



2018  
número  
**23**  
2ª série



Lisboa\_INSA, IP

publicação quadrimestral\_ setembro - dezembro

ISSN: 2183-8873 (em linha)

# Observações

— Boletim Epidemiológico

## sumário\_

### \_Editorial

Observação em Saúde Pública - Efetivamente funciona p03

*Public Health observation - Effectively works*

Carlos Matias Dias, Baltazar Nunes

### \_Artigos breves

#### \_Emergências e catástrofes naturais

1\_ Preparação das famílias para fazer face a emergências e p05  
catástrofes: avaliação após o incêndio de 2017 ocorrido nos

concelhos de Pedrógão Grande, Figueiró dos Vinhos e Castanheira de Pera

*Household disaster preparedness: a survey research results after the wildfires in the Pedrógão Grande, Figueiró dos Vinhos and Castanheira de Pera, Portugal, 2017*

Mariana Neto, João Pimentel, António Morais, Cristina Santos, António J Ferreira, Pedro L Ferreira

#### \_Doenças infecciosas

2\_ Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral: p12  
infeções TORCH em crianças com paralisia cerebral  
nascidas em 2001-2010

*Portuguese National Surveillance of Cerebral Palsy: TORCH infection in children with cerebral palsy born in 2001-2010*

Teresa Folha, Daniel Virella, Ana Cadete, Eulália Calado, José Joaquim Alvarelhão, Rosa Gouveia, Teresa Gaia, Carla Conceição, Maria da Graça Andradá; Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral

3\_ Utilização dos cuidados de saúde na presença de síndrome p16  
gripal: descrição das épocas 2011/2012 a 2016/2017

*Use of health care during influenza season: seasons 2011/2012 to 2016/2017*

Irina Kislaya, Ausenda Machado, Verónica Gomez, Ricardo Mexia

4\_ Variantes genéticas do gene *IFITM3* revelam um potencial p19  
modificador da gravidade sintomática da gripe

*Genetic variants of the IFITM3 gene reveal a potential modifier of influenza severity*

Susana David, Vanessa Correia, Liliãna Antunes, Ricardo Faria, José Ferrão, Paula Faustino, Baltazar Nunes, Fernando Maltez, João Lavinha, Helena Rebelo de Andrade

5\_ Evidência para o efeito de um “gene principal” do hospedeiro p27  
na suscetibilidade à tuberculose multirresistente em Portugal  
*Evidence for a host “major gene” effect in the susceptibility to multidrug resistant tuberculosis in Portugal*

Susana David, Ana RA Mateus, Elsa L Duarte, José Albuquerque, Clara Portugal, Luísa Sancho, João Lavinha, Guilherme Gonçalves

#### \_Alimentação e nutrição

6\_ Projeto RiskBenefit4EU – uma estratégia para a avaliação de p35  
risco-benefício de alimentos em Portugal

*RiskBenefit4EU project – a strategy for risk-benefit assessment of foods in Portugal*

Ricardo Assunção, Paula Alvito, Roberto Brazão, Paulo Carmona, Catarina Carvalho, Paulo Fernandes, Lea S Jakobsen, Carla Lopes, Carla Martins, Jeanne-Marie Membre, Sarogini Monteiro, Pedro Nabais, Sofie T Thomsen, Duarte Torres Silvia Viegas, Sara M Pires, Géraldine Boué

7\_ Avaliação da intervenção qualitativa na composição nutricional p39  
de refeições escolares: programa *Eat Mediterranean*

*Assessment of the qualitative intervention on school meals’ nutritional composition: program Eat Mediterranean*

Mariana Santos, Sofia Mendes, Ana Dinis, Carla Rascôa, Ana Isabel Rito

8\_ O stress ambiental pode provocar mais alterações nas plantas p44  
do que a engenharia genética

*Environmental stress is the major cause of transcriptomic and proteomic changes in GM and non-GM plants*

Rita Batista, Cátia Fonseca, Sébastien Planchon, Sónia Negrão, Jenny Renaut, M Margarida Oliveira

9\_ Bromo, um contaminante de preocupação emergente em p49  
couve portuguesa

*Bromine, a contaminant of emerging concern in Portuguese cabbage*

Marta Ventura, Inês Delgado, Inês Coelho, Mariana Ribeiro, Marta Ferreira, Maria Helena Costa, Isabel Castanheira



Instituto Nacional de Saúde  
Doutor Ricardo Jorge

**Doenças genéticas**

**10\_ Variantes da hemoglobina com mobilidade eletroforética semelhante à da hemoglobina S p53**

*Hemoglobin variants with electrophoretic behavior similar to hemoglobin S*

Armandina Miranda, Filomena Seuanes, Sandra Copeto, Pedro Loureiro, Isabel Picanço, Alcina Costa, Sandra Costa, Maria Teresa Seixas, João Gonçalves, Paula Faustino

**11\_ CNVs em loci de suscetibilidade com penetrância incompleta: da certeza no diagnóstico à incerteza no prognóstico p57**

*Susceptibility loci CNVs with incomplete penetrance: from an accurate diagnosis to an uncertain prognosis*

Sílvia Serafim, Bárbara Marques, Hildeberto Correia

**12\_ Espectro de alterações moleculares detetadas no gene CYP21A2 associadas a deficiência em 21 hidroxilase p62**

*Spectrum of molecular alterations detected in the CYP21A2 gene associated with 21-hydroxylase deficiency*

Susana Gomes, Iris Pereira-Caetano, Maria Lurdes Lopes, Catarina Limbert, Daniela Amaral, Rosa Pina, Diana Antunes, Inês Carvalho, Teresa Kay, Lurdes Sampaio, Carla Pereira, Oana Moldovan, Ana Berta, Irene Rebelo, Isabel Gaspar, Helena Cardoso, José Cidade Rodrigues, Lina Ramos, Fabiana Ramos, Isabel Dinis, Rita Cardoso, Alice Mirante, João Gonçalves

**Doenças renais crónicas**

**13\_ Informação disponível sobre transplantação renal: Portugal na União Europeia a 28 p67**

*Available information on renal transplantation: Portugal within the European Union of 28*

Bruno A Lima, Helena Alves

## Observação em Saúde Pública - Efetivamente funciona

### *Public Health Observation - Effectively Works*

A aplicação de conhecimento científico à intervenção em saúde tem no início do século XX uma cada vez maior base científica. No entanto, essa evidência não se fica apenas pelos resultados da vigilância epidemiológica, nem pela demonstração da eficácia das intervenções, geralmente obtida em estudos epidemiológicos comparativos e aleatorizados, clínicos ou populacionais, realizados em condições controladas. A evidência da eficiência económica assume, também, papel importante, em especial quando está em questão a equidade do acesso a novas tecnologias. Por fim, a situação real em que determinada intervenção clínica, ou preventiva, irá ser aplicada, determina a medida da sua efetividade, agora avaliada em condições do mundo real.

Conforme alguns episódios recentes têm demonstrado, as pessoas interessadas numa nova medida, curativa ou preventiva, sejam doentes, pessoas em elevado risco, as suas famílias, os médicos ou os decisores políticos, conhecem cada vez melhor as possibilidades técnicas disponíveis, mas nem sempre detêm o conjunto de informação acerca da eficácia, da eficiência e da efetividade dessas mesmas intervenções ou as podem julgar com base na sua experiência profissional.

Já no final do século XX, o início do movimento “medicina baseada na evidência” assumia essa necessidade de rever e conjugar a melhor evidência científica disponível com o conhecimento clínico ou epidemiológico concreto acerca do caso em apreciação para chegar às melhores opções terapêuticas ou preventivas, à seleção e à decisão de intervir sobre um determinado doente, de forma individualizada, ou sobre uma população-alvo, de forma a maximizar os impactos necessários com o menor risco <sup>(1)</sup>.

Uma das questões que então se colocava, e coloca ainda, na preparação dessas intervenções, geralmente terapêuticas, em situação real, concreta, é que se encontram, muitas vezes

conjuntos de indivíduos que pelas suas características não estavam representados nas amostras inicialmente estudadas na investigação acerca da eficácia da intervenção. Essa validade externa dos estudos de investigação, epidemiológica, ou clínica, é cada vez mais necessária à medida que outros fatores são identificados nos patamares causais da doença, da incapacidade e da saúde.

A evidência observacional, que constitui a totalidade dos artigos publicados até hoje neste Boletim, baseada muitas vezes em dados do mundo real “*real world data*” é, assim, relevante e cada vez mais importante na avaliação dos contextos e fatores causais, dos efeitos, e na medição da efetividade e do valor atribuível às medidas terapêuticas clínicas <sup>(2)</sup>, mas também de medicina preventiva ou de saúde pública.

O caso das doenças infecciosas, das quais as doenças evitáveis pela vacinação são exemplo de relevo, exemplificam esta necessidade, em especial numa década em que diferentes taxas de cobertura por vacinas e bolsas de pessoas com diferentes suscetibilidades levam a que um mesmo país ou região tenham realidades epidemiológicas diferentes, cujo conhecimento é essencial antes de qualquer decisão ou intervenção, sem mencionar a carência de medidas de efetividade das vacinas.

Reclama-se atualmente, também, uma epidemiologia mais consequencialista <sup>(3)</sup>, que tenha como objetivo conhecer os fatores e intervenções que reduzem o risco de doença e melhoram o estado de saúde das populações. Esta “nova” abordagem epidemiológica tem como base estudos realizados em amostras representativas e probabilísticas de base populacional, geralmente de grande dimensão, e recolha de informação sobre as várias realidades onde indivíduo se insere (a população, a geografia e o ambiente, a sociedade e a política) assim como informação individual para além da biológica, por exemplo psicológica e comportamental.

O Inquérito Nacional de Saúde (INS) por entrevista, estatística oficial de saúde incluída no sistema estatístico nacional, que o Ministério da Saúde iniciou na década de 80 do século passado no então Departamento de Estudos e Planeamento da Saúde, mantém-se no Observatório Nacional de Saúde (ONSA),

atual Departamento de Epidemiologia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) (4). Em colaboração com o Instituto Nacional de Estatística, foram desde então realizados os 4º e 5º INS (5,6) e o 6º INS, agora em preparação.

Ao longo dos anos, o INSA tem desenvolvido, promovido, publicado e disseminado outros estudos de grande dimensão com estas características, como o Inquérito Serológico Nacional (ISN) (7,8), o Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (IAN-AF) (9,10), o e\_COR (Prevalência de fatores de risco cardiovascular na população portuguesa) (11,12) e o Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF) (13-16). Importa referir o carácter colaborativo destes estudos, realizados em estreita colaboração com entidades externas ao INSA, como é o caso das regiões de saúde e da academia, prática habitual no INSA, mas que importa vincar.

Importará considerar na reestruturação do INSA, em curso, a decisão de basear aquelas funções essenciais de interesse estratégico nacional nos dados, nas amostras e nos resultados do trabalho laboratorial destes estudos epidemiológicos colaborativos de grande dimensão e na sua desagregação regional e mesmo local.

Alimentar-se-ão, deste modo, várias necessidades que extravasam a própria instituição:

- 1) a base regular de evidência de âmbito nacional e subnacional, disponível para apreciação pelos serviços e profissionais de saúde pública, investigadores e decisores, no âmbito da observação em saúde;
- 2) a monitorização programada do estado de saúde, evitando que a necessária repetição periódica de operações de campo complexas dependa de agendas de financiamento não alinhadas com a saúde pública nacional, ou das circunstâncias, como se verificou em 2014/2015;
- 3) a investigação epidemiológica e laboratorial, concretizadas desejavelmente em rede com outras equipas, num mesmo assunto de interesse para a população portuguesa, com uma orientação especial para o estudo dos fatores protetores da saúde e de medidas de efetividade e impacte das intervenções em saúde pública.

#### Carlos Matias Dias

Médico especialista em Saúde Pública,  
Coordenador do DEP

#### Baltazar Nunes

Investigador auxiliar, responsável pela Unidade de  
Investigação Epidemiológica

Departamento de Epidemiologia (DEP)  
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP

#### Referências bibliográficas:

- (1) Sackett DL, Rosenberg WM, Gray JA, et al. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. *BMJ*. 1996 Jan 13;312(7023):71-2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2349778/>
- (2) National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Board on Health Sciences Policy; et al. (eds). *Real-World evidence generation and evaluation of therapeutics: proceedings of a workshop*. Washington, DC: National Academies Press, 2017. <https://doi.org/10.17226/24685>
- (3) Galea S. An argument for a consequentialist epidemiology. *Am J Epidemiol*. 2013;178(8):1185-91. <https://doi.org/10.1093/aje/kwt172>
- (4) Matias Dias C, Graça MJ. *O Inquérito Nacional de Saúde: história, métodos e alguns resultados*. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2000.
- (5) Instituto Nacional de Estatística, Instituto Nacional de saúde Doutor Ricardo Jorge. *Inquérito Nacional de Saúde 2005/2006*, Lisboa: INE, 2009. [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOE\\_Spub\\_boui=69365215&PUBLICACOEStema=55538&PUBLICACOEStema=2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOE_Spub_boui=69365215&PUBLICACOEStema=55538&PUBLICACOEStema=2)
- (6) Instituto Nacional de Estatística, Instituto Nacional de saúde Doutor Ricardo Jorge. *Inquérito Nacional de Saúde 2014*, Lisboa: INE, 2016. [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOE\\_Spub\\_boui=263714091&PUBLICACOEStema=55538&PUBLICACOEStema=2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOE_Spub_boui=263714091&PUBLICACOEStema=55538&PUBLICACOEStema=2)
- (7) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. *Inquérito Serológico Nacional 2015-2016: Infecções Sexualmente Transmissíveis*. Lisboa: INSA IP, 2017. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5402>
- (8) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. *Inquérito Serológico Nacional 2015-2016: Doenças Evitáveis por Vacinação*. Lisboa: INSA IP, 2017. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5401>
- (9) Lopes C, Torres D, Oliveira A, et al.; Consórcio IAN-AF. *Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, IAN-AF 2015-2016: relatório metodológico*. Universidade do Porto, 2017. <https://ian-af.up.pt/sites/default/files/IAN-AF%20Relatorio%20Metodol%C3%B3gico.pdf>
- (10) Lopes C, Torres D, Oliveira A, et al. *Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, IAN-AF 2015-2016: relatório de resultados*. Universidade do Porto, 2017. [https://ian-af.up.pt/sites/default/files/IAN-AF%20Relat%C3%B3rio%20Resultados\\_3.pdf](https://ian-af.up.pt/sites/default/files/IAN-AF%20Relat%C3%B3rio%20Resultados_3.pdf)
- (11) Alves AC, Siopa M, Rato Q, et al. *Novos dados sobre os fatores de risco em Portugal: resultados preliminares do estudo e\_COR (3 regiões): relatório preliminar*. *Anamnéis*. 2014;23(217):20-21. [https://docs.wixstatic.com/ugd/3e50c3\\_6c6a4ed8cb764d99a2fa9ffc86e0e1ce.pdf](https://docs.wixstatic.com/ugd/3e50c3_6c6a4ed8cb764d99a2fa9ffc86e0e1ce.pdf)
- (12) Mariano C, Antunes M, Rato Q, et al. *e\_LIPID: caracterização do perfil lipídico da população portuguesa*. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2015 outubro-dezembro;4(14):7-10. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/3223>
- (13) Nunes B, Barreto M, Gil AP, et al. *The first Portuguese National Health Examination Survey (2015): design, planning and implementation*. *J Public Health (Oxf)*. 2018. [Epub ahead of print] <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdy150>
- (14) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP. *1º Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF 2015): Estado de Saúde*. Lisboa: INSA IP, 2016. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/4115>
- (15) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. *1º Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF 2015): Determinantes de Saúde*. Lisboa: INSA IP, 2017. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/4795>
- (16) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. *1º Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF 2015): Cuidados Preventivos*. Lisboa: INSA IP, 2017. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/4796>

## Preparação das famílias para fazer face a emergências e catástrofes: avaliação após o incêndio de 2017 ocorrido nos concelhos de Pedrógão Grande, Figueiró dos Vinhos e Castanheira de Pera

*Household disaster preparedness: a survey research results after the wildfires in the Pedrógão Grande, Figueiró dos Vinhos and Castanheira de Pera, Portugal, 2017*

Mariana Neto<sup>1,2</sup>, João Pimentel<sup>3</sup>, António Morais<sup>3</sup>, Cristina Santos<sup>4</sup>, António J Ferreira<sup>5</sup>, Pedro L Ferreira<sup>6</sup>

mariana.neto@insa.min-saude.pt

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

(2) Instituto de Saúde Ambiental. Faculdade de Medicina, Universidade Lisboa, Lisboa, Portugal.

(3) Departamento de Saúde Pública, Administração Regional de Saúde do Centro, Lisboa, Portugal.

(4) Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra, Portugal.

(5) Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

(6) Faculdade de Economia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

### Resumo

Os incêndios florestais constituem uma séria ameaça à saúde das populações e ao ambiente. A preparação das famílias para fazer face a desastres e emergências é crucial para a sua proteção e para a resiliência da comunidade. Aproximadamente um ano depois do incêndio florestal de 2017 ocorrido na região portuguesa de Pedrógão Grande, foi realizado um inquérito sobre medidas de preparação, envolvendo uma amostra aleatória e representativa de 330 pessoas da população afetada. Analisaram-se as relações entre as variáveis sociodemográficas e a adoção de medidas básicas de preparação pelas famílias, bem como do índice de preparação, através de *odds ratio*, estimadas por regressão logística. A taxa de resposta ao inquérito foi de 83%. Alimentos que não requerem refrigeração nem preparação culinária e o abastecimento de água foram as medidas de preparação mais referidas (85% e 63% respetivamente). Aproximadamente 79% dos respondentes referiram dispor de um rádio a pilhas e 47% de uma lanterna a pilhas, mas apenas 35% verificava regularmente a carga das pilhas. A forma preferida para obter informações durante um desastre ou emergência era a televisão (36,4%), o telefone (22%) e o rádio (15%). A análise do índice de preparação revela a existência de pequenas diferenças a nível local e que as mulheres tendem a adotar menos medidas de preparação que os homens. A existência de doenças crónicas está relacionada com a adoção de um maior número de medidas de preparação.

### Abstract

Wildfires are a serious threat to populations' health and the environment. Household preparedness for disasters and emergency is crucial to help people to protect themselves and improve community resilience. A survey on preparedness household measures was conducted in 2018 in a random representative sample (n=330) of the population affected by the 2017 wildfire in the Portuguese region of Pedrógão Grande. Associations between sociodemographic variables and the preparedness measures as well the preparedness index were tested by odds ratio estimated by logistic regression. A response rate of 83% was obtained. Non-perishable food and water supplies were the preparedness measures most referred (85% and 63% respectively). To have a battery operated radio (79%) and a flashlight (47%) were also referred but only 35% checked the batteries regularly. The preferred

primary means of getting information during a disaster or emergency were television (36,4%), telephone (22%) and radio (15%). The preparedness index analysis shows a slightly difference at local level and that women tended to be less prepared than men. Having a chronic disease is associated with the adoption of a higher number of preparedness measures.

### Introdução

A 17 de junho de 2017 ocorreu em Portugal um incêndio florestal de grandes proporções que abrangeu vários concelhos da região Centro, com especial gravidade nos concelhos de Pedrógão Grande, Figueiró dos Vinhos e Castanheira de Pera, tendo causado 65 mortes, 30 mil hectares de floresta ardida, perda parcial ou total de mais de 500 casas de habitação e inúmeros prejuízos nas áreas económica e ambiental (1-2).

Apesar de os incêndios florestais serem uma ocorrência comum em Portugal, assim como em muitos países do sul da Europa, prevê-se um aumento de frequência devido ao efeito das alterações climáticas (3). Isto implica que mais populações poderão vir a estar expostas e a sofrer os seus efeitos, pelo que importa melhorar a sua capacidade de resistência e preparação para fazer face a estas e outras catástrofes, naturais ou não. Embora as catástrofes sejam largamente imprevisíveis, os danos por elas causados podem ser mitigados, ou parcialmente prevenidos.

A preparação para emergências na área da saúde está relacionada com a capacidade de resposta dos sistemas de saúde

pública e do sistema prestador de cuidados, comunidades e indivíduos. De um modo geral, estas medidas visam prevenir, proteger, responder com rapidez e recuperar de emergências na área da saúde, particularmente aquelas cuja escala, tempo ou imprevisibilidade ameaçam sobrecarregar as capacidades para fazer face às necessidades do dia-a-dia (4). Segundo as Nações Unidas, a preparação para emergências é o “conhecimento e as capacidades de resposta e recuperação desenvolvidas pelos governos, organizações profissionais, comunidades e indivíduos para efetivamente antecipar, responder e recuperar dos impactos de eventos ou condições provavelmente perigosos, iminentes ou em curso” (5).

A Organização Mundial de Saúde coloca o seu foco de preparação para emergências nos serviços de saúde e na resposta que estes devem dar às necessidades das populações afetadas, prevenindo simultaneamente a rotura da prestação de serviços. Envolvem, entre outros, a preparação dos profissionais de saúde, a manutenção da estrutura e funcionalidade

das instalações de prestação de cuidados de saúde, a manutenção de uma reserva adequada de medicamentos, um sistema de vigilância da saúde e serviços laboratoriais, uma previsão adequada de cuidados de emergência, um seguro estatal/governamental e um fundo de emergência (4,6).

Em relação à preparação individual e das famílias, as medidas propostas são menos sistematizadas e concisas. De acordo com a FEMA, 2004 (7), esta preparação envolve conhecimentos sobre os perigos que podem afetar a família, o desenvolvimento de um plano de emergência para o alojamento, a manutenção de uma reserva de água e de alimentos não perecíveis para todos os elementos da família, o conhecimento da localização de zonas de segurança ou de abrigo para todos os tipos de emergência e o conhecimento dos sistemas de alerta comunitários e vias de evacuação.

Neste sentido, a *Federal Emergency Management Agency* propõe as medidas básicas apresentadas no quadro 1.

**Quadro 1:**  **Recomendações para a preparação domiciliária de emergências e catástrofes.**  
(EUA - *Federal Emergency Management Agency*, 2004)

<b>■ Estar informado</b>	
Ter conhecimento sobre os planos de emergência locais para efeitos de abrigo e evacuação e sobre os contactos locais das pessoas a contactar em caso de emergência ou catástrofe.	
<b>■ Preparar uma reserva mínima para fazer face a desastres e emergências</b>	
A reserva mínima para desastres e emergências é constituída por um conjunto de <i>itens</i> básicos que deve existir no alojamento e que poderão ser necessários no caso de uma emergência:	
Água	Ter em reserva 3 a 4 litros de água por pessoa/dia, para três dias, tanto para beber como para uso sanitário
Alimentos	Ter pelo menos uma reserva de alimentos para três dias que não requeiram frigorífico ou de ser cozinhados
Medicamentos	Ter uma reserva de medicamentos suficiente para três dias para cada doente crónico residente no alojamento
Comunicações	Ter um rádio portátil a pilhas ou acionado por manivela
Iluminação/sinalização	Ter uma lanterna a pilhas ou acionada por manivela
<b>■ Ter um plano</b>	
O plano de emergência deve contemplar o auxílio a membros da família com mobilidade reduzida ou necessidades funcionais específicas, o cuidado de animais de estimação, bem como formas seguras de desligar os equipamentos domésticos.	
O plano deverá ser testado pelo menos duas vezes por ano e ajustado ou atualizado sempre que ocorrerem alterações.	

Adaptado de DeBastiani et al., 2012 (*Centers for Disease Control and Prevention*) (8)

O grau de preparação para emergências varia de acordo com as variáveis sociodemográficas (9) e poderá estar ainda associado à ocorrência de doenças crónicas no agregado familiar (10) e à existência de perturbações psicológicas, por exemplo.

### **\_Objetivo**

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a adoção de medidas básicas de preparação para emergências pela população dos concelhos afetados pelos incêndios de Pedrógão Grande, Figueiró dos Vinhos e Castanheira de Pera relacionadas com a manutenção de uma reserva de alimentos e água, meios de comunicação e medicação para doentes crónicos.

### **\_Métodos**

#### **Desenho do estudo**

Na sequência dos incêndios de 2017 ocorridos nos concelhos de Pedrógão Grande, Figueiró dos Vinhos e Castanheira de Pera foi desenvolvido o Plano Estratégico no âmbito da Saúde Pública, decorrente do n.º 2 da Resolução do Conselho de Ministros n.º 101-A/20, de 12 de julho de 2017 (11). Um dos objetivos desse plano é a recolha *“de evidências que permitam ... aumentar a resiliência das populações em risco e capacitar os serviços de saúde (sistema prestador e saúde pública) para disponibilizarem a resposta adequada às necessidades da população”*.

No âmbito deste plano, foi desenvolvido um inquérito aplicado a uma amostra de 330 pessoas, com idade compreendida entre os 18 e os 79 anos, representativa da população dos três concelhos afetados, estratificada e proporcional por idade, sexo e concelho de residência com extração aleatória a partir da base de dados do Registo Nacional de Utentes.

Para a recolha de dados foram efetuadas entrevistas com suporte *web* (*Computer Assisted Personal Interview*) por uma equipa de colaboradores da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, treinados para o efeito por uma equipa do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e da Administração Regional de Saúde do Centro. O trabalho de campo decorreu entre 19 de março e 7 de maio de 2018.

### **Questionário**

Com base nos dados da primeira vaga deste inquérito foi realizado um estudo transversal baseado nas respostas às perguntas relativas a preparação para emergências, adaptadas do *Disaster Preparedness Module do questionário do Behavioral Risk Factor Surveillance System - BRFSS (Centers for Disease Control and Prevention, 2012)*:

- “Tem, em lugar conhecido e acessível a todos, um rádio a pilhas para, em caso de haver falha de energia, poder estar a par das indicações das autoridades?”*
- “Dispõe, em lugar conhecido e acessível a todos, de uma lanterna a pilhas para o caso de haver falha de energia?”*
- “Tem em sua casa água engarrafada suficiente para três dias para todas as pessoas que vivem consigo? (aproximadamente três litros/pessoa/dia)”*
- “Tem, em sua casa, uma reserva de alimentos que não requerem frigorífico ou necessitem de ser cozinhados, tais como conservas e enlatados?”*

Este grupo de perguntas admitia as respostas “Sim”, “Não”, “Não sabe/Não responde”.

Para efeitos de análise foi criado um índice de preparação para emergências (Pouco ou nada preparado/Preparado ou bem preparado), resultante do somatório destas quatro principais medidas: de 0, 1 e 2 – nada ou pouco preparado; de 3 e 4 – preparado ou bem preparado.

