são poucos os estudos para o teor de Li em couves e alguns encontram-se expressos em peso seco. Kabata-Pendias (2001) indica teores de $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ (peso seco) neste produto hortícola (8), enquanto Figueroa, *et al.* (2013) observou concentrações mais elevadas em amostras provenientes do

Gráfico 1: ▣ Concentração de Li ($\mu\text{g}/\text{kg}$ peso fresco) em couves do local 1 (próximo da mina) e local 2 (afastado da mina).





norte do Chile (região produtora de Li), entre 3800 e 3200 µg/kg (peso seco) (5). Convertendo os teores de Li encontrados no local 1 para peso seco, estes variaram entre 304 µg/kg e 11144 µg/kg. Tendo por base a distância das hortas relativamente à mina, verificou-se que, das 9 hortas mais próximas, que distam no máximo 0,5 km da mina, 6 apresentaram resultados acima de 3800 µg/kg (peso seco). Estes resultados demonstram que a variabilidade dos teores de Li nas couves pode estar relacionada com a exploração mineira, mas também com as condições locais, como características físico-químicas do solo, entre elas o pH, que influencia a disponibilidade de Li e a consequente transferência deste elemento do solo para a planta (7,9,10).

Os valores de Li para o local 2 (afastado da mina, 2 a 8,5 km), variaram entre 34 ± 1 µg/kg e 509 ± 19 µg/kg (peso fresco), com uma mediana de 109 µg/kg. Estes resultados são, em média, inferiores aos teores de Li encontrados nas couves do local 1, assim como a amplitude dos resultados no local 2 é menor. O teste de *t-student* mostrou diferenças significativas entre a média dos dois locais ($p=0,010$).

Comparando os resultados dos dois locais, verifica-se uma sobreposição entre os 5 teores mais baixos de Li encontrados no local 1 e os resultados obtidos para o local 2. Destes, dois têm origem em hortas que distam da mina mais de 0,8 km, o que parece sugerir que a proximidade de explorações mineiras com recursos litiníferos pode ter influência nos teores encontrados nos alimentos. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Pinheiro D. (2020) que determinou também nos solos teores de Li mais elevados perto da mina C57 comparativamente a outros locais mais afastados (6). Também Sobolev, *et al.* (2019) concluiu que em locais onde existem reservas de Li é esperada uma concentração nos alimentos superior (9). Esta evidência deverá ser suportada pelos restantes resultados previstos no projeto, quer noutros locais, quer noutras matrizes.

_Conclusão

Dado o crescente aumento de interesse nas energias verdes, e o subsequente aumento das explorações mineiras de Li, é essencial entender qual o seu impacto na alimentação e por consequência na saúde das populações circundantes.

De acordo com os resultados preliminares obtidos, os teores de Li nas couves parecem ser mais elevados nas hortas localizadas a menos de 0,5 km da mina C57. Para distâncias superiores a 0,5 km observou-se uma grande variabilidade de concentrações, que poderá estar relacionada com outras fontes.

Com a inclusão dos restantes dados analíticos (restantes locais, couves, batatas, águas e solos) previstos no projeto será possível avaliar e concluir sobre o impacto da proximidade a explorações mineiras no teor de Li dos alimentos consumidos pela população local. A integração dos resultados analíticos com os questionários sociodemográficos irá permitir uma avaliação da dose de exposição ao Li associada ao consumo destes alimentos.

Financiamento:

Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto EXPL/CTA-AMB/0977/2021.

Referências bibliográficas:

- (1) Kaunda RB. Potential environmental impacts of lithium mining. *J Energy & Natural Resources Law*. 2020 Jul 2;38(3):237-44. <https://doi.org/10.1080/02646811.2020.1754596>
- (2) Ministério da Economia e do Mar. Despacho n.º 15040/2016, de 13 de dezembro. DR n.º 237/2016, 2ª Série(2016-12-13):36474. Cria o Grupo de Trabalho «Lítio», para identificação e caracterização das ocorrências do depósito mineral de lítio no nosso país, bem como das respetivas atividades económicas. <https://dre.pt/dre/detalhe/despacho/15040-2016-1053487593>.
- (3) Yalamanchali R. Lithium, an emerging environmental contaminant, is mobile in the soil-plant system. (Thesis Master's Degree, Lincoln University, 2012). <https://researcharchive.lincoln.ac.nz/handle/10182/5231>
- (4) Rodrigues PMSM, Antão AMMC, Rodrigues R. Evaluation of the impact of lithium exploitation at the C57 mine (Gonçalo, Portugal) on water, soil and air quality. *Environ Earth Sci*. 2019 Sep 19;78(17):533. <http://link.springer.com/10.1007/s12665-019-8541-4>



artigos breves_ n. 8

- (5) Figueroa LT, Razmillic B, Zumeata O, et al. Environmental Lithium Exposure in the North of Chile — II. Natural Food Sources. *Biol Trace Elem Res.* 2013 Jan 28;151(1):122-31. <http://link.springer.com/10.1007/s12011-012-9543-1>
- (6) Pinheiro D. Lithium concentration and distribution in Portuguese soils. Lisboa: Instituto Superior Técnico, 2020. (Extended Abstract) <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/downloadFile/1689244997262046/Versao%20Final-Extended%20Abstract%2078323%20MEGM.pdf>
- (7) Ammari TG, Al-Zu'bi Y, Abu-Baker S, et al. The occurrence of lithium in the environment of the Jordan Valley and its transfer into the food chain. *Environ Geochem Health.* 2011 Oct;33(5):427-37. Epub 2010 Sep 26. <https://doi.org/10.1007/s10653-010-9343-5>.
- (8) Kabata-Pendias Alina, Pendias Henryk. Trace elements in soils and plants (3th ed.). Boca Raton: CRC Press, c2011.
- (9) Sobolev OI, Gutyj BV, Darmohray LM, et al. Lithium in the natural environment and its migration in the trophic chain. *Ukr J Ecol.* 2019;9(2):195-203. http://193.138.93.8/bitstream/BNAU/2489/1/lithium_in_the_natural.pdf
- (10) Tanveer M, Hasanuzzaman M, Wang L. Lithium in Environment and Potential Targets to Reduce Lithium Toxicity in Plants. *J Plant Growth Regul.* 2019 Dec 28;38(4):1574-86. <http://link.springer.com/10.1007/s00344-019-09957-2>

A dor nos adolescentes com paralisia cerebral: dados preliminares do Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral

Pain in adolescents with cerebral palsy: preliminary data from the Portuguese Cerebral Palsy Surveillance Program

*Teresa Folha¹, Ana João Santos¹, Joaquim Alvarelhão²⁻⁴, Ana Cadete^{5,6}, Inês Vicente⁷, Cândida Cancelinha^{8,9}, Daniel Virella^{10,11}; em nome da equipa do projeto Reavaliação de Adolescentes do Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral**

m.teresa.folha@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Escola Superior de Saúde, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

(3) Associação do Porto de Paralisia Cerebral, Porto, Portugal

(4) Federação das Associações Portuguesas de Paralisia Cerebral, Lisboa, Portugal

(5) Centro de Reabilitação de Paralisia Cerebral Calouste Gulbenkian, Santa Casa da Misericórdia de Lisboa, Lisboa, Portugal

(6) Secção de Reabilitação Pediátrica, Sociedade Portuguesa de Medicina Física e de Reabilitação, Lisboa, Portugal

(7) Centro de Desenvolvimento da Criança, Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

(8) Equipa Intra-hospitalar de Suporte em Cuidados Paliativos Pediátricos – Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

(9) Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

(10) Unidade Funcional de Neonatologia, Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central, Lisboa, Portugal

(11) Sociedade Portuguesa de Neonatologia, Sociedade Portuguesa de Pediatria, Lisboa, Portugal

** Equipa do Projeto de Reavaliação de Adolescentes do Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral indicada no fim do artigo*

_Resumo

A dor afeta negativamente a vida das pessoas com paralisia cerebral (PC). Este estudo explora a prevalência de dor significativa em adolescentes com PC em Portugal e o seu impacto multidimensional. Foi estudada uma amostra de conveniência de adolescentes registados no Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral (PVNPC) aos 5-8 anos de idade, seguindo o protocolo comum da SCPE, nas duas regiões de Portugal com maior cobertura regional, Grande Lisboa e Alto Minho. Foi estimada a prevalência de dor e das suas características e exploradas associações com aspetos funcionais, gravidade, complexidade do quadro clínico e participação social. Obteve-se informação sobre a presença de dor em 107 de 164 adolescentes (65%). Referiram ter dor 36 adolescentes (34%; IC95% 25,4-43,0); 21 (58%) localizaram a dor à anca, 17 (47%) aos membros inferiores, 7 (19%) à coluna e 3 (9%) nos membros superiores. A dor foi referida em 13% dos adolescentes com 0 indicadores de complexidade e em 51% daqueles com 1 ou mais indicadores de complexidade (*Odds Ratio* 7,1; IC95% 2,30-26,63; $p < 0,001$). Todos os adolescentes com 4 indicadores de gravidade reportavam experiência de dor. A dor afeta cerca de 1/3 dos adolescentes com PC, sendo tanto mais prevalente quanto maior a complexidade da PC. A gestão da dor deve ser uma prioridade clínica estratégica na PC, promovendo-se a implementação de modelos individualizados de avaliação e controlo. O PVNPC continuará a avaliar o impacto da dor na funcionalidade, na qualidade de vida e nos níveis de participação das pessoas com PC.

_Abstract

*Pain has a negative effect on the life of people living with cerebral palsy (CP). We explored the prevalence of significant pain among adolescents with CP in Portugal and its multidimensional impact. We reassessed a convenience sample of adolescents registered at age 5-8 year-old to Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral (PVNPC), following the SCPE protocol, recruited from the two Portuguese regions with higher coverage rates, Greater Lisbon and High Minho. The prevalence rate of pain was estimated, it was characterized and associations with functionality, severity and clinical complexity and social participation were explored. Information on the experience of pain was obtained from 107 of 164 adolescents (65%). Pain was reported by 36 adolescents (34%; IC95% 25.4-43.0); pain was located on the hip by 21 (58%), 17 (47%) on the lower limbs, the spine by 7 (19%) and by 3 (9%) on the upper limbs. Pain was reported by 13% of those adolescents with 0 indicators of complexity of CP vs. 51% of those with 1 or more indicators of complexity (*Odds Ratio* 7.1; IC95% 2.30-26.63; $p < 0.001$). Every adolescent with all 4 indicators of complexity reported the experience of pain. Pain affects circa 1/3 of the adolescents with CP. Prevalence increases with the complexity of CP. Pain management skills must be a strategic clinical priority in CP, the implementation of individualized models for assessment and control being promoted. PVNPC will preserve on assessing the impact of pain on functionality, quality of life and the levels of participation of people with CP.*



_Introdução

A paralisia cerebral (PC) é a deficiência motora mais comum na infância (1) e engloba um conjunto amplo de condições clínicas permanentes, mas não inalteráveis, com afetação do tônus, movimento e/ou postura, devidas a interferência/lesão/anomalia não progressiva do desenvolvimento do cérebro imaturo (*Surveillance of Cerebral Palsy in Europe* – SCPE) (2).

A PC nem sempre foi abordada como uma situação não inalterável e, durante anos, foi referido aos pais que a sua situação funcional estabilizava no início da idade adulta (3). No entanto, os adultos com PC relatam consistentemente condicionantes clínicas e de saúde secundárias, bem como a presença de indicadores de envelhecimento precoce, que nem sempre foram reconhecidos, valorizados ou geridos pelos profissionais de saúde que os acompanham. As alterações relacionadas com a idade mais comumente relatadas envolvem a dor e fadiga, e alterações no desempenho físico e no sistema músculo-esquelético (4-8).

Desde 2006, o Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral em Portugal (PVNPC) recolhe dados clínicos, epidemiológicos e funcionais das crianças com PC nascidas desde 2001, à idade recomendada de 5 anos (9), *i.e.*, antes da idade recomendada para início do ensino básico (10). Em 2018, o Programa de Vigilância iniciou, experimentalmente, a reavaliação na adolescência dos casos notificados, nascidos em 2001-2003, tendo em conta aspetos funcionais e de saúde, de qualidade de vida e de participação social (11).

Existem poucos estudos específicos sobre dor crónica na PC e raramente relatam a sua etiologia. É, no entanto, a comorbilidade mais consistentemente relatada em diferentes estudos envolvendo pessoas com PC, nas diferentes idades. Alguns estudos referem a presença de dor em 30% a 80% dos adultos com PC (3,12), e em 32% das crianças e 74% dos adolescentes (13).

Os relatos de dor podem ser difíceis de obter, devido a dificuldades de comunicação ou de perturbação do

desenvolvimento intelectual grave, presentes num número significativo de pessoas com PC, tornando a sua avaliação subjetiva numa percentagem significativa de doentes. Destaca-se também que a dor é um fator que acarreta importantes consequências, quer a nível das alterações na função, quer na qualidade de vida, sobrecarga e capacidade de interação socioemocional das pessoas com PC (13-16).

_Objetivo

Este estudo tem o objetivo de estimar a prevalência de dor em adolescentes com paralisia cerebral e avaliar o seu impacto multidimensional explorando associações com aspetos funcionais, níveis de gravidade e de complexidade do quadro clínico, e com a morbilidade associada.

_Métodos

Foi estudada uma amostra de conveniência, recrutada com base na cobertura regional do PVNPC e na regularidade da participação dos notificadores do PVNPC. O PVNPC desenvolve a vigilância voluntária, ativa e sistemática de casos de PC em Portugal, fazendo o seu registo na idade recomendada de 5-8 anos de idade, seguindo o protocolo comum da SCPE (9).

Selecionaram-se duas das regiões de Portugal continental com as melhores taxas de cobertura no PVNPC entre 2006 e 2010: Área Metropolitana de Lisboa (média da cobertura 108%) e Alto Minho (média da cobertura 118%); estas duas regiões abrangem 34,2% da coorte nacional de nascimento 2001-2003.

Entre 2016 e 2019, foram contactados 10 notificadores regulares do PVNPC em ambas as regiões. Foi solicitado aos notificadores que classificassem os indivíduos identificados para reavaliar na adolescência em quatro categorias: “Avaliados”, “Não avaliados por alteração de residência”, “Falecidos” e “Não contactáveis”.

Foi solicitada a aplicação de um formulário aos adolescentes nascidos em 2001-2003, identificados entre



os casos registados em criança ao PVNPC. Os dados foram recolhidos, sempre que possível, por inquirição ou observação do adolescente, ou, na sua impossibilidade, por inquirição dos familiares e/ou cuidadores ou por consulta dos registos clínicos. O formulário aplicado incluiu os indicadores clínicos e funcionais do formulário de registo aplicado aos 5-8 anos ⁽⁹⁾, bem como questões sobre morbilidade após a infância, qualidade de vida, participação e apoios.