Foi ainda incluída uma pergunta relativa à medicação de doentes crónicos e outra sobre os meios de comunicação escolhidos para receber informação em situação de emergência ou catástrofe:

- “Dispõe de uma reserva de medicamentos para 3 dias para cada doente crónico que vive consigo?” (Sim, Não, Não se aplica (não vive com doentes crónicos), Não sabe/Não responde)*
- “Qual seria o seu principal meio de comunicação para receber informações e indicações das autoridades, no caso de uma catástrofe de grandes dimensões?” (Televisão, Rádio, Internet, Jornais, Vizinhos, Outros)”*.

Foram também consideradas as características sociodemográficas sexo, grupo etário, concelho de residência, atividade económica, situação laboral e as respostas à pergunta "Tem alguma doença crónica ou problema de saúde prolongado? (Sim, Não, Não sabe/Não responde).

### Análise estatística

Foram realizadas análises descritivas para caracterizar os fatores sociodemográficos segundo as medidas adotadas e de acordo com a classificação de preparação para emergências.

As magnitudes das associações foram medidas pelas *odds ratio* (OR) e *odds ratio* ajustadas (ORa) e os respetivos intervalos de confiança a 95%, estimadas pelo modelo de regressão logística. Foi usado o programa de estatística IBM SPSS Statistics V.25, 2017 e o nível de significância dos testes foi fixado em 5%.

### Resultados

Participaram no inquérito 274 pessoas (taxa de adesão de 83%), mas apenas puderam ser considerados 269 participantes, por terem sido detetadas inconsistências nos dados em cinco casos.

A medida de preparação mais frequentemente referida foi a manutenção de uma reserva de alimentos que não requerem frigorífico ou necessitem de ser cozinhados (n=228; 85%), mas apenas 170 (63%) referiram manter uma reserva de água para três dias para cada pessoa do alojamento ([gráfico 1](#)).

Em relação à existência de equipamento a pilhas (com autonomia), 79% (n=212) dos participantes afirmam dispor de uma lanterna a pilhas e 47% (126), referiram dispor de um rádio a pilhas ([gráfico 1](#)). De entre aqueles que usam lanternas e rádio a pilhas (n=219; 81%), apenas 77 (35%) responderam verificar regularmente a carga das pilhas.

Considerando o índice de preparação, 58,2% dos participantes referem estar preparados ou bem preparados. Ou seja, tinham adotado três ou quatro das medidas previstas.

Observou-se uma diferença significativa em Pedrógão Grande, com uma probabilidade menor de adoção de medidas (apenas 45,3% dos participantes deste concelho). As mulheres também têm uma probabilidade menor de adotar a totalidade das medidas (50,7% em comparação com 67,8% dos homens). Os trabalhadores da indústria transformadora também têm uma menor probabilidade (41,5%) de estarem preparados em comparação com trabalhadores de outras atividades económicas ([tabela 1](#)).

Gráfico 1: Adoção de medidas básicas de preparação para emergências, referidas pelos participantes no inquérito (n=269).

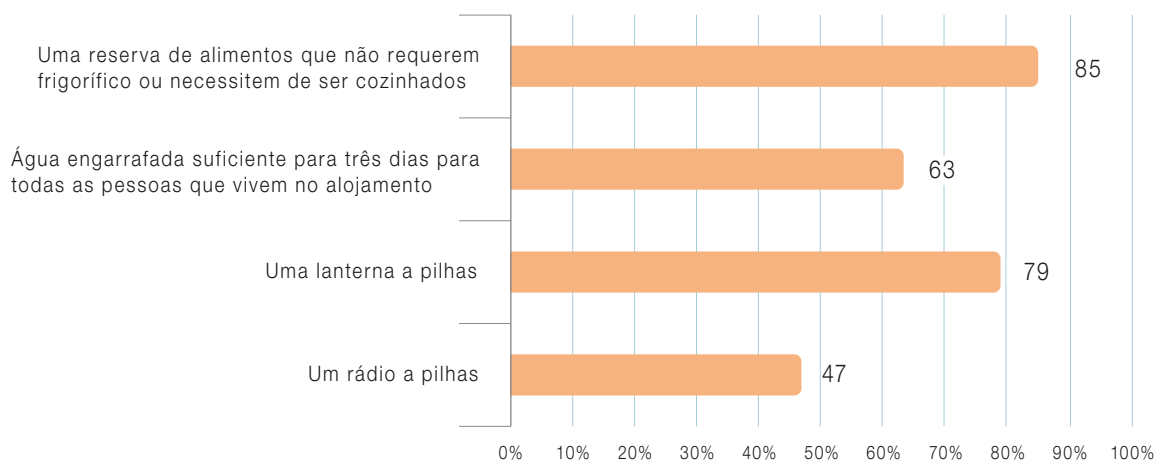


Tabela 1: Preparação das famílias para emergências e catástrofes: índice de preparação.

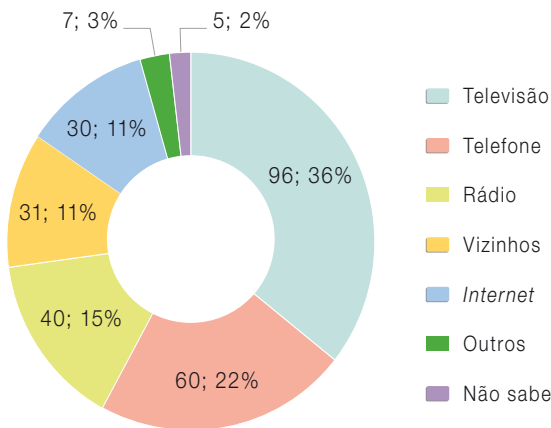
	Preparadas ou bem preparadas	Bivariável		Multivariável	
	n (%)	OR	IC95%	ORa	IC95%
Concelho (n=156)					
Castanheira de Pera	44 (61,1)	1		1	
Figueiró dos Vinhos	83 (62,9)	1,08	0,6 - 1,9	0,93	0,48 - 1,80
Pedrógão Grande	29 (45,3)	0,53	0,27 - 1,04	0,37*	0,17 - 0,83
Género (n=156)					
Masculino	80 (67,8)	1		1	
Feminino	76 (50,7)	0,49**	0,30 - 0,81	0,44**	0,25 - 0,78
Grupo etário (n=156)					
20-39	24 (60,0)	1		1	
40-49	31 (58,5)	0,94	0,41 - 2,17	0,76	0,30 - 1,91
50-59	38 (61,3)	1,06	0,47 - 2,38	0,76	0,31 - 1,87
60-69	39 (55,7)	0,84	0,38 - 1,85	0,48	0,17 - 1,36
70+	24 (55,8)	0,84	0,35 - 2,02	0,55	0,16 - 1,87
Atividade económica (CAE) (n=181)					
Agricultura	22 (59,5)	1		1	
Indústria transformadora	17 (41,5)	0,48	0,20 - 1,20	0,32*	0,11 - 0,87
Construção	21 (84,0)	3,58	1,02 - 12,55	2,13	0,54 - 8,40
Atividades administrativas	10 (58,8)	0,97	0,30 - 3,13	0,63	0,16 - 2,24
Outras atividades de serviço	33 (57,9)	0,94	0,40 - 2,17	0,86	0,34 - 2,18
Produção das famílias para uso próprio	10 (66,7)	1,36	0,39 - 4,80	1,11	0,29 - 4,29
Outras	68 (25,3)	0,84	0,37 - 1,90	0,60	0,24 - 1,50
Situação laboral (n=153)					
Empregado	77 (58,8)	1		1	
Desempregado	13 (50)	0,70	0,30 - 1,63	0,85	0,32 - 2,26
Reformado	51 (57,3)	0,94	0,55 - 1,62	1,41	0,56 - 3,53
Outros	12 (92,3)	1,50	0,57 - 3,93	2,60	0,80 - 8,45

OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança 95%; ORa: odds ratio ajustada. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

Além destes resultados, ser portador de uma doença crónica aumenta a probabilidade de adoção de medidas de proteção (OR=1,7; IC-95%: 1,04-2,8). Verificou-se que 82% (n=220) dos participantes no inquérito referiram coabitar com doentes crónicos, mas destes apenas 93% (n=205) referiram manter uma reserva de medicamentos de três dias para cada um (15 participantes referiram não ter).

Quando inquiridos em relação aos principais meios de comunicação utilizados para receber informações e indicações das autoridades no caso de uma catástrofe de grandes dimensões, (36%) mencionaram a televisão, 22% o telefone (fixo e móvel), 15% o rádio e 11% internet (gráfico 2).

Gráfico 2: ↓ Principal meio de comunicação referido para receber informações e indicações das autoridades em caso de catástrofe (n=269).



De entre os participantes que referiram a televisão como principal meio de comunicação, verificou-se que se tratava de uma preferência sem diferenças significativas em relação ao concelho e ao sexo. Em relação à idade, os participantes com 70 e mais anos preferem a televisão (ORa=2,7; IC95%=1,09-6,83) como fonte de informação em caso de emergência.

Não se detetaram diferenças significativas em relação ao uso do telefone (fixo e móvel). Os participantes de Pedrógão Grande evidenciaram uma preferência menor pelo uso de rádio a pilhas (ORa=0,22; IC95% =0,06-0,81) em relação aos outros dois concelhos e de entre aqueles que preferem a internet como meio de informação, são os mais jovens (20-49 anos) que manifestaram essa preferência, uma vez que os mais velhos (50-59 anos) manifestaram um uso menor (ORa=0,22; IC95%=0,07-0,70).

### Discussão e conclusões

Quando comparados com os valores obtidos nos Estados Unidos em 2012, através do *Behavioral Risk Factor Surveillance System* - BRFSS (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2012) em 14 estados e referente a dados recolhidos em 2006-2010, verificou-se que a proporção de participantes portugueses que afirmavam dispor de lanterna (79%) ou de

rádio a pilhas (47%) era inferior aos valores registados pelo BRFSS (94,8% e 77,7%, respetivamente). No entanto, os portugueses apresentavam uma proporção superior de reserva de água (63% vs 53,6%) e proporções semelhantes de reserva de comida e medicação (85% vs 82,9%; 93% vs 89,7%).

Não se observou qualquer relação com a idade, ao contrário dos resultados obtidos em alguns estudos, que apontam para indivíduos de meia-idade (40-69) ou para os grupos etários mais velhos, que os autores relacionam com a experiência de vida e consequentemente, com uma maior sensibilidade para o problema (8).

À semelhança de outros estudos (9,10), verificou-se que os doentes crónicos têm uma probabilidade estatisticamente significativa de manter em casa uma reserva de medicação que possibilite o controlo da sua doença durante um determinado período de tempo. A proporção relatada de 89% (9) é semelhante à proporção observada no presente estudo (93%).

Verificámos que a maioria prefere meios de comunicação sem autonomia energética (televisão + telefone + internet = 186; 69%), o que poderá ser muito limitativo em caso de falha no fornecimento. Embora muito popular em determinada época, o rádio a pilhas tende a cair em desuso face aos telemóveis e outros dispositivos e verificou-se que são poucos os que examinam regularmente a carga das pilhas (35%). Existem alternativas com autonomia energética acessíveis, como os rádios alimentados por dínamo carregado por fricção (manivela) ou por células fotovoltaicas e estas alternativas devem ser consideradas para efeitos de um kit de emergência (8).

Por questões operacionais, não foram incluídas no presente estudo perguntas relativas a planos familiares de emergência escritos, mas trata-se de um aspeto importante, sobretudo para famílias com crianças, doentes crónicos acamados, com limitações cognitivas, doença mental ou com mobilidade condicionada, não esquecendo os animais de estimação (12,13).

As Autarquias, a Proteção Civil e outros agentes comunitários podem prestar uma ajuda importante através de programas específicos, envolvendo a sinalização destas situações, divulgando informação pertinente e desenvolvendo formas e mate-

rais de apoio que possibilitem a criação e atualização destes planos familiares. Este tipo de programas deverá ser avaliado com regularidade (14,15).

## \_Recomendações

Desenvolver programas comunitários de apoio às famílias para que possam preparar os seus planos de emergência. Além disto, as Autarquias e a Proteção Civil devem fazer simulacros regulares para melhor preparar as famílias para emergências e catástrofes. Este tipo de programas deverá ser avaliado com regularidade.

Ter em atenção as preferências por meios específicos de comunicação, mas incentivar o recurso a equipamentos com autonomia, como por exemplo, os rádios e lanternas alimentados por dínamo carregado por fricção ou por células fotovoltaicas.

Identificar e sinalizar na comunidade as famílias com indivíduos com limitações cognitivas ou de mobilidade, perturbações psicológicas, incapacidade ou com outras dificuldades, com pessoas vulnerabilidades (crianças e idosos, por exemplo) de modo a poderem dispor de medidas de emergência adequadas.

Os profissionais de saúde devem sensibilizar os doentes crónicos que necessitam de medicação continuada para que mantenham uma reserva de medicação para usarem em caso de necessidade e que poderá ser, por exemplo, aviar a receita de manutenção duas semanas antes de esgotar o medicamento em casa.

## Agradecimentos:

Ao Doutor Carlos Dias pela revisão do texto; à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra pela colaboração no trabalho de campo e recolha de dados.

## Referências bibliográficas:

- (1) Assembleia da República. Comissão Técnica Independente. Análise e apuramento dos factos relativos aos incêndios que ocorreram em Pedrogão Grande, Castanheira de Pera, Ansião, Alvaiázere, Figueiró dos Vinhos, Arganil, Góis, Penela, Pampilhosa da Serra, Oleiros e Sertã, entre 17 e 24 de junho de 2017: relatório, outubro 2017. [https://www.parlamento.pt/Documents/2017/Outubro/Relat%C3%B3rioCTI\\_VF%20.pdf](https://www.parlamento.pt/Documents/2017/Outubro/Relat%C3%B3rioCTI_VF%20.pdf)
- (2) Viegas DX (coord). O complexo de incêndios de Pedrógão Grande e concelhos limítrofes, iniciado a 17 de junho de 2017: relatório. Centro de Estudos sobre Incêndios Florestais/Universidade de Coimbra, out. 2017. <https://www.portugal.gov.pt/download-ficheiros/ficheiro.aspx?v=3bb9773b-59fb-4099-9de5-a22fdcad1e3b>
- (3) Programa Nacional para as Alterações Climáticas. [Em linha]. [consult. 15/11/2018]. <https://www.apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=81&sub2ref=117&sub3ref=1376>
- (4) Nelson C, Lurie N, Wasserman J, et al. Conceptualizing and defining public health emergency preparedness. *Am J Public Health*. 2007;97 Suppl 1:S9-11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1854988/>
- (5) United Nations Office for Disaster Risk Reduction. Terminology Disaster Risk Reduction. [Em linha]. [consult. 15/11/2018]. <https://www.unisdr.org/we/inform/terminology>
- (6) World Health Organisation. A Strategic Framework for Emergency Preparedness. Geneva: WHO, 2017. <http://www.who.int/ihr/publications/9789241511827/en/>
- (7) FEMA Independent Study Program. Emergency Management Institute. Are you ready?: An In-depth Guide to Citizen Preparedness. Emmitsburg MD: FEMA, 2004. <https://www.fema.gov/media-library/assets/documents/7877>
- (8) DeBastiani D, Strine TW. Household preparedness for public health emergencies - 14 states, 2006-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2012;61(36):713-9. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6136a1.htm>
- (9) Chan EY, Yue J, Lee P, et al. Socio-demographic Predictors for Urban Community Disaster Health Risk Perception and Household Based Preparedness in a Chinese Urban City. *PLoS Curr*. 2016;8. pii: ecurrents.dis.2871b7fee6f9f4521af441a236c2d519. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5569964/>
- (10) Ko JY, Strine TW, Allweiss P. Chronic conditions and household preparedness for public health emergencies: Behavioral Risk Factor Surveillance System, 2006-2010. *Prehosp Disaster Med*. 2014;29(1):13-20. Epub 2013 Dec 13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5165694/>
- (11) Resolução do Conselho de Ministros n.º 101-A/2017, de 6 de julho. DR 1ª Série 2017-07-12, n.º 133 (1º Supl): 3714-(2)-(4). Aprova a adoção de medidas de carácter extraordinário para fazer face aos danos provocados pelos incêndios ocorridos entre os dias 17 e 21 de junho de 2017 nos municípios de Castanheira de Pera, Figueiró dos Vinhos, Góis, Pampilhosa da Serra, Pedrógão Grande, Penela e Sertã. <https://data.dre.pt/eli/resolconsmin/101-a/2017/07/12/p/dre/pt/html>
- (12) Kruger J, Hinton CF, Sinclair LB, et al. Enhancing individual and community disaster preparedness: Individuals with disabilities and others with access and functional needs. *Disabil Health J*. 2018;11(2):170-173. Epub 2017 Dec 13.
- (13) Smith DL, Notaro SJ. Is emergency preparedness a "disaster" for people with disabilities in the US? Results from the 2006-2012 Behavioral Risk Factor Surveillance System (BRFSS) *Disabil. Soc.* 2015;30(3):401-18.
- (14) Kirsch KR, Feldt BA, Zane DF, et al. Longitudinal Community Assessment for Public Health Emergency Response to Wildfire, Bastrop County, Texas. *Health Secur*. 2016;14(2):93-104.
- (15) MacDougall C, Gibbs L, Clark R. Community-based preparedness programmes and the 2009 Australian bushfires: policy implications derived from applying theory. *Disasters*. 2014;38(2):249-66.

## Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral: infeções TORCH em crianças com paralisia cerebral nascidas em 2001-2010

Portuguese National Surveillance of Cerebral Palsy: TORCH infection in children with cerebral palsy born in 2001-2010

Teresa Folha<sup>1</sup>, Daniel Virella<sup>2</sup>, Ana Cadete<sup>3</sup>, Eulália Calado<sup>4</sup>, José Joaquim Alvarelhão<sup>5</sup>, Rosa Gouveia<sup>6</sup>, Teresa Gaia<sup>7</sup>, Carla Conceição<sup>8</sup>, Maria da Graça Andrada<sup>7</sup>; 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) Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais do Hospital Dona Estefânia, Centro Hospitalar de Lisboa Central, Lisboa, Portugal.

(3) Serviço de Medicina Física e de Reabilitação, Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca, Amadora, Portugal.

(4) Hospital CUF Descobertas, Lisboa, Portugal.

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

(6) Sociedade Portuguesa de Pediatria do Neurodesenvolvimento, Sociedade Portuguesa de Pediatria, Coimbra Portugal

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

(8) Consultora de Neuroimagem - Área de Neurociências, Centro Hospitalar de Lisboa Central, Lisboa, Portugal.

### \_Resumo

As infeções TORCH são causa de perturbação neurosensorial grave no feto e recém-nascido, podendo ser causa ou associar-se à paralisia cerebral (PC). Os registos do Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral (PVNPC) foram usados para identificar e caracterizar, aos 5 anos de idade, as crianças com PC e infeção TORCH, nascidas em 2001-2010, e estimar a frequência desta associação em Portugal. Foi estimada a prevalência da associação da PC à infeção TORCH em 5,8% (IC95% 4,64-7,29). Os agentes infecciosos mais frequentemente registados foram: citomegalovirus (45 casos), vírus da imunodeficiência humana (15 casos) e *Treponema pallidum* (6 casos), a grande maioria em crianças nascidas em Portugal. Nas crianças com PC e infeção TORCH predomina o tipo clínico de PC espástica bilateral com 4 membros afetados, sendo frequentes morbilidades e défices associados. Na ressonância magnética encefálica é mais frequente o predomínio das lesões do 1º e 2º trimestres da gestação. A prevenção primária, parece ter maior potencial de sucesso quando pré-natal, no início da gestação ou na transmissão perinatal. A elevada suspeição clínica e epidemiológica poderá aumentar o sucesso da prevenção terciária. Os dados da vigilância epidemiológica nacional ajudam a entender e aplicar estratégias de prevenção na PC associada à infeção TORCH.

### \_Abstract

TORCH infection causes severe foetal and neonatal disease and neurological disorders, such as cerebral palsy (CP) may occur. Data from the Portuguese National Surveillance of Cerebral Palsy (PVNPC) are used to characterize, at 5 years of age, children with CP born 2001-2010 with TORCH infection and to estimate the prevalence of the the association in Portugal. The prevalence of the association of CP with TORCH infection was estimated in 5.8% (95%CI 4.64-7.29). The infectious agents most frequently registered were cytomegalovirus (45), HIV (15) and *Treponema pallidum* (6), the large majority are children born in Portugal. The predominant clinical type in children with CP and TORCH infection is bilateral spastic CP with 4 affected limbs, frequently with associated morbidity and functional impairments. Cranial magnetic resonance shows mostly

predominant lesions originated in the 1st and 2nd trimester of pregnancy. These results highlight the potential for primary prevention, with higher potential for success in cases of either prenatal or early gestational infection or perinatal transmission; high clinical and epidemiological suspicion can increase the success of tertiary prevention. Data from national epidemiologic surveillance contribute to better understand and implement strategies to prevent CP associated to TORCH infection.

### \_Introdução

A paralisia cerebral (PC) é um conjunto amplo de condições clínicas permanentes, mas não inalteráveis, com afectação da função motora, movimento e/ou postura, devidas a interferência/lesão/anomalia não progressiva do desenvolvimento do cérebro imaturo (*Surveillance of Cerebral Palsy in Europe* - SCPE) (1). É a deficiência motora mais comum na infância, persistindo na adolescência e idade adulta. Condiciona esforço familiar e social relevantes e um gasto avultado de recursos.

A vigilância epidemiológica da PC proporciona um indicador importante dos cuidados de saúde maternos e perinatais (2). Portugal conta desde 2006 com o Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral (PVNPC), o primeiro registo de PC com dimensão nacional na Europa, associado desde 2007 à SCPE e, desde 2016, ao *Joint Research Centre* da Comissão Europeia, integrando a Plataforma Europeia de Registos de Doenças Raras. Desde abril de 2018, o Instituto

artigos breves\_ n. 2

Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge integra o consórcio que suporta o PVNPC, contribuindo para a vertente científica e a articulação com outros programas de registo e vigilância.

A associação da PC com infeção por citomegalovirus (CMV) está estudada (3), mas a associação ao conjunto das infeções TORCH carece de caracterização quanto à sua frequência, gravidade clínica e funcional, e factores de risco associados.

### \_Objetivos

Caracterizar as crianças com PC nascidas na década de 2001-2010 com infeção TORCH e estimar a frequência da associação.

### \_Métodos

O PVNPC desenvolve a vigilância activa de casos de PC em Portugal, fazendo o seu registo e caracterização na idade recomendada de 5 anos de idade, seguindo o protocolo comum da SCPE (4), que inclui a definição e classificação da PC, instrumentos de avaliação funcional, imagiológica (5) e de morbilidade associada. Para os efeitos deste estudo, consideraram-se infeções TORCH as definidas pela Rede Nacional de Vigilância Laboratorial e Clínica de Infeções Congénitas (TORCHnet) (6). Foram estudados os casos de PC notificados ao PVNPC até setembro de 2018, nascidos em 2001-2010, avaliados em 2006-2016. Foram estimadas proporções e *odds ratio* (OR) com intervalos de confiança de 95% (IC95%); compararam-se proporções com testes qui-quadrado e exato de Fisher, conforme adequado. Foram usados os programas IBM SPSS Statistics V25 e OpenEpi (7).

### \_Resultados

Foram notificadas ao PVNPC 1731 crianças com PC nascidas entre 2001 e 2010, 125 não nascidas em Portugal (7,2%). Obteve-se informação sobre infeção TORCH em 1202/1731 casos (69,4%), 60/1202 não nascidas em Portugal (5,25%). Identificaram-se 70/1202 crianças com registo de infeção TORCH (5,8%; IC95% 4,64-7,29), correspondendo a 63/1142 nascidos em Portugal (5,5%; IC95% 4,34-7,0) e 7/60 não nascidos em Portugal (11,7%; IC95% 5,77-22,18) ( $p=0,047$ ).

As infeções identificadas estão referidas na [tabela 1](#). Os agentes mais frequentemente registados foram o CMV (45 casos

[40 nascidos em Portugal], 3 em coinfecção), o VIH (15 casos [13 nascidos em Portugal], 2 em coinfecção) e o *Treponema pallidum* (6 casos, todos nascidos em Portugal).

A ressonância magnética (RM) encefálica (802/1202 casos) revela padrões de lesão diferentes ( $p<0,001$ ), sendo nas crianças com PC e infeção TORCH mais frequentes as lesões do 1º e 2º trimestres (anomalias congénitas) (40% vs. 11,7%) e as classificadas em Diversos (32,5% vs. 10,2%) ([tabela 2](#)). O padrão de tipos clínicos de PC é diferente ( $p=0,002$ ), sendo mais frequente nas crianças com infeção TORCH a PC espástica bilateral com afectação de 4 membros (59,4% vs. 35,9%; OR 2,6; IC95% 1,59-4,32). A epilepsia é mais frequente nas crianças com PC e infeção TORCH (55,6% vs. 43,6%; OR 1,6 IC95% 0,97-2,72;  $p=0,042$ ). São também mais frequentes e mais graves os défices neurossensoriais e cognitivo.

As crianças com PC e infeção TORCH nasceram mais frequentemente de mães mais jovens ( $p=0,001$ ), de gestação de termo e leves para a idade gestacional (37% vs. 17%;  $p<0,001$ ).

**Tabela 1:** Agentes de infeções TORCH identificadas em crianças com paralisia cerebral nascidas em 2001-2010, registadas no Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral.

Agentes referidos no registo	n	%
Citomegalovirus (CMV)	42	60
CMV + Vírus da Imunodeficiência Humana	2	2,9
CMV + Vírus da rubéola	1	1,4
Vírus Herpes simplex	2	2,9
Vírus da Imunodeficiência Humana	12	17,1
Vírus da rubéola	2	2,9
<i>Treponema pallidum</i>	6	8,6
<i>Toxoplasma gondii</i>	1	1,4
Apenas referida infeção do grupo TORCH	2	2,9
Total	70	100

**Tabela 2:** Classificação da ressonância magnética em crianças com paralisia cerebral nascidas em 2001-2010, registadas no Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral com e sem referência a infeção TORCH.

Padrão predominante de lesão na ressonância magnética	Infeção TORCH (n=40)	Não Infeção TORCH (n=762)
A – Malformações: padrões do 1º e 2º trimestres	16 (40%)	89 (11,7%)
B – Lesão predominante da substância branca: padrões precoces do 3º trimestre	4 (10%)	309 (40,6%)
C – Lesão predominante da substância cinzenta: padrões tardios do 3º trimestre	6 (15%)	243 (31,9%)
D – Diversos ( <i>miscellaneous</i> )	13 (32,5%)	78 (10,2%)
E – Normal	1 (2,5%)	43 (5,6%)

Classificação da ressonância magnética em idade pós-neonatal, baseada no padrão predominante de lesão que possa provocar o padrão clínico predominante da paralisia cerebral <sup>(5)</sup>.

## \_Discussão

A prevalência de infeção TORCH registada em Portugal nas crianças com PC foi de cerca de 6%, possivelmente mais frequente entre os casos não nascidos em Portugal. Em Portugal existem dados actuais e abrangentes referentes à infeção congénita e perinatal por CMV na população geral de recém-nascidos, estimada em  $6,6 \times 10^5$  (IC95% 4,81-8,92) <sup>(9)</sup>. Apesar de ser uma estimativa referente apenas a CMV e de reflectir provavelmente subdiagnóstico e subnotificação, é a infeção TORCH mais frequente, sugerindo que, nas crianças com PC, a associação é muito mais frequente do que na população em geral.

Existe a percepção de que, no seu conjunto, infeção TORCH seja uma condição subdiagnosticada, quer na população em geral quer nas crianças com PC, pois é de difícil confirmação, particularmente quando se investiga tardiamente a etiologia da PC, dada a heterogeneidade e carácter multifactorial dos agentes, da apresentação clínica e do padrão neuroimagiológico.

A PC espástica bilateral com afectação de 4 membros é o tipo clínico mais frequente nas crianças com infeção TORCH (59,4%), estimando-se que esta forma muito grave de PC tenha uma possibilidade cerca de 2,5 vezes maior de ocorrer quando a PC se associa à infeção TORCH. Apesar de se tratar do tipo clínico típico da criança com PC nascida a termo <sup>(4)</sup>, estas crianças com PC e infeção TORCH raramente apresentam clínica de hipóxia perinatal e a RM mostra

maioritariamente lesões predominantes com origem no 1º e no 2º trimestres da gestação, sugerindo o efeito directo e precoce dos agentes no encéfalo em desenvolvimento.

Os agentes registados mais frequentemente (CMV, VIH, sífilis) sugerem poder haver potencial de prevenção da transmissão vertical e da gravidade da afeção se houver diagnóstico e tratamento precoces. As lesões encontradas na RM (*vide supra*) sugerem maior potencial de sucesso se o tratamento ocorrer precocemente, antes ou no início da gestação; no entanto, nas situações de risco ou de certeza de transmissão perinatal (sífilis, VIH, CMV), o tratamento específico logo após o nascimento poderá estar fortemente recomendado. As características identificadas que potencialmente permitiriam identificar gestações e crianças em risco (mães jovens, recém-nascidos de termo e leves para a idade gestacional, anomalia congénita encefálica) abrem alguma expectativa de poderem contribuir para o diagnóstico e para a intervenção precoces.

## \_Conclusões

Sendo a proporção de casos graves de PC mais frequente do que nas crianças com PC sem infeção TORCH, é importante haver elevada suspeição clínica e epidemiológica para permitir a sua prevenção (primária e secundária) e iniciar precocemente a intervenção de reabilitação. A vigilância epidemiológica da PC permite obter informação rigorosa para auxiliar a suspeição clínica e a planificação de cuidados.

**Referências bibliográficas:**

- (1) Surveillance of Cerebral Palsy in Europe. Surveillance of cerebral palsy in Europe: a collaboration of cerebral palsy surveys and registers. *Dev Med Child Neurol.* 2000;42(12):816-24. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2000.tb00695.x>
- (2) EURO-PERISTAT Project with SCPE and EUROCAT. European perinatal health report: health and care of pregnant women and babies in Europe in 2010. May 2013. <http://www.europeristat.com/reports/european-perinatal-health-report-2010.html>
- (3) Dakovic I, da Graça Andrada M, Folha T, et al. Clinical features of cerebral palsy in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Eur J Paediatr Neurol.* 2014;18:618-23.
- (4) Virella D, Folha T, Andrada MG, et al. Vigilância nacional da paralisia cerebral aos 5 anos de idade: crianças nascidas entre 2001 e 2007. 2ª ed. Lisboa: Federação das Associações Portuguesas de Paralisia Cerebral, 2017.
- (5) Himmelmann K, Horber V, De La Cruz J, et al.; SCPE Working Group. MRI classification system (MRICS) for children with cerebral palsy: development, reliability, and recommendations. *Dev Med Child Neurol.* 2017;59:57-64. Epub 2016 Jun 21. <https://doi.org/10.1111/dmcn.13166>
- (6) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Rede Nacional de Vigilância Laboratorial e Clínica de Infecções Congénitas | TORCHnet [Em linha]. (consult. 26/9/2018). <http://www.insa.min-saude.pt/category/areas-de-atuacao/doencas-infeciosas/rede-nacional-de-vigilancia-laboratorial-e-clinica-de-infecoes-congenitas/>
- (7) Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version 2.3.1. [Em linha] [consult. 26/9/2018]. [www.openepi.com](http://www.openepi.com)
- (8) Paixão P, Brito MJ, Virella D, et al. Maternal recurrent CMV infection associates with symptomatic congenital infection in the offspring: data from the surveillance of congenital cytomegalovirus infection in Portugal. 2018. (no prelo)

## Utilização dos cuidados de saúde na presença de síndrome gripal: descrição das épocas 2011/2012 a 2016/2017

Use of health care during influenza season: seasons 2011/2012 to 2016/2017

Irina Kislaya, Ausenda Machado, Verónica Gomez, Ricardo Mexia

irina.kislaya@insa.min-saude.pt

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

### \_Resumo

A gripe é uma doença respiratória aguda que, apesar de normalmente benigna, pode ter um curso mais severo, com impacto nos serviços de saúde. O objetivo deste estudo é caracterizar o comportamento de procura de cuidados de saúde numa amostra da população portuguesa face a sintomatologia de gripe (SG). Realizou-se um estudo descritivo com base na informação recolhida pelo sistema de vigilância participativa Gripenet, nas épocas de gripe de 2011/2012 a 2016/2017. Entre 2011/2012 e 2016/2017 foram identificados 4196 casos de SG. Do total dos casos, 71,3% (IC95%: 69,9-72,6) referiu não ter recorrido a nenhum serviço de saúde; 11,4% (IC95%: 10,4-12,4) referiu uma consulta de Medicina Geral e Familiar (MGF) e 6,2% (IC95%: 3,2-6,5) terá recorrido a uma urgência/serviço hospitalar. O estudo revelou que a maioria das pessoas não recorre a nenhum serviço de saúde, sendo a consulta de MGF o serviço mais utilizado numa situação de SG.

### \_Abstract

Influenza is an acute respiratory disease that although usually benign, can have severe form, with impact in health services use. The objective of this study is to characterize the health seeking behaviour on a Portuguese population sample regarding influenza like illness (ILI). We conducted a descriptive study based on data collected through the online collaborative system, Gripenet, in influenza seasons from 2011/12 to 2016/17. From all cases collected in 2011/12-2016/17 (n=4196), 71.3% [95%CI: 69.9-72.6] didn't consult with any health service; 11.4% [10.4-12.4] reported having had a GP appointment and 6.2% [95%CI: 5.6-7.0] recurred to the ER/hospital. This study shows that the majority of ILIs does not seek any health services and the use of GP services was the most frequent service.

### \_Introdução

A gripe é uma doença respiratória aguda, provocada pelo vírus influenza, normalmente benigna e responsável por epidemias sazonais. Contudo, a gripe pode ser uma doença mais severa com impacto na procura de cuidados de saúde. Anualmente, estima-se que o vírus influenza seja responsável por 3 a 5 milhões de casos de doença grave e por 250 mil a 500 mil mortes em todo o mundo <sup>(1)</sup>.

A informação resultante dos sistemas de monitorização e vigilância da gripe apoiam o planeamento, implementação e avaliação das estratégias de prevenção. Atualmente, o Gripenet <sup>(2)</sup> é o único sistema de monitorização de base populacional e não dependente da procura de cuidados existente em Portugal para a vigilância da gripe.

Este sistema de vigilância participativa, em que qualquer cidadão residente em Portugal pode voluntariamente participar, conta com mais de 2000 participantes ativos que respondem a questionários *online* entre novembro e maio, permitindo a monitorização da epidemia sazonal. Adicionalmente, o *website* <http://www.gripenet.pt>, que serve de suporte ao projeto, está disponível durante todo o ano, fornecendo informação sobre a doença e as temáticas com ela envolvidas, sendo o maior repositório de conteúdos *online* em língua portuguesa sobre a gripe.

O sistema integra ainda o consórcio europeu Influenzanet <sup>(3)</sup>, ([www.influenzanet.eu](http://www.influenzanet.eu)) que faz a análise, apresentação e divulgação dos dados a nível europeu.

### \_Objetivo

O presente estudo teve como objetivo caracterizar o comportamento de procura de cuidados de saúde numa amostra da população portuguesa face a sintomatologia de gripe (síndrome gripal-SG).

### \_Métodos

Realizou-se um estudo epidemiológico descritivo com base na informação recolhida em seis épocas (2011/2012 a 2016/2017) pelo sistema de vigilância participativa Gripenet.

Este sistema de base comunitária consiste na notificação semanal, através da *internet*, de um conjunto de sintomas clínicos e dos comportamentos deles decorrentes. Para este estudo analisaram-se a procura de cuidados de saúde (consultas de medicina geral e familiar - MGF, urgência/serviço hospitalar e outros) e o recurso ao serviço telefónico (SNS 24) dos indivíduos com SG.

Para este estudo utilizou-se a definição de SG da União Europeia (4): início súbito de sintomas, 1 sintoma respiratório (tosse, dificuldade respiratória, dor de garganta) e 1 sintoma sistémico (febre, mialgia, mal-estar, dor de cabeça). Para avaliar as diferenças nos comportamentos por época, utilizou-se o teste de Qui-quadrado, com um nível de significância de 5%.

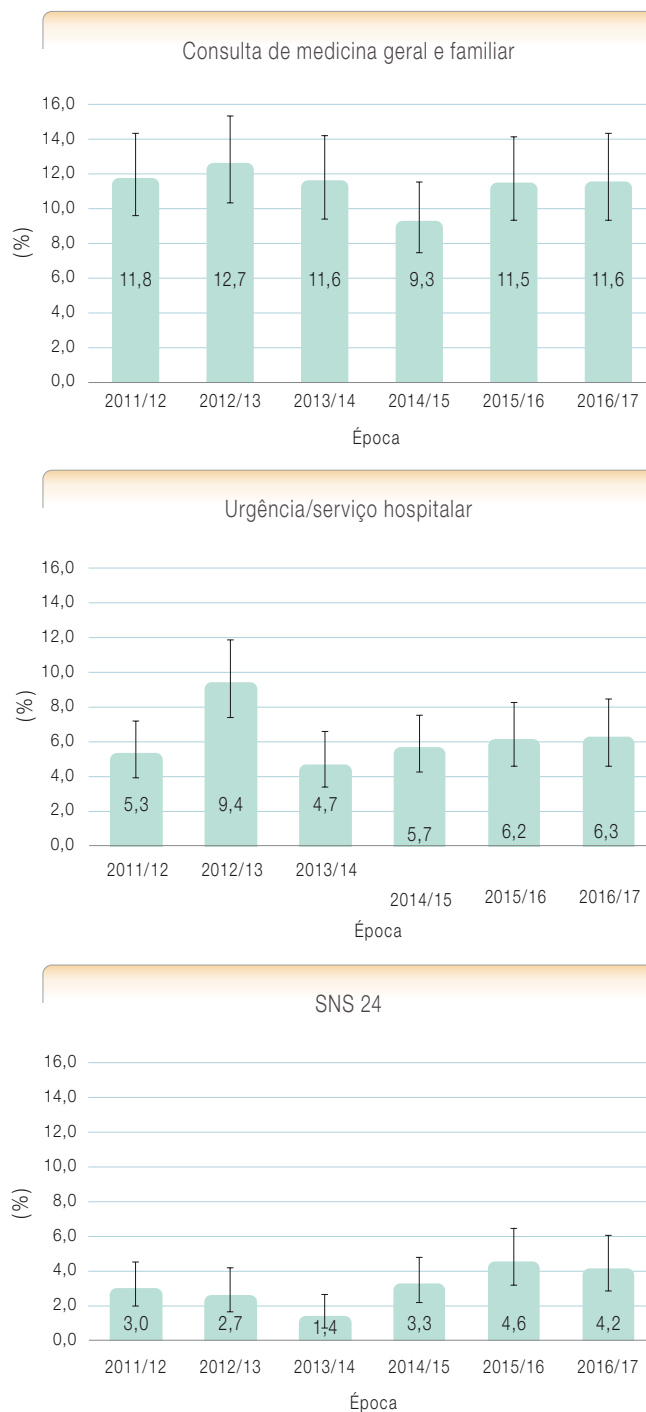
## \_Resultados

Nas seis épocas de gripe estudadas entre 2011/2012 e 2016/2017 foram identificados na base de registos de Gripenet, 4196 casos de SG, com idade entre os 1 e 86 anos, dos quais 39,8% eram do sexo masculino.

A maioria dos indivíduos (71,3%; IC 95%: 69,9 a 72,6) referiu não ter recorrido a nenhum serviço de saúde. Do total de notificações, 11,4% [10,4% a 12,4%] referiu o recurso a uma consulta de MGF e 6,2% [5,6% a 7,0%] terá recorrido a urgência/serviço hospitalar. No gráfico 1 encontra-se discriminada a evolução ao longo das seis épocas em estudo.

Nas seis épocas em análise não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no recurso às consultas de MGF ( $p=0,464$ ). Contudo, verificou-se uma utilização mais frequente de urgências/serviços hospitalares em 2012/2013 (9,4%) comparativamente às restantes épocas (4,7% em 2013/2014 a 6,3% em 2016/2017) ( $p=0,007$ ). A utilização do serviço SNS 24 variou significativamente ( $p=0,015$ ) entre 1,4% [0,7% a 2,7%] em 2013/2014 e 4,6% [3,2% a 6,5%] em 2015/2016 (gráfico 1).

Gráfico 1: ↓ Proporção de indivíduos com SG que referiram ter procurado os cuidados de saúde nas épocas 2011/2012 a 2016/2017. (n=4196 casos de SG)



Fonte: Gripenet.

## Discussão e conclusões

Os resultados deste estudo preliminar revelam que a maior parte da população não recorre a nenhum serviço de saúde numa situação de síndrome gripal. O serviço mais referido foi o dos cuidados de saúde primários, sendo a frequência de utilização de uma consulta de MGF estável ao longo das épocas, o que está de acordo com o descrito em outros estudos (5).

O recurso a urgência/serviço hospitalar variou ao longo das épocas, sendo mais elevado numa época com cocirculação de vírus do tipo A(H1) e B (linhagem Yamagata). Considerando que existe um diferencial de circulação de vírus associado à idade (6), a distribuição etária dos participantes na plataforma Grippenet pode ser uma explicação para este resultado, dada a sub-representação de crianças e idosos.

O recurso ao serviço SNS 24 foi referido por 3,7% dos casos notificados no período em estudo. Este resultado surpreende, na medida em que seria expectável que quem participa num sistema de vigilância participativa *online* pudesse ter uma utilização mais frequente de uma ferramenta de aconselhamento e encaminhamento à distância.

Tendo em conta as recomendações, poderá ser importante aumentar a literacia da população para melhor gerir episódios de gripe, incentivando a utilização de serviços como SNS 24, reduzindo, assim, a procura dos cuidados de saúde presenciais.

Esta informação é importante para o planeamento de serviços de saúde durante a epidemia de gripe, pois permite um dimensionamento da capacidade de resposta adequado ao volume da procura, determinado em monitorização permanente e tempo útil.

## Agradecimento:

Agradece-se a todos os participantes no Grippenet.

## Referências bibliográficas:

- (1) Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, et al; Global Seasonal Influenza-associated Mortality Collaborator Network. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*. 2018;391(10127):1285-1300. Epub 2017 Dec 14.
- (2) van Noort SP, Muehlen M, Rebelo de Andrade H, et al. Grippenet: an internet-based system to monitor influenza-like illness uniformly across Europe. *Euro Surveill*. 2007;12(7):E5-6. <https://doi.org/10.2807/esm.12.07.00722-en>
- (3) Koppeschaar CE, Colizza V, Guerrisi C, Turbelin C, et al. Influenzanet: citizens among 10 countries collaborating to monitor influenza in Europe. *JMIR Public Health Surveill*. 2017;3(3):e66. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5627046/>
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza case definitions. [Em linha] (consult. 20/10/2018). <https://ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/surveillance-and-disease-data/eu-case-definitions> <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018D0945&from=EN#page=24>
- (5) Peppas M, John Edmunds W, Funk S. Disease severity determines health-seeking behaviour amongst individuals with influenza-like illness in an internet-based cohort. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):238. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC28359335/>
- (6) Skowronski DM, Chambers C, De Serres G, et al. Age-Related Differences in Influenza B Infection by Lineage in a Community-Based Sentinel System, 2010-2011 to 2015-2016, Canada. *J Infect Dis*. 2017;216(6):697-702. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5853978/>

## Variantes genéticas do gene *IFITM3* revelam um potencial modificador da gravidade sintomática da gripe

### Genetic variants of the *IFITM3* gene reveal a potential modifier of influenza severity

Suzana David<sup>1,2</sup>, Vanessa Correia<sup>3</sup>, Liliana Antunes<sup>4</sup>, Ricardo Faria<sup>1</sup>, José Ferrão<sup>1</sup>, Paula Faustino<sup>1,5</sup>, Baltazar Nunes<sup>4</sup>, Fernando Maltez<sup>6</sup>, João Lavinha<sup>1,7</sup>, Helena Rebelo de Andrade<sup>3,8</sup>

suzana.david@insa.min-saude.pt

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

(2) Centro de Estudos de Ciência Animal. Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

(3) Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

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

(5) Instituto de Saúde Ambiental. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

(6) Serviço de Doenças Infecciosas. Hospital de Curry Cabral, Centro Hospitalar de Lisboa Central, Lisboa, Portugal.

(7) BiolSI. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(8) Centro de Patogénese Molecular. Unidade de Retrovirus e Infeções Associadas. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

### \_Resumo

As epidemias de gripe representam um sério problema de saúde pública com elevados custos económicos. Foi sugerido que um dos alelos do gene *IFITM3* (rs12252-C) constitui um importante fator de risco de base populacional para as formas graves da gripe por infeção pelo vírus A(H1N1)pdm09. Analisámos variantes do *IFITM3* associadas à gravidade da doença em doentes portugueses (n=41). Foram identificados sete SNPs no amplicão de 352bp do *IFITM3* em torno do rs12252. De acordo com HapMap, o SNP rs34481144 pertence ao mesmo bloco de desequilíbrio de ligação (LD) que rs12252, e está em LD com rs6421983. A associação negativa com formas sintomáticas graves em relação a ligeiras observada para o alelo rs34481144-A é sugestiva de um efeito protetor no modelo de hereditariedade dominante. Para além disso, o haplótipo Hap4 com rs34481144-A, e sem o rs12252-C, mostrou estar significativamente associado a gripe sintomaticamente ligeira. Por outro lado, apesar de a um nível de significância limiar, o haplótipo Hap1 com rs34481144-G, sem rs12252-C, mostrou-se associado à gripe com sintomatologia grave. Em comparação com a população portuguesa em geral, foram observadas diferenças significativas nas frequências do alelo possivelmente protetor rs34481144-A no grupo com sintomatologia grave, do Hap1 deletério no grupo com sintomatologia ligeira e do Hap4 protetor no grupo com doença grave. A proporção de casos com sintomas graves que poderiam ser evitados se todos os indivíduos da população apresentassem o alelo protetor rs34481144-A foi estimada em 56% e 64%, respetivamente na população em geral e no grupo de indivíduos com doença ligeira. A implicação destas variantes nos fenótipos da doença necessita de estudos de validação, nomeadamente de natureza funcional.

### \_Abstract

Influenza epidemics are a serious global public health and economic problem. The *IFITM3* allele (rs12252-C) was suggested as a strong population-based genetic risk factor for severe influenza virus infection by A(H1N1)pdm09. We analyzed *IFITM3* variants for association to influenza severity in Portuguese patients (n=41). Seven SNPs, within the 352bp

*IFITM3* amplicon around rs12252, were identified. According to HapMap SNP rs34481144 belongs to the same linkage disequilibrium (LD) block as rs12252, and is in strong LD with rs6421983. A negative association with severe relative to mild disease was observed for allele rs34481144-A, indicating a protective effect under the dominant model. Moreover, haplotype Hap4 with rs34481144-A, not including rs12252-C, was significantly associated to mild influenza. Conversely, although with borderline significance, haplotype Hap1 with rs34481144-G, not including rs12252-C, was associated to severe disease. Moreover, in comparison to the general Portuguese population, statistical significant differences in the frequencies of the protective allele rs34481144-A in the severe disease group, the deleterious Hap1 in the mild disease group and the protective Hap4 in the severe disease group, were observed. The population attributable risk (PAR) for the targeted rs34481144 allele or genotype was of 55.91% and 64.44% in the general population and the mildly infected individuals, respectively. Implication of these variants in disease phenotype needs further validation, namely through functional analysis.

### \_Introdução

As epidemias de gripe sazonal são responsáveis por elevada morbidade e mortalidade a nível mundial (1). O seu impacto na saúde global e na economia impulsionaram a pesquisa das bases genéticas da predisposição à gripe.

Em resposta a uma infeção viral aguda, o sistema imunitário do hospedeiro induz a síntese de moléculas antivirais tais como as proteínas transmembranares da família IFITM que estão envolvidas (i) no sequestro viral, (ii) no bloqueio de recetores virais, e (iii) na restrição da endocitose/fusão, podendo assim inibir a

replicação de vários tipos de vírus incluindo o da gripe, um Ortomixovírus (2). No gene de uma dessas proteínas, a *IFITM3*, o alelo C do polimorfismo (SNP) do locus rs12252, foi associado a sintomas graves da gripe causada pelo vírus pandémico A(H1N1)pdm09 em várias populações. Este alelo, raro nas populações com ancestralidade europeia mas muito comum nas populações do Extremo Oriente, poderá representar um fator de risco populacional importante (3-6).

### \_Objetivo

Investigar a associação do genótipo *IFITM3* na região do SNP rs12252-C com a gravidade sintomática da gripe, causada pelo vírus A(H1N1)pdm09, em doentes da população portuguesa.

### \_Material e métodos

#### Sujeitos

Foram selecionados 41 doentes portugueses com infeção confirmada pelo vírus A(H1N1)pdm09 e classificados entre doentes com formas ligeiras da doença recebendo tratamento ambulatorio e doentes com formas graves da doença recorrendo às Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Os critérios de admissão às UCI foram pneumonia ou dispneia. Para efeitos comparativos foram também selecionadas 200 amostras da população geral portuguesa provenientes de uma amostragem de conveniência, do Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (DGH/INSA). As amostras foram anonimizadas antes da investigação.

#### Genotipagem

A extração do ADN genómico dos pacientes foi efetuada a partir de leucócitos periféricos no MagNA Pure LC (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e a partir de exsudados nasais utilizando o kit QIAamp® Viral RNA Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os primers direto e reverso: 5'-GGAACTGTTGAGAAACCGAA-3' e 5'-CATACGCACCTTCACGGAGT-3'(4) foram utilizados na amplificação por PCR de um fragmento de 352 pb no primeiro exão do gene *IFITM3* (chr11: 320556 -320907, GRCh38/hg38). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados por eletroforese capilar ABI-3130 XL (Applied Biosystems, MA, EUA).

As sequências foram analisadas com o programa FinchLa™ (Geospiza). Os haplótipos foram reconstruídos a partir dos dados genómicos para os 7 SNPs do amplicão do gene *IFITM3* pelo programa PHASE 2.1 (7,8). A anotação alélica atribuída ao haplótipo (Hap) seguiu a seguinte ordem: (5'>3'): rs34481144 c.-23G>A (5' UTR); rs1136853 c.9C>A (p.His3Gln); SNP codão 11 c.33T>C (p.Pro11Pro); rs12252 c.42T>C (p.Ser14Ser); rs56323507 c.51C>T (p.Pro17Pro); rs56020216 c.60T>C (p.Tyr20Tyr); rs11553885 c.165C>T (p.Pro55Pro).

#### Estudos de associação

Os estudos de associação genótipo-fenótipo foram efetuados para os indivíduos com formas graves e ligeiras da doença. Apenas foram analisados os SNPs em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e com uma frequência do alelo minoritário (MAF) >5% em ambos os grupos fenotípicos.

A análise estatística foi efetuada em R (<http://www.R-project.org>). Foram utilizados testes do qui-quadrado e exato de Fisher (duas caudas) (no caso de amostras pequenas) para os estudos de associação sob diferentes modelos de hereditariedade. O qui-quadrado também foi utilizado para avaliar os possíveis efeitos de confundimento devidos à idade, sexo e doença crónica.

Os resultados da associação genótipo-fenótipo foram apresentados como a razão das probabilidades complementares (*Odds Ratio*, OR), e o intervalo de confiança (IC) representando o grau de precisão no tamanho do efeito. Devido ao tamanho reduzido da amostra populacional e o baixo nível de penetrância das variantes observadas neste primeiro estudo preliminar, foi considerado justificável um nível de significância de 10%. Neste caso, além do seu nível habitualmente considerado de 95%, o IC de 90% para o OR foi também calculado para efeitos limiares (*borderline*), sugestivos mas não conclusivos. O critério do *False Discovery Rate* (FDR) foi aplicado para reduzir a proporção de falsos positivos devidos à realização de testes múltiplos, apesar de que, considerando a natureza não aleatória na escolha dos loci genéticos, esta correção não seria obrigatória.

A proporção de risco atribuível à população (*Population Attributable Risk*, PAR), foi calculada por:  $PAR\% = 100 \times p(1-OR) / [p(1-OR) + 1]$ , onde  $p$  é a prevalência do alelo em estudo

na população geral (ou no grupo com doença ligeira) e o OR representa uma estimativa do risco relativo de doença grave na população com o alelo (ou o genótipo) em estudo comparada com a população que não apresenta o alelo (ou o genótipo).