O formulário do PVNPC segue o protocolo comum da SCPE ⁽⁹⁾, que inclui a definição e a classificação da PC, instrumentos de avaliação funcional (a função motora global, pela *Gross Motor Function Classification System* – GMFCS; a motricidade fina, pela *Bimanual Fine Motor Function* – BFMF; o desempenho na expressão pela fala, pela *Viking Speech Scale* – VSS, imagiológica e de morbilidade associada.

O PVNPC considera cinco níveis de complexidade de PC pela presença das seguintes condições: afetação moderada a grave da motricidade global (GMFCS – níveis III, IV e V); perturbação do desenvolvimento intelectual moderada a grave (QI <50); défice visual e/ou défice auditivo grave; e epilepsia ativa ⁽⁹⁾.

Para efeitos de avaliação da inclusão e de participação social, foram considerados como “não integrados” os adolescentes institucionalizados, os que frequentavam instituição de ensino direcionada apenas para pessoas com deficiência e os que não frequentavam qualquer instituição de ensino.

Efetou-se a análise descritiva da presença de dor (sim/não), da sua localização e da associação com os indicadores funcionais, de qualidade de vida e de participação considerados mais relevantes na adolescência. Para comparar proporções, foram usados os testes do Qui-Quadrado e Exato de Fisher, conforme adequado, e estimou-se a razão das possibilidades através de regressão logística (*Odds Ratio*) com intervalos de confiança (IC) de 95%. Foram utilizados os programas informáticos SPSS.25 (SPSS 25. IBM Corporation 1994, 2018) e OpenEpi https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm

_Resultados

Foram identificados na base de dados do PVNPC 274 casos elegíveis, dos quais em 63 (23%) não foi possível obter qualquer informação. Dos restantes 211, 25 tinham falecido (12%) e 22 (10%) tinham alterado a área residência, passando a residir fora das regiões de interesse.

Dos 164 adolescentes revistos, apenas se obteve informação sobre a presença ou ausência de dor em 107 (65%), dos quais 36 (34%) (IC95% 25,4-43,0) adolescentes referiram ter dor. Destes, 21 (58%) identificaram a anca como a localização da dor, 17 (47%) os membros inferiores, 7 (19%) a coluna e 3 (9%) os membros superiores.

Não se registou nenhum caso com referência a dor frequente nos adolescentes com quadro clínico predominante de PC atáxica. A presença de dor foi referida por 50% dos adolescentes em que a PC é predominantemente disquinética e por 39% daqueles em que é predominantemente espástica.

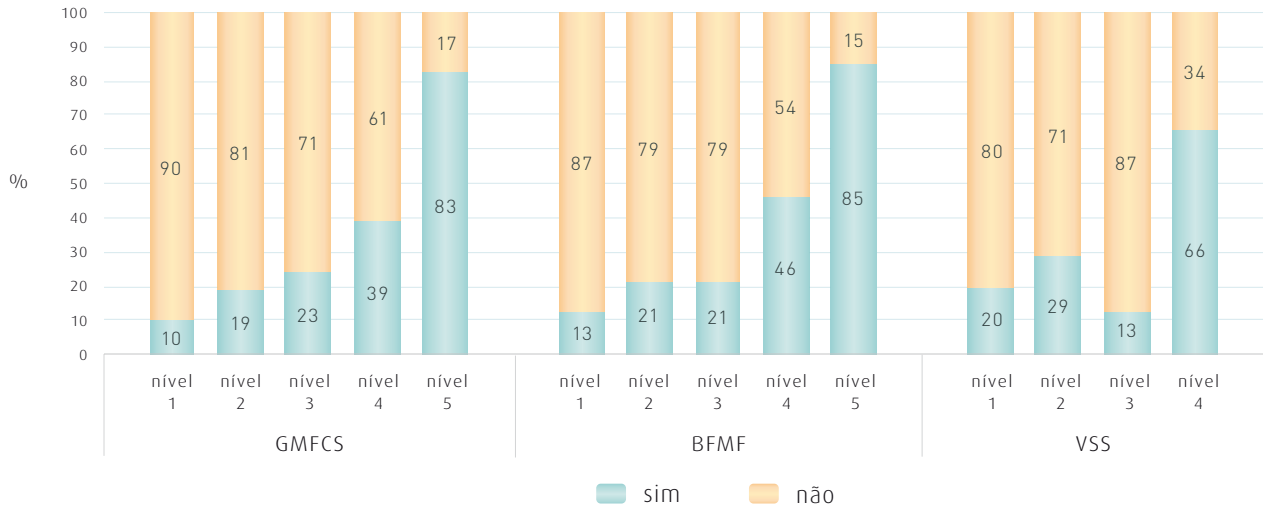
Verificou-se maior frequência de registo de dor nas adolescentes do sexo feminino do que nos do sexo masculino, 40% *versus* 28%, não se tendo confirmado diferença estatisticamente significativa entre os sexos na possibilidade de relato de dor, ($p=0,134$).

Foi possível confirmar que a dor é mais frequentemente referida nos adolescentes com maior afetação funcional (**gráfico 1**). Em termos de competências neuromotoras, destacaram-se os dados relativos ao sistema de classificação da motricidade global, com registo de dor frequente em 83% dos adolescentes classificados no nível 5 do GMFCS (*Odds Ratio* 17,8 [IC95% 5,62-68,11]; $p<0,001$). No que respeita à motricidade fina, verificou-se o registo de dor frequente em 85% dos casos de nível 5 no BFMF (*Odds Ratio* 19,3 [IC95% 5,48-90,07]; $p<0,001$).

O **gráfico 1** apresenta também a referência a dor conforme a classificação da inteligibilidade da fala, tendo registo de dor 66% dos adolescentes classificados no



Gráfico 1: Referência a dor, conforme a classificação da afetação da funcionalidade motora, por adolescentes com paralisia cerebral incluídos no estudo (n=107).



BFMF – Bimanual Fine Motor Function Classification System; GMFCS – Gross Motor Function Classification System; VSS – Viking Speech Scale;

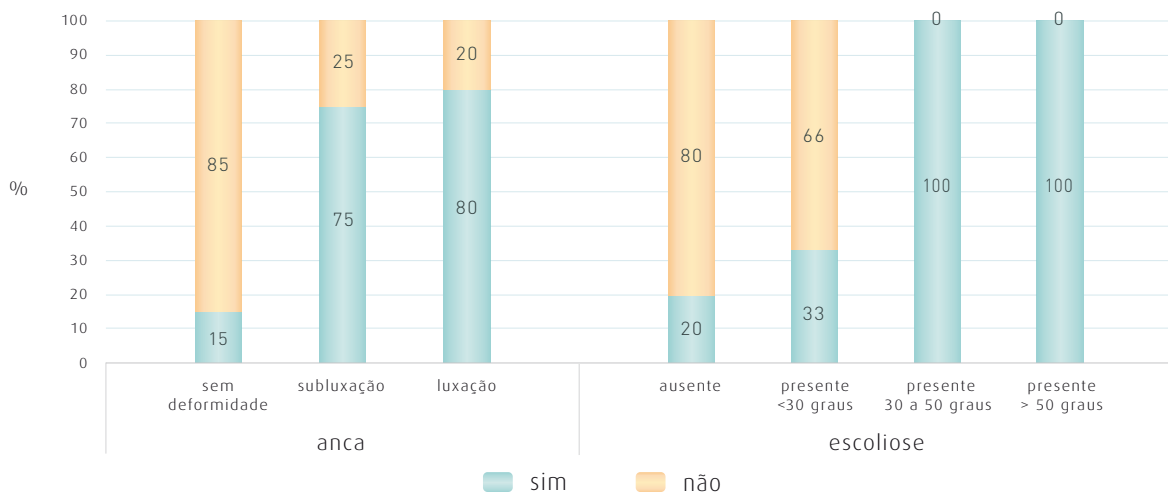
nível 4 da VSS, sendo 11 vezes maior a possibilidade de ser reportada dor neste grupo (*Odds Ratio* 10,8 [IC95% 3,98-31,46]; $p < 0,001$).

O relato de dor foi mais comum nos adolescentes com perturbação do desenvolvimento intelectual moderada a grave, nomeadamente em 56% dos adolescentes com $QI < 50$, vs. 27% nos adolescentes com $QI \geq 50$, sendo que os primeiros tinham 5 vezes mais possibilidade de registar dor (*Odds Ratio* 4,6 [IC95% 1,96-11,38]; $p < 0,001$).

A possibilidade de reportar dor foi duas vezes maior nos casos com epilepsia ativa, tendo sido referida em 43% dos casos, face a 26% nos adolescentes sem epilepsia ativa (*Odds Ratio* 2,1 [IC95% 0,94-4,92]; $p < 0,050$).

A dor foi referida por 75% dos adolescentes com registo de subluxação da anca, em 80% dos com luxação da anca, e em apenas 15% naqueles sem deformidade da anca (**gráfico 2**) os adolescentes com registo de subluxação ou luxação da anca tiveram 16 vezes

Gráfico 2: Referência a dor segundo os indicadores de deformidade músculo-esquelética, registados em adolescentes com paralisia cerebral, incluídos no estudo (n=107).





mais possibilidades de reportar dor [*Odds Ratio* 16,3 IC95% 5,99-48,02]; $p < 0,001$).

A dor foi reportada em todos os adolescentes com registo de escoliose superior a 30 graus (100%), em 33% dos casos com ângulo de escoliose inferior a 30 graus e em 20% nos adolescentes sem escoliose (**gráfico 2**). Ter escoliose associou-se a ter cerca de cinco vezes mais possibilidade de reportar dor frequente (*Odds Ratio* 4,7 [IC95% 1,86-12,48]; $p = 0,001$).

A dor foi referida em 13% dos adolescentes com 0 indicadores de complexidade e em 51% dos adolescentes com 1 ou mais indicadores de complexidade, que tinham sete vezes mais possibilidade de reportar dor (*Odds Ratio* 7,1 [IC95% 2,30-26,63]; $p < 0,001$). Todos os adolescentes que registavam 4 indicadores de gravidade reportavam a presença de dor.

A dor foi relatada por 28% dos adolescentes que estavam integrados no ensino regular e por 50% dos considerados “não integrados”. Não se verificou diferença estatisticamente significativa na possibilidade de reportar dor de acordo com a inclusão ou não no ensino regular ($p = 0,180$).

_Discussão

Este estudo preliminar, usando uma amostra de conveniência de duas regiões populosas de Portugal, alerta para a elevada prevalência de dor em adolescentes com PC residentes no país. A variabilidade da prevalência de dor acompanha a heterogeneidade da PC, sendo maior nas formas com maior compromisso funcional e maior afetação anatómica.

As estimativas de prevalência de dor variam muito entre os estudos publicados devido à interação complexa de múltiplas influências e fontes de viés, o que torna difícil distinguir entre fatores preditivos de prevalência (por exemplo: idade, memória, capacidade de autorrelato), assim como comparar estimativas de prevalência entre estudos (13-16).

Devido a vieses nos sistemas de pesquisa e vigilância, diversos estudos referem a necessidade de cautela na apreciação dos dados epidemiológicos obtidos ao longo da vida das pessoas com PC (13-16). Num estudo anterior, o PVNPC procedeu à análise dos possíveis fatores condicionantes da interpretação dos dados recolhidos (11). Nessa análise foi confirmada a maior possibilidade de reavaliação dos indivíduos com registo de condições mais complexas na infância, correndo-se assim o risco de estar perante um viés de participação em favor dos casos de maior gravidade, descrevendo uma evolução pior do que a real. Concluiu-se, no entanto, que a reavaliação na adolescência dos indivíduos registados na infância no PVNPC é exequível, desde que sejam implementadas medidas de promoção da participação e de controlo de viés (11).

De entre os 164 adolescentes incluídos neste estudo preliminar, apenas se obteve informação sobre a dor em 107. A baixa proporção de respostas a esta questão poderá ser consistente com a literatura, que relata que este tema é pouco valorizado pelos técnicos, encontrando-se pouco documentado nos registos e processos clínicos (17). Adicionalmente, parte dos dados foram obtidos por proxy, tendo em conta as dificuldades de autorrelato, o que pode gerar viés na informação obtida. Em 66% dos adolescentes que reportaram dor frequente, a escala de expressão fala (VSS) foi classificada como ‘não perceptível’, e 38% da amostra tinha perturbação do desenvolvimento intelectual moderada a grave (9).

Os dados obtidos não permitiram confirmar a tendência para que a dor na adolescência seja reportada mais frequentemente no sexo feminino. Considerando os valores observados e os reportados na literatura (18-20), estes resultados poderão dever-se a falta de potência da amostra.

Por outro lado, os resultados obtidos sugerem maior prevalência de dor nos adolescentes com quadros clínicos de PC predominantemente disquinética ou espás-



tica. Também se verificou que a dor era mais reportada nos casos de maior gravidade funcional (motricidade global, motricidade fina e inteligibilidade da fala), resultados concordantes com o descrito na literatura (18-20).

Destacou-se uma grande amplitude da prevalência de dor registada para as diferentes variáveis estudadas, o que poderá orientar cuidadores, clínicos e investigadores para uma atenção especial para valorização, diagnóstico e estabelecimento de um acompanhamento estruturado e sistemático na forma de gerir a dor em subgrupos específicos dentro deste grande grupo.

Sublinha-se também a necessidade de um cuidado especial na avaliação dos adolescentes com dificuldades de autorrelato, como são as pessoas com PC com dificuldades comunicativas, dificuldades cognitivas e/ou com alterações de comportamento. Nestas pessoas, “comunicar que têm dor” poderá incluir diferentes estratégias, como alterações nas expressões vocais e faciais, na atividade motora, nos ritmos de sono ou de alimentação, ou alterações de comportamento e na interação social (20).

Este estudo preliminar permite fundamentar a necessidade de desenvolver a abordagem da epidemiologia da dor no adolescente e no jovem com PC, providenciando registos mais precisos e sistemáticos da frequência, gravidade, topografia, medidas de controlo e afetação funcional, da participação e na qualidade de vida. Os indicadores que serão obtidos ajudarão a desenvolver e implementar recomendações clínicas de prevenção e intervenção.