## \_Resultados

Dos sete SNPs detetados no amplicão de 352 pb do *IFITM3* (tabela 1), os estudos de associação genótipo-fenótipo foram efetuados apenas para os SNPs com MAF >5%: rs12252, rs1136853 e rs34481144 (tabela 2). Os resultados evidenciaram um efeito protetor significativo contra as formas graves da gripe para o alelo rs34481144-A no modelo dominante (OR=0,26; IC95% 0,07-0,97) e um efeito significativo limiar *borderline* no modelo sobredominante (OR=0,27; IC90% 0,09-0,82). Estes resultados, não resistiram aos critérios FDR. Comparando a distribuição deste SNP com a população geral, foi observada uma diferença *borderline* significativa na distribuição do alelo rs34481144-A, no grupo de gripe sintomaticamente grave em relação à população geral ( $p=0,071$ ).

Tendo em conta que, a ausência do alelo rs34481144-A se mostrou associada a um risco acrescido de gripe com sintomas graves, foi estimado o PAR, a proporção de graves que poderiam ser evitados se todos os indivíduos da população tivessem o alelo protetor. Pelos nossos resultados, 56% e 64% do risco de infeção com características graves é atribuível à ausência do alelo rs34481144-A, respetivamente na população geral portuguesa e no grupo de doentes com sintomas ligeiros.

De acordo com a nossa análise, os fatores idade e sexo não mostraram associação com o genótipo, assim como o fator doença crónica não mostrou associação com a gravidade sintomática da gripe, razão pela qual não foram considerados em ajustamentos para fatores de confundimento. Nenhuma outra associação significativa foi evidenciada para os outros dois SNPs, apesar de uma tendência observada para o alelo rs12252-C em associação com um risco acrescido de doença grave, tal como previamente descrito para outras populações.

Estudos de associação genótipo-fenótipo foram realizados para os três haplótipos com frequências >5%: Hap1 (GCTTCTC), Hap3 (GATCCTC), Hap4 (ACTTCTC). O Hap1 revelou-se como um fator genético deletério relativo à gripe com sintomas ligeiros (OR=2,41; IC90% 1,14-5,08) (tabela 3), e o Hap4 um fator genético protetor estatisticamente significativo contra a gripe sintomaticamente grave (OR=0,29; IC95% 0,10-0,82) (figura 1 e tabela 3). Para o Hap4, o teste qui-quadrado resistiu ao critério FDR. Em comparação com a população geral portuguesa, a distribuição do Hap1 deletério no grupo de doentes com sintomas de gripe ligeiros foi significativamente diferente do observado na população geral ( $p=0,017$ ) enquanto a distribuição do Hap4 protetor no grupo de doença grave foi significativamente diferente da observada na população geral portuguesa ( $p=0,016$ ).

Os padrões de desequilíbrio de ligação (*Linkage disequilibrium*, LD), das variantes genéticas na região cromossómica em volta do rs34481144, foram visualizados numa população com ancestralidade na Europa do norte e oeste do HapMap, com o programa Haploview (9). Este SNP parece pertencer ao mesmo bloco de LD do rs12252 (figura 2), estando este último em LD perfeito com o rs1136853 ( $r^2=1$ ). O SNP rs34481144 parece estar em LD com o rs6421983 ( $r^2=0,88$ ). A análise de transcrição *in vitro* do *IFITM3* com os haplótipos Hap1 e Hap4, não evidenciou diferenças significativas, mesmo após estímulo por interferão, IFN- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$  (dados não apresentados). A análise *in silico* das variantes intrónicas rs6421983 c.249+171G>A e c.249+171G>C, utilizando o programa *Human Splicing Finder* (10), não revelou alterações potenciais de *splicing*.

Tabela 1: ▾ Frequências alélicas e genótípicas das variantes do *IFITM3* na população geral portuguesa e em doentes portugueses infetados pelo vírus A(H1N1)pdm09

SNP, variante	Genótipo	PGP <sup>a</sup> (n=200)	Doentes portugueses infetados pelo vírus A(H1N1)pdm09 <sup>a</sup>		
			Total (n=41)	Sintomatologia ligeira <sup>b</sup> (n=19)	Sintomatologia grave <sup>c</sup> (n=22)
rs12252 c.42T>C (p.Ser14Ser)	CC	0,00 (0/200)	0,0244 (1/41)	0,0526 (1/19)	0,00 (0/22)
	CT	0,1200 (24/200)	0,1463 (6/41)	0,1053 (2/19)	0,1818 (4/22)
	TT	0,8800 (176/200)	0,8293 (34/41)	0,8421 (16/19)	0,8182 (18/22)
	Alelo C	0,0600 (24/400)	0,0976 (8/82)	0,1053 (4/38)	0,0909 (4/44)
	Alelo T	0,9400 (376/400)	0,9024 (74/82)	0,8947 (34/38)	0,9091 (40/44)
	HWE <sup>d</sup>	0,815	1,170		
rs34481144 c.-23G>A (5' UTR)	AA	0,1100 (22/200)	0,0976 (4/41)	0,1053 (2/19)	0,0909 (2/22)
	AG	0,4450 (89/200)	0,4146 (17/41)	0,5789 (11/19)	0,2727 (6/22)
	GG	0,4450 (89/200)	0,4878 (20/41)	0,3158 (6/19)	0,6364 (14/22)
	Alelo A	0,3325 (133/400)	0,3049 (25/82)	0,3947 (15/38)	0,2273 (10/44)
	Alelo G	0,6675 (267/400)	0,6951 (57/82)	0,6053 (23/38)	0,7727 (34/44)
	HWE <sup>d</sup>	0,001	0,019		
rs1136853 c.9C>A (p.His3Gln)	AA	0,00 (0/200)	0,0244 (1/41)	0,0526 (1/19)	0,00 (0/22)
	AC	0,1050 (21/200)	0,1463 (6/41)	0,1053 (2/19)	0,1818 (4/22)
	CC	0,8950 (179/200)	0,8293 (34/41)	0,8421 (16/19)	0,8182 (18/22)
	Alelo A	0,0525 (21/400)	0,0976 (8/82)	0,1053 (4/38)	0,0909 (4/44)
	Alelo C	0,9475 (379/400)	0,9024 (74/82)	0,8947 (34/38)	0,9091 (40/44)
	HWE <sup>d</sup>	0,614	1,170		
rs11553885 c.165C>T (p.Pro55Pro)	TT	0,00 (0/200)	0,00 (0/41)	0,00 (0/19)	0,00 (0/22)
	TC	0,00 (0/200)	0,0488 (2/41)	0,0526 (1/19)	0,0455 (1/22)
	CC	1,00 (200/200)	0,9512 (39/41)	0,9474 (18/19)	0,9545 (21/22)
	Alelo T	0,00 (0/400)	0,0244 (2/82)	0,0263 (1/38)	0,0227 (1/44)
	Alelo C	1,00 (400/400)	0,9756 (80/82)	0,9737 (37/38)	0,9773 (43/44)
	HWE <sup>d</sup>	NA	0,026		
SNP cd11 c.33T>C (p.Pro11Pro)	CC	0,00 (0/200)	0,00 (0/41)	0,00 (0/19)	0,00 (0/22)
	CT	0,00 (0/200)	0,0244 (1/41)	0,0526 (1/19)	0,00 (0/22)
	TT	1,00 (200/200)	0,9756 (40/41)	0,9474 (18/19)	1,00 (22/22)
	Alelo C	0,00 (0/400)	0,0122 (1/82)	0,0263 (1/38)	0,00 (0/44)
	Alelo T	1,00 (400/400)	0,9878 (81/82)	0,9737 (37/38)	1,00 (44/44)
	HWE <sup>d</sup>	NA	0,006		
rs56323507 c.51C>T (p.Pro17Pro)	TT	0,00 (0/200)	0,00 (0/41)	0,00 (0/19)	0,00 (0/22)
	TC	0,00 (0/200)	0,00 (0/41)	0,00 (0/19)	0,00 (0/22)
	CC	1,00 (200/200)	1,00 (41/41)	1,00 (19/19)	1,00 (22/22)
	Alelo T	0,00 (0/400)	0,00 (0/82)	0,00 (0/38)	0,00 (0/44)
	Alelo C	1,00 (400/400)	1,00 (82/82)	1,00 (38/38)	1,00 (44/44)
	HWE <sup>d</sup>	NA	NA		
rs56020216 c.60T>C (p.Tyr20Tyr)	CC	0,00 (0/200)	0,00 (0/41)	0,00 (0/19)	0,00 (0/22)
	CT	0,00 (0/200)	0,00 (0/41)	0,00 (0/19)	0,00 (0/22)
	TT	1,00 (200/200)	1,00 (41/41)	1,00 (19/19)	1,00 (22/22)
	Alelo C	0,00 (0/400)	0,00 (0/82)	0,00 (0/38)	0,00 (0/44)
	Alelo T	1,00 (400/400)	1,00 (82/82)	1,00 (38/38)	1,00 (44/44)
	HWE <sup>d</sup>	NA	NA		

PGP – População geral portuguesa (este estudo); HWE – equilíbrio de Hardy-Weinberg; NA – variante observada sem frequência ou população (1000 Genomes Project) <sup>(11)</sup>; SNP – Single Nucleotide Polymorphism; cd - codão.

<sup>a</sup> Frequência alélica e genotípica documentada a partir do presente estudo; <sup>b</sup> A sintomatologia ligeira corresponde a doentes observados apenas em ambulatório; <sup>c</sup> A sintomatologia grave corresponde a doentes hospitalizados em Unidades de Cuidados Intensivos; <sup>d</sup> Valores do qui-quadrado do HWE para os dados colhidos no presente estudo.

Tabela 2: Associação dos polimorfismos rs12252, rs1136853 and rs34481144 ao risco acrescido de gripe com sintomatologia grave, sob diferente modelos de hereditariedade.

Modelo genético	SNP	Tabela de contingência			P Qui-quadrado ( $\chi^2$ )	P Teste exato de Fisher <sup>a</sup>	OR (IC 95%)	
Aditivo	rs12252		CC	CT	TT			Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	0	4	18	NA	0,429	0,00 (0-NaN)
		Sintomas ligeiros da gripe	1	2	16	NA	0,486	0,00 (0-NaN)
	rs1136853		AA	AC	CC			Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	0	4	18	NA	0,429	0,00 (0-NaN)
		Sintomas ligeiros da gripe	1	2	16	NA	0,486	0,00 (0-NaN)
	rs34481144		AA	AG	GG			Heterozigoto
Sintomas graves da gripe		2	6	14	NA	0	1,83 (0,20-16,51)	
	Sintomas ligeiros da gripe	2	11	6	NA	0,578	0,43 (0,05-3,79)	
Alélico	rs12252		T	C				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	40	4		NA	1	0,85 (0,20-3,66)
		Sintomas ligeiros da gripe	34	4		NA	1	0,85 (0,20-3,66)
	rs1136853		C	A				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	40	4		0,100	0,149	0,45 (0,17-1,18)
	Sintomas ligeiros da gripe	34	4					
Dominante	rs12252		TT	CC+CT				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	18	4		NA	1	1,19 (0,23-6,12)
		Sintomas ligeiros da gripe	16	3		NA	1	1,19 (0,23-6,12)
	rs1136853		CC	AA+AC				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	18	4		0,041	0,062	0,26 (0,07-0,97) <sup>b</sup>
	Sintomas ligeiros da gripe	16	3					
Recessivo	rs12252		CT+TT	CC				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	22	0		NA	0,463	0 (0-NaN)
		Sintomas ligeiros da gripe	18	1		NA	0,463	0 (0-NaN)
	rs1136853		AC+CC	AA				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	22	0		NA	1	0,85 (0,11-6,70)
	Sintomas ligeiros da gripe	18	1					
Sobredominante	rs12252		CC+TT	CT				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	18	4		NA	0,668	1,89 (0,31-11,68)
		Sintomas ligeiros da gripe	17	2		NA	0,668	1,89 (0,31-11,68)
	rs1136853		AA+CC	AC				Heterozigoto
		Sintomas graves da gripe	18	4		0,047	0,062	0,27 (0,07-1,01) <sup>c</sup>
	Sintomas ligeiros da gripe	17	2					
rs34481144		AA+GG	AG				Heterozigoto	
	Sintomas graves da gripe	16	6					
	Sintomas ligeiros da gripe	8	11					

SNP – Single Nucleotide Polymorphism; IC – Intervalo de confiança; OR – Odds Ratio; NA – Não aplicável.

<sup>a</sup> O teste exato de Fisher refere-se ao teste com duas caudas; <sup>b</sup> O intervalo de confiança a 90% para um nível de significância de 10% (borderline): OR=0,26; IC90% 0,09-0,79;

<sup>c</sup> O intervalo de confiança a 90% para um nível de significância de 10% (borderline): OR=0,27; IC90% 0,09-0,82.

Figura 1: Histograma das frequências dos alelos e haplótipos nos doentes portugueses infetados pelo vírus A(H1N1)pdm09.

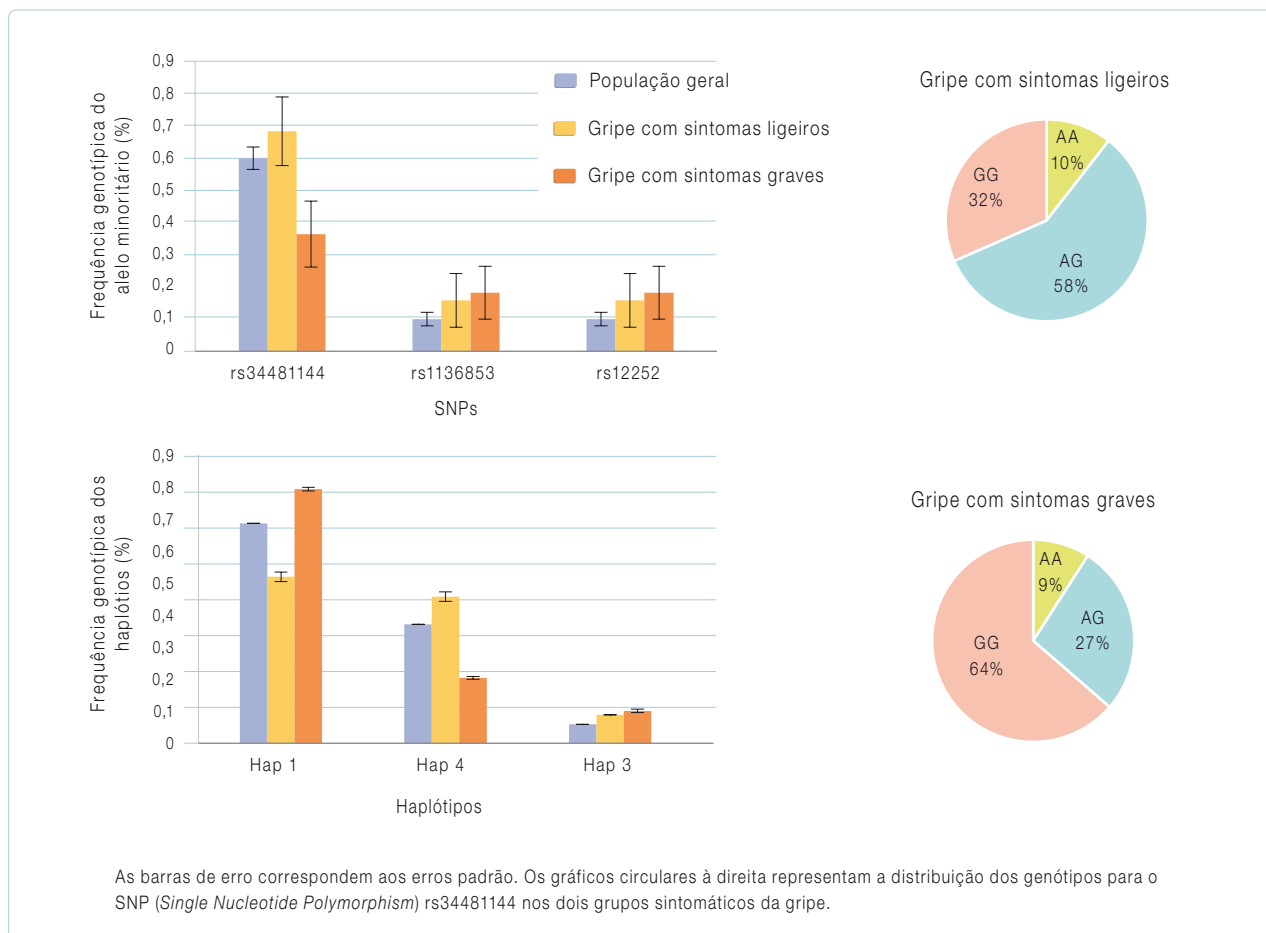


Tabela 3: Associação dos haplótipos maioritários<sup>a</sup> ao risco acrescido de gripe com sintomatologia grave.

Tabela de contingência				P Qui-quadrado ( $\chi^2$ )	P Teste exato de Fisher <sup>b</sup>	OR (IC 95%)
Haplótipo-1	Sintomas graves da gripe	Ausente	Presente	0,051	0,075	2,41 (0,99-5,86) <sup>c</sup>
	Sintomas ligeiros da gripe	16	28			
Haplótipo-3	Sintomas graves da gripe	Ausente	Presente	NA	0,463	0,00 (0,00-NaN)
	Sintomas ligeiros da gripe	22	16			
Haplótipo-4	Sintomas graves da gripe	Ausente	Presente	0,016	0,024	0,29 (0,10-0,82)
	Sintomas ligeiros da gripe	44	0			
		37	1			
		37	7			
		23	15			

IC – Intervalo de confiança; OR – Odds Ratio; NA – Não aplicável.

<sup>a</sup> Os haplótipos maioritários são os que apresentam uma frequência > 5% nos grupos populacionais em estudo: população geral portuguesa e doentes infetados pelo vírus A(H1N1) da gripe. Para a definição dos haplótipos ver o corpo do texto; <sup>b</sup> O teste exato de Fisher refere-se ao teste duas caudas; <sup>c</sup> O intervalo de confiança a 90% para um nível de significância de 10% (borderline): OR=2,41; IC90% 1,14-5,08.



ligeira mais baixo que o esperado, e a frequência do Hap4 protetor no grupo de doença grave mais baixo que o observado na população geral portuguesa. A proporção de casos com sintomas graves que poderiam ser evitados se todos os indivíduos da população apresentassem o alelo protetor rs34481144-A foi estimada, respetivamente, em 56% e 64% na população geral e no grupo de indivíduos com doença ligeira.

Os mecanismos genéticos e moleculares das proteínas IFITM que interferem com os ciclos de infeção viral e bacteriana ainda não estão inteiramente elucidados (12,13). No nosso estudo, o SNP rs34481144 no seu alelo G foi associado com formas graves da infeção pelo vírus da gripe. A análise *in vitro* da transcrição dos haplótipos Hap1 e Hap4 mais frequentes do gene *IFITM3* não evidenciou nenhuma diferença significativa, com ou sem estimulação pelo IFN- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$ .

## \_Conclusões

Estes resultados apontam para diferenças importantes no risco de desenvolver doença grave por infeção pelo vírus da gripe A(H1N1)pdm09 em populações de fundo genético diferente. A confirmação dos nossos resultados em grupos populacionais maiores e em estudos funcionais dos SNPs em LD com o rs34481144 (rs6421983) seria necessária para identificar novos alvos de intervenção no controlo da gripe.

## Agradecimentos:

Este estudo foi financiado pela FCT/MEC e cofinanciado pelo FEDER, sob o *Partnership Agreement* PT2020, no projeto UIDMULTI/00211/2013. Agradecemos a assistência clínica das Dras. Madalena Almeida Santos e Maria José Silvestre do Hospital Curry Cabral e o apoio técnico da Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA. Agradecemos à Patrícia Barros, Rafaela Lacerda e Juliane Menezes do DGH/INSA, ao Luís Santos do Departamento de Doenças Infecciosas/INSA, bem como à Stephanie David Bosne pelas discussões proveitosas para a realização deste trabalho. O plasmídeo pGL3-control foi facultado por Peter Jordan, DGH/INSA.

## Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Fact sheet n° 211 - Influenza. [Em linha]. [consult. 23/10/2018]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
- (2) Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*. 2011;472(7344):481-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3409588/>
- (3) Everitt AR, Clare S, Pertel T, et al. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature*. 2012;484(7395):519-23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3648786/>
- (4) Zhang YH, Zhao Y, Li N, et al. Interferon-induced transmembrane protein-3 genetic variant rs12252-C is associated with severe influenza in Chinese individuals. *Nat Commun*. 2013;4:1418. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3562464/>
- (5) Yang X, Tan B, Zhou X, et al. Interferon-inducible transmembrane protein 3 genetic variant rs12252 and influenza susceptibility and severity: a meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(5):e0124985. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4420464/>
- (6) Mills TC, Rautanen A, Elliott KS, et al. IFITM3 and susceptibility to respiratory viral infections in the community. *J Infect Dis*. 2014;209(7):1028-31. Epub 2013 Aug 30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/23997235/>
- (7) Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet*. 2003;73(5):1162-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1180495/>
- (8) Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*. 2001;68(4):978-89. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1275651/>
- (9) Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-5. Epub 2004 Aug 5.
- (10) Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, et al. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(9):e67. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2685110/>
- (11) 1000 Genomes Project Consortium; Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56-65. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/23128226/>
- (12) Tartour K, Cimarelli A. Les IFITM, un obstacle commun à de nombreux virus. *Med Sci (Paris)*. 2015;31(4):377-82. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153104011>
- (13) Ranjbar S, Haridas V, Jasenosky LD, et al. A Role for IFITM Proteins in Restriction of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Cell Rep*. 2015;13(5):874-83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4916766/>

## Evidência para o efeito de um “gene principal” do hospedeiro na suscetibilidade à tuberculose multirresistente em Portugal

### Evidence for a “major gene” effect in the susceptibility to multidrug resistant tuberculosis in Portugal

Suzana David<sup>1</sup>, Ana R A Mateus<sup>2,3</sup>, Elsa L Duarte<sup>4</sup>, José Albuquerque<sup>1</sup>, Clara Portugal<sup>5</sup>, Luísa Sancho<sup>5</sup>, João Lavinha<sup>1</sup>, Guilherme Gonçalves<sup>6</sup>

suzana.david@insa.min-saude.pt

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

(2) Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal.

(3) Institute of Biology, Leiden University, Leiden, The Netherlands.

(4) Escola de Ciências e Tecnologia/Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Évora, Portugal.

(5) Serviço de Patologia Clínica, Hospital Fernando Fonseca, Amadora, Portugal.

(6) Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, Portugal.

### \_Resumo

A análise do genoma do patógeno e da genética do hospedeiro tem possibilitado o entendimento da coevolução do *Mycobacterium tuberculosis* com o seu hospedeiro humano, conduzindo a relações simpátricas mais estáveis entre o hospedeiro e o patógeno. A influência de fatores clínicos (coinfecção pelo VIH e tuberculose multirresistente (MDRTB)) e demográficos (sexo e idade) na relação hospedeiro-patógeno simpátrica foi investigada utilizando o *spacer oligonucleotide typing (spoligotyping)* enquanto método de genotipagem de isolados do *M. tuberculosis* pertencendo à linhagem *Euro-Americana*. Foram analisados 547 casos de tuberculose (TB) e os isolados correspondentes, de uma amostragem consecutiva de seis anos num contexto de elevada prevalência para a coinfecção TB-VIH (32,0%). Entre estes, 62,0% resultaram de infeção causada pelos principais genótipos de *M. tuberculosis* em circulação. A relação simpátrica foi definida de acordo com o *spoligotype* em comparação com a base de dados internacional de *spoligotype* SpolDB4. Foi evidenciada uma associação estatisticamente significativa da MDRTB com os isolados simpátricos, independente da coinfecção pelo VIH. Para além disso, o resultado do estudo da prevalência da distribuição da infeção com a idade foi sugestivo de que os determinantes da predisposição genética do hospedeiro à TB simpátrica eram impulsionados por variantes comuns sob efeito de um “gene principal” (“*major gene effect*”). Em termos de saúde pública, estes resultados poderão dar um importante contributo para a elaboração de modelos que preveem a duração dos ciclos de transmissão ativa, nomeadamente associada a casos graves de MDRTB.

### \_Abstract

Major contributions from pathogen genome analysis and host genetics have equated the possibility of *Mycobacterium tuberculosis* co-evolution with its human host leading to more stable sympatric host-pathogen relationships. We explored the influence on the sympatric host-pathogen relationship of clinical (HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis (MDRTB)) and demographic (gender and age) factors using *spacer oligonucleotide typing (spoligotyping)* for the classification of *M. tuberculosis* strains within the *Euro-American* lineage. We analyzed a total of 547 tuberculosis (TB) cases, from six year consecutive sampling in a setting with high TB-HIV coinfection (32.0%). Of these, 62.0% were caused by major circulating *M. tuberculosis* genotypes. The sympatric relationship was defined according to *spoligotype* in comparison to the international *spoligotype* database SpolDB4. A significant association of MDRTB with sympatric strains, regardless of the HIV status, was evidenced. Furthermore, distribution curves of the prevalence of sympatric TB in relation to patients' age suggested that the host genetic determinisms in the host-pathogen relationship were driven by more common variants under a “major gene” effect.

### \_Introdução

Durante os séculos XVIII e XIX, a tuberculose (TB) causou 20% de todas as mortes na Europa numa epidemia sem paralelo. Em 1958, a partir da análise de dados de morbilidade e mortalidade, E. R. N. Grigg concluiu que uma epidemia de TB dura aproximadamente 300 anos (1-2). A baixa incidência da TB atualmente observada na Europa seria sugestiva de seu declínio final. As elevadas taxas de mortalidade observadas em populações virgens evidenciam grandes diferenças na resposta imunitária à doença (3-5). No entanto, a influência da estirpe infecciosa no fenótipo da doença também tem vindo a ser valorizada (6-10). As relações hospedeiro-patógeno têm sido classificadas como simpátricas quando o hospedeiro e o patógeno compartilham uma origem geográfica ancestral comum, ou alopátrica, quando se originam de áreas geográficas não sobrepostas (11). Consequentemente, a relação patógeno-hospedeiro simpátrica seria caracterizada por associações mais estáveis entre as linhagens do *M. tuberculosis* e suas populações humanas (12-14).

Em Portugal, estudos anteriores delinearam a especificidade geográfica dos genótipos de *M. tuberculosis* (15-18). Mais especificamente, por meio do *spoligotyping*, foram identificados os *spoligotypes* característicos do contexto português (16).