Estão preconizadas recomendações para que os técnicos consigam ajudar a gerir melhor a dor na pessoa com PC. Entre elas, refira-se a indicação de avaliar de forma sistemática a presença de dor ou de risco de dor à admissão de uma pessoa com PC (em consulta ou internamento), após qualquer alteração do seu estado clínico, e antes, durante e após um procedimento/intervenção, utilizando, para tal, sistemas/instrumentos

apropriados e validados (21-23). Por outro lado, face a uma situação de dor (real ou potencial) deve ser proposto e estabelecido, com a participação do próprio, um plano de intervenção, visando escolher e implementar as estratégias adequadas para assegurar uma abordagem abrangente. Estas estratégias devem incorporar os objetivos da pessoa e da equipa técnica, bem como integrar e ter em conta as características e contexto em que a pessoa está inserida (20).

O controlo eficaz da dor no indivíduo com PC tem um impacto significativo, afeta positivamente a sua qualidade de vida e favorece a possibilidade de uma melhor integração e participação social, com consequentes repercussões socioeconómicas e nas políticas de saúde.

Conclusões

Este estudo alerta para o impacto multidimensional da dor nos adolescentes com paralisia cerebral (PC) e evidencia a sua relação com múltiplos aspetos funcionais, níveis de gravidade e de complexidade do quadro clínico, bem como com morbilidade associada.

Sugere-se que a gestão da dor seja vista como uma prioridade clínica estratégica na paralisia cerebral, com a implementação de modelos individualizados de avaliação e gestão da dor.

É necessário continuar a avaliar o impacto da dor na funcionalidade, na qualidade de vida e nos níveis de participação das pessoas com PC.

Equipa do Projeto de Reavaliação de Adolescentes do Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral:

Teresa Folha (Coordenação, INSA); Ana Cadete (CRPCCG-SCML), Ana João Santos (INSA), Conceição Correia (APCVC), Cristina Duarte (CDC-HGO), Daniel Virella (Epidemiologia, INSA), Isabel Batalha (CMRA-SCML), Isabel Vieira (APCP), Joaquim Alvarelhão (FAPPC), Maria da Graça Andrada (CRPCCG-SCML), Susana Almeida (CDC-HGO), Teresa Gaia (CRPCCG-SCML).



APCP: Associação de Paralisia Cerebral do Porto; APCVC: Associação de Paralisia Cerebral de Viana do Castelo; CDC-HGO: Centro de Desenvolvimento da Criança Professor Torrado da Silva, Hospital Garcia de Orta; CMRA-SCML: Centro de Medicina de Reabilitação de Alcoitão, Santa Casa da Misericórdia de Lisboa; CRPCCG-SCML: Centro de Reabilitação de Paralisia Cerebral Calouste Gulbenkian, Santa Casa da Misericórdia de Lisboa; FAPPC: Federação das Associações Portuguesas de Paralisia Cerebral; INSA: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Referências bibliográficas:

- (1) Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, et al. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology*. 2007 Jan 30;68(5):326-37. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000252807.38124.a3>
- (2) Surveillance of Cerebral Palsy in Europe. Surveillance of cerebral palsy in Europe: a collaboration of cerebral palsy surveys and registers. *Surveillance of Cerebral Palsy in Europe (SCPE)*. *Dev Med Child Neurol*. 2000 Dec;42(12):816-24. <https://doi.org/10.1017/s0012162200001511>
- (3) Turk MA. Health, mortality, and wellness issues in adults with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol*. 2009 Oct;51(Suppl 4):24-9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2009.03429.x>
- (4) Morgan P, McGinley JL. Cerebral palsy. *Handb Clin Neurol*. 2018;159:323-36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63916-5.00020-3>
- (5) McPhee PG, MacDonald MJ, Cheng JL, et al. Emerging evidence for accelerated ageing and cardiovascular disease in individuals with cerebral palsy. *J Rehabil Med*. 2019 Jul 8;51(7):525-31. <https://doi.org/10.2340/16501977-2564>
- (6) Morgan P, McGinley J. Gait function and decline in adults with cerebral palsy: a systematic review. *Disabil Rehabil*. 2014;36(1):1-9. Epub 2013 Apr 17. <https://doi.org/10.3109/09638288.2013.775359>
- (7) Eriksson E, Hägglund G, Alriksson-Schmidt AI. Pain in children and adolescents with cerebral palsy - a cross-sectional register study of 3545 individuals. *BMC Neurol*. 2020 Jan 11;20(1):15. <https://doi.org/10.1186/s12883-019-1597-7>
- (8) Jacobson DNO, Löwing K, Tedroff K. Health-related quality of life, pain, and fatigue in young adults with cerebral palsy. Epub 2019 Nov 28. *Dev Med Child Neurol*. 2020 Mar;62(3):372-378. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14413>
- (9) Virella D, Folha T, Cadete A, et al. Evolução dos Fatores de Risco de Paralisia Cerebral em Portugal no século XXI. Lisboa: Federação das Associações Portuguesas de Paralisia Cerebral, 2022. <https://www.fappc.pt/conhecimento/investigacao-e-recursos/pvnpc/pvnpc/categoria/14-pvnpc-2022?download=28:fatores-de-risco>
- (10) Educação - Gabinetes da Secretária de Estado Adjunta e da Educação e do Secretário de Estado da Educação. Despacho Normativo n.º 6/2018. Estabelece os procedimentos da matrícula e respetiva renovação e as normas a observar na distribuição de crianças e alunos. DR n.º 72/2018, 2.ª Série, 2018-04-12, pp. 10277-82. <https://dre.pt/application/conteudo/115093805>
- (11) Folha T, Santos AJ, Alvarelhão JJ, et al. Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral: exequibilidade da reavaliação de adolescentes com paralisia cerebral nascidos em 2001-2003. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2021 jan-abr;10(29):4-9 <http://hdl.handle.net/10400.18/7762>
- (12) van der Slot WMA, Benner JL, Brunton L, et al. Pain in adults with cerebral palsy: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Ann Phys Rehabil Med*. 2021 May;64(3):101359. Epub 2020 Feb 13 <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2019.12.011>
- (13) Mckinnon CT, Meehan EM, Harvey AR, et al. Prevalence and characteristics of pain in children and young adults with cerebral palsy: a systematic review. *Dev Med Child Neurol*. 2019 Mar;61(3):305-14. Epub 2018 Dec 3. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14111>
- (14) Chin EM, Lenz C, Ye X, et al. Clinical Factors Associated With Chronic Pain in Communicative Adults With Cerebral Palsy: A Cross-Sectional Study. *Front Pain Res (Lausanne)*. 2020 Nov 24;1:553026. <https://doi.org/10.3389/fpain.2020.553026>
- (15) Ostojic K, Paget S, Kyriagis M, et al. Acute and Chronic Pain in Children and Adolescents With Cerebral Palsy: Prevalence, Interference, and Management. *Arch Phys Med Rehabil*. 2020 Feb;101(2):213-219. Epub 2019 Sep 12. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2019.08.475>
- (16) Flanigan M, Gaebler-Spira D, Kocherginsky M, et al. Spasticity and pain in adults with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol*. 2020 Mar;62(3):379-385. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14368>. Epub 2019 Oct 10
- (17) Registered Nurses' Association of Ontario. *Assessment and Management of Pain*, 3rd ed. Toronto, ON: RNAO, 2013. <https://rnao.ca/media/3227/download>
- (18) Rodby-Bousquet E, Alriksson-Schmidt A, Jarl J. Prevalence of pain and interference with daily activities and sleep in adults with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol*. 2021 Jan;63(1):60-67. Epub 2020 Sep 19. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14678>
- (19) Vogtle LK. Pain in adults with cerebral palsy: impact and solutions. *Dev Med Child Neurol*. 2009 Oct;51 Suppl 4:113-21. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2009.03423.x>
- (20) Parkinson KN, Dickinson HO, Arnaud C, et al ; SPARCLE group. Pain in young people aged 13 to 17 years with cerebral palsy: cross-sectional, multicentre European study. *Arch Dis Child*. 2013 Jun;98(6):434-40. Epub 2013 Apr 20. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2012-303482>
- (21) Caravau H, Rosa AF, Rocha NP, et al. Pain assessment in cerebral palsy: a systematic review of measurement properties and evaluation using the COSMIN checklist. *Disabil Rehabil*. 2022 Mar;44(6):910-920. Epub 2020 Jul 3. <https://doi.org/10.1080/09638288.2020.1783000>
- (22) Vinkel MN, Rackauskaite G, Finnerup NB. Classification of pain in children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol*. 2022 Apr;64(4):447-52. Epub 2021 Nov 2. <https://doi.org/10.1111/dmcn.15102>
- (23) Schiarioti V, Oberlander TF. Evaluating pain in cerebral palsy: comparing assessment tools using the International Classification of Functioning, Disability and Health. *Disabil Rehabil*. 2019 Nov;41(22):2622-2629. Epub 2018 Jun 11. <https://doi.org/10.1080/09638288.2018.1472818>

Perceções parentais sobre a prática da investigação em crianças com anomalias congénitas ou paralisia cerebral: entre o que preocupa as famílias e a prática

Parental perceptions of research agenda in children with congenital anomalies or cerebral palsy: between families concerns and research practice

Ana João Santos, Paula Braz, Ausenda Machado, Teresa Folha, Carlos Matias Dias

ana.carvalho@insa.min-saude.pt

Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

Resumo

As anomalias congénitas (AC) e a paralisia cerebral (PC) são importantes causas de mortalidade e morbilidade infantil, bem como de incapacidade a longo prazo. A participação das famílias e cuidadores de crianças com estas condições na investigação e no estabelecimento das suas prioridades pode ser importante para revelar questões e aspetos não considerados. No âmbito do projeto EUROlinkCAT que pretendeu, entre outros objetivos, promover a participação das famílias na partilha e disseminação de prioridades de investigação, apresentam-se os resultados de um estudo sobre os aspetos que mais preocupam os pais e a perceção destes relativamente à agenda de investigação. O estudo descritivo, transversal, foi realizado com uma amostra de conveniência de pais de crianças diagnosticadas com uma AC, incluída num de quatro grandes grupos (anomalias cardíacas graves, espinha bifida, fendas orofaciais e síndrome de Down) e, ou, com PC. Foi construído um questionário online, semiestruturado, acessível através de uma hiperligação, destinado a ser respondido pelos pais de crianças com AC e, ou, PC. A hiperligação foi enviada aos pontos focais de cinco associações portuguesas, que a disseminaram junto dos seus associados. Apresenta-se uma análise descritiva para um conjunto de perguntas fechadas. As famílias de crianças com uma das AC estudadas ou com PC preocupavam-se, sobretudo, com os aspetos sociais e com o desenvolvimento global das crianças. Consideraram que a investigação se centra em aspetos da saúde e não tanto na qualidade de vida ou no desenvolvimento social das crianças e que não há uma interação com as famílias.

Abstract

Congenital Anomalies (CA) and Cerebral Palsy (CP) are important causes of infant mortality and morbidity, as well as long-term disability. The participation of families and caregivers of children with these conditions in research and the definition of research priorities can be essential to point out not considered issues. The study is developed, partly, within the scope of the EUROlinkCAT project, which also aimed to promote a reciprocal relationship between families and researchers. The study focused on aspects that most concern parents over their children conditions and their perception concerning the research agenda. The cross-sectional descriptive study was conducted with a convenience sample of parents of children diagnosed with four groups of CA (severe heart anomalies; spina bifida; orofacial clefts and Down syndrome) and/or CP. A semi-structured online

questionnaire to be answered by parents was sent by web link to focal points of five Portuguese associations. Descriptive analysis is presented for the closed-ended questions. Families of children with one of the included CA or with CP were mainly concerned with the social aspects and global development of their children. They perceived no interaction between research and families and believed research focused almost solely on health and not as much on quality of life or social development.

Introdução

As anomalias congénitas (AC) e paralisia cerebral (PC) são importantes causas de mortalidade e morbilidade infantil, bem como de incapacidade a longo prazo (1,2).

O projeto EUROlinkCAT (*Establishing a linked European Cohort of Children with Congenital Anomalies*), foi desenvolvido por 21 registos de anomalias congénitas de base populacional, situados em 13 países europeus, tendo sido utilizada a metodologia e os critérios de qualidade do *European Surveillance of Congenital Anomalies* (EUROCAT). Entre outros objetivos, pretendia promover a interação entre as famílias e os profissionais na partilha e disseminação de prioridades relevantes de pesquisa e os resultados da mesma, com foco em algumas anomalias congénitas específicas (3). O presente estudo decorre da implementação do EUROlinkCAT em Portugal e teve como objetivo identificar a perceção de pais e cuidadores sobre o papel da investigação e interação com a comunidade científica, em relação aos aspetos que preocupam as famílias. A investigação, que não se foque necessariamente nas famílias, não tem como prática comum incluir as



mesmas no desenvolvimento dos estudos, contudo as famílias têm um amplo conhecimento das condições das crianças de quem cuidam, bem como dos desafios que decorrem da sua vida quotidiana (4,5). Um estudo anterior sobre o envolvimento dos pais na investigação em saúde identificou, entre as questões indicadas pelos pais, aspetos de que os investigadores não estavam cientes ou que não eram valorizados (5,6).

_Objetivos

O objetivo do estudo foi descrever a perceção de pais e cuidadores de crianças com anomalias cardíacas graves, espinha bífida, fenda lábio-palatina, síndrome de Down ou paralisia cerebral, sobre a investigação e o seu impacto no dia-a-dia das crianças e das suas famílias, em relação aos aspetos que mais preocupam os pais.

_Métodos

O estudo descritivo, transversal, foi realizado com uma amostra de conveniência de pais de crianças diagnosticadas com quatro grupos de AC (anomalias cardíacas graves, espinha bífida, fenda lábio-palatina, síndrome de Down) ou com PC.

Um questionário *online*, semiestruturado, foi enviado por meio de uma hiperligação para os pontos focais de associações de pais e instituições profissionais em Portugal (Pais21 – Down Portugal; Associação Spina Bífida e Hidrocefalia de Portugal; Associação Coração Feliz; Associação Portuguesa dos Amigos das Crianças Portadoras de Fendas Lábio-Palatinas; a Federação das Associações Portuguesas de Paralisia Cerebral e o Centro de Reabilitação de Paralisia Cerebral Calouste Gulbenkian). Entre 5 e 27 de maio de 2018, o questionário foi disseminado pelos pontos focais junto das famílias.

No questionário incluiu-se: a) um conjunto de quatro itens que avaliaram, numa escala de 5 pontos do tipo Likert, o grau de preocupação dos pais e cuidadores sobre os diferentes aspetos do crescimento e desenvolvimento das crianças; b) um conjunto de

oito itens, avaliados numa escala do tipo Likert, que possibilitaram avaliar a perceção de pais e cuidadores sobre a inclusão de aspetos, para si considerados importantes na prática da investigação pela comunidade científica (escala de 4 pontos, “completamente” a “de forma alguma”).

_Resultados

Ao todo, foram recebidos 254 questionários, dos quais 153 (60%) tinham preenchido as subsecções consideradas. A maioria dos respondentes eram mulheres (89%), entre os 34 e os 54 anos (77%), casados ou em união de facto (79%) e com o 12º ano de escolaridade (66%).

Mais de metade dos pais (>60%) mostrou um grau de preocupação elevado com todos os aspetos questionados, mas foram os aspetos sociais (75,5%) e aqueles relacionados com o desenvolvimento global da criança (73,5%), os que foram mais frequentemente considerados como “mais preocupantes” (**gráfico 1**).

O **gráfico 2** apresenta os vários itens relacionados com a perceção de regularidade na prática da investigação de aspetos que as famílias consideraram importantes. Para a maioria dos respondentes, a investigação centra-se sobretudo em questões de saúde (84,4%). Ainda assim, quase metade considerava que parte da investigação se centra no desenvolvimento social (47%) e na qualidade de vida (47,5%).

Para 43,2% dos respondentes, as experiências das famílias são tidas em conta na investigação, ainda que para cerca de um terço não existisse uma comunicação entre a investigação e as famílias: não existindo incentivo por parte dos investigadores na participação ativa dos pais (62,1%); não se observando a transmissão da informação do que vai sendo investigado (62,6%) ou a comunicação dos resultados de investigação às famílias (66,9%).



Gráfico 1 ▾ Distribuição das frequências quanto ao grau de preocupação (muita e pouca) de pais e cuidadores, do impacto da anomalia congénita ou paralisia cerebral nos aspetos sociais, de desenvolvimento global, nos cuidados de saúde imediatos ou a longo prazo (n=153).

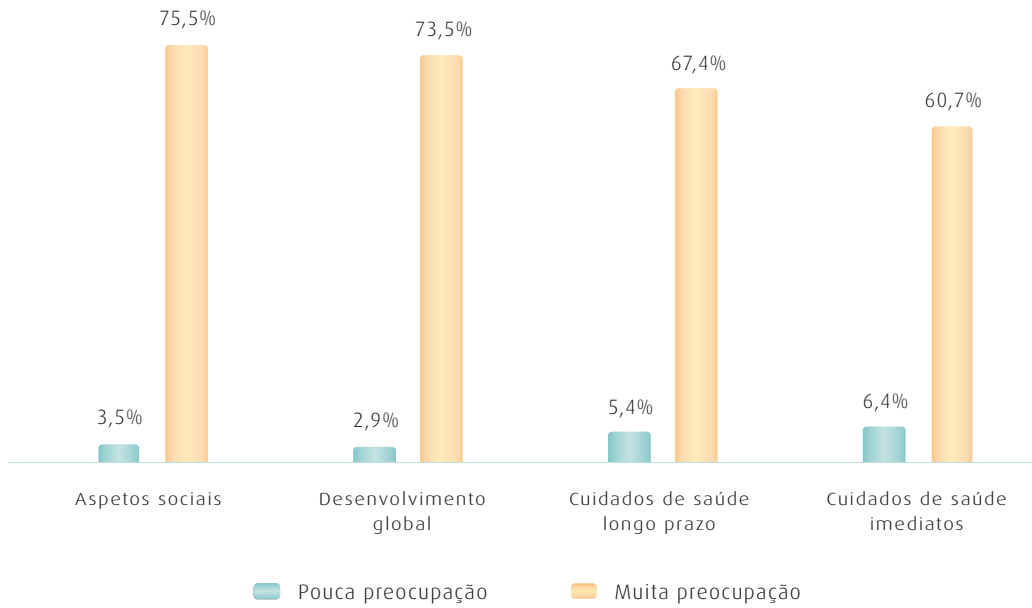
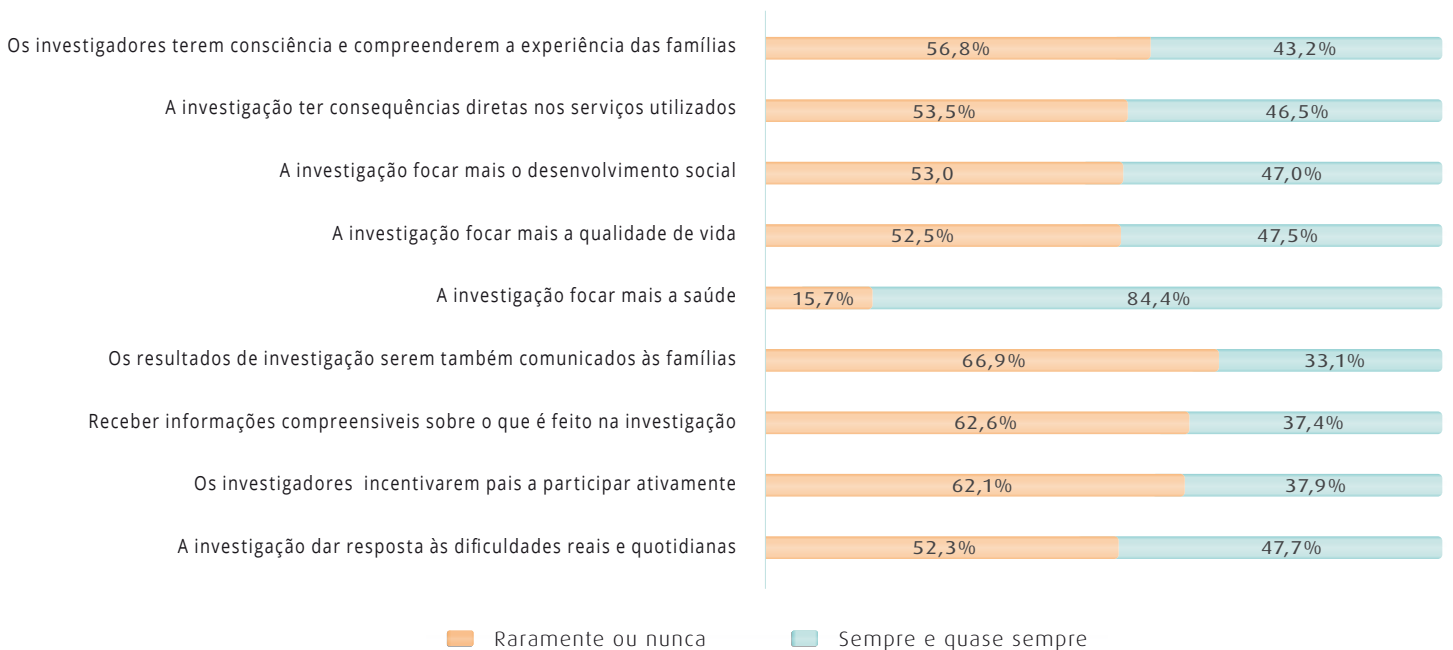


Gráfico 2 ▾ Distribuição da frequência de pais e cuidadores quanto à regularidade na prática da investigação da comunidade científica de aspetos que consideraram importantes, na área das anomalias congénitas e paralisia cerebral (n=153).





Conclusão

De modo geral, as famílias de crianças com anomalias cardíacas graves, espinha bífida, fenda lábio-palatina, síndrome de Down ou com paralisia cerebral (PC) preocupavam-se, sobretudo, com os aspetos sociais e o desenvolvimento global das crianças. Este resultado pode significar que as questões de saúde, no momento de resposta ao questionário, se encontravam relativamente acauteladas. Por outro lado, estes são aspetos que outros estudos têm também identificado como sendo relevantes – cuidadores tendem a valorizar a informação sobre o desenvolvimento global e a integração social, posicionando-se numa perspetiva mais global (5,7), ainda que a manutenção de um “bom estado de saúde” também seja reconhecido (6).

Os resultados indicam ainda que, para os respondentes e apesar da importância da investigação noutras áreas, a temática da investigação se centraria sobretudo em questões de saúde e não tanto na qualidade de vida ou no desenvolvimento social. Para mais de metade dos respondentes, há a perceção de que a comunidade científica e a investigação na área das anomalias congénitas (AC) e da PC, é algo que decorre à parte das famílias.

Os estudos tendem a indicar alguma incongruência entre as prioridades de investigação da comunidade científica e as respostas que as famílias sentem ser necessárias para melhorar a qualidade de vida, globalmente (4,6). Antecipando a dificuldade de definir uma agenda de investigação apenas nas necessidades sentidas pelos cuidadores, não deixa de ser necessário repensar o contributo daqueles que beneficiam dos resultados de investigação.

Agradecimento:

A todos os participantes que responderam ao questionário e partilharam, assim, um pouco da história das suas famílias.

Financiamento:

Parte deste trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto EUROLINKCAT – Estabelecendo uma coorte europeia de Crianças com Anomalias Congénitas, financiado pelo programa de financiamento de investigação e inovação, Horizonte 2020 (ref.ª n.º 733001).

Referências bibliográficas:

- (1) Dolk H, Loane M, Garne E. The prevalence of congenital anomalies in Europe. *Adv Exp Med Biol.* 2010;686:349-64. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9485-8_20
- (2) World Health Organization. Congenital Anomalies [online]. [consult. 24/10/2022]. https://www.who.int/health-topics/congenital-anomalies#tab=tab_1
- (3) Morris JK, Garne E, Loane M, et al.; EUROLINKCAT Consortium. EUROLINKCAT protocol for a European population-based data linkage study investigating the survival, morbidity and education of children with congenital anomalies. *BMJ Open.* 2021 Jun 28;11(6):e047859. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-047859>
- (4) Holm KG, Neville AJ, Pierini A, et al. The Voice of Parents of Children With a Congenital Anomaly - A EUROLINKCAT Study. *Front Pediatr.* 2021 Nov 29;9:654883. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.654883>
- (5) Marceau LD, Welch LC, Pemberton VL, et al. Educating Parents About Pediatric Research: Children and Clinical Studies Website Qualitative Evaluation. *Qual Health Res.* 2016 Jul;26(8):1114-22. Epub 2015 Dec 28. <https://doi.org/10.1177/1049732315616620>.
- (6) Sinclair M, McCullough JE, Elliott D, et al. Exploring Research Priorities of Parents Who Have Children With Down Syndrome, Cleft Lip With or Without Cleft Palate, Congenital Heart Defects, or Spina Bifida Using ConnectEpeople: A Social Media Coproduction Research Study. *J Med Internet Res.* 2019 Nov 25;21(11):e15847. <https://doi.org/10.2196/15847>
- (7) Kuhlthau KA, Bloom S, Van Cleave J, et al. Evidence for family-centered care for children with special health care needs: a systematic review. *Acad Pediatr.* 2011 Mar-Apr;11(2):136-43. <https://doi.org/10.1016/j.acap.2010.12.014>

_Avaliação dos aspetos nutricionais de bolachas infantis disponíveis no mercado português

Evaluation of nutritional aspects of children's biscuits available in the Portuguese market

Rita Santos¹, Miguel Godinho², Helena S. Costa^{3,4}, Paula Pereira¹, Tânia Gonçalves Albuquerque^{3,4}

tania.albuquerque@insa.min-saude.pt

(1) Instituto Universitário Egas Moniz, Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz CRL, Almada, Portugal

(2) Nutrialma, Lisboa, Portugal

(3) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(4) Rede de Química e Tecnologia/Laboratório Associado para a Química Verde. Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal

_Resumo

As bolachas estão incluídas na alimentação diária das crianças, devido à elevada conveniência e ao sabor apelativo. O presente trabalho visou recolher a composição nutricional de bolachas infantis disponíveis no mercado nacional e avaliar a sua adequação nutricional através da aplicação de diferentes ferramentas. Os dados para as bolachas infantis foram recolhidos através da consulta de *websites* de hipermercados, entre maio e junho de 2022. Avaliaram-se 45 amostras, e apenas uma cumpriu a meta definida na Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS) para o teor de açúcar. Verificou-se uma distribuição maioritária dos produtos entre a categoria amarela e vermelha no descodificador de rótulos, assim como classificações de *Nutri-Score* D e E. Ao avaliar a adequação da refeição do lanche, considerando a ingestão de uma porção de bolachas (35 g), a inclusão destes alimentos não parece estar de acordo com as recomendações do Guia para Lanches Escolares Saudáveis. O óleo de girassol com alto teor de oleico foi o tipo de gordura encontrado na maioria das amostras. Verificou-se com este trabalho que é fundamental refletir sobre as estratégias a adotar para que exista uma reformulação gradual no perfil nutricional destes alimentos.

_Abstract

*Biscuits are included in children's daily diet due to their practicality and appealing taste. The present work aimed to collect the nutritional composition of children's biscuits, available in the national market, and to evaluate their nutritional adequacy through the application of different tools. The data was collected by consulting online supermarket websites, between May and June of 2022. Forty-five samples were selected and only one satisfied the Integrated Strategy for the Promotion of Healthy Eating (EIPAS) target for sugar content. The majority of the samples were in the yellow and red category in the "Descodificador de rótulos", as well as in *Nutri-Score* D and E. When evaluating the adequacy of the snack meal, considering the intake of one portion of biscuits (35 g), the inclusion of these foods does not seem to be in accordance with the recommendations contemplated in the "Guia para Lanches Escolares Saudáveis". High oleic sunflower oil was the type of added fat found in most of the evaluated samples. Therefore, it seems fundamental to reflect on the strategies to be adopted so that there is a gradual reformulation in the nutritional profile of these foods.*

_Introdução

Nas últimas décadas, tem sido notória a atenção crescente em torno do papel da alimentação durante os primeiros anos de vida, tal como o seu impacto na saúde futura do indivíduo adulto (1). À luz desta perspetiva, a promoção de hábitos alimentares saudáveis deverá ser instruída desde cedo, devido à influência na adoção de práticas e preferências alimentares, que poderão condicionar os comportamentos futuros (2). A oferta alimentar na infância é igualmente determinante para o crescimento e desenvolvimento físico e psíquico, apresentando uma forte influência no risco de doenças crónicas não transmissíveis na idade adulta, nomeadamente doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes *mellitus*, entre outras (3,4).

Apesar do sucessivo decréscimo na prevalência de excesso de peso e obesidade infantil reportado nos últimos anos, em 2019, de acordo com o sistema europeu de vigilância nutricional infantil integrado no estudo *Childhood Obesity Surveillance Initiative*, 11,9% das crianças portuguesas em idade escolar (entre os 6 e os 8 anos) apresentavam obesidade e 29,6% excesso de peso (5,6).