## \_Objetivos

Reanalisar a nossa compreensão atual da estrutura populacional do *M. tuberculosis* em Portugal e, numa abordagem epidemiológica molecular retrospectiva, investigar a influência da infecção pelo VIH e da MDRTB na relação simpátrica patógeno-hospedeiro.

## \_Materiais e métodos

### Características da população

Este estudo retrospectivo de epidemiologia molecular incluiu 859 doentes de TB com cultura positiva para o *M. tuberculosis*, que foram diagnosticados e tratados de acordo com os procedimentos recomendados em Portugal entre 1999 e 2006. Os isolados correspondentes de *M. tuberculosis* incluíam 665 isolados da área metropolitana de Lisboa (16) e 194 de várias localizações em Portugal. Dados sociodemográficos (idade, sexo) e parâmetros laboratoriais (dados da resistência do *M. tuberculosis* a antibióticos de primeira linha, estado de infecção pelo VIH) foram obtidos do hospital totalmente anonimizados e associados apenas ao número do isolado de *M. tuberculosis*.

Um total de 547 doentes da área metropolitana de Lisboa com diagnóstico confirmado para a TB e conhecido para o VIH, 82,3% (547/665), foram incluídos no estudo. Destes 32,0% (175/547) estavam infetados pelo VIH e 68,0% (372/547) eram VIH-negativos. Os dados de resistência da TB aos antibióticos estavam disponíveis para 86,7% (474/547) dos casos. As amostras independentes provenientes de várias localizações em Portugal foram utilizadas apenas como elemento comparativo.

Analisámos a distribuição da TB causada *M. tuberculosis* de genótipos específicos, observando a frequência dos casos em função da idade. Para não distorcer as observações quanto às tendências evolutivas da relação simpátrica entre o *M. tuberculosis* e o seu hospedeiro humano, os indivíduos VIH-negativos foram considerados como o grupo de referência.

## Análise molecular

O *Spacer oligonucleotide typing*, *spoligotyping*, e a classificação em tipos internacionais partilhados (SIT), com a ajuda da base de dados internacional de *spoligotyping* (SpolDB4) (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>) (19,20) e do programa Spotclust (<http://homepages.rpi.edu/~bennek/EpiResearch>) (21), foram realizados como anteriormente descrito (16,18). Os padrões SIT foram submetidos a análise filogenética utilizando o MIRU-VNTR-plus (<http://www.MIRU-VNTRplus.org>) (22,23). Os complexos clonais (CC) e *Singletons* (não agrupados) foram obtidos através da análise de variação de *locus* único (SLV). Os SITs foram considerados característicos da população portuguesa, conforme os critérios anteriormente descritos (16). A distribuição dos SITs entre os grupos de estirpes simpátricas e alopatricas foi também analisada no “subgrupo principal” de 339 casos. O “subgrupo principal” de 339 casos foi definido como aquele em que as assinaturas de *spoligotype* classificadas em SIT agruparam 15 ou mais isolados, representando 62,0% (339/547) dos pacientes incluídos no estudo. Dados sobre a resistência aos antibióticos estavam disponíveis para 86,7% (294/339) desses casos.

## Análise estatística

Toda a análise de dados foi realizada com R (R *Development Core Team* 2005).

A associação dos CCs derivados dos *spoligotypes* com o MIRU-VNTR-plus foi avaliada utilizando o modelo linear generalizado  $CCs \sim \text{infecção por VIH} + MDRTB + \text{sexo} + \text{grupo etário}$ , assumindo uma distribuição binomial do erro. De igual modo foi estudada a associação dos SITs simpátricos utilizando o modelo  $SIT \text{ simpátrico} \sim \text{infecção por VIH} + MDRTB + \text{sexo} + \text{grupo etário}$ , para o conjunto de doentes infetados pelo VIH e VIH negativos, e para os doentes VIH negativos separadamente. A fim de evitar artefactos resultantes de genótipos raros, o modelo foi testado para o “subgrupo principal” (n=339). A razão das probabilidades complementares (*Odd Ratios*, ORs) foi derivada para os modelos finais. As interações entre fatores foram testadas, mas, por não serem estatisticamente significativas, não foram incluídas nos modelos finais. Também testamos o efeito da idade na prevalência da TB utilizando o modelo linear generalizado *Prevalência de tuberculose* ~

tuberculose simpática + grupo etário, sendo os pacientes VIH negativos considerados o grupo de referência, assumindo uma distribuição Poisson do erro. Quando foram encontradas diferenças significativas para os diferentes fatores nos modelos (Anova,  $P \leq 0,05$ ), realizamos comparações *post-hoc pairwise* entre os níveis de fatores com o teste de *Tukey's honest significant differences* (HSD) ( $\alpha=0,01$ ).

## Resultados

A linhagem predominante de *M. tuberculosis* observada, a linhagem *Euro-Americana*, 92,1% (504/547), foi adicionalmente subdividida em CCs derivados de *spoligotypes* utilizando MIRU-VNTRplus (22,23). A análise descritiva dos fatores demográficos e clínicos entre as estirpes alopátricas e simpátricas para o "subgrupo maior" ( $n=339$ ) figura no quadro 1. Desta população 33,3% (113/339) estava infetada pelo VIH e 66,7% (226/339) era VIH-negativa. A distribuição da idade é mostrada em relação a estes dois grupos. Entre os doentes, 56,3% (191/339) estavam infetados por estirpes alopátricas e 43,7% (148/339) por estirpes simpátricas. Neste "subgrupo principal", todas, exceto as estirpes com *spoligotype* Beijing, pertenciam à linhagem *Euro-Americana*, 95,6% (324/339). Uma árvore filogenética (figura 1) mostra a família *spoligotype* predominante *Latino-Americana Mediterrânica* (LAM), pertencendo à linhagem *Euro-Americana*, principalmente agrupada dentro do CC1. As estirpes simpátricas estão representadas pelos SITs 20, 64, 389, 244 e 1106, enquanto as estirpes alopátricas pelos SITs 42, 150, 17, 53, 50, 1, 34, 47. As estirpes simpátricas, exceto SIT244, foram todas identificadas em amostras de conveniência independentes de várias regiões em Portugal.

Na análise estatística da associação dos CCs à infeção pelo VIH, MDRTB, sexo e idade, foi evidenciada a associação da coinfeção pelo VIH com os *Singletons* ( $p=0,03$ ) ( $n=339$ ) e o CC contendo o SIT244 ( $p<0,001$ ) ( $n=547$ ). Embora, na nossa classificação original, o SIT244 tenha sido incluído no grupo de estirpes característico da população portuguesa (16), na presente análise, o SIT244 foi associado à infeção pelo VIH. Como os genótipos relacionados com o VIH foram previamente associados a estirpes alopátricas (24), duas aná-

lises subsequentes foram consideradas no nosso modelo final, uma na qual o SIT244 foi incluído no grupo simpátrico de estirpes e a outra onde foi agrupada com o alopátrico. No primeiro caso, foi observada uma associação positiva entre a infeção pelo VIH e as estirpes simpátricas. No entanto, quando o SIT244 foi excluído deste grupo e incluído no grupo alopátrico nenhuma relação, nem positiva nem negativa, foi observada com a infeção pelo VIH. No entanto, uma associação estatisticamente significativa foi observada entre a MDRTB e as estirpes simpátricas, na análise restrita ao subgrupo principal ( $n=339$ ) (tabela 1), bem como relativa à base de dados completa ( $n=547$ ) (dados não apresentados). A associação foi significativa, quer o SIT244 fosse incluído no grupo simpátrico ( $p<0,001$ ) quer no alopátrico ( $p<0,001$ ) e não foi afetada quando os casos infetados pelo VIH foram excluídos ( $p<0,001$ ). Assim, a associação das estirpes simpátricas com a MDRTB não se mostrou dependente do estado de infeção pelo VIH.

Para a TB alopátrica, a distribuição da prevalência de acordo com o grupo etário mostrou três picos, correspondendo às crianças muito jovens, adultos jovens e idosos, tipicamente referida como uma curva trimodal (gráfico 1). As diferenças de prevalência entre grupos etários não foram tão pronunciadas para a TB causada por estirpes simpátricas devido à queda da prevalência nos muito jovens e idosos e às alterações do pico central. Isso foi traduzido numa tendência para uma curva de distribuição típica (padrão). Essa tendência foi ainda mais acentuada quando o SIT244 foi incluído no grupo alopátrico.

Quadro 1: Características dos doentes com tuberculose segundo o genótipo da linhagem *M. tuberculosis* para os genótipos mais frequentemente observados.

Genótipo das estirpes <sup>1</sup>							Características dos doentes					
Spoligotype árvore geradora mínima <sup>2</sup>							Sexo masculino (%)	MDRTB <sup>4</sup> (%)	Infeção VIH <sup>5</sup> (%)	Idade <sup>6</sup> (média ± dp)		
	CC	Node	SLV (1)	SLV (2)	Linhagem (Spoligotype) <sup>3</sup>	Frequência (%)				Todos	VIH+	VIH-
Todos (n=339)	-	-	-	-	-	100,0% (339/339)	72,0% (244/339)	9,9% (29/294)	33,3% (113/339)	40,42 ± 16,84	37,03 ± 10,21	42,12 ± 19,11
Alopátrico (n=191)	-	-	-	-	-	56,3% (191/339)	72,3% (138/191)	2,4% (4/164)	27,2% (52/191)	40,68 ± 17,05	37,96 ± 10,23	41,70 ± 18,92
Simpátrico (n=148)	-	-	-	-	-	43,7% (148/339)	71,6% (106/148)	19,2% (25/130)	41,2% (61/148)	40,09 ± 16,60	36,23 ± 10,21	42,79 ± 19,51
	CC1					59,0% (200/339)	75,0% (150/200)	11,5% (20/174)	33,0% (66/200)	42,00 ± 17,43	37,83 ± 10,62	44,04 ± 19,66
		SIT42			Euro-Americana (LAM9)	18,0% (61/339)	72,1% (44/61)	3,8% (2/52)	32,8% (20/61)	43,21 ± 16,90	38,70 ± 8,34	45,41 ± 19,50
			SIT150		Euro-Americana (LAM9)	6,0% (20/339)	85,0% (17/20)	0,0% (0/18)	30,0% (6/20)	40,50 ± 17,22	39,83 ± 16,61	40,79 ± 18,08
			SIT20	SIT17	Euro-Americana (LAM1 66% LAM9 34%)	24,2% (82/339)	79,3% (65/82)	20,8% (15/72)	36,6% (30/82)	41,85 ± 18,45	38,07 ± 12,03	44,04 ± 21,09
				SIT389	Euro-Americana (LAM2 82% LAM1 11%)	2,9% (10/339)	50,0% (5/10)	0,0% (0/8)	30,0% (3/10)	38,80 ± 16,43	32,00 ± 3,46	41,71 ± 19,18
					Euro-Americana (LAM1 66% LAM9 34%)	3,8% (13/339)	69,2% (9/13)	23,1% (3/13)	30,8% (4/13)	39,46 ± 9,20	38,50 ± 5,20	39,89 ± 10,78
				SIT64	Euro-Americana (LAM9)	4,1% (14/339)	71,4% (10/14)	0,0% (0/11)	21,4% (3/14)	44,29 ± 21,99	30,67 ± 4,04	48,00 ± 23,55
	CC2					15,3% (52/339)	71,2% (37/52)	4,7% (2/43)	26,9% (14/52)	39,48 ± 16,86	39,64 ± 11,58	39,42 ± 18,57
		SIT53			Euro-Americana (T1)	11,5% (39/339)	71,8% (28/39)	3,2% (1/31)	23,1% (9/39)	39,77 ± 16,80	38,22 ± 7,21	40,23 ± 18,82
			SIT50		Euro-Americana (H3 77% T1 23%)	3,8% (13/339)	69,2% (9/13)	8,3% (1/12)	38,5% (5/13)	38,62 ± 17,72	42,20 ± 17,87	36,38 ± 18,47
	Singletons					25,7% (87/339)	65,5% (57/87)	9,1% (7/77)	37,9% (33/87)	37,37 ± 15,06	34,30 ± 8,32	39,24 ± 17,80
		SIT244			Euro-Americana (T2 82% T1 18%)	8,8% (30/339)	56,7% (17/30)	7,1% (2/28)	63,33% (19/30)	34,63 ± 9,60	33,63 ± 7,95	36,36 ± 12,18
			SIT1		Leste-Asiática (Beijing)	4,4% (15/339)	53,3% (8/15)	0,0% (0/12)	20,0% (3/15)	35,27 ± 18,51	31,33 ± 6,66	36,25 ± 20,56
			SIT34		Euro-Americana (S 78% T1 22%)	3,5% (12/339)	75,0% (9/12)	0,0% (0/11)	25,0% (3/12)	44,33 ± 25,45	33,00 ± 8,72	48,11 ± 28,41
			SIT1106		Euro-Americana (LAM9 60% T2 40%)	2,7% (9/339)	55,6% (5/9)	83,3% (5/6)	55,6% (5/9)	36,56 ± 13,63	36,60 ± 10,74	36,50 ± 18,48
			SIT47		Euro-Americana (Haarlem1)	6,2% (21/339)	85,7% (18/21)	0,0% (0/20)	14,3% (3/21)	39,14 ± 11,13	39,00 ± 11,00	39,17 ± 11,47

<sup>1</sup> A classificação alopátrica e simpatria das estirpes de *M. tuberculosis* foi obtida a partir da comparação dos spoligotypes portugueses com a base de dados de spoligotyping internacional SpoIDB4<sup>(21)</sup>. Esta base de dados classifica as estirpes de acordo com o tipo "Shared international type" (SIT). As estirpes alopátricas incluem estirpes com SITs 42, 150, 17, 53, 50, 1, 34, 47 (n=191) e as estirpes simpátricas incluem aquelas com SITs 20, 64, 389, 244, 1106 (n=148) (n=148).

<sup>2</sup> O MIRU-VNTR plus (<http://www.miru-vntrplus.org>) foi utilizado para analisar dados de spoligotyping dos isolados de *M. tuberculosis* (22,23). O algoritmo de Kruskal foi utilizado para agrupar em complexos clonais (CC) dados de SITs, utilizando uma única variação de locus, SLV (1), e para gerar uma árvore filogenética.

<sup>3</sup> As linhagens de *M. tuberculosis* foram classificadas segundo o spoligotype. A designação do spoligotype foi obtida com a ajuda da base de dados SpoIDB4 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITdemo>) (19,20) e o programa Spotclust ([http://www.rpi.edu/\\$bennek/EpiResearch](http://www.rpi.edu/$bennek/EpiResearch)) (21). A designação das linhagens, Leste-Asiática e Euro-Americana resulta da análise de Long Sequence Polymorphism (LSP) (14).

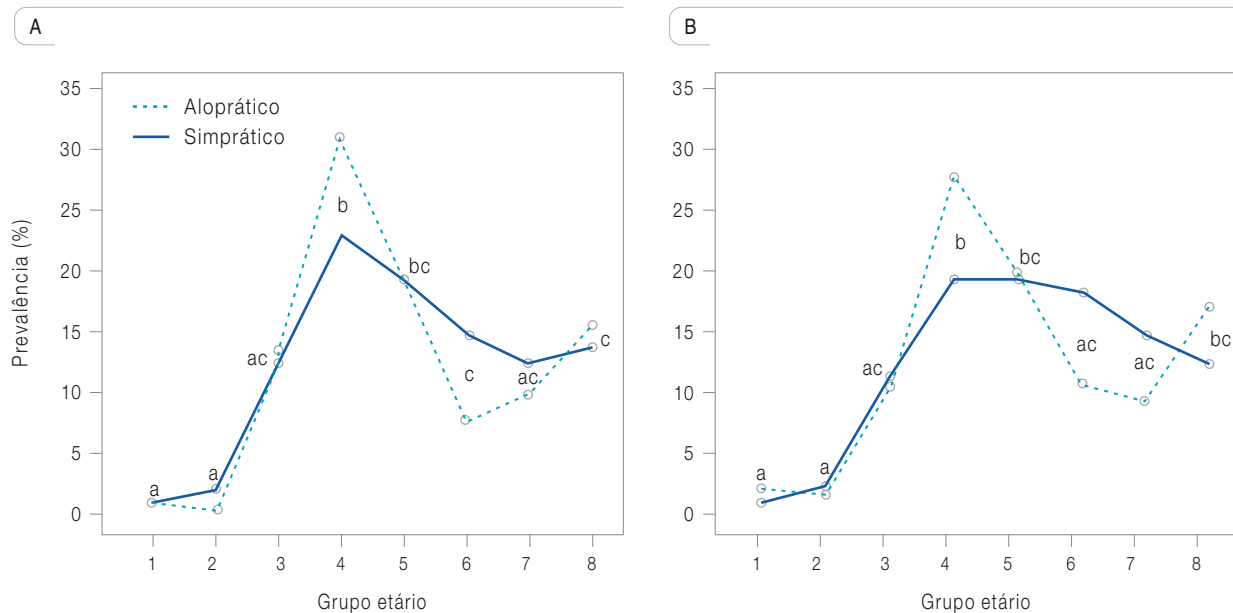
<sup>4</sup> Os dados de resistência aos antibióticos estavam disponíveis para 86,7% (294/339) dos casos e foram usados para determinar a percentagem de casos de tuberculose multirresistente (MDRTB) segundo o genótipo de estirpe.

<sup>5</sup> VIH = infeção pelo vírus da imunodeficiência humana.

<sup>6</sup> A idade em anos expressa como média ± dp, dp = desvio padrão.



Gráfico 1: ▾ Distribuição da frequência de TB causada por estirpes simpátricas e alopátricas de *M. tuberculosis*, em função da faixa etária em indivíduos VIH-negativos, 68,0% (372/547).



Os grupos 1 a 8 representam as categorias de idade em anos de 0 a 4, 5 a 14, 15 a 24, 25 a 34, 35 a 44, 45 a 54, 55 a 64, acima de 65, respetivamente. Diferenças significativas entre os grupos etários (HSD de Tukey,  $p < 0,01$ ) são indicadas por letras minúsculas, idênticas quando a mesma relação é obtida; (A) TB causada por estirpes simpátricas, 26,3% (98/372), versus alopátricas, 73,7% (274/372), marcando o desvio em relação às curvas de distribuição trimodal usuais; (B) TB causada por estirpes simpátricas, 23,4% (87/372), versus alopátricas, 76,6% (285/372), excluindo as estirpes SIT244 do grupo simpático. Diferenças significativas entre fatores do grupo etário (HSD de Tukey,  $p < 0,01$ ) são indicadas por letras diferentes sendo as mesmas para cada PTSIT (alopátrico e simpático).

## \_Discussão

A TB permanece endémica na população portuguesa, com maior incidência nas grandes áreas urbanas. Corroborando um declínio lento da TB, a média da idade de incidência tem vindo a aumentar (25). De acordo com os nossos estudos anteriores, Portugal aparece como podendo ter uma das maiores proporções globais de estirpes endémicas da família *spoligotype* LAM (16,18). Dados restritos à área metropolitana de Lisboa revelaram uma prevalência de 51% da família LAM e uma elevada proporção das subfamílias SIT20 (LAM1) e SIT42 (LAM9) (16).

Investigamos a significância estatística da associação entre estirpes simpátricas e a infeção pelo VIH, idade, género e MDRTB utilizando um nível de análise genotípica mais estrinvente em comparação com estudos anteriores (24), através da

definição de CC a partir dos *spoligotypes* utilizando o programa MIRU-VNTRplus. Foi evidenciada uma associação estatisticamente significativa do VIH com o CC contendo o SIT244. Esta família de *spoligotype* não foi detetada em amostras independentes provenientes de várias localizações em Portugal. Além disso, na base de dados internacional SpolDB4 o SIT244 estava representado em números elevados em apenas dois lugares, Portugal e Bangladesh (20,26). A natureza dos laços históricos entre estas duas populações provavelmente não iria resultar numa partilha duradora de características genéticas. Estes factos contribuíram para refutar a classificação do SIT244 nas estirpes simpátricas. O SIT244 pode ter resultado de uma estirpe alopátrica importada que se tornou prevalente entre pacientes infetados pelo VIH na área metropolitana de Lisboa. Consequentemente, eliminando o SIT244 do grupo simpático, os nossos resultados corroboraram investigações

anteriores em que a TB simpátrica não estava associada à infeção pelo VIH (24). No entanto, foi observada uma associação estatisticamente significativa da MDRTB com estirpes simpátricas, independente de haver infeção pelo VIH. As estirpes simpátricas são mais propensas a superar as alopátricas na transmissão ativa da TB (14,24). A principal assinatura LAM no nosso estudo, o SIT20, pertence à subfamília LAM1 caracterizada pela deleção RDRio. Nos nossos estudos anteriores, a deleção RDRio foi detetada em cerca de 60% dos isolados de LAM em Portugal e foi associada à transmissão de MDRTB (18,27). As estirpes RDRio têm sido associadas à transmissão contínua e a uma maior carga bacilar (30,31). Embora a transmissão ativa de isolados deste estudo não tenha sido avaliada, dados sobre a transmissão ativa de *spoligotypes* relevantes para este estudo encontram-se disponíveis noutros relatos (15,18,27,30). As curvas da prevalência da TB em relação ao grupo etário geralmente mostram uma distribuição trimodal e são úteis como marcador da evolução epidémica da doença (25,31). A distribuição trimodal observada foi acentuada no caso dos genótipos alopátricos (gráfico 1A) e mantida mesmo quando o SIT244 foi incluído nesse grupo (gráfico 1B). No entanto, para a TB causada por estirpes simpátricas, foi observada a tendência para uma distribuição normal. Ao que parece a idade é menos relevante na suscetibilidade às estirpes de TB simpátricas altamente transmissíveis.

A TB em idade precoce tem sido atribuída a mutações raras no genoma do hospedeiro responsáveis por características Mendelianas monogénicas (altamente penetrantes) enquanto em idade avançada atribuída a polimorfismos comuns, tendo um efeito mais moderado (menor penetrância) sobre o risco de doença clínica. Estas situações, no entanto, foram consideradas como as duas extremidades de um espectro contínuo de suscetibilidade genética do hospedeiro. Garantindo este *continuum*, encontraríamos um efeito devido a um "gene principal" ("*major gene effect*") (32,33). De facto, para as estirpes simpátricas, a maior estabilidade da relação hospedeiro-patógeno, característica de populações que sobreviveram à exposição histórica, a atenuação do pico central e a perda dos picos nos extremos da distribuição etária trimodal poderiam ser sugestivas de determinantes genéticos polimórficos

mais comuns. Além disso, o efeito de um "gene principal" que regeria a relação simpátrica hospedeiro-patógeno, sugerido pelos resultados do nosso estudo, seria concordante com os aspetos que regem a especificidade geográfica da variação genética humana na Europa (34) e parece particularmente relevante para o desenho de estudos futuros.

## \_Conclusão

A epidemiologia molecular trouxe evidência sugestiva da coevolução hospedeiro-patógeno na TB permitindo a introdução da ideia de que a resposta imunitária do hospedeiro pode variar de acordo com a estirpe de *M. tuberculosis* que o infeta. Essa premissa tem importantes implicações em termos de saúde pública. A escolha dos determinantes genéticos para definição das relações hospedeiro-patógeno simpátricas ou alopátricas pode afetar os modelos de infeção e doença na TB. A questão da predisposição genética do hospedeiro e sua possível influência na duração dos ciclos de transmissão ativa de TB simpátrica que, como vimos, podem estar associados a casos graves de MDRTB, permanece de grande interesse.

## Agradecimento:

Este trabalho foi financiado pela Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento (LACR Award program - 2007) e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Portugal, (POCTI/ESP/44826/2002), com a participação dos fundos da Comunidade Europeia (FEDER).

Este artigo constitui uma tradução abreviada da publicação: David S, Mateus AR, Duarte EL, Albuquerque J, Portugal C, Sancho L, Lavinha J, Gonçalves G. *Determinants of the Sympatric Host-Pathogen Relationship in Tuberculosis*. PLoS One. 2015;10(11):e0140625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140625>

Referências bibliográficas:

- (1) Grigg ERN. The arcana of tuberculosis with a brief epidemiologic history of the disease in the U.S.A. Parts I and II. *Am Rev Tuberc.* 1958;78(2):151-72.
- (2) Grigg ERN. The arcana of tuberculosis; with a brief epidemiologic history of the disease in the U.S.A. Part III. *Am Rev Tuberc.* 1958;78(3):426-53.
- (3) Stead WW. Genetics and resistance to tuberculosis. Could resistance be enhanced by genetic engineering? *Ann Intern Med.* 1992;116(11):937-41.
- (4) Stead WW. The origin and erratic global spread of tuberculosis. How the past explains the present and is the key to the future. *Clin Chest Med.* 1997;18(1):65-77.
- (5) Sousa AO, Salem JL, Lee FK, et al. An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(24):13227-32. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24291/>
- (6) Caws M, Thwaites G, Dunstan S, et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2008;4(3):e1000034. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2268004/>
- (7) Herb F, Thye T, Niemann S, et al. ALOX5 variants associated with susceptibility to human pulmonary tuberculosis. *Hum Mol Genet.* 2008;17(7):1052-60.
- (8) Intemann CD, Thye T, Niemann S, et al. Autophagy gene variant IRGM -261T contributes to protection from tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* but not by *M. africanum* strains. *PLoS Pathog.* 2009;5(9):e1000577. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19750224/>
- (9) van Crevel R, Parwati I, Sahiratmadja E, et al. Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains is associated with polymorphisms in SLC11A1/NRAMP1 in Indonesian patients with tuberculosis. *J Infect Dis.* 2009;200(11):1671-4.
- (10) Thye T, Niemann S, Walter K, et al. Variant G57E of mannose binding lectin associated with protection against tuberculosis caused by *Mycobacterium africanum* but not by *M. tuberculosis*. *PLoS One.* 2011;6(6):e20908. doi: 10.1371/journal.pone.0020908. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC21695215/>
- (11) Pasipanodya JG, Moonan PK, Vecino E, et al. Allopatric tuberculosis host-pathogen relationships are associated with greater pulmonary impairment. *Infect Genet Evol.* 2013;16:433-40. doi: 10.1016/j.meegid.2013.02.015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC23501297/>
- (12) Gagneux S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012;367(1590):850-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3267123/>
- (13) Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, et al. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(14):4871-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC387341/>
- (14) Gagneux S, DeRiemer K, Van T, et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(8):2869-73. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1413851/>
- (15) Portugal I, Covas MJ, Brum L, et al. Outbreak of multiple drug-resistant tuberculosis in Lisbon: detection by restriction fragment length polymorphism analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999;3(3):207-13.
- (16) David S, Ribeiro DR, Antunes A, et al. Contribution of spoligotyping to the characterization of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Infect Genet Evol.* 2007;7(5):609-17.
- (17) Perdigão J, Macedo R, Joao I, Fernandes E, Brum L, Portugal I. Multidrug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: a molecular epidemiological perspective. *Microb Drug Resist.* 2008;14(2):133-43.
- (18) David S, Duarte EL, Leite CQF, et al. Implication of the RDRio *Mycobacterium tuberculosis* sublineage in multidrug resistant tuberculosis in Portugal. *Infect Genet Evol.* 2012;12(7):1362-7.
- (19) Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, et al. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol.* 2003;41(5):1963-70. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154710/>
- (20) Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* 2006;6:23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1468417/>
- (21) Vitol I, Driscoll J, Kreiswirth B, et al. Identifying *Mycobacterium tuberculosis* complex strain families using spoligotypes. *Infect Genet Evol.* 2006;6(6):491-504.
- (22) Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, et al. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2692-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2519508/>
- (23) Weniger T, Krawczyk J, Supply P, et al. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Web Server issue):W326-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2896200/>
- (24) Fenner L, Egger M, Bodmer T, et al.; Gagneux S; Swiss HIV Cohort and Molecular Epidemiology of Tuberculosis Study Groups. HIV infection disrupts the sympatric host-pathogen relationship in human tuberculosis. *PLoS Genet.* 2013;9(3):e1003318. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3591267/>
- (25) Briz T, Nunes C, Alves J, et al. O controlo da tuberculose em Portugal: uma apreciação crítica epidemiológica global. *Rev Port Saude Publica.* 2009;27:19-54. <https://run.unl.pt/handle/10362/4334>
- (26) Rahim Z, Zaman K, van der Zanden AGM, et al. First assessment of major circulating phylogeographical clades of tubercle bacilli found in Bangladesh. In: Abstract Proceeding of the 27th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, London, July 2006.
- (27) Perdigão J, Macedo R, Silva C, et al. Tuberculosis drug-resistance in Lisbon, Portugal: a 6-year overview. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011;17(9):1397-402. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03351.x>
- (28) Lazzarini LC, Spindola SM, Bang H, et al. RDRio *Mycobacterium tuberculosis* infection is associated with a higher frequency of cavitory pulmonary disease. *J Clin Microbiol.* 2008;46(7):2175-83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2446940/>
- (29) Weisenberg SA, Gibson AL, Huard RC, et al. Distinct clinical and epidemiological features of tuberculosis in New York City caused by the RDRio *Mycobacterium tuberculosis* sublineage. *Infect Genet Evol.* 2012;12(4):664-70. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3290718/>
- (30) Gibson AL, Huard RC, Gey van Pittius NC, et al. Application of sensitive and specific molecular methods to uncover global dissemination of the major RDRio Sublineage of the Latin American-Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype family. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1259-67. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2292928/>
- (31) Stead WW, Bates JH. Geographic and evolutionary epidemiology of tuberculosis. In: Rom WN, Garay SM (eds). *Tuberculosis*. New York: Little, Brown and Company, 1996. pp. 77-83.
- (32) Abel L, Casanova JL. Genetic predisposition to clinical tuberculosis: bridging the gap between simple and complex inheritance. *Am J Hum Genet.* 2000;67(2):274-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1287174/>
- (33) Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:581-620.
- (34) Novembre J, Johnson T, Bryc K, et al. Genes mirror geography within Europe. *Nature.* 2008;456(7218):98-101. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2735096/>

## Projeto RiskBenefit4EU – uma estratégia para a avaliação de risco-benefício de alimentos em Portugal

### RiskBenefit4EU project – a strategy for risk-benefit assessment of foods in Portugal

Ricardo Assunção<sup>1,2</sup>, Paula Alvíto<sup>1,2</sup>, Roberto Brazão<sup>1</sup>, Paulo Carmona<sup>3</sup>, Catarina Carvalho<sup>4</sup>, Paulo Fernandes<sup>1</sup>, Lea S. Jakobsen<sup>5</sup>, Carla Lopes<sup>6,7</sup>, Carla Martins<sup>1,2,8</sup>, Jeanne-Marie Membré<sup>9</sup>, Sarogini Monteiro<sup>3</sup>, Pedro Nabais<sup>3</sup>, Sofie T. Thomsen<sup>5</sup>, Duarte Torres<sup>4,6</sup>, Sílvia Viegas<sup>1</sup>, Sara M. Pires<sup>5</sup>, Géraldine Boué<sup>9</sup>

ricardo.assuncao@insa.min-saude.pt

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

(2) Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

(3) Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, Lisboa, Portugal.

(4) Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

(5) Division for Diet, Disease Prevention and Toxicology. The National Food Institute. Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark.

(6) Unidade de Investigação em Epidemiologia. Instituto de Saúde Pública, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

(7) Departamento de Ciências da Saúde Pública e Forenses, e Educação Médica. Unidade de Epidemiologia. Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

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

(9) Unité Sécurité des Aliments et Microbiologie. Institut National de la Recherche Agronomique, Université Bretagne Loire, Oniris, Nantes, France.

### \_Resumo

O balanço entre os riscos e benefícios para a saúde resultante do consumo de alimentos é um importante contributo para apoiar a definição de políticas de saúde e a promoção da literacia dos consumidores. No âmbito do projeto RiskBenefit4EU, financiado pela *European Food Safety Authority* e coordenado pelo Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, o presente trabalho pretende descrever a estratégia implementada para a capacitação das equipas portuguesas em avaliação de risco-benefício de alimentos (RBA). Concretizada pelos parceiros do Institut National de la Recherche Agronomique e da Technical University of Denmark, a capacitação consiste em três atividades principais: 1) Formação teórica, focando os conceitos-chave para a avaliação de RBA; 2) Formação prática, aplicando os conceitos adquiridos e as metodologias transmitidas a um estudo de caso; e 3) Missões científicas, de curta duração, para formação avançada em domínios específicos da avaliação de RBA. No que diz respeito à formação prática, e com o objetivo de consolidar os conhecimentos adquiridos em avaliação de RBA, está previsto o desenvolvimento de um estudo de caso português sobre alimentos à base de cereais habitualmente consumidos por crianças. A estratégia de capacitação seguida neste projeto servirá de modelo para outras equipas e países, contribuindo para a disseminação de uma cultura de avaliação de RBA nas vertentes toxicológica, microbiológica e nutricional a nível internacional.

### \_Abstract

The balance of risks and health benefits from food consumption constitutes a crucial topic to consumer literacy and health policy-makers. Through the RiskBenefit4EU project, funded by the *European Food Safety Authority*, and coordinated by the Food and Nutrition Department of Portuguese National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, the present work intends to identify the applied strategy to capacitate the Portuguese teams for the development and implementation of risk-benefit assessment (RBA) in food.

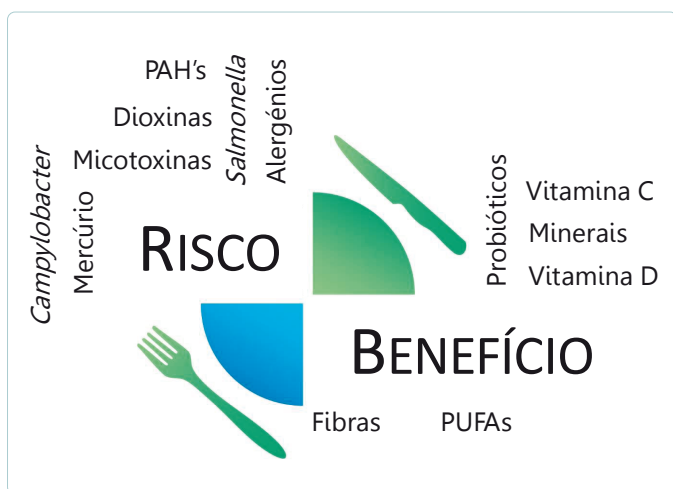
The training of the Portuguese team is being accomplished by the French National Institute for Agricultural Research and the Technical University of Denmark members, through three main capacity building activities: 1) Theoretical training, focusing on the key concepts for RBA; 2) Practical training, applying the concepts acquired and the methodologies transmitted to a concrete case study; and 3) Short-term scientific missions for advanced training in specific areas of RBA. In order to complete the training of the Portuguese teams and consolidate the knowledge acquired in RBA, a Portuguese case study on cereal-based foods usually consumed by children is planned. The training strategy followed in this project will contribute as a model of capacity building for disseminating a culture of risk-benefit assessment in the toxicological, microbiological and nutritional aspects at the international level.

### \_Introdução

É reconhecido que a dieta, os alimentos que a constituem ou os seus componentes podem apresentar riscos e benefícios para os consumidores (figura 1). O resultado do balanço destes dois elementos assume particular importância para os diferentes intervenientes da cadeia alimentar, desde os decisores políticos, que contribuem para o estabelecimento de recomendações de saúde, aos consumidores, que fazem escolhas que determinarão alterações nas suas dietas. A avaliação de risco-benefício de alimentos (RBA) consiste numa ferramenta que permite estimar os riscos e os benefícios para a saúde humana da exposição (ou da ausência dela) a um

alimento ou grupo de alimentos (dieta) ou a alguns dos seus componentes. Estes riscos e benefícios, de natureza toxicológica, microbiológica ou nutricional, deverão ser integrados em métricas comparáveis, por forma a determinar o balanço entre o risco e o benefício<sup>(1)</sup>.

Figura 1: Avaliação de risco-benefício de alimentos.



Apesar da evolução a nível internacional verificada nos últimos anos no domínio da avaliação de RBA, através do desenvolvimento de diferentes projetos<sup>(2-8)</sup>, redes e iniciativas<sup>(9)</sup>, existem diversos desafios no desenvolvimento da avaliação de RBA<sup>(10)</sup>, entre os quais se destacam a ausência de dados e de conhecimento nas diferentes áreas que a integram, a não inclusão da componente microbiológica nestas avaliações e a não utilização de métricas integrativas de saúde.

Em Portugal, os estudos de RBA desenvolvidos até ao momento estão exclusivamente associados à avaliação de riscos e benefícios associados ao consumo de peixe ou alimentos relacionados, integrando maioritariamente as componentes nutricional e toxicológica<sup>(11-19)</sup>. Assim, considera-se de extrema relevância o desenvolvimento de ações que permitam a atualização e/ou capacitação científica e técnica necessárias para a implementação da avaliação de RBA em Portugal.

Através da linha de financiamento da *European Food Safety Authority (EFSA's Partnering Grants)*, foi possível estabelecer uma equipa internacional multidisciplinar, integrando par-

ticipantes de diferentes instituições nacionais (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, INSA; Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, ASAE; Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, UPORTO) e internacionais (Institut National de la Recherche Agronomique, INRA; National Food Institute, Technical University of Denmark, DTU), no âmbito do projeto RiskBenefit4EU (<https://riskbenefit4eu.wordpress.com/>). Assumindo como lema "trabalhando em equipa para fortalecer a avaliação de risco-benefício na UE (União Europeia) através do desenvolvimento e aplicação de uma abordagem holística", o projeto RiskBenefit4EU, coordenado pelo Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA, tem como principal objetivo o fortalecimento da capacidade da UE para avaliar e integrar os riscos e benefícios alimentares para a saúde dos consumidores, nas vertentes toxicológica, microbiológica e nutricional. Através da capacitação das equipas portuguesas para a implementação de avaliação de RBA pretende-se desenvolver uma estratégia de capacitação que poderá ser aplicada no futuro em diferentes países da EU.

### \_Objetivo

Este artigo apresenta a estratégia para o desenvolvimento e execução da avaliação de risco-benefício de alimentos (RBA) em Portugal, desenvolvida e implementada no âmbito do projeto RiskBenefit4EU para a capacitação das equipas portuguesas envolvidas neste projeto.


### \_Material e métodos

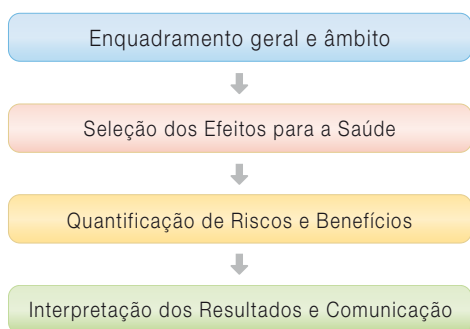
Com especial enfoque para a capacitação, as atividades de formação desenvolvidas no âmbito do projeto RiskBenefit4EU são enquadradas na tarefa 2 do projeto: "*Capacity building & Framework development*". Através de uma formação teórica complementada com exercícios de aplicação práticos, os membros das equipas do INRA e DTU transmitiram os conceitos-chave para a implementação de avaliação de RBA aos membros das equipas portuguesas. Neste artigo é apresentada a estratégia utilizada para esta capacitação, bem como as atividades desenvolvidas e planeadas no âmbito do projeto RiskBenefit4EU.

## \_Resultados

No âmbito do projeto RiskBenefit4EU foram consideradas três atividades principais de capacitação: 1) formação teórica, focando os conceitos-chave para a avaliação de RBA; 2) formação prática, aplicando os conceitos adquiridos a um estudo de caso concreto, aplicando as metodologias e ferramentas transmitidas; e 3) missões científicas de curta duração, no sentido de obter formação avançada em domínios específicos da avaliação de RBA.

No que concerne à formação teórica, foi seguida uma abordagem passo a passo, em conformidade com a abordagem previamente descrita por Boué e colaboradores<sup>(20)</sup>. A [figura 2](#) apresenta os principais passos considerados na RBA, no âmbito do projeto RiskBenefit4EU e sobre os quais incidiu a formação teórica desenvolvida.

**Figura 2:**  Abordagem passo a passo da avaliação de risco-benefício em alimentos: principais passos considerados no âmbito do projeto RiskBenefit4EU.



No âmbito da etapa 1, “Enquadramento geral e âmbito”, foram estabelecidas as recomendações para a definição do problema a ser avaliado no âmbito da avaliação de RBA, bem como a definição dos cenários a considerar na avaliação. Na etapa seguinte, “Seleção dos Efeitos para a Saúde”, foram apresentadas as estratégias para a identificação e priorização dos efeitos para a saúde. Na “Quantificação de Riscos e Benefícios”, as metodologias de avaliação individual dos riscos e benefícios, tendo em conta a sua natureza (toxicológica, microbiológica e nutricional) foram apresentadas e discutidas, bem como as metodologias para quantificação do impacto

na saúde. Por último, na etapa “Interpretação dos Resultados e Comunicação”, foram focadas as principais metodologias para comparar os diferentes cenários, interpretação dos resultados e sua comunicação.

Por forma a dar seguimento à capacitação das equipas portuguesas, está previsto o desenvolvimento de um estudo de caso português sobre alimentos à base de cereais, habitualmente consumidos por crianças. Com o objetivo de planificar as atividades necessárias à realização do estudo de caso, será realizado um segundo momento de formação maioritariamente num formato de tutoria. O desenvolvimento deste estudo de caso será uma oportunidade para consolidar os conhecimentos adquiridos e em complemento com as missões de curta duração, obter conhecimentos avançados em avaliação de RBA. Estas missões permitirão aos membros das equipas portuguesas visitar as instituições internacionais parceiras (INRA ou DTU), durante um período máximo de duas semanas, favorecendo uma maior proximidade entre os elementos da equipa formadora e em formação e desta forma o aprofundamento de aspetos determinantes para o sucesso desta capacitação.

## \_Discussão e conclusão

O fortalecimento da capacidade para avaliar e integrar os impactos adversos e benéficos resultantes do consumo de alimentos para a saúde dos consumidores, nas vertentes toxicológicas, microbiológicas e nutricionais é uma recente necessidade e importante propósito na União Europeia<sup>(9)</sup>.

A avaliação de risco-benefício de alimentos (RBA) constitui uma ferramenta valiosa para a tomada de decisão, baseada na evidência científica, visando a prevenção da doença e promoção da saúde pública.

O projeto RiskBenefit4EU constitui uma oportunidade de capacitação das equipas portuguesas envolvidas para uma futura implementação da avaliação de RBA em Portugal. A estratégia de capacitação seguida neste projeto servirá de modelo para no futuro capacitar outras equipas, de diferentes nacionalidades, e assim contribuir para o estabelecimento e disseminação de uma cultura de avaliação de risco-benefício a nível internacional.

## Financiamento:

Trabalho desenvolvido no âmbito do projeto "RiskBenefit4EU – Partnering to strengthen the risk-benefit assessment within EU using a holistic approach" financiado pela EFSA Partnering Grants (Grant Agreement Number A/EFSA/AFSCO/2017/01 – GA02). 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) Tijhuis MJ, de Jong N, Pohjola MV, et al. State of the art in benefit-risk analysis: food and nutrition. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(1):5-25. Epub 2011 Jun 12.
- (2) Persson M, Fagt S, Nauta MJ. Personalised fish intake recommendations: the effect of background exposure on optimisation. *Br J Nutr.* 2018;120(8):946-57.
- (3) Thomsen ST, Pires SM, Devleeschauwer B, et al. Investigating the risk-benefit balance of substituting red and processed meat with fish in a Danish diet. *Food Chem Toxicol.* 2018;120:50-63.
- (4) Boué G, Cummins E, Guillou S, et al. Public health risks and benefits associated with breast milk and infant formula consumption. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(1):126-145. Epub 2017 Jun 2.
- (5) Boué G, Membré J-M. Risk-benefit assessment in Europe. In: Assunção R, Martins C, Alvito P (eds). *RiskBenefit4EU – Workshop on risk-benefit assessment of foods: book of abstracts*, 2018, p. 16. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5560>
- (6) Boué G, Membré J-M. Risk-benefit assessment in Europe. In: Assunção R, Martins C, Alvito P (eds). *RiskBenefit4EU – Workshop on risk-benefit assessment of foods: book of abstracts*, 2018, p. 27. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5560>
- (7) Boué G, Cummins E, Guillou S, et al. Development and Application of a Probabilistic Risk-Benefit Assessment Model for Infant Feeding Integrating Microbiological, Nutritional, and Chemical Components. *Risk Anal.* 2017;37(12):2360-88.
- (8) 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;5(1):32-58.
- (9) Pires SM, Boué G, Boobis A, et al. Risk Benefit Assessment of foods: Key findings from an international workshop. *Food Res. Int.* 2018. Epub 2018 Sep 10
- (10) Nauta MJ, Andersen R, Pilegaard K, et al. Meeting the challenges in the development of risk-benefit assessment of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 2018;76:90-100. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.004>
- (11) Afonso C, Lourenço HM, Cardoso C, et al. From fish chemical characterisation to the benefit-risk assessment-part A. *Food Chem.* 2013;137(1-4):99-107. Epub 2012 Oct 23.
- (12) Afonso C, Cardoso C, Lourenço HM, et al. Evaluation of hazards and benefits associated with the consumption of six fish species from the Portuguese coast. *J Food Comp Anal.* 2013;32(1):59-6.
- (13) Cardoso C, Bandarra N, Lourenço H, et al. Methylmercury risks and EPA + DHA benefits associated with seafood consumption in Europe. *Risk Anal.* 2010;30(5):827-40.
- (14) Jacobs S, Sioen I, Jacxsens L, et al. Risk assessment of methylmercury in five European countries considering the national seafood consumption patterns. *Food Chem Toxicol.* 2017;104:26-34. Epub 2016 Oct 27.
- (15) Jacobs S, Sioen I, Pieniak Z, et al. Consumers' health risk-benefit perception of seafood and attitude toward the marine environment: Insights from five European countries. *Environ Res.* 2015;143(Pt B):11-9.
- (16) Matos J, Lourenço HM, Brito P, et al. Influence of bioaccessibility of total mercury, methyl-mercury and selenium on the risk/benefit associated to the consumption of raw and cooked blue shark (*Prionace glauca*). *Environ Res.* 2015;143(Pt B):123-9.
- (17) Costa S, Afonso C, Bandarra NM, et al. The emerging farmed fish species meagre (*Argyrosomus regius*): how culinary treatment affects nutrients and contaminants concentration and associated benefit-risk balance. *Food Chem Toxicol.* 2013;60:277-85.
- (18) Afonso C, Costa S, Cardoso C, et al. Benefits and risks associated with consumption of raw, cooked, and canned tuna (*Thunnus spp.*) based on the bioaccessibility of selenium and methylmercury. *Environ Res.* 2015;143(Pt B):130-7.
- (19) Afonso C, Costa S, Cardoso C, et al. Evaluation of the risk/benefit associated to the consumption of raw and cooked farmed meagre based on the bioaccessibility of selenium, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, total mercury, and methylmercury determined by an in vitro digestion model. *Food Chem.* 2015;170:249-56. Epub 2014 Aug 20.
- (20) Boué, G. Public health risk-benefit assessment in foods: methodological development with application to infant milk-based diet. (PhD Thesis ONIRIS, Nantes Atlantic College of Veterinary Medicine, Food Science and Engineering, 2017). <http://www.theses.fr/2017ONIR100F.pdf>

## Avaliação da intervenção qualitativa na composição nutricional de refeições escolares: programa *Eat Mediterranean*

*Assessment of the qualitative intervention on school meals' nutritional composition: program Eat Mediterranean*

Mariana Santos<sup>1,2</sup>, Sofia Mendes<sup>3</sup>, Ana Dinis<sup>4</sup>, Carla Rascôa<sup>4</sup>, Ana Isabel Rito<sup>1,3</sup>

mariana.coelho@insa.min-saude.pt

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

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

(3) Centro de Estudos e Investigação em Dinâmicas Sociais e Saúde, Oeiras, Portugal.

(4) Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, Lisboa, Portugal.

### Resumo

O programa de intervenção comunitária *Eat Mediterranean*: a program for eliminating dietary inequality in schools (EM), promovido pela Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, teve como objetivo contribuir para a redução das desigualdades nutricionais em meio escolar, através da promoção da Dieta Mediterrânica enquanto estilo de vida saudável e com um padrão alimentar mediterrânico. O presente artigo refere-se à avaliação da composição nutricional das refeições escolares, antes e após intervenção deste programa, relativamente às recomendações nutricionais estabelecidas para a população em estudo. Na fase de diagnóstico as refeições avaliadas apresentaram um desvio negativo, para os teores de energia e hidratos de carbono para os grupos 6-10 e 16-21 anos (com e sem pão nas refeições), mantendo-se esta tendência para as outras faixas etárias, particularmente para as refeições sem pão. Em contraste, com exceção da faixa etária dos 16-21, observaram-se desvios tendencialmente positivos para os teores de proteína, relativamente às recomendações nutricionais estabelecidas para a população em estudo. Os teores de sal apresentaram desvios diferentes para as diferentes faixas etárias, sendo estes superiores a 40% para a faixa etária dos 2-5, quando comparados com o valor da dose diária recomendada. Na fase pós-intervenção, conseguiram-se melhorias significativas nos teores de energia e hidratos de carbono para as faixas etárias dos 2-5 e 6-10 ano, nos valores de proteína manteve-se o desvio positivo e, no teor de sal, observou-se uma redução nos desvios obtidos para todas as faixas etárias. Quanto ao valor de gordura esteve sempre dentro dos intervalos de referência, na fase de diagnóstico e intervenção. O programa EM demonstrou ter um impacto positivo na qualidade nutricional das refeições escolares disponibilizadas, embora os aspetos relacionados com a redução do teor de sal, a oferta de quantidades adequadas de proteína e hidratos de carbono, bem como a porção servida à respetiva faixa etária, precisem de ser acompanhados, ajustados e reavaliados.

### Abstract

*The community-based intervention Eat Mediterranean: a program for eliminating dietary inequality in schools (EM), promoted by the Portuguese Regional Health Administration of Lisbon and Tagus Valley, aimed to contribute to the reduction of nutritional inequalities in the school environment through the promotion of the Mediterranean Diet, an healthy lifestyle with a mediterranean food pattern. The present study addresses the evaluation of the nutritional composition of school meals, before and*

*after the intervention of the EM, considering the nutritional recommendations set out for the population under study and/or the value of the recommended daily allowance, for the respective age group. In the diagnostic phase, the evaluated meals showed a negative deviation for total energy and for the carbohydrate content, for the groups 6-10 and 16-21 ages (with and without bread), being this trend maintained for the remaining age ranges, particularly for meals without bread. In contrast, with the exception of the age group of 16-21, protein content presented tendentially positive deviations, as compared with the nutritional recommendations set out for the population under study. Regarding salt content, different deviations were observed among the studied age groups being these deviations higher than 40% for the age group of 2-5, as compared with the value of the recommended daily allowance, for the respective age group. In the post-intervention phase, corrections were achieved for total energy and carbohydrate content particularly for the age groups of 2-5 e 6-10, for protein values, the positive deviation was still registered and the salt content decreased for all age groups. The fat content was always within the reference intervals, in the diagnosis and intervention phase. The EM program has proved to have an overall positive impact on the nutritional quality of the school meals provided. However, the reduction of salt content, the provision of adequate amounts of protein as well as the adjustment of the portion served to the respective age group should be reinforced, adjusted and monitored.*

### Introdução

As escolas, enquanto espaços educativos e promotores de saúde, devem assegurar um ambiente que valorize uma alimentação adequada, quer através dos conteúdos curriculares, quer através da oferta alimentar em meio escolar.

A qualidade das refeições realizadas em meio escolar é determinante para a saúde e desenvolvimento das crianças e jovens, uma vez que é na escola que ingerem a maioria das suas refeições e onde passam um tempo significativo das suas vidas <sup>(1)</sup>.

Em Portugal, os municípios são responsáveis pelo fornecimento das refeições escolares (almoço) e pela gestão das ementas do ensino pré-escolar e 1º ciclo do ensino básico (2). No 2º e 3º ciclos do ensino básico e no ensino secundário, com exceção das escolas com o seu próprio serviço de cozinha, o fornecimento de refeições escolares é da responsabilidade da Direção-Geral dos Estabelecimentos Escolares (DGEstE) (3).

A Organização Mundial da Saúde e a União Europeia, reconhecem o papel da escola no combate à obesidade, bem como a importância de estabelecer políticas de apoio a comportamentos alimentares adequados que limitem a disponibilidade de produtos com elevados teores de sal, açúcar e gordura (4-6).