Segundo o Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (IAN-AF) 2015-2016, a ingestão média de açúcares livres por parte das crianças (<10 anos), foi de 41,8 g/dia. Quanto à prevalência do consumo de açúcares livres em quantidades superiores a 10% do valor energético total, esta é de 40,7% nas crianças.



Comparativamente aos adultos, as crianças demonstraram um maior contributo percentual de ácidos gordos saturados (12,1%) para o valor energético total, com uma ingestão média de 21,9 g/dia. Verificou-se igualmente um consumo médio de sal correspondente a 5,3 g/dia nas crianças (7).

Importa ainda salientar que a informação nutricional disponibilizada no rótulo dos géneros alimentícios, por vezes, torna-se complexa e de difícil interpretação, influenciando as escolhas realizadas no momento da compra. Pretendendo ultrapassar este obstáculo e melhorar a acessibilidade da informação ao consumidor, o Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável (PNPAS) da Direção-Geral da Saúde recomenda o uso do descodificador de rótulos, que pode ser facilmente transportado e utilizado de forma simples (8). Por outro lado, os sistemas de rotulagem nutricional simplificada na frente da embalagem foram igualmente identificados como instrumentos eficientes, que visam encorajar os consumidores para escolhas alimentares mais saudáveis e informadas (9). O *Nutri-Score* encontra-se na zona frontal das embalagens dos produtos alimentares e tem como principal propósito informar o consumidor acerca da qualidade dos alimentos, assim como encorajar a indústria alimentar a melhorar o perfil nutricional dos produtos através de reformulações e/ou inovações (10).

Tal como se tem vindo a assistir nos últimos anos, a forte aposta na área do *marketing* e publicidade por parte da indústria alimentar, bem como a elevada diversidade e oferta disponível no mercado, acabam por influenciar e condicionar os hábitos alimentares dos consumidores. Tal não remete para opções estratégicas alimentares adequadas, acabando de forma implícita por motivar e originar o consumo de produtos alimentares pouco equilibrados nutricionalmente. As bolachas constituem um grupo alimentar incluído continuamente na alimentação das crianças, devido à sua grande disponibilidade, praticidade e sabor extre-

mamente apelativo. As mais consumidas habitualmente são caracterizadas por terem elevados teores de açúcar, gordura saturada e sal. Assim, é crucial avaliar a qualidade nutricional destes produtos e o possível impacto na saúde das crianças, clarificando a informação contida no rótulo destes géneros alimentícios.

_Objetivo

Recolher informação relativa à composição nutricional de bolachas infantis, disponíveis no mercado nacional, a respeito dos valores para energia, lípidos, ácidos gordos saturados, hidratos de carbono, açúcares, proteínas, sal e fibra, com a finalidade de: i) Comparar os valores de açúcar e sal obtidos, com as metas definidas na Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS); ii) Caracterizar os produtos recolhidos de acordo com as diferentes categorias do descodificador de rótulos, bem como aplicar o algoritmo do *Nutri-Score*; iii) Avaliar o contributo percentual para o valor energético e de macronutrientes na refeição do lanche, considerando a ingestão de uma porção de bolachas (35 g); e iv) Identificar qual o tipo de gordura utilizado na produção destes géneros alimentícios.

_Material e métodos

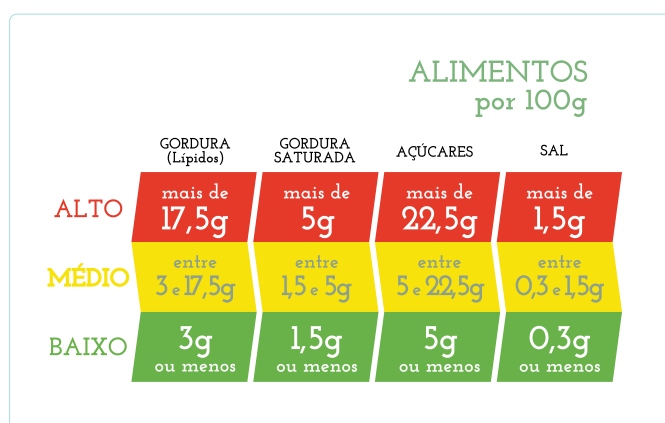
Entre maio e junho de 2022, procedeu-se à pesquisa de bolachas com a integração de todo o tipo de ilustração e/ou personagens direcionadas ao público infantil, através da consulta dos rótulos concedidos pelas plataformas *online* de cadeias de hipermercados, a operar em território português.

A análise compreendeu a identificação da marca, nome do produto, descrição do produto, lista de ingredientes, presença de alegações nutricionais ou alegações de saúde, e informação nutricional por 100 g: valor energético (kJ e kcal), lípidos (g), ácidos gordos saturados (g), hidratos de carbono (g), açúcares (g), proteínas (g), sal (g) e fibra (g). O tratamento dos dados e a análise estatística foram efetuados com recurso ao *Microsoft Excel*.



A informação recolhida foi utilizada para a aplicação do descodificador de rótulos e do *Nutri-Score* (NS). Para caracterizar as amostras monitorizadas de acordo com as diferentes categorias do descodificador de rótulos, foi utilizado o modelo representado na **figura 1**, sugerido pelo PNPAS. De modo a atribuir o respetivo NS a todos os produtos selecionados, integrou-se a informação nutricional recolhida na folha de cálculo, em formato *Microsoft Excel*, disponibilizada no *website* da *Santé publique France* (11).

Figura 1: Descodificador de rótulos – alimentos por 100 g, Direção-Geral da Saúde (8)



Para avaliar a adequação nutricional destes produtos, os valores de açúcar e sal foram posteriormente comparados com as metas definidas na EIPAS, ou seja, 5 g/100 g e 0,3 g/100 g, respetivamente.

De forma a avaliar a adequação da refeição de um lanche, onde poderá ser incluída a ingestão de uma porção de bolachas (35 g), calcularam-se as necessidades energéticas diárias para a faixa etária dos 3 aos 6 anos e dos 7 aos 10 anos, de acordo com a *European Food Safety Authority* (12), e utilizou-se o *Guia para Lanches Escolares Saudáveis*, desenvolvido pela Direção-Geral da Educação e Direção-Geral da Saúde, onde se assumiu que 10% da ingestão diária das crianças advém do lanche (13).

Por último, utilizou-se a informação recolhida na lista de ingredientes destes produtos para avaliar qual o tipo de gordura mais utilizado na sua produção.

_Resultados e discussão

No presente estudo, o universo considerado para análise compreendeu 45 amostras, sendo que 22,2% (n=10) não apresentavam informação na declaração nutricional relativa ao valor para a fibra, dado que este não é um elemento obrigatório na declaração nutricional.

Procedeu-se à determinação dos parâmetros estatísticos: média, mediana, desvio-padrão, mínimo e máximo, da informação nutricional disponibilizada na declaração nutricional de cada género alimentício (**tabela 1**).

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que para os açúcares, o valor médio foi de 26,3 g/100 g, substancialmente acima das recomendações precon-

Tabela 1: Média, mediana, desvio-padrão, mínimo e máximo das amostras selecionadas (n=45).

Parâmetro (por 100 g)	Média	Mediana	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Energia (kJ)	1999	1983	176,8	1785	2979
Energia (kcal)	472,1	474	23,6	424	517
Lípidos (g)	18,3	19	4,2	8,9	27
Ácidos gordos saturados (g)	5,9	5	4,2	1,1	16
Hidratos de carbono (g)	69	68,5	4,2	58	78
Açúcares (g)	26,3	28	7,7	2,2	39
Proteínas (g)	6,1	6	1,1	1,9	9,5
Sal (g)	0,7	0,6	0,3	0,4	1,6
Fibra (g)	3,4	2,7	2,6	1,7	17



artigos breves_ n. 11

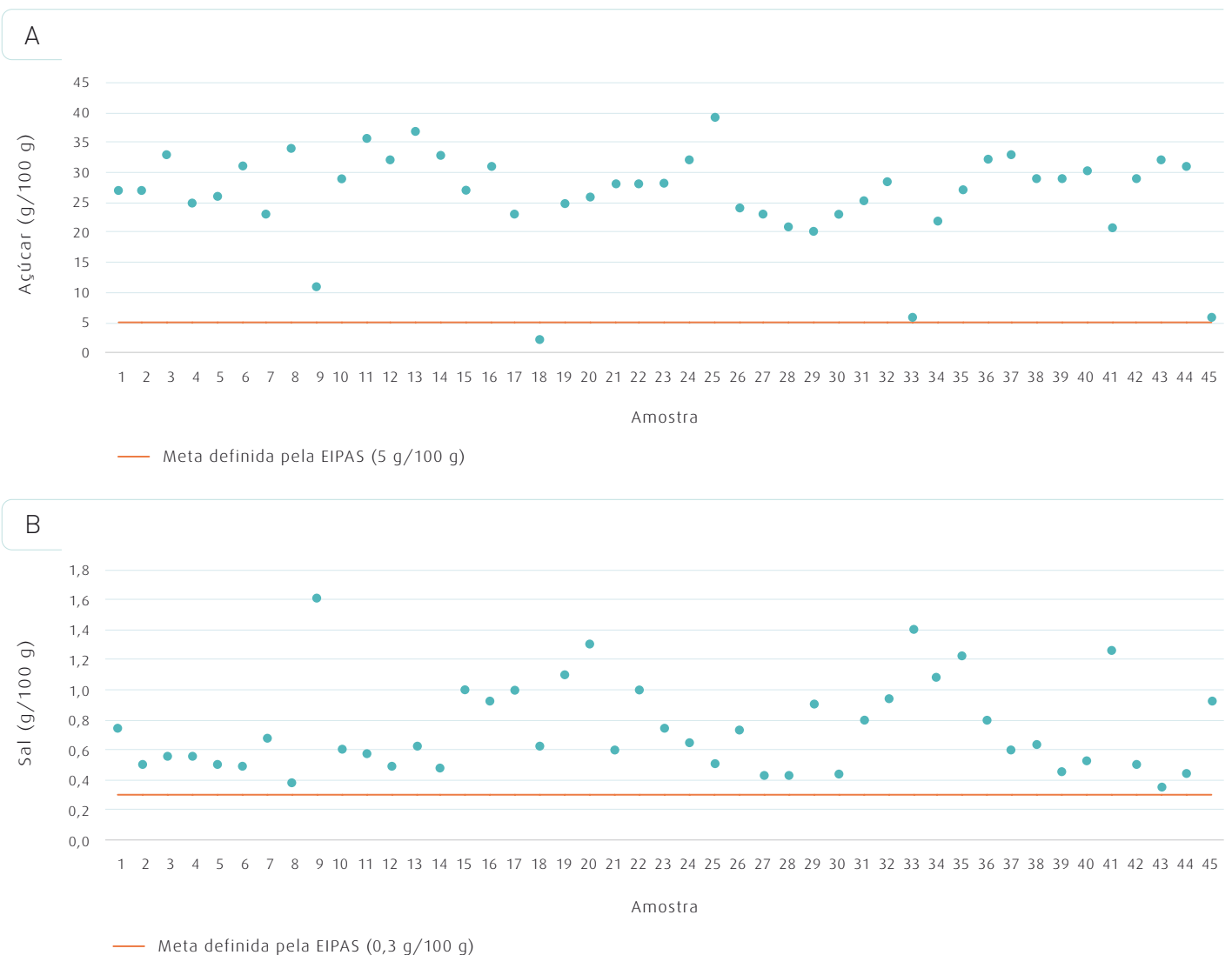
zadas pela EIPAS (5 g/100 g), sendo que apenas um produto cumpriu o respetivo valor de referência, como se pode observar no **gráfico 1A**. De referir ainda que a média para o sal (0,7 g/100 g) excedeu igualmente a meta definida na EIPAS (0,3 g/100 g), verificando-se que nenhuma amostra se encontrou dentro do limite estabelecido (**gráfico 1B**).

Do total de bolachas monitorizadas (n=45), foi possível agrupar 30 nas seguintes categorias: Bolachas recheadas com chocolate (n=11), Bolachas simples (n=10), Bolachas de chocolate (n=5) e Bolachas com cobertura

de chocolate (n=4). As restantes bolachas não ficaram incluídas em nenhuma destas categorias, porque têm todas características distintas relativamente às categorias definidas.

Avaliando os valores médios entre as mesmas, as “Bolachas com cobertura de chocolate” obtiveram a média mais elevada relativa à energia, lípidos, ácidos gordos saturados e açúcares, contudo, para os hidratos de carbono e sal esta foi identificada na categoria “Bolachas com chocolate”. O tipo “Bolachas simples”, apresentou os valores máximos para sal, proteínas e fibra.

Gráfico 1 (A,B): ■ Valores de açúcar (A) e de sal (B) (g/100 g) para as amostras seleccionadas, de acordo com a informação disponibilizada na declaração nutricional.





No que respeita aos limites estabelecidos pela EIPAS, a única amostra a cumprir a meta preconizada para os níveis de açúcar, encontra-se inserida na categoria “Bolachas simples”.

A **figura 2** ilustra a distribuição das 45 bolachas pelas diferentes categorias do descodificador de rótulos. As recomendações apontam para o consumo de alimentos com nutrientes, predominantemente, na categoria verde. Deverá existir uma ingestão moderada de alimentos situados na categoria amarela e evitar aqueles que contenham um ou mais nutrientes na categoria vermelha (8). Como é possível observar, a maioria apresenta valores elevados de gordura, gordura saturada e açúcares, e valores médios de sal.

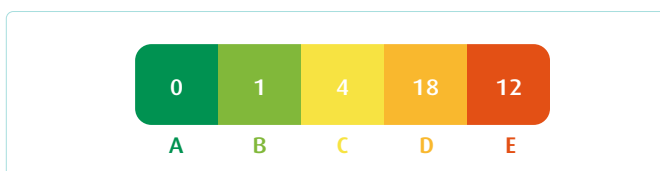
A distribuição maioritária entre a categoria amarela e a categoria vermelha, indica que na generalidade estes produtos devem ser consumidos com moderação, tanto em quantidade como em frequência.

Após efetuar uma avaliação dentro de cada categoria, constatou-se que todos os produtos do tipo “Bolachas

Figura 2: Distribuição do número de bolachas, segundo o descodificador de rótulos (n=45).

	Gordura (lípidos)	Gordura saturada	Açúcares	Sal
Alto	26	22	37	2
Médio	19	18	7	43
Baixo	0	5	1	0

Figura 3: Distribuição do número de bolachas segundo o *Nutri-Score* (n=35).



com cobertura de chocolate” manifestaram valores altos de gordura (lípidos), gordura saturada e açúcares, e valores médios de sal.