O programa de intervenção comunitária *Eat Mediterranean: a program for eliminating dietary inequality in schools* (EM), promovido pela Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, nos municípios de Santarém e Alpiarça nos anos letivos de 2015/2016 e 2016/2017, teve como principal objetivo contribuir para a redução das desigualdades nutricionais em meio escolar, através da promoção da Dieta Mediterrânica e seus princípios, enquanto estilo de vida saudável e com um padrão alimentar mediterrânico (7).

De entre os vários objetivos da estrutura da intervenção do programa EM, a nível individual e comunitário, foi definida como área de intervenção prioritária a avaliação e melhoria da oferta alimentar nos refeitórios, bares e bufetes escolares e máquinas de venda automática de alimentos.

### **\_Objetivo**

O presente estudo refere-se à avaliação da composição nutricional das refeições escolares, antes e após intervenção do programa EM.

### **\_Material e métodos**

O programa EM foi desenvolvido em três Agrupamentos de Escolas dos municípios de Santarém e de Alpiarça, nos anos letivos 2015/16 e 2016/17, num total de 25 escolas. Os alunos que beneficiaram da presente intervenção foram alunos do ensino pré-escolar até ao secundário, compreendendo idades entre os 2 e os 21 anos (tabela 1).

**Tabela 1:** Distribuição dos alunos por ano letivo.

Ano letivo	Alunos nas escolas (n)
Fase 1 (2015/2016)	5773
Fase 2 (2016/2017)	5925

O programa incluiu as fases: 1) Fase de Diagnóstico inicial (março-junho 2016) onde foram avaliadas as ementas escolares referentes ao ano letivo 2015/2016, e colhidas amostras para avaliação laboratorial, 2) Fase de Intervenção (julho-março de 2017) onde foram elaboradas e implementadas novas ementas alinhadas para corrigir os desvios encontrados na Fase 1 e 3) Fase Pós-Intervenção (abril-junho de 2017) onde foi realizada uma nova avaliação laboratorial das refeições escolares.

Foram identificados dez pontos de colheita que forneciam as refeições às 25 escolas integradas no programa EM, representando assim 100% dos locais de confeção de alimentos para as 25 escolas.

Uma refeição completa era composta por pão, sopa, prato principal e uma peça de fruta. As amostras colhidas incluíam: pão, sopa e prato principal (com salada ou hortícolas cozidos). Em cada momento foram colhidas 10 refeições, tendo sido analisadas no total 20 refeições, que representaram 60 amostras.

Os teores de proteína, gordura total, hidratos de carbono, valor energético e sal foram determinados por métodos internos desenvolvidos e validados pelo laboratório, e de acordo com normas europeias ou internacionais (8). As análises foram realizadas, em condições de garantia da qualidade cumprindo os requisitos descritos na norma EN ISO/IEC 17025 (9).

A avaliação da composição nutricional das refeições foi realizada considerando que a refeição do almoço deverá contribuir com 30% do valor energético diário (10), e através da verificação dos desvios relativos às recomendações nutricionais, estabelecidas pelo *Joint FAO/WHO Expert Consultation* para a população em estudo (11).

Assumindo que algumas crianças nem sempre consomem o pão (que é oferecido adicionalmente na refeição), dois cenários foram considerados para avaliar a composição nutricional das refeições: com e sem pão.

A existência de desvios relativos foi considerada sempre que os resultados estivessem abaixo ou acima dos valores mínimo e máximo de referência usados, para os nutrientes e valor de energia analisados. O limite inferior foi usado como valor de referência, para analisar os desvios que estavam abaixo do intervalo de referência. Da mesma forma, o limite superior foi usado como valor de referência para considerar os desvios que estavam acima do intervalo de referência. Qualquer valor dentro do intervalo de referência foi considerado como tendo 0% de desvio.

Estabeleceu-se que houve alteração ao desvio relativo obtido, antes e após a intervenção, quando essa alteração foi superior a 5%.

## \_Resultados

Verifica-se na [tabela 2](#) que na fase de diagnóstico as refeições (com e sem pão) apresentaram um desvio negativo, para os valores de energia e hidratos de carbono relativamente às recomendações nutricionais estabelecidas para os grupos 6-10 e 16-21 anos, mantendo-se esta tendência para as outras faixas etárias, particularmente para as refeições sem pão. Quanto ao teor de proteína, com exceção da faixa etária dos 16-21, observou-se uma percentagem de desvio tendencialmente positiva, em especial para as refeições com pão. O valor de gordura estava dentro dos intervalos de referência e o teor de sal apresentou um desvio superior a 40%, relativamente ao valor da dose diária recomendada, para a faixa etária dos 2-5 anos.

Na fase pós-intervenção, verificou-se que os teores de energia e hidratos de carbono aproximaram-se daqueles estabelecidos nos intervalos de referência, nas refeições com pão, para as faixas etárias dos 2-5 e 6-10 anos. Na faixa etária dos 11-15, a intervenção não revelou alterações nos teores de hidratos de carbono quando comparados com os interva-

los de referência e, na faixa etária dos 16-21, o desvio negativo encontrado acentuou-se. Para os valores de proteína, com exceção da faixa etária dos 16-21, onde os teores de proteína se mantiveram próximos dos estabelecidos nos intervalos de referência, mantiveram-se os desvios positivo relativos aos intervalos de referência nos restantes grupos etários, com acentuação dos mesmos para as faixas etárias dos 2-5 e 6-10. O valor de gordura não revelou alterações e quanto ao teor de sal observou-se uma redução para todas as faixas etárias, que no caso dos grupos 6-10 e 11-15 anos, para as refeições com pão, passou de um desvio positivo para um negativo (-15%).

## \_Discussão

Muito embora as refeições escolares tenham que obedecer a capitações pré-estabelecidas compreendendo as necessidades nutricionais por faixa etária, entende-se que as escolas servem refeições para todos os níveis de ensino de forma semelhante, principalmente no que se refere à quantidade servida (porções) independentemente da idade da criança, dificultando, por essa razão, qualquer correção de desvios nutricionais registados.

No entanto, o *Eat Mediterranean* alcançou vários resultados positivos. Na fase pós-intervenção verificou-se a) redução do teor de sal para todas as faixas etárias, para as refeições com e sem pão; b) melhoria nos desvios dos teores de energia e hidratos de carbono recomendados para as faixas etárias mais jovens (2-5 e 6-10 anos), principalmente para as refeições sem pão. Todavia, houve alguns resultados que não foram atingidos: a) na quantidade de proteína recomendada, o desvio positivo foi superior para as faixas etárias mais jovens (2-5 e 6-10 anos); b) na quantidade de hidratos de carbono recomendada, para a faixa etária dos 16-21 anos acentuaram-se os desvios negativos.

Tabela 2: ▾ Desvios relativos observados referentes às recomendações nutricionais definidas para as faixas etárias em estudo antes e após intervenção.

Faixa etária	Análises	Recomendações <sup>1, 2</sup>	% Desvio relativo			
			Antes intervenção		Pós-intervenção	
			Com pão	Sem pão	Com pão	Sem pão
2-5	Energia	420-490 Kcal	0,8	-16,8	4,7	0,0
	Proteína	10,5-18,4 g	13,9	0,0	59,5	46,2
	Gordura	7,0-16,3 g	0,0	0,0	0,0	0,0
	Hidratos de carbono	57,8-91,9 g	0,0	-18,0	0,0	-11,1
	Sal	<1,8 g	61,1	44,4	50,0	33,3
6-10	Energia	492-574 Kcal	-15,8	-19,0	0,0	-2,7
	Proteína	12,3-21,5 g	20,0	5,4	31,9	17,8
	Gordura	8,2-19,1 g	0,0	0,0	0,0	0,0
	Hidratos de carbono	67,7-107,6 g	-4,7	-30,0	0,0	-12,7
	Sal	<3,06 g	4,6	-5,2	-15,0	-24,8
11-15	Energia	621-725 Kcal	0,0	-16,3	0,0	-16,4
	Proteína	15,5-21,2 g	27,9	11,2	29,6	12,9
	Gordura	10,4-24,2 g	0,0	0,0	0,0	0,0
	Hidratos de carbono	85,4-135,8 g	-1,6	-32,2	-4,4	-32,9
	Sal	<4,08 g	0,5	-11,8	-14,2	-31,4
16-21	Energia	714-833 Kcal	-15,0	-28,0	-16,7	-28,6
	Proteína	17,9-31,2 g	0,0	0,0	1,5	0,0
	Gordura	11,9-27,8 g	0,0	0,0	0,0	0,0
	Hidratos de carbono	98,2-156,2 g	-14,9	-33,5	-23,6	-38,9
	Sal	<5,0 g	-20,0	-28,0	-30,0	-44,0

Desvio relativo (%)=(Desvio observado/Valor referência) x100

<sup>1</sup> Refeição do almoço deverá contribuir com 30% do valor energético diário (energia, proteína, gordura e hidratos de carbono);

<sup>2</sup> Valor diário recomendado (sal).

■ resultados atingidos com a intervenção    ■ resultados não atingidos com a intervenção  
■ resultados que se mostraram inalterados com a intervenção

## \_Conclusões

O programa *Eat Mediterranean* demonstrou ter um impacto positivo na qualidade nutricional das refeições escolares disponibilizadas nas escolas intervencionadas.

Existem alguns aspetos que necessitam ainda de ser melhorados, nomeadamente: a redução do teor de sal, a oferta de quantidades mais adequadas de proteína e hidratos de

carbono, o ajuste das porções servidas às respetivas faixas etárias, o que pode ter tido impacto nos desvios observados nos resultados não atingidos.

O cumprimento das recomendações relativas às refeições escolares é fundamental para garantir o correto aporte energético e nutricional das crianças e jovens.

**Referências bibliográficas:**

- (1) Machado MI. Educação alimentar em meio escolar: referencial para uma oferta alimentar Saudável. Lisboa: Direção-Geral de Inovação e de Desenvolvimento Curricular, 2006.  
[http://www.dge.mec.pt/sites/default/files/Esauade/educacao\\_alimentar\\_em\\_meio\\_escolar.pdf](http://www.dge.mec.pt/sites/default/files/Esauade/educacao_alimentar_em_meio_escolar.pdf)
- (2) Despacho n° 8452-a/2015, 30 de julho. DR. n° 148/2015, 2ª Série (2º Supl), 2015-07-3: 21392-(22-27). Regula as condições de aplicação das medidas de ação social escolar, da responsabilidade do Ministério da Educação e Ciência e dos municípios.  
<https://dre.pt/home/-/dre/69927755/details/maximized?serie=II&drelid=69927750>
- (3) Direção-Geral da Educação. Circular n° 3097/DGE/2018, de 08/08/2018. Orientações sobre ementas e refeitórios escolares 2018.  
<http://www.dge.mec.pt/sites/default/files/Esauade/circular2brefeitorios2bjulho2b2018.pdf>
- (4) WHO Regional Office for Europe. European Charter on counteracting obesity. 2006;(November). Copenhagen: WHO/Europe, 2006.  
[http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0009/87462/E89567.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0009/87462/E89567.pdf?ua=1)
- (5) União Europeia. Parecer do Comité Económico e Social Europeu sobre «A obesidade na Europa — papel e responsabilidades dos parceiros da sociedade civil». JO 31.1.2006: C 24/63-72.  
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52005IE1070&from=PT>
- (6) Commission of the European Communities. White Paper on A Strategy for Europe on Nutrition, Overweight and Obesity related health issues. Brussels: European Commission, 2007.  
[http://ec.europa.eu/health/archive/ph\\_determinants/life\\_style/nutrition/documents/nutrition\\_wp\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/archive/ph_determinants/life_style/nutrition/documents/nutrition_wp_en.pdf)
- (7) Centro de estudos e Investigação em Dinâmicas Sociais e Saúde. Eat Mediterranean Program. [Em linha]. [consult. 30/11/2018]. <http://www.ceidss.com/eat-mediterranean/>
- (8) Association of Official Analytical Chemists International. Official methods of analysis of AOAC International. 20th edition. Gaithersburg, MD: Association of Analytical Communities, 2016.
- (9) ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- (10) Institute of Medicine (US) Committee on Nutrition Standards for National School Lunch and Breakfast Programs; Stallings VA, West Sutor C, Taylor CL (eds). School meals: building blocks for healthy children. Washington (DC): National Academies Press, 2010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK219975/>
- (11) Joint FAO/WHO Expert Consultation. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva: WHO/FAO, 2003. (WHO Technical Report; Series 916). [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42665/WHO\\_TRS\\_916.pdf;jsessionid=22407BB3BE68B193EE73F98CF5148245?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42665/WHO_TRS_916.pdf;jsessionid=22407BB3BE68B193EE73F98CF5148245?sequence=1)

## O stress ambiental pode provocar mais alterações nas plantas do que a engenharia genética

*Environmental stress is the major cause of transcriptomic and proteomic changes in GM and non-GM plants*

Rita Batista<sup>1</sup>, Cátia Fonseca<sup>1,3</sup>, Sébastien Planchon<sup>2</sup>, Sónia Negrão<sup>4</sup>, Jenny Renaut<sup>2</sup>, M. Margarida Oliveira<sup>3</sup>

rita.batista@insa.min-saude.pt

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

(2) Environmental Research and Innovation Department. Luxembourg Institute of Science and Technology, Esch-sur-Alzette, Luxembourg.

(3) Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier. Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal.

(4) Division of Biological and Environmental Sciences and Engineering. King Abdullah University of Science and Technology, Thuwal, Saudi Arabia.

### \_Resumo

A aprovação das plantas geneticamente modificadas é precedida de vários anos de investigação intensiva de forma a garantir a sua segurança para o homem e ambiente. Recentemente demonstrámos que o *stress* da cultura *in vitro* parece ser o fator que mais influencia as diferenças proteómicas encontradas entre as plantas geneticamente modificadas (GM) e os seus controlos. Neste trabalho tentámos avaliar quantas gerações são necessárias para os efeitos da "memória" desse *stress* serem apagados. Tentámos também comparar a relevância das alterações provocadas pelo *stress* da cultura *in vitro* quando comparadas com as provocadas por outros *stresses* ambientais. Para tal seguimos três linhas de arroz durante oito gerações após a transgénese combinando técnicas de análise transcritómica e proteómica. Na geração F6 as plantas foram sujeitas a *stress* salino. Os resultados deste trabalho demonstraram que: (a) as diferenças promovidas durante a modificação genética são maioritariamente diferenças fisiológicas de curta duração, que atenuam ao longo do tempo; (b) os *stresses* ambientais podem causar mais alterações proteómicas/transcritómicas que a engenharia genética. Com base nos dados obtidos questionamos quais os ensaios que são realmente relevantes e quais aqueles claramente excessivos na avaliação do risco das plantas GM para a saúde humana e animal, plantas e ambiente.

### \_Abstract

*The approval of genetically modified (GM) crops is preceded by years of intensive research to demonstrate safety to humans and environment. We recently showed that in vitro culture stress is the major factor influencing proteomic differences of GM vs. non-GM plants. This made us question the number of generations needed to erase such "memory". We also wondered about the relevance of alterations promoted by transgenesis as compared to environment-induced ones. Here we followed three rice lines throughout eight generations after transgenesis combining proteomics and transcriptomics, and further analyzed their response to salinity stress on the F6 generation. Our results showed that: (a) differences promoted during genetic modification are mainly short-term physiological changes, attenuating throughout generations, and (b) environmental stress may cause far more proteomic/transcriptomic alterations than transgenesis. Based on our data, we question what is really relevant in risk assessment design for GM food crops.*

### \_Introdução

As preocupações com a biossegurança das plantas geneticamente modificadas têm levado os governos a implementar regras rígidas para avaliar os seus potenciais riscos antes destas serem colocadas no mercado (1). Esta avaliação do risco é baseada na comparação entre as plantas geneticamente modificadas e os seus controlos e pretende assegurar a segurança no que diz respeito à saúde humana e animal, às plantas e ambiente.

Recentemente evidenciámos que o fator que parece mais influenciar as diferenças encontradas entre uma planta geneticamente modificada e os seus controlos é o *stress* da cultura *in vitro* imposto durante a transformação da planta (2-3). É importante referir que a cultura *in vitro* é uma metodologia não controversa, comumente utilizada no melhoramento de plantas por exemplo para obtenção de plantas livres de pragas e de doenças causadas por bactérias, fungos e, particularmente, por vírus. Demonstrámos também que essas diferenças (causadas pelo *stress* da cultura *in vitro*) são potencialmente memorizadas ao longo das gerações, levando-nos a questionar a relevância das diferenças encontradas entre as plantas GM e os seus controlos quando da avaliação do risco (2).

Se, de facto, as diferenças encontradas entre as plantas GM e os seus controlos forem maioritariamente alterações fisiológicas de curta duração, deverão desaparecer ao longo das gerações. Se for este o caso será de questionar quantas gerações serão precisas para que as plantas GM eliminem a memória do *stress* da cultura *in vitro*. É sabido que o extenso processo que precede a comercialização das plantas GM implica o seu

cultivo por vários anos após a modificação genética e antes da entrada no mercado. Será este período suficiente para a perda de todos os sinais epigenéticos induzidos pelos protocolos de engenharia genética?

Outra questão diz respeito à dimensão das diferenças observadas quando comparadas com as diferenças que sabemos muitas vezes acontecerem devido aos *stresses* ambientais. De facto vários estudos científicos têm evidenciado que o *stress* induz alterações transcritómicas e proteómicas nas plantas e que essas alterações podem inclusivamente alterar a sua potencial alergenicidade (4-7). As plantas que utilizamos na nossa alimentação são maioritariamente cultivadas em campo aberto e, inevitavelmente, sujeitas aos mais diversos tipos de *stress* ambientais. Apesar das estratégias da agricultura moderna tentarem minimizar estímulos indesejados, alguns fatores são imprevisíveis. Assim, potencialmente qualquer consumidor pode consumir plantas que estiveram sujeitas a períodos de *stress* ambiental durante o seu cultivo ou durante os tratamentos pós-colheita.

### \_Objetivos

Este estudo teve como objetivo principal não só perceber como as alterações promovidas pelo *stress* da cultura *in vitro* (que é inevitável durante a produção de plantas geneticamente modificadas, e que provámos ser provavelmente o fator com maior contribuição para as diferenças encontradas entre as plantas GM e os seus controlos) evoluem ao longo das gerações, mas também avaliar se diferenças promovidas por outros *stresses* ambientais *ex vitro* (neste estudo testámos a salinidade) são relevantes quando comparadas com as alterações que as plantas GM podem apresentar quando comparadas com os seus controlos.

### \_Materiais e métodos

Neste trabalho combinámos a análise proteómica (*Multiplex fluorescence 2D gel electrophoresis* acoplada à espectrometria de massa) e transcritómica (*microarrays - Affymetrix RUSGene 1.1ST ArrayStrip*) para comparar as três linhas de arroz em estudo (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponba-

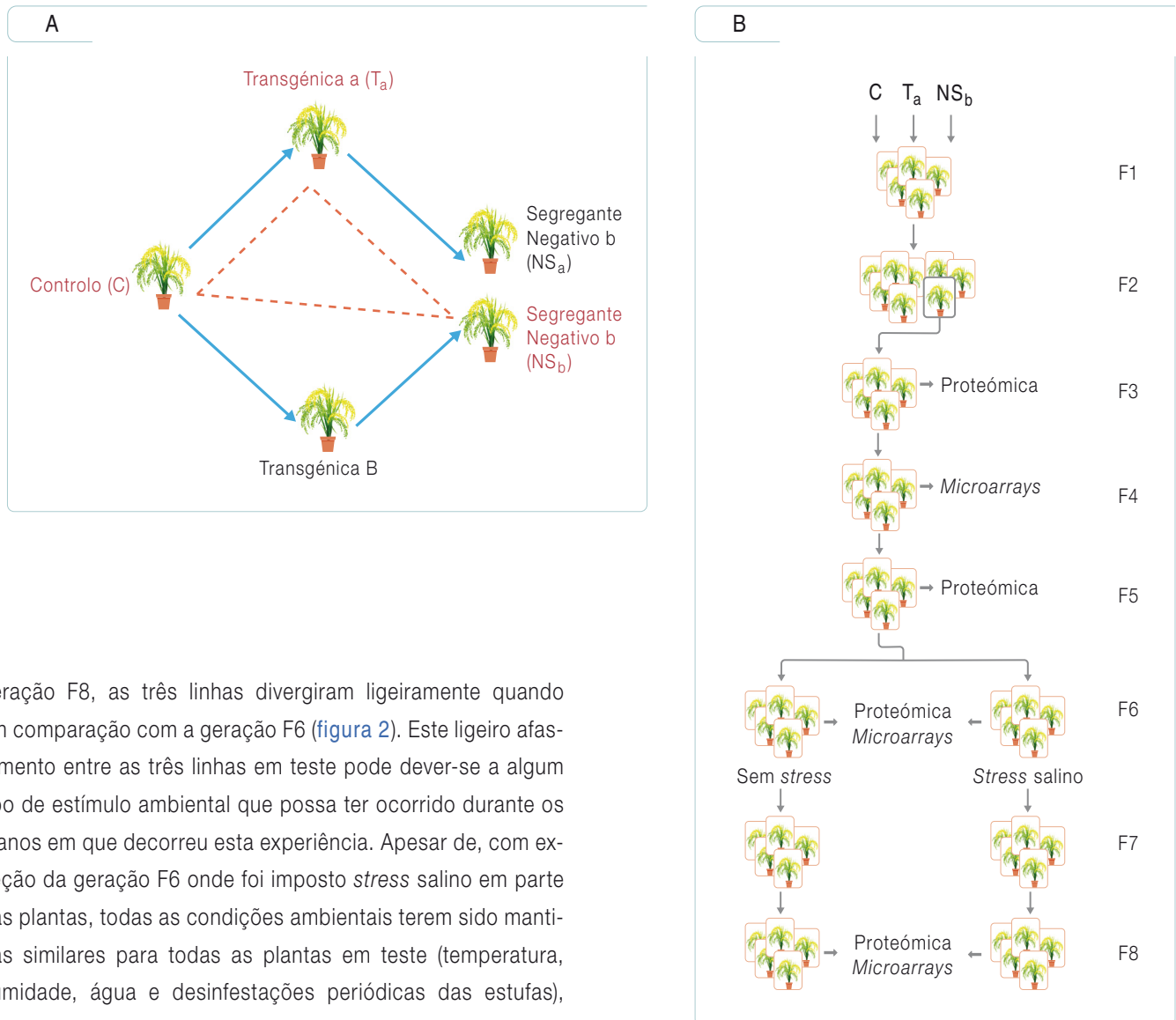
re): um controlo convencional (C), uma linha transgénica ( $T_a$ ) e uma linha segregante negativa ( $NS_b$ ) descendente de uma linha transgénica diferente ( $T_b$ ) (figura 1a). Por definição, um controlo convencional é uma linha o mais parecida possível com a linha transgénica. Neste caso, foi utilizada como controlo a linha de arroz que deu origem à linha transgénica  $T_a$ . Um segregante negativo é uma linha homocigótica que não contém o transgene (não transgénica), obtida por auto polinização de linhas transgénicas heterocigóticas, ou por polinização cruzada entre estas e as linhas controlo convencionais. Dizem-se segregantes negativos pois são linhas que “perderam” o transgene devido à segregação mendeliana. Todas as linhas foram analisadas até à geração F8 e sujeitas a *stress* salino na geração F6 (figura 1b).

### \_Resultados

Neste trabalho confirmámos que o *stress* da cultura *in vitro* parece ser o fator que mais influencia as diferenças encontradas entre as plantas transgénicas e os seus controlos, provocando alterações que persistem ao longo das gerações e que atenuam com o tempo. De facto, os nossos dados de proteómica confirmaram que as linhas  $T_a$  e  $NS_b$  apresentam os seus proteomas alterados de forma similar ao longo das gerações ficando cada vez mais próximas da linha controlo (figura 2). No ensaio de proteómica da geração F6 já não foi possível distinguir as três linhas em teste. Demonstrámos também que, tal como para a geração F3 (2) os spots diferenciadamente abundantes entre as linhas  $T_a$  e  $NS_b$  vs. C na geração F5, correspondem a proteínas que podem ser relacionadas com a resposta a *stress*.

Pudemos constatar também que o número de transcritos diferenciadamente expressos entre as linhas C,  $T_a$  e  $NS_b$ , ao longo das gerações é extremamente baixo face aos 45207 transcritos analisados simultaneamente com o *array* em questão: 47, 17 e 29 transcritos diferenciadamente expressos nas gerações F4, F6 e F9, respetivamente. Os resultados de transcritómica reforçaram também a ideia de que a geração F6 foi aquela onde as três linhas em teste se apresentaram mais similares. É, no entanto, importante referir que, contrariamente ao esperado, na

Figura 1: Linhas utilizadas (A) e representação esquemática da estratégia experimental (B).



geração F8, as três linhas divergiram ligeiramente quando em comparação com a geração F6 (figura 2). Este ligeiro afastamento entre as três linhas em teste pode dever-se a algum tipo de estímulo ambiental que possa ter ocorrido durante os 4 anos em que decorreu esta experiência. Apesar de, com exceção da geração F6 onde foi imposto *stress* salino em parte das plantas, todas as condições ambientais terem sido mantidas similares para todas as plantas em teste (temperatura, humidade, água e desinfestações periódicas das estufas), algum fator não controlado pode ter sido responsável pelas diferenças observadas. Apesar desta pequena divergência observada na geração F8, no geral os nossos resultados parecem indicar que as alterações induzidas pela transgênese são escassas e vão diminuindo ao longo das gerações.