Das 45 bolachas recolhidas, foram apenas consideradas 35 para a distribuição pelas diferentes escalas do NS, devido à falta de informação na declaração nutricional relativa ao teor de fibra. Verificou-se que apenas uma amostra apresentou NS-B, e a maioria encontra-se entre o NS-D e E (**figura 3**).

Das 30 bolachas categorizadas nas classes anteriormente referidas, apenas 24 continham a informação necessária para o cálculo do respetivo NS: Bolachas recheadas com chocolate (n=10), Bolachas simples (n=8), Bolachas de chocolate (n=2) e Bolachas com cobertura de chocolate (n=4).

Na categoria “Bolachas recheadas com chocolate”, 40% (n=4) apresentavam um NS-D e 60% (n=6) um NS-E. Na categoria “Bolachas simples”, integrou-se o único produto com NS-B, uma vez que os restantes 25% (n=2) obtiveram um NS-C e 62,5% (n=5) um NS-D. Os dois produtos analisados nas “Bolachas de chocolate” atingiram um NS-C e D, no entanto, todos os inseridos na categoria “Bolachas com cobertura de chocolate” obtiveram a classificação E.

O facto de existirem produtos com melhores classificações no que se refere às categorias “Bolachas recheadas com chocolate” e “Bolachas simples”, demonstra que 60% dos produtos com NS-E e 62,5% com NS-D poderiam ser alvo de reformulações no perfil nutricional, com o intuito de melhorar as respetivas classificações de *Nutri-Score*.

De acordo com a roda dos alimentos, uma porção de bolachas equivale a 35 g (14). Tendo por base as recomendações nutricionais disponibilizadas pela EFSA, para a faixa etária dos 3 aos 6 anos e dos 7 aos 10 anos, as necessidades energéticas diárias, em média, correspondem a 1251 kcal e 1621 kcal, respetivamente, considerando um nível de atividade física “sedentário”.



Como mencionado anteriormente, admitiu-se que um lanche corresponde a 10% das necessidades energéticas diárias (3-6 anos: 125 kcal; 7 - 10 anos: 162 kcal). Para ambas as faixas etárias, de acordo com o Guia para Lanches Escolares Saudáveis, os lípidos deverão corresponder a 30% do valor energético do lanche, os hidratos de carbono a 50% e as proteínas a 20%.

A **tabela 2** apresenta o valor energético em quilocalorias e os valores em gramas, baseados nas percentagens acima atribuídas, para lípidos, hidratos de carbono e proteínas por lanche.

Em suma, se considerarmos a ingestão de uma porção de bolachas (35 g), para a faixa etária dos 3 aos 6 anos, todos os produtos extrapolaram o valor recomendado relativamente à energia e hidratos de carbono a incluir num lanche. Nenhum ultrapassou os níveis de proteínas e 91,1% (n=41) excederam o valor estabelecido para os lípidos. No caso da faixa etária dos 7 aos 10 anos, 66,7% (n=30) e 86,7% (n=39) ultrapassaram os valores recomendados em relação à energia e aos lípidos, respetivamente. Todos excederam, novamente, o limite estabelecido para os hidratos de carbono e nenhum apresentou valores acima dos estipulados para os níveis de proteínas.

De destacar que este tipo de alimentos, em regra, não é consumido individualmente. A ingestão de uma porção de bolachas acompanhada por outros produtos alimentares terá, certamente, um contributo nos parâmetros acima referidos ainda mais elevado. Assim, deve ponderar-se a inclusão das bolachas infantis, consideradas para a realização deste estudo, num dia alimentar de uma criança.

Ao analisar a lista de ingredientes de cada amostra, identificaram-se os seguintes tipos de gordura: óleo de girassol com alto teor de oleico (OGAO), óleo de girassol, óleo de palma, óleo de palmiste, gordura vegetal de coco, gordura vegetal de karité, manteiga de cacau, manteiga, gordura de leite e gordura de leite anidra (**gráfico 2**). Importa referir que muitas das amostras avaliadas contêm mais do que uma gordura adicionada na sua formulação.

Conforme se pode verificar no **gráfico 2**, o OGAO, o óleo de palma, a manteiga e a manteiga de cacau são o tipo de gordura adicionada presente na maioria das amostras. A presença de OGAO em 57,8% (n=26) das amostras, poderá indicar um esforço por parte da indústria alimentar, no sentido de pretender melhorar a qualidade do perfil lipídico destes produtos alimentares, pelo facto de ser uma fonte de gordura vegetal, constituída, maioritariamente, por ácidos gordos insaturados (essencialmente, monoinsaturados) (15).

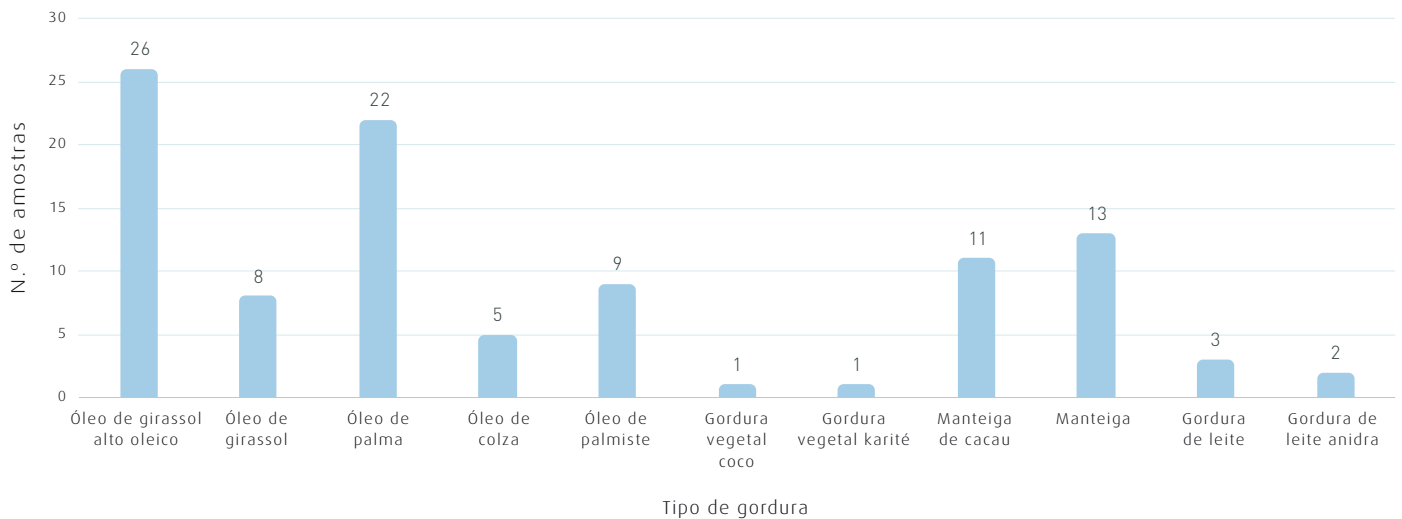
Analisando os 45 produtos, verificou-se que a percentagem total de ácidos gordos saturados apresenta valores muito díspares, variando entre os 7,1% e os 73,7%, sendo que as “Bolachas recheadas com chocolate” e “Bolachas com cobertura de chocolate”, obtiveram as médias mais elevadas em relação a este parâmetro nutricional. Nesse sentido, a elevada divergência entre valores mínimos e máximos aponta para a capacidade da reformulação gradual do teor em ácidos gordos saturados nestes produtos alimentares, mantendo o sabor e educando o paladar do público consumidor.

Tabela 2: Valores adequados de energia e nutrientes para a refeição do lanche por faixa etária.

Faixa etária	Energia (kcal)	Lípidos (g)	Hidratos de Carbono (g)	Proteína (g)
3 aos 6 anos	125	4,2	15,6	6,2
7 aos 10 anos	162	5,4	20,3	8,1



Gráfico 2: Distribuição das bolachas selecionados de acordo com o tipo de gordura referido na lista de ingredientes.



Conclusão

Destacando a prevalência de excesso de peso e obesidade infantil em Portugal, potencialmente associada ao consumo de alimentos com elevada densidade energética e tendo em conta a relevância dos alimentos estudados na alimentação das crianças, parece essencial refletir sobre as estratégias a adotar para que continue a existir uma reformulação gradual na composição destes géneros alimentícios por parte da indústria alimentar. Para controlar a tendência de comportamentos alimentares obesogénicos na infância, o aumento da literacia dos cuidadores responsáveis, a adoção de campanhas de educação alimentar e a promoção à leitura integral dos rótulos, são imprescindíveis.

Referências bibliográficas:

- (1) Agostoni C, Baselli L, Mazzoni MB. Early nutrition patterns and diseases of adulthood: a plausible link? *Eur J Intern Med.* 2013 Jan;24(1):5-10. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2012.08.011>. Epub 2012 Sep 13.
- (2) Scagliani S, De Cosmi V, Ciappolino V, et al. Factors Influencing Children's Eating Behaviours. *Nutrients.* 2018 May 31;10(6):706. <https://doi.org/10.3390/nu10060706>
- (3) Lanigan J, Singhal A. Early nutrition and long-term health: a practical approach. *Proc Nutr Soc.* 2009 Nov;68(4):422-9. <https://doi.org/10.1017/S002966510999019X>. Epub 2009 Aug 24.
- (4) Zalewski BM, Patro B, Veldhorst M, et al. Nutrition of infants and young children (one to three years) and its effect on later health: A systematic review of current recommendations (EarlyNutrition project). *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017 Feb 11;57(3):489-500. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.888701>
- (5) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável. Estado nutricional [online]. [consul. 2022/9/6]. <https://alimentacaosaudavel.dgs.pt/alimentacao-em-numeros/estado-nutricional/>
- (6) Rito A, Mendes S, Baleia J, et al. Childhood Obesity Surveillance Initiative: COSI Portugal 2019. Lisboa:INSA, 2021. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7783>
- (7) Lopes, C., Torres, D., Oliveira, A., Severo, M., Alarcão, V., Guiomar, S., ... Ramos, E. (2017). Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, IAN-AF 2015-2016. Consultado a 6 setembro 2022. Disponível em https://ian-af.up.pt/sites/default/files/IAN-AF%20Relat%C3%B3rio%20Resultados_0.pdf
- (8) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável. Descodificador de Rótulos [online]. [consul. 2022.9.6]. <https://alimentacaosaudavel.dgs.pt/descodificador-de-rotulos/>
- (9) Egnell M, Galan P, Fialon M, et al. The impact of the Nutri-Score front-of-pack nutrition label on purchasing intentions of unprocessed and processed foods: post-hoc analyses from three randomized controlled trials. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2021 Mar 17;18(1):38. <https://doi.org/10.1186/s12966-021-01108-9>
- (10) Hercberg S, Touvier M, Salas-Salvado J; Group of European scientists supporting the implementation of Nutri-Score in Europe. The Nutri-Score nutrition label. *Int J Vitam Nutr Res.* 2022 Jul;92(3-4):147-157. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000722>. Epub 2021 Jul 27
- (11) Santé Publique France. Nutri-Score [online]. [consul. 10/9/2022]. Disponível em: <https://www.santepubliquefrance.fr/determinants-de-sante/nutrition-et-activite-physique/articles/nutri-score>
- (12) European Food Safety Authority. Dietary reference values for nutrients: summary report. Parma: EFSA, 2017. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.e15121>
- (13) Gregório MJ, Lima R, Sousa S, et al. Guia para lanches escolares saudáveis. Lisboa: DGE, 2021. https://www.dge.mec.pt/sites/default/files/Noticias_documentos/guia_lanch_escolares.pdf
- (14) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável. Roda dos Alimentos [online]. [consul. 15/9/2022]. <https://alimentacaosaudavel.dgs.pt/roda-dos-alimentos/>
- (15) Allman-Farinelli MA, Gomes K, Favaloro EJ, et al. A diet rich in high-oleic-acid sunflower oil favorably alters low-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and factor VII coagulant activity. *J Am Diet Assoc.* 2005 Jul;105(7):1071-9. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2005.04.008>

_Escolhas alimentares sustentáveis: o contributo do projeto ALTERNATIVA enquanto ferramenta para a escolha de fontes alternativas de proteína

Sustainable dietary choices: the contribution of the ALTERNATIVA project as a tool for selecting alternative protein sources

Ana Serôdio¹, Beatrice Biasini², Géraldine Boué³, Isabel Castanheira¹, Elena Cozzi², Michel Federighi³, Lea Jakobsen⁴, Carla Martins^{1,5}, Davide Menozzi², Carla Motta¹, Androniki Naska⁶, katerina Niforou⁶, Marta Pavel⁴, Sara Pires⁴, Morten Poulsen⁴, Ricardo Assunção^{1,7,8}

rassuncao@egasmoniz.edu.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) University of Parma, Parma, Italia

(3) National Research Institute for Agriculture, Food and Environment, Nantes, França

(4) National Food Institute, Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Dinamarca

(5) Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

(6) Department of Hygiene, Epidemiology and Medical Statistics. School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Grécia

(7) Instituto Universitário Egas Moniz, Monte da Caparica, Portugal

(8) Centro de Estudos Ambientais e Marinhos, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

_Resumo

O aumento da população humana e a consequente pressão exercida pelos sistemas alimentares desafiam a saúde e o meio ambiente, cujo impacto se reflete, entre outros, ao nível das alterações climáticas associadas ao aquecimento global, exploração de recursos naturais e da perda de biodiversidade. Entre os fatores que mais contribuem para esse impacto está a produção de proteínas de origem animal, como a carne vermelha e os laticínios. Neste sentido, urge uma transformação dos sistemas alimentares, sendo que esta transformação deverá ser sustentada numa avaliação dos impactos de fontes alternativas de proteínas, quer na saúde quer na sustentabilidade. Este artigo tem como principal objetivo discutir os desafios colocados aos sistemas alimentares e a necessidade de avaliar o impacto destes, à luz do projeto ALTERNATIVA (*Alternative sources of protein in European diets – integrating risk-benefit for health and sustainability*) como uma ferramenta para o desenvolvimento sustentável nas diferentes vertentes – ambiental, social e económica, através de uma metodologia que reúne e combina conhecimentos em avaliação do risco-benefício (ARB) de alimentos e a avaliação da sustentabilidade. A utilização de abordagens holísticas, como a que está a ser aplicada no projeto ALTERNATIVA com o objetivo de fornecer ferramentas inovadoras para apoiar decisões sobre as futuras dietas, é fundamental para minimizar os efeitos dos desafios atuais tentando garantir alimentos seguros, economicamente justos, acessíveis, dietas nutricionalmente adequadas e saudáveis com menores impactos ambientais.