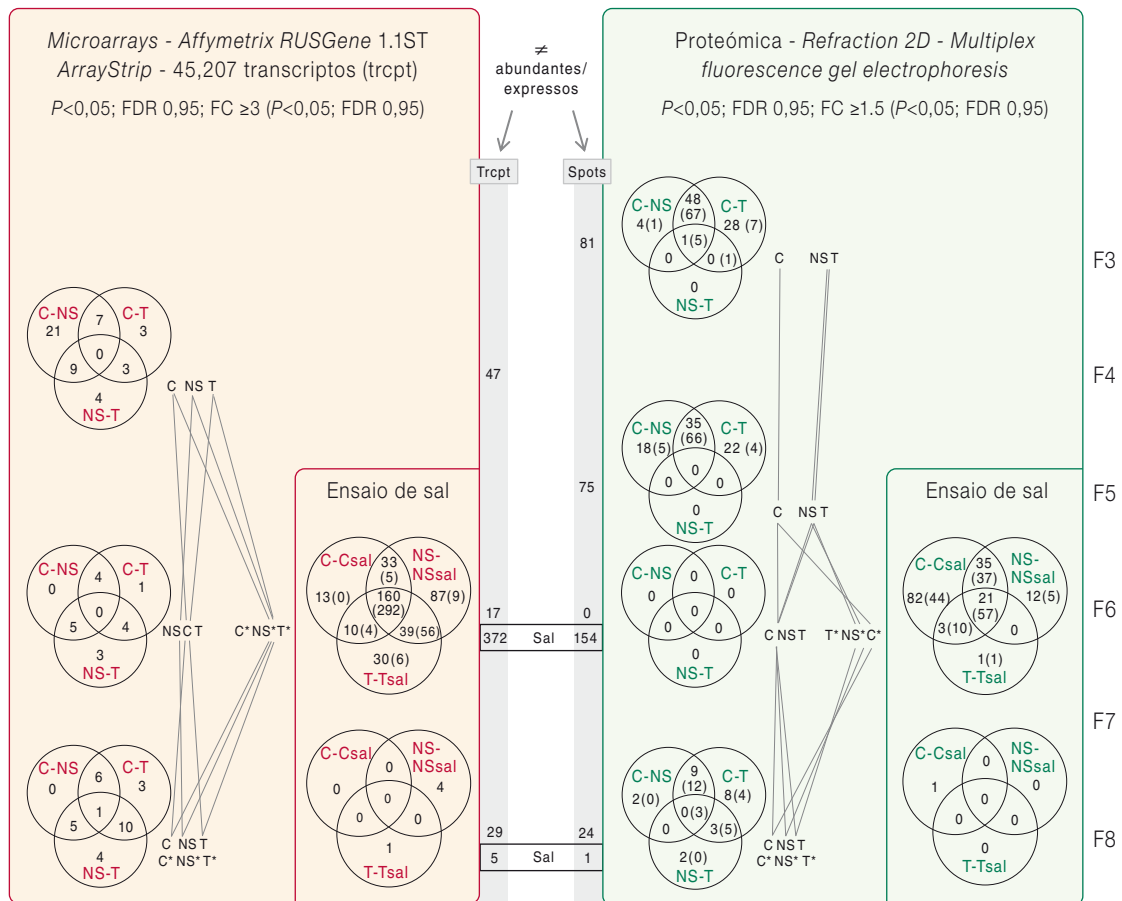
Como esperado, confirmámos que o *stress* salino influencia fortemente o proteoma/transcritoma do arroz. Encontrámos 154 *spots* diferenciadamente abundantes com uma diferença de expressão superior a 1,5 ( $FC > 1,5$ ) e 372 transcritos diferenciadamente expressos com uma  $FC > 3$  pelo menos numa das comparações (C vs. Csal;  $NS_b$  vs.  $NS_b$ sal and  $T_a$  vs.  $T_a$ sal).

Cinquenta e sete dos 154 *spots* diferenciadamente abundantes (37%) e 292 dos 372 transcritos diferenciadamente expressos (78%) viram a sua expressão alterada nas três linhas como consequência do *stress* salino (figura 2).

### \_Discussão e conclusão

É verdade que, neste estudo, o impacto da engenharia genética foi avaliado duas gerações após a transformação das plantas, e o impacto do *stress* salino foi avaliado imediatamente

Figura 2: Sumário dos transcritos diferenciadamente expressos/spots diferenciadamente abundantes ao longo das gerações.



Os diagramas de Venn apresentam o número de spots diferenciadamente abundantes com uma diferença  $\geq 1,5$  (Fold change (FC)  $\geq 1,5$ ) e os transcritos diferenciadamente expressos com uma diferença  $\geq 3$  (FC  $\geq 3$ ) em cada situação. Sempre que aplicado, apresentamos entre parêntesis a redistribuição destes spots/transcritos negligenciando a FC. Para simplificação NS<sub>b</sub>=NS; T<sub>a</sub>=T; Trcpt=Transcritos; C\*=Csal; T\*=Tsal; NS\*=NSsal; FDR=False Discovery Rate; ≠ =diferenciadamente.

após a imposição do stress. No entanto, a regulamentação respeitante à análise do risco das plantas GM obriga a que estas plantas sejam submetidas a uma série de testes antes de serem colocadas no mercado. A avaliação da estabilidade genética da sequência inserida/modificada e a estabilidade fenotípica da planta GM são exemplos de testes que requerem 5 gerações de análises. Assim, as plantas geneticamente modificadas que entram no mercado já passaram por várias gerações após a transgénese. Pelo contrário, todas as plantas cultivadas (GM ou não GM) são inevitavelmente expostas a diferentes stresses bióticos/abióticos (variações de tempe-

ratura, seca, raios ultravioletas, agentes patogénicos, etc.) e consequentemente todos os consumidores ingerem inevitavelmente plantas afetadas pelo ambiente. Porque se sabe que as condições ambientais podem influenciar a produção de proteínas eventualmente tóxicas/alérgicas (4-7), é provável que a toxicidade/alérgenicidade das plantas possa variar de acordo com as condições de crescimento/processamento às quais foram sujeitas. De facto, de acordo com o software AlgPred (8) que prevê a alérgenicidade das proteínas com base na sua sequência, 50% das proteínas que neste estudo viram a sua abundância alterada como resposta ao stress são

potenciais alergénios e 38% dos transcritos com expressão alterada pelo *stress* salino codificam para proteínas que são potenciais alergénios. Embora esta previsão, por si só, não prove a alergenicidade é indicativa de que os estímulos ambientais podem, de facto, ter impacto na alergenicidade de uma dada planta.

Se efetivamente o ambiente por si só pode originar muito mais alterações nas plantas que a engenharia genética, acreditamos ser pertinente questionar o que é relevante e o que é claramente excessivo na avaliação do risco das plantas geneticamente modificadas. Os resultados pormenorizados deste trabalho estão compilados num artigo publicado em 2017 (9).

#### Referências bibliográficas:

- (1) EFSA Panel on Genetically Modified Organisms. Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. *EFSA Journal* 2011; 9(5):2150. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2150>
- (2) Fonseca C, Planchon S, Serra T, et al. In vitro culture may be the major contributing factor for transgenic versus nontransgenic proteomic plant differences. *Proteomics*. 2015;15(1):124-34. Epub 2014 Dec 4.
- (3) Fonseca C, Planchon S, Serra T, et al. A cultura in vitro tem impacto nas diferenças encontradas entre os alimentos transgénicos e seus controlos. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2014;3(Supl 4):48-52. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2542>
- (4) Ahlholm JU, Helander ML, Savolainen J. Genetic and environmental factors affecting the allergenicity of birch (*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii* [Orl.] Hämet-ahti) pollen. *Clin Exp Allergy*. 1998;28(11):1384-8.
- (5) Hänninen AR, Mikkola JH, Kalkkinen N, et al. Increased allergen production in turnip (*Brassica rapa*) by treatments activating defense mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(1):194-201.
- (6) Pühringer H, Moll D, Hoffmann-Sommergruber K, et al. The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Sci*. 2000; 152(1):35-50.
- (7) Armentia A, Callejo A, Díaz-Perales A, et al. Enhancement of tomato allergenicity after treatment with plant hormones. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2003;31(1):44-6.
- (8) Saha S, Raghava GP. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Web Server issue):W202-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1538830/>
- (9) Batista R, Fonseca C, Planchon S, et al. Environmental stress is the major cause of transcriptomic and proteomic changes in GM and non-GM plants. *Sci Rep*. 2017;7(1):10624. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5587699/>

## **Bromo, um contaminante de preocupação emergente em couve portuguesa**

### *Bromine, a contaminant of emerging concern in Portuguese cabbage*

Marta Ventura<sup>1,2</sup>, Inês Delgado<sup>1</sup>, Inês Coelho<sup>1</sup>, Mariana Ribeiro<sup>1</sup>, Marta Ferreira<sup>3</sup>, Maria Helena Costa<sup>2</sup>, Isabel Castanheira<sup>1</sup>

marta.ventura@insa.min-saude.pt

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

(2) Centro de Ciências do Mar e do Ambiente. Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal.

(3) Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona, Lisboa, Portugal.

#### **\_Resumo**

O bromo é um dos principais halogéneos da tabela periódica e tem vindo a ser classificado como contaminante de preocupação emergente, porque devido à sua bio-magnificação pode constituir um risco para a saúde humana. Os compostos bromados são contaminantes não biodegradáveis que se acumulam nos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar. O objetivo deste trabalho foi avaliar os teores de bromo em amostras de couve portuguesa (*Brassica Oleracea* var. *costata* DC), uma hortícola do género brássica bastante consumida pela população portuguesa. Foram recolhidas cento e dezassete amostras durante o período 2015-2017 em diferentes locais representativos de cada distrito de Portugal, em dois períodos de colheita. O teor de bromo foi determinado por espectrometria de massa com plasma indutivo acoplado (ICP-MS), precedido por uma extração alcalina com Tetrametilhidróxido de amónia (TMAH). Os valores de bromo encontrados na primeira colheita estavam compreendidos entre 0,5 e 14,5 mg/kg e na segunda colheita os valores observados estavam compreendidos entre 1,0 e 7,8 mg/kg. As amostras foram organizadas de acordo com a Nomenclatura de Unidades Territoriais NUTS II para Portugal e constatou-se que as regiões com valores mais elevados de bromo foram a Região do Algarve e a Região Autónoma da Madeira. Em comparação com o LMR (limite máximo de resíduos) para os teores do ião brometo em alimentos da espécie brássica (30 mg/kg) verificou-se que nenhuma das amostras analisadas ultrapassou esse valor estipulado. No entanto, serão necessários estudos adicionais sobre a avaliação da exposição, bem como sobre a toxicologia deste contaminante, para que entidades reguladoras possam avaliar a pertinência da revisão da legislação em vigor.

#### **\_Abstract**

*Bromine is one of the principal halogens of the periodic table and has been classified as a contaminant of emerging concern because due to its bio-magnification it may pose a risk to human health. Brominated compounds are non-biodegradable contaminants that accumulate at different trophic levels in the food chain. The main goal of this work was to evaluate the bromine contents in samples of Portuguese cabbage (*Brassica Oleracea* var. *Costata* DC), a vegetal of the *Brassica* genus that is widely consumed by the Portuguese population. One hundred and seventeen samples were collected between 2015-2017 in different representative locations of each district of Portugal. This was done in two harvest periods. The Bromine contents were analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), preceded by an alkaline extraction with 25% ammonium tetramethylhydroxide (TMAH). The Bromine amounts found in the first crop were*

*between 0.5 and 14.5 mg/kg and in the second crop between 1.0 and 7.8 mg/kg. The samples were organized according to the Nomenclature of NUTS II Territorial Units for Portugal and it was found that the regions with the highest bromine contents were the Algarve Region and the Autonomous Region of Madeira. Compared to the MRL (maximum residue limit) for bromide ion contents in foods of the Brassica species (30 mg/kg), none of the analysed samples exceeded this legislated value. However, further studies on the exposure assessment as well as the toxicology of this contaminant will be required, so that regulatory authorities can assess the relevance of the review of existing legislation.*

#### **\_Introdução**

O Bromo (Br) é o 35º elemento e é um dos principais halogéneos da tabela periódica, à temperatura ambiente forma um líquido vermelho-acastanhado denso que é extremamente tóxico para a saúde humana (1).

Este elemento químico tem apenas dois isótopos estáveis na natureza; <sup>79</sup>Br (50,57%) e <sup>81</sup>Br (49,43%), no entanto no meio ambiente pode encontrar-se em várias formas químicas, mas é sobretudo na sua forma inorgânica, o ião brometo, que integra a maioria dos compostos (2). Encontra-se na crosta terrestre em águas do mar, massas de água em geral e ainda pode ser encontrado em solos, plantas e animais (3).

A presença, e respetivas concentrações, de Br no ambiente são essencialmente atribuídas à libertação antropogénica do elemento, através da utilização de pesticidas, fertilizantes e fumigantes na agricultura, emissões industriais, mineração, uso de desinfetantes e retardadores de chama bromados (*brominated flame retardants* - BFRs), estes últimos são compostos aplicados na indústria têxtil, equipamentos elétricos, eletrónicos, plásticos, materiais de construção e mobiliário de forma a aumentar a resistência a incêndios, evitando a

combustão (4). Estes compostos têm a capacidade de ficar retidos no meio ambiente de forma persistente e duradoura, com posterior efeito bioacumulador na cadeia alimentar, como é o caso de produtos de origem marinha (contaminação através do ambiente aquático) e vegetais (contaminação através dos solos e águas de rega) que serão posteriormente consumidos pela população (5).

A maior classe dos compostos BFRs são os difenil éter polibromados (*Polybrominated diphenyl ethers* - PBDEs) que são considerados contaminantes de preocupação emergente e disruptores endócrinos pois podem influenciar o metabolismo do iodo, ao nível da produção das hormonas tiroideias, no sentido de provocar uma diminuição de iodo na tiroide ou aumentar a excreção renal de iodo (6). A ingestão foi reconhecida como a principal via de exposição a PBDEs no ser humano (7).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda um consumo diário de hortícolas entre 3 e 5 porções diárias. Para além dos benefícios nutricionais as hortícolas de folha, como é o caso das couves (*Brassica oleracea* L.), são alimentos acumuladores de metais pesados e sinalizadores de contaminantes ambientais, como é o caso do bromo.

Uma das espécies de brássica mais consumida pela população portuguesa é a couve tronchuda ou, como é mais conhecida, a couve portuguesa (*Brassica Oleracea* var. *costata* DC) (8-10). A avaliação do teor de bromo neste tipo de alimentos é de extrema relevância uma vez que é considerado um indicador do teor de compostos bromados no ambiente e na cadeia alimentar. A avaliação do bromo em alimentos tem despertado o interesse da comunidade científica pois continua a existir algum desconhecimento sobre a toxicidade, e o seu comportamento, a nível ambiental e humano.

### \_Objetivo

Este trabalho teve como objetivo a determinação dos teores de bromo em amostras de folha de couve portuguesa representativas de todos os distritos de Portugal, uma hortícola bastante consumida pela população em Portugal, através do método de ICP-MS.

### \_Materiais e métodos

Foram recolhidas um total de cento e dezassete amostras em diferentes locais representativos de cada distrito de Portugal, em dois períodos distintos, no primeiro período (ano 2015) foram recolhidas 99 amostras em todas as regiões de Portugal e no segundo período (ano 2017) foram recolhidas 18 amostras apenas da região centro do país. As amostras foram agrupadas em 39 *pools*, cada uma constituída por 3 folhas exteriores de 3 couves diferentes.

O teor de bromo foi determinado por espectrometria de massa com plasma indutivo acoplado (ICP-MS), precedido por uma extração alcalina com Tetrametilhidróxido de amónia (TMAH) 25%. Os resultados foram obtidos através de procedimentos analíticos que refletiram os requisitos de garantia da qualidade, descritos na norma ISO/IEC 17025:2005 (11). A concentração foi expressa, em mg de bromo/kg de couve pela média de três réplicas.

### \_Resultados e discussão

As amostras recolhidas no primeiro período de colheita apresentaram valores de bromo compreendidos entre 0,5 e 14,5 mg/kg. No segundo período de colheita os valores de bromo obtidos para as amostras compreenderam valores entre 1,0 e 7,8 mg/kg.

De acordo com o Regulamento (UE) n.º 839/2008 (12), os limites máximos de resíduos (LMR) para os teores do ião brometo em brássicas, como é o caso da couve portuguesa, correspondem a 30 mg/Kg. Os resultados obtidos neste trabalho não ultrapassaram este valor legislado.

Constatou-se que 59% das amostras analisadas apresentaram valores entre 0 e 2,9 mg de bromo por kg de amostra.

As 39 amostras analisadas em forma de *pools*, foram organizadas de acordo com a Nomenclatura de Unidades Territoriais NUTS II para Portugal presente no Regulamento (UE) n.º 868/2014 (13). Como se pode observar no gráfico 1, a Região do Algarve (7,0 mg/kg) e a Região Autónoma da Madeira (6,5 mg/kg) apresentaram os valores de bromo mais elevados.

O Centro é a região onde foi observado o teor mais baixo de bromo (1,8 mg/kg).

Valores semelhantes aos deste estudo são reportados por Yuita e colaboradores, que concluíram que os valores de bromo presentes em solos e em plantas aumentariam com a proximidade da área costeira (14).

No gráfico 2 pode-se observar a diferença do teor de bromo entre os dois períodos de recolha nos locais da região centro do país, e constatou-se que em todas as amostras os valores mais elevados foram encontrados no 2º período, exceto no caso das amostras com os números 34 e 39, em que se verificou um decréscimo no 2º período.

## \_Conclusões

Em comparação com os LMR estipulados no Regulamento (UE) nº 839/2008 para os teores do ião brometo em alimentos da espécie brássica (30 mg/kg) verificou-se que nenhuma das amostras analisadas ultrapassou esse valor estipulado, não representando um perigo para o consumidor.

Até ao momento, em Portugal, estão publicados poucos dados sobre o bromo em alimentos representativos da dieta nacional. O plano de recolha e de análise das amostras de couve portuguesa seguiu uma abordagem de forma a garantir a representatividade das amostras nacionais, o que permitiu a integração dos dados em bases de dados de âmbito europeu como as da

Gráfico 1: Avaliação do teor bromo de acordo com a classificação das Unidades Territoriais-NUTS II.

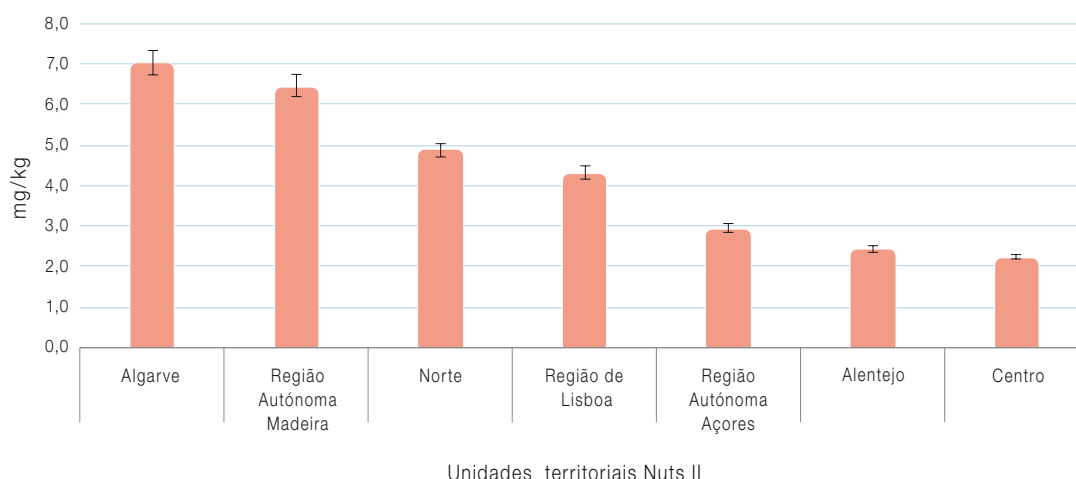
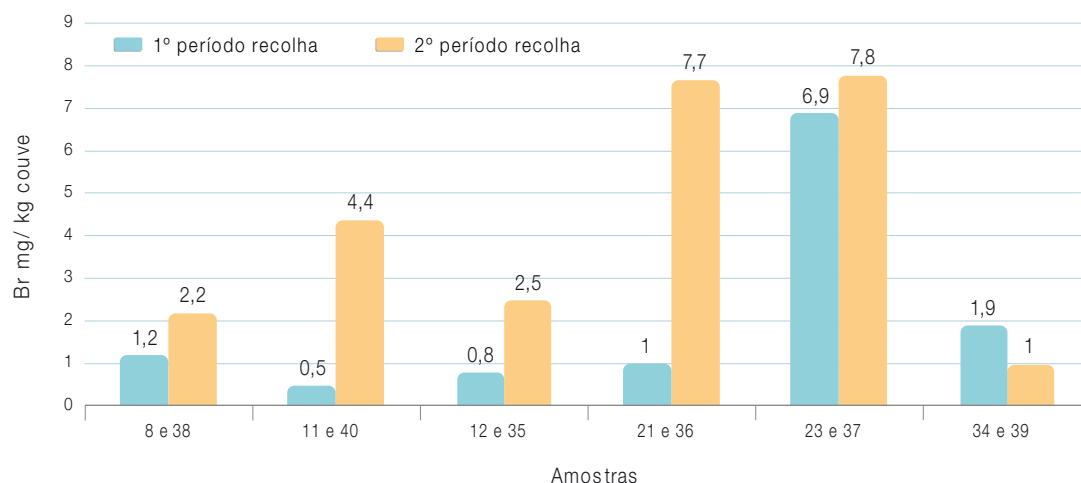


Gráfico 2: Comparação dos teores de bromo entre os dois períodos de recolha de couve portuguesa na região centro de Portugal.



Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, na sigla em inglês).

Este trabalho permitiu então constatar que os teores de bromo nas amostras de couve portuguesa representativas do consumo da população, não constituem risco para a saúde humana. No entanto, os resultados aconselham estudos adicionais sobre a avaliação da exposição a este contaminante. Os dados analíticos obtidos quando combinados com os dados de consumo podem ser um ponto de partida fiável que permitirá às entidades reguladoras avaliar a pertinência da revisão da legislação em vigor.

#### Financiamento:

Este trabalho teve o apoio financeiro do Projeto PRO-METROFOOD, o qual recebeu financiamento do programa de investigação e inovação Horizonte 2020 da União Europeia ao abrigo do contrato de subvenção 739568.

#### Referências bibliográficas:

- (1) Mesko MF, Toralles IG, Hartwig CA, et al. Bromine and Iodine Contents in Raw and Cooked Shrimp and Its Parts. *J Agric Food Chem*. 2016 ;64(8):1817-22.
- (2) van Leeuwen FX, Sangster B. The toxicology of bromide ion. *Crit Rev Toxicol*. 1987;18(3):189-213.
- (3) Shtangeeva I, Perämäki P, Niemelä M, et al. Potential of wheat (*Triticum aestivum* L.) and pea (*Pisum sativum*) for remediation of soils contaminated with bromides and PAHs. *Int J Phytoremediation*. 2018;20(6):560-566.
- (4) Silva MV, Rodrigues AM, Cardoso VV, et al. Retardantes de Chama Bromados: Éteres Difenílicos Polibromados (PBDEs). *Acta Farm Port*. 2014;3(1):67-78. <http://www.actafarmaceuticaportuguesa.com/index.php/afp/article/view/42>
- (5) Ceko MJ, O'Leary S, Harris HH, et al. Trace Elements in Ovaries: Measurement and Physiology. *Biol Reprod*. 2016;94(4):86.
- (6) García-Espiñeira MC, Tejeda-Benítez LP, Olivero-Verbel J. Toxic Effects of Bisphenol A, Propyl Paraben, and Triclosan on *Caenorhabditis elegans*. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(4). pii: E684. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5923726/>
- (7) Cruz R, Cunha SC, Casal S. Brominated flame retardants and seafood safety: a review. *Environ Int*. 2015;77:116-31.
- (8) Ferreres F, Souza C, Valentão P, et al. Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) seeds: Phytochemical characterization and antioxidant potential. *Food Chem*. 2007;101(2):549-58.
- (9) Pereira J. Composição química e actividade antioxidante das folhas internas da couve tronchuda. In: *Actas do 8o Encontro Química dos Alimentos*, 2007.
- (10) Sousa C, Valentão P, Pereira DM, et al. Phytochemical and antioxidant characterization of *Brassica oleracea* var. *costata* extracts . In: Govil J. (ed). *Recent progress on medicinal plants*, 2009, pp. 311-39.
- (11) Instituto Português da Qualidade. NP EN ISO/IEC 17025:2005.Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.
- (12) Comissão Europeia. Regulamento n.º 839/2008, da Comissão, de 31 de julho de 2008, que altera o Regulamento (CE) n.º 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere aos anexos II, III e IV relativos aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície de determinados produtos. JO 30.8.2008: L 234/1-216. <http://data.europa.eu/eli/reg/2008/839/oj>
- (13) União Europeia. Regulamento n.º 868/2014, da Comissão, de 8 de agosto de 2014, que altera os anexos do Regulamento (CE) n.º 1059/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo à instituição de uma Nomenclatura Comum das Unidades Territoriais Estatísticas (NUTS). JO 13.8.2014: L 241/1-54. <http://data.europa.eu/eli/reg/2014/868/oj>
- (14) Yuita K. Iodine, bromine and chlorine contents in soils and plants of Japan: III. iodine, bromine and chlorine contents in the andosols and in plants of central honshu. *Soil Sci. Plant Nutr*. 1983;29(4): 403-28.

## Variantes da hemoglobina com mobilidade eletroforética semelhante à da hemoglobina S Hemoglobin variants with electrophoretic behavior similar to hemoglobin S

Armandina Miranda<sup>1</sup>, Filomena Seuanes<sup>1</sup>, Sandra Copeto<sup>1</sup>, Pedro Loureiro<sup>2</sup>, Isabel Picanço<sup>1</sup>, Alcina Costa<sup>1</sup>, Sandra Costa<sup>1</sup>, Maria Teresa Seixas<sup>1</sup>, João Gonçalves<sup>2-4</sup>, Paula Faustino<sup>4,5</sup>

armandina.miranda@insa.min-saude.pt

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

(2) Unidade de Genética Molecular. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(3) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

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

(5) Instituto de Saúde Ambiental. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

### Resumo

As hemoglobinopatias são doenças genéticas relacionadas com défice da hemoglobina, a proteína vital para o transporte de oxigénio no organismo. De entre elas salienta-se a Drepanocitose causada pela variante S da hemoglobina (HbS) em homozigotia. Neste estudo pretendeu-se identificar as variantes de hemoglobina cujo padrão de migração eletroforética é semelhante ao da HbS. Foram investigados 660 casos de variantes com as características acima referidas detetadas por focagem isoelétrica. Para a identificação presumtiva foi efetuado o teste de solubilidade e a caracterização por HPLC de troca iónica e de fase reversa. A identificação das variantes raras foi efetuada através de sequenciação de Sanger do respetivo gene globínico. De entre os casos estudados, 467 foram confirmados como sendo HbS (70,8%), 101 HbD (15,3%) e 74 HbLepore (11,2%). Os restantes 18 casos (2,7%) foram classificados como variantes raras tendo sido 11 identificadas por sequenciação de DNA. Concluímos que a combinação metodológica utilizada é adequada pois permitiu o correto diagnóstico das variantes mais frequentes e com relevância clínica (HbS, HbD e HbLepore) e, nos casos raros