_Abstract

The growth of human population and the consequent pressure exerted by food systems challenge health and the natural environment, whose impact is reflected, among others, in terms of contribution to climate change associated with global warming, exploitation of natural resources and loss of biodiversity. Among the major con-

*tributors to this impact is the production of proteins of animal origin, such as red meat and dairy. Therefore, the need of transforming food systems is urgent and should be supported by assessing the overall health impact of alternative protein sources considering also sustainability aspects. Our main objective is to discuss the challenges posed to food systems and the need to assess their impact under the umbrella of the ALTERNATIVA (*Alternative sources of protein in European diets – integrating risk-benefit for health and sustainability*) as a tool for sustainable development in different aspects – health, environmental, social and economic, through a methodology that brings together and combines knowledge in risk-benefit assessment (RBA) and sustainability assessment. The use of holistic approaches, such as the one being applied in the ALTERNATIVA project aiming to provide innovative tools to support decisions about the future diets, is fundamental to minimize the effects of the current challenges trying to guarantee secure, economically fair, affordable, nutritionally adequate and healthy diets having lower environmental impacts.*

_Introdução

O conceito de desenvolvimento sustentável esteve, durante muito tempo, restritivamente associado ao ambiente, sob diferentes formas, desde a pegada ecológica, às emissões de carbono, o aumento da temperatura média global e a perda de biodiversidade. Atualmente, para além do ambiente, reconhecem-se outras dimensões igualmente complexas e preponderantes, tal como as dimensões económica e social (1).



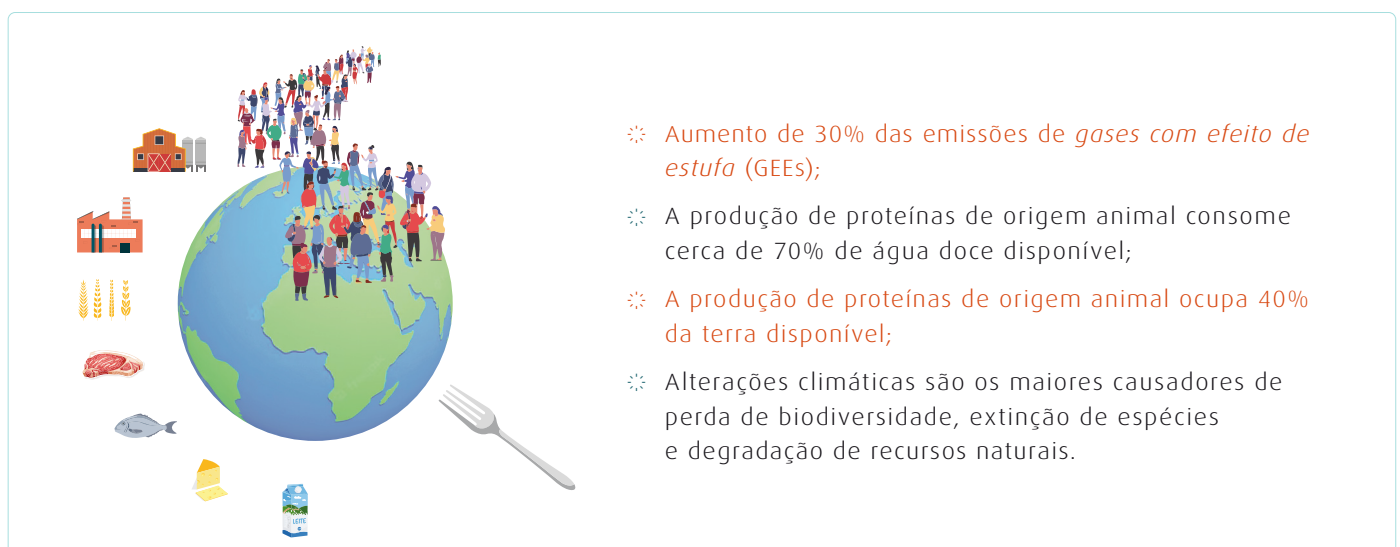
A pressão que os sistemas alimentares globais exercem sobre o meio ambiente tem vindo a amplificar-se nos últimos tempos. Para tal, muito contribui o crescimento mundial da população humana e, conseqüentemente, a intensificação dos sistemas de produção assim como algumas mudanças nos padrões de consumo de alimentos. Espera-se um crescimento da população mundial de mais de 30% em 2050 em relação ao atual (2). Todos estes fatores têm conseqüências inevitáveis para o meio ambiente e a saúde humana (3).

A produção de alimentos e a agricultura intensiva são responsáveis por até cerca de 30% de todas as emissões de gases com efeitos de estufa (2,4), cuja concentração na atmosfera até 2100 pode alcançar valores até 250% acima dos valores considerados em 1750, sendo expectável um aumento continuado da temperatura média global relacionado com a presença destes gases na atmosfera (1). Associada à produção de alimentos e agricultura intensiva está também a perda da biodiversidade, extinção das espécies e degradação de recursos naturais (5). O ritmo acelerado das alterações climáticas dificulta a adaptação de animais e plantas, com alterações nos seus períodos de reprodução e desenvolvimento, respetivamente, conduzindo à sua extinção (1).

Os principais alimentos cuja produção tem gerado um maior impacto ao nível do ambiente são os alimentos à base de proteína de origem animal, tais como a carne e o leite (2,3,6-8), uma vez que a sua produção apresenta níveis mais elevados de emissões de gases com efeito de estufa (GEEs), quando comparados com a produção de alimentos de origem vegetal. Adicionalmente, a produção de proteínas de origem animal ocupa 40% de terra disponível e consome cerca de 70% da água doce disponível. Pelo contrário, a produção de alimentos de origem vegetal tende a ser ambientalmente menos agressiva, além de que a adesão a dietas de base vegetal, normalmente ricas em fibras, estão associadas a um menor risco de desenvolvimento de doenças crónicas, com e conseqüentes benefícios para a saúde (9).

Reconhece-se, assim, que os padrões alimentares têm um impacto no ambiente, assim como o ambiente e os fatores económicos afetam as escolhas alimentares (figura 1), pelo que esta ligação entre a nutrição humana, o ambiente e os fatores económicos é multidirecional (10). A pressão causada pelo atual sistema alimentar sobre os recursos naturais da Terra exige o desenvolvimento de sistemas sustentáveis de produção de alimentos (3).

Figura 1:  Implicações ambientais decorrentes da pressão exercida pelos sistemas alimentares (baseado em: (9)).





Neste sentido, urge a necessidade de uma avaliação dos impactos na saúde e na sustentabilidade de fontes proteicas alternativas às de origem animal, existentes atualmente. Como tal, diversas alternativas têm surgido nos últimos tempos, tais como: cereais e leguminosas, insetos comestíveis, micoproteínas e proteínas derivadas de algas.

Deste modo, a integração equilibrada das diferentes dimensões para um desenvolvimento sustentável no futuro exige que, hoje, sejam tomadas ações globais e abrangentes. A tomada de ações globais e abrangentes requerem uma pré-avaliação também esta abrangente, que integre diferentes áreas do conhecimento (ex.: nutrição, toxicologia, microbiologia, química e epidemiologia) para uma melhor compreensão dos impactos na saúde de cada alternativa à proteína de origem animal considerada. Desta forma, a avaliação do risco-benefício (ARB) é uma ferramenta importante de apoio às decisões e ações, que integra riscos e benefícios em medidas comparáveis e que permite estimar o impacto que um determinado alimento ou componente alimentar tem na saúde humana em geral, quer por exposição ou ausência dessa exposição a estes componentes alimentares (11-13).

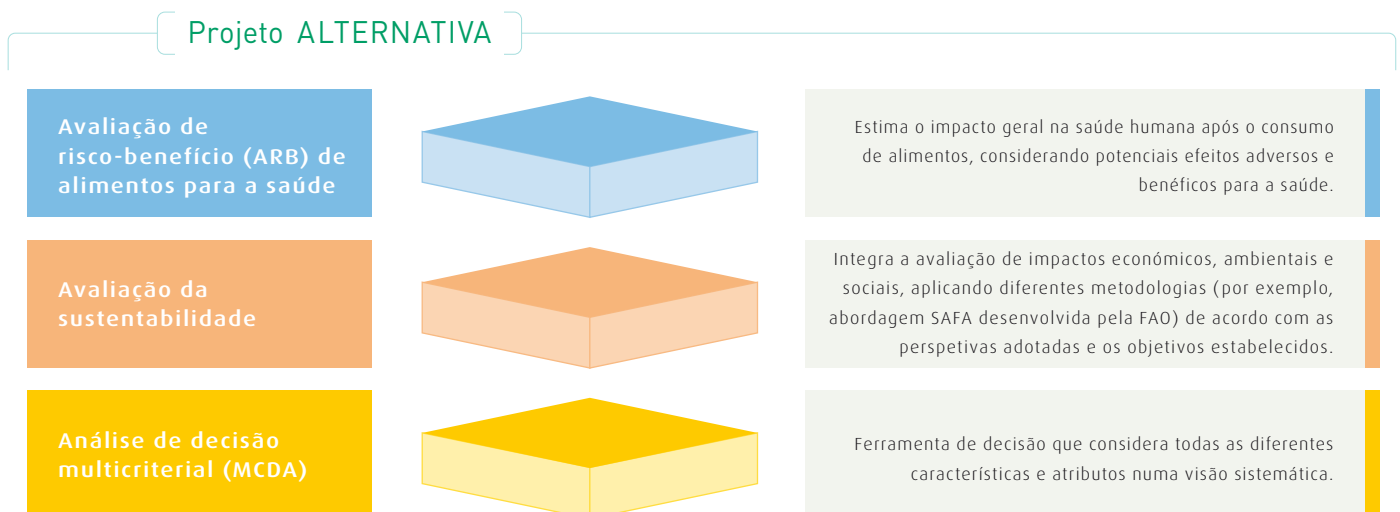
_Objetivo

Este artigo pretende discutir os desafios colocados aos sistemas alimentares e a necessidade de avaliar o impacto destes, à luz do projeto ALTERNATIVA (*Alternative sources of protein in European diets – integrating risk-benefit for health and sustainability*) como uma ferramenta para o desenvolvimento sustentável nas diferentes vertentes – ambiental, social e económica, através de uma metodologia que reúne e combina conhecimentos em avaliação do risco-benefício (ARB) de alimentos e a avaliação da sustentabilidade. Assim, são apresentadas e discutidas as principais preocupações em termos de ambiente, saúde e economia, bem como as diferentes alternativas à proteína de origem animal considerando as suas vantagens e desvantagens.

_Metodologia

O projeto ALTERNATIVA visa desenvolver uma abordagem holística para avaliar o impacto de fontes alternativas de proteína, integrando uma avaliação de saúde e sustentabilidade. Especificamente, este projeto visa reunir e combinar conhecimentos em ARB de alimentos e avaliação da sustentabilidade, para aumentar a capacidade dos parceiros envolvidos e permitir a sua aplica-

Figura 2: Metodologias consideradas no projeto ALTERNATIVA (*Alternative sources of protein in European diets – integrating risk-benefit for health and sustainability*).



FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations; SAFA – Sustainability Assessment of Food and Agriculture systems.



artigos breves_ n. 12

ção à avaliação do impacto da substituição do consumo de carne vermelha por fontes alternativas de proteína.

Resultados e discussão

Tal como mencionado anteriormente, diversas alternativas à proteína de origem animal comumente utilizada, têm sido identificadas nos últimos tempos,

tais como: cereais e leguminosas, insetos comestíveis, micoproteínas e proteínas derivadas de algas, cujas vantagens e desvantagens relativamente às proteínas de origem animal estão sistematizadas na **tabela 1**.

Tabela 1: Vantagens e desvantagens de diferentes fontes alternativas à proteína de origem animal, comumente utilizada.

	Vantagens	Desvantagens	Ref. ^a
Cereais e Leguminosas	<ul style="list-style-type: none"> Já integram a dieta humana corrente Produção menos intensiva em recursos e menos destrutiva do ponto de vista ambiental do que a pecuária Menores custos associados à produção Consumo associado a um menor risco de doenças crónicas (ex.: Doença isquémica cardíaca, Diabetes tipo 2, Cancro e Síndrome metabólica) Benefícios nutricionais pela presença de vitaminas, minerais, fibras, antioxidantes, e agentes anti-inflamatórios 	<ul style="list-style-type: none"> Proteínas vegetais podem não disponibilizar todos os aminoácidos essenciais quando considerados os alimentos de forma individual Elevadas emissões de gases com efeito de estufa Presença de compostos antinutricionais que poderão interferir com algumas funções biológicas Produtos de base vegetal poderão apresentar elevados níveis de pesticidas, contaminantes ambientais e toxinas naturais 	(2) (14) (15) (14) (16)
Insetos comestíveis	<ul style="list-style-type: none"> Tradicionalmente consumidos há milhares de anos (especialmente, no Oriente, África e alguns países da América Latina) Reduzido impacto na deflorestação e fertilidade do solo Reduzida pegada ecológica Reduzido consumo de água Reduzidas emissões de gases com efeito de estufa e amónia Ciclos de vida curtos Elevadas taxas de reprodução Composição nutricional bastante variável (elevada variedade de insetos) Taxas de conversão alimentar mais elevadas se considerados os mamíferos 	<ul style="list-style-type: none"> Podem apresentar contaminantes (ex.: metais pesados) Veículo de exposição a compostos produzidos endogenamente (ex.: glicosídeos cianogénicos, benzoquinonas) Reservatório de microrganismos patogénicos (ex.: bactérias, fungos e suas toxinas, parasitas e vírus) 	(17) (2) (18) (19)
Micoproteínas	<ul style="list-style-type: none"> Melhorias nos níveis de colesterol no sangue e na resposta glicémica Reduzido teor de gordura e alto teor de proteína e fibra Reduzido teor de sódio e boa fonte de zinco, selénio e antioxidantes Utilização da terra e da água mais eficiente, comparativamente à produção de carne de porco e de frango Reproduz bem o sabor e a consistência da carne, aumentando a aceitação deste substituto da carne 	<ul style="list-style-type: none"> Emissões de GEEs comparáveis às da produção de carne de porco e de frango Elevado teor de RNA pode levar a um aumento da quantidade de ácido úrico no organismo (risco de gota) Níveis de ferro e vitamina B12 baixos em comparação com os encontrados na carne vermelha Reações alérgicas 	(20)
Proteínas de algas	<ul style="list-style-type: none"> A sua produção não requer irrigação, terra arável e fertilização Propriedades bioativas dos peptídeos de algas marinhas: antioxidantes, anti-hipertensivas, antidiabéticas, anti-inflamatórias, anticancerígenas, entre outras 	<ul style="list-style-type: none"> A sua estrutura e propriedades biológicas estão ainda mal documentadas Efeitos da variação sazonal da composição de algas na bioatividade de seus peptídeos, dificuldades na extração de proteínas da estrutura complexa de algas, segurança dos peptídeos, escalabilidade e reprodutibilidade dos métodos desenvolvidos para a produção de peptídeos bioativos Necessidade de mais estudos sobre a biodisponibilidade dos peptídeos bioativos e de validação dos resultados em modelos animais e testes em humanos antes de sua aplicação para consumo humano (ex.: alimentos funcionais ou ingredientes farmacêuticos) 	(21)



Não existe uma solução única e de aplicação rápida que promova uma mudança global no sentido de uma alimentação mais sustentável e saudável. Para qualquer mudança é necessária uma fase de transição, que permita um processo de avaliação e integração de todas as dimensões envolvidas, isto é, ao nível social, económico e de sustentabilidade ambiental, onde também se incluem os riscos e benefícios para a saúde (22,23).

Neste sentido, o projeto ALTERNATIVA como ferramenta para escolhas alimentares sustentáveis reúne uma equipa multidisciplinar de cinco instituições pertencentes a cinco Estados-Membros da União Europeia – Portugal, Dinamarca, França, Itália e Grécia. O projeto está estruturado em cinco grupos de trabalho (WPs) (figura 3).

De forma a atuar como uma ferramenta para escolhas alimentares saudáveis, com base numa abordagem risco-benefício mais integrativa, que tenha em conta a saúde, aspetos socioeconómicos e sustentabilidade ambiental, o projeto ALTERNATIVA propôs-se a realizar diferentes atividades que se complementam entre si.

São elas:

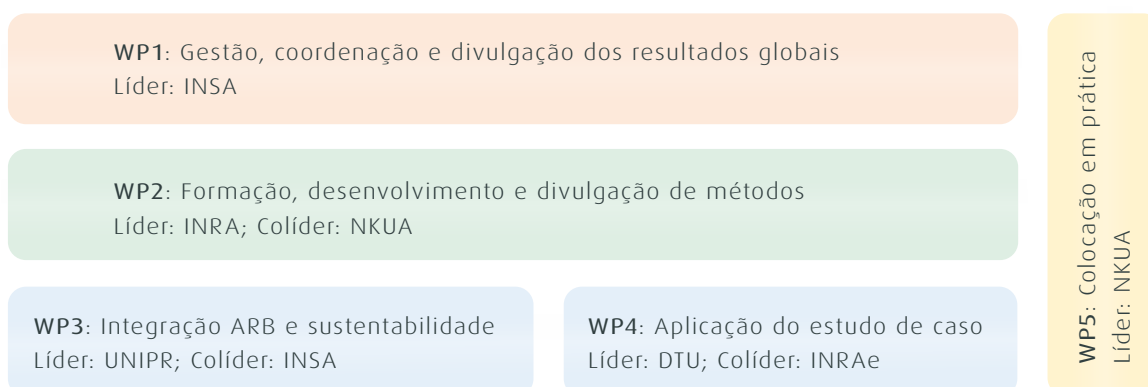
1) Sessões de formação

Com esta atividade espera-se a harmonização do conhecimento e aumento da capacidade de todos os parceiros envolvidos sobre as metodologias de ARB de alimentos e de avaliação da sustentabilidade. Os conteúdos destas sessões serão constituídos por duas vertentes principais: i) avaliação do risco-benefício de alimentos; e ii) avaliação da sustentabilidade.

2) Criação de um protocolo de integração da avaliação do risco-benefício e da avaliação do impacto da sustentabilidade

Espera-se que o protocolo a ser desenvolvido constitua uma estrutura coerente, que considere as abordagens de ARB atuais com medidas de sustentabilidade de géneros alimentícios e onde os conceitos de saúde e de sustentabilidade ambiental e económica sejam elevados a um nível de maior abrangência, onde mais variáveis são incluídas. Por exemplo, para uma avaliação mais abrangente do impacto na saúde, o conceito de saúde precisa de integrar diferentes variáveis como nutrição, toxicologia, microbiologia e epidemiologia;

Figura 3: Estrutura dos grupos de trabalho (WPs) do projeto ALTERNATIVA (*Alternative sources of protein in European diets – integrating risk-benefit for health and sustainability*).



INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Portugal; UNIPR – University of Parma, Itália; NKUA – National and Kapodistrian University of Athens, Grécia; INRAe – National Research Institute for Agriculture, Food and Environment, França; DTU – National Food Institute, Technical University of Denmark, Dinamarca.



da mesma forma, para uma avaliação mais abrangente da sustentabilidade económica, ambiental e social têm que ser incluídas novas variáveis, tais como valor agregado bruto, distribuição da margem bruta, valor de reputação, análise do ciclo de vida, cálculos de pegada de carbono, igualdade de género, coesão territorial, entre outros. Por outro lado, o desenvolvimento do protocolo servirá de apoio ao desenvolvimento de uma outra atividade, um estudo de caso. Pretende-se que este mesmo protocolo sirva de suporte para futuras avaliações neste âmbito e consequentemente para a formulação de políticas e definição de estratégias para a promoção de sistemas alimentares seguros e sustentáveis.

3) Estudo de caso

Através da aplicação do protocolo mencionado anteriormente, o estudo de caso pretende avaliar o impacto da substituição do consumo de carne vermelha por leguminosas, uma fonte vegetal alternativa de proteína, onde poderá ser feita uma avaliação em tempo real da metodologia desenvolvida no protocolo. Este estudo de caso contempla a seleção da fonte alternativa de proteína a ser considerada e dos indicadores para a avaliação da sustentabilidade, recolha e harmonização dos dados necessários à execução da avaliação, avaliação dos impactos na saúde e na sustentabilidade, terminando com a integração de todos os resultados e a comunicação dos principais resultados.

4) Grupo focal

Esta atividade teve como objetivo, numa primeira fase, criar um grupo de discussão que tenha em comum o interesse e envolvimento na integração da ARB e na avaliação prática dos impactos da sustentabilidade para assim se conseguirem obter informações sobre o entendimento, interesses, necessidades e questões por parte de todos os envolvidos, existindo assim uma melhor preparação e antevisão dos desafios globais gerados pela mudança atual dos sistemas alimentares e dietas sustentáveis. Esta atividade atua de forma transversal em relação às restantes atividades do projeto ao fazer a ponte entre os aspetos técnicos/cien-

tíficos com a demanda real dos formuladores de políticas, fornecendo uma visão preliminar para a criação do protocolo de integração da avaliação do risco-benefício e da avaliação do impacto da sustentabilidade e, ainda, acumulando o conhecimento gerado pelas sessões de formação e pelo estudo de caso, de forma a aumentar a sua aplicabilidade. Para tal, foi desenvolvido um questionário contemplando:

- duas fases, em que a primeira servirá para identificar os principais tópicos a serem avaliados no questionário e, em que a segunda fase servirá para discutir a versão preliminar do questionário;
- e dois subgrupos, em que um grupo será formado por avaliadores de risco e outro grupo por gestores e comunicadores de risco, com um máximo de dez participantes por subgrupo e com, aproximadamente 1 a 2 horas para cada sessão.

_Conclusão

A gestão e antecipação das tendências adversas que a Humanidade enfrenta na atualidade, diretamente associadas às escolhas alimentares das populações, só é possível por meio de uma abordagem holística, que tenha em consideração os diversos impactos (riscos e benefícios) e que integre diferentes áreas científicas, como é o caso da avaliação do risco-benefício e da avaliação do ciclo de vida. Somente desta forma será possível fazer face aos desafios esperados, através da tomada de decisões e da implementação de ações mais adequadas.

Além do reduzido impacto ambiental, as dietas sustentáveis, aquelas que compreendem menos alimentos de origem animal e mais de origem vegetal, contribuem para uma alimentação e nutrição seguras, promovendo uma vida saudável para as gerações presentes e futuras.

O projeto ALTERNATIVA contribuirá para os atuais desafios, fornecendo ferramentas inovadoras para apoiar as melhores decisões sobre as dietas do futuro, garantindo a nutrição humana e a saúde do planeta.



Financiamento:

Trabalho desenvolvido no âmbito do projeto ALTERNATIVA (*Alternative sources of protein in European diets – integrating risk-benefit for health and sustainability*) financiado pelas EFSA Partnering Grants (Grant Agreement Number – GP/EFSA/ENCO/2020/03 – GA 2).

Os autores declaram que este manuscrito reflete apenas a opinião dos autores e a EFSA não é responsável por qualquer uso que possa ser feito das informações nele contidas = *The authors declare that this manuscript reflects only the authors' view and EFSA is not responsible for any use that may be made of the information it contains*

Referências bibliográficas:

- (1) Instituto Camões. Ficha temática: Desenvolvimento sustentável e ação climática. [Agenda Pos 2015], p. [4]. https://www.instituto-camoes.pt/images/agendaPos2015/FichaAED_DesenvSustentAcaoClimatica.pdf
- (2) Fasolin LH, Pereira RN, Pinheiro AC, et al. Emergent food proteins - Towards sustainability, health and innovation. *Food Res Int.* 2019 Nov;125:108586. Epub 2019 Jul 29. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108586>
- (3) Alsaffar AA. Sustainable diets: The interaction between food industry, nutrition, health and the environment. *Food Sci Technol Int.* 2016 Mar;22(2):102-11. Epub 2015 Feb 13. <https://doi.org/10.1177/1082013215572029>
- (4) Tian J (Jingxin), Bryksa BC, Yada RY. Feeding the world into the future – food and nutrition security: the role of food science and technology. *Front Life Sci.* 2016 Jul 2;9(3):155-66. <https://doi.org/10.1080/21553769.2016.1174958>
- (5) Funabashi M. Human augmentation of ecosystems: objectives for food production and science by 2045. *NPJ Sci Food.* 2018 Sep 21;2:16. <https://doi.org/10.1038/s41538-018-0026-4>
- (6) Nadathur SR, Wanasundara JP, Scanlin L (eds). Proteins in the Diet: Challenges in Feeding the Global Population. IN: *Sustainable Protein Sources*. Elsevier. 2016, pp 1-19.
- (7) Spector TD, Gardner CD. Challenges and opportunities for better nutrition science- an essay by Tim Spector and Christopher Gardner. *BMJ.* 2020 Jun 26;369:m2470. <https://doi.org/10.1136/bmj.m2470>
- (8) van der Spiegel M, Noordam MY, van der Fels-Klerx HJ. Safety of Novel Protein Sources (Insects, Microalgae, Seaweed, Duckweed, and Rapeseed) and Legislative Aspects for Their Application in Food and Feed Production. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2013 Nov;12(6):662-678. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12032>
- (9) Lynch H, Johnston C, Wharton C. Plant-Based Diets: Considerations for Environmental Impact, Protein Quality, and Exercise Performance. *Nutrients.* 2018 Dec 1;10(12):1841. <https://doi.org/10.3390/nu10121841>
- (10) Chen C, Chaudhary A, Mathys A. Dietary Change Scenarios and Implications for Environmental, Nutrition, Human Health and Economic Dimensions of Food Sustainability. *Nutrients.* 2019 Apr 16;11(4):856. <https://doi.org/10.3390/nu11040856>
- (11) Assunção R, Alvito P, Brazão R, et al. Building capacity in risk-benefit assessment of foods: Lessons learned from the RB4EU project. *Trends Food Sci Technol.* 2019 Sep;91:541-8. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.028>
- (12) Boué G, Guillou S, Antignac J-P, et al. Public Health Risk-benefit Assessment Associated with Food Consumption-A Review. *Eur J Nutr Food Saf.* 2015 Jan 10;5(1):32-58. <https://doi.org/10.9734/EJNFS/2015/12285>
- (13) Pires SM, Boué G, Boobis A, Eneroth H, Hoekstra J, Membré JM, Persson IM, Poulsen M, Ruzante J, van Klaveren J, Thomsen ST, Nauta MJ. Risk Benefit Assessment of foods: Key findings from an international workshop. *Food Res Int.* 2019 Feb;116:859-69. Epub 2018 Sep 10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.021>
- (14) Lynch H, Johnston C, Wharton C. Plant-Based Diets: Considerations for Environmental Impact, Protein Quality, and Exercise Performance. *Nutrients.* 2018 Dec 1;10(12):1841. <https://doi.org/10.3390/nu10121841>
- (15) Henchion M, Hayes M, Mullen AM, et al. Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. *Foods.* 2017 Jul 20;6(7):53. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>
- (16) Lonnie M, Hooker E, Brunstrom JM, et al. Protein for Life: Review of Optimal Protein Intake, Sustainable Dietary Sources and the Effect on Appetite in Ageing Adults. *Nutrients.* 2018 Mar 16;10(3):360. <https://doi.org/10.3390/nu10030360>
- (17) van Huis A, van Itterbeeck J, Mertens H, et al. Edible insects: Future prospects for food and feed security. Rome: Food Agric Organ United Nations, 2013. (FAO Forestry paper; 171). <https://www.fao.org/3/i3253e/i3253e.pdf>
- (18) Chen J, Fewtrell M, Kennedy G, et al. Nutrition challenges ahead. *EFSA J.* 2016 Jun;14 (S1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.s0504>
- (19) Loveday SM. Food Proteins: Technological, Nutritional, and Sustainability Attributes of Traditional and Emerging Proteins. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2019 Mar 25;10:311-39. Epub 2019 Jan 16. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121128>
- (20) Souza Filho PF, Andersson D, Ferreira JA, et al. Mycoprotein: environmental impact and health aspects. *World J Microbiol Biotechnol.* 2019 Sep 23;35(10):147. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2723-9>
- (21) Admassu H, Gasmalla MAA, Yang R, et al. Bioactive Peptides Derived from Seaweed Protein and Their Health Benefits: Antihypertensive, Antioxidant, and Antidiabetic Properties. *J Food Sci.* 2018 Jan;83(1):6-16. Epub 2017 Dec 11. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14011>
- (22) Clark MA, Springmann M, Hill J, et al. Multiple health and environmental impacts of foods. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Nov 12;116(46):23357-23362. Epub 2019 Oct 28. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906908116>
- (23) Hollander A, De Jonge R, Biesbroek S, et al. Exploring solutions for healthy, safe, and sustainable fatty acids (EPA and DHA) consumption in The Netherlands. *Sustain Sci.* 2019 Mar 20;14(2):303-13. <http://link.springer.com/10.1007/s11625-018-0607-9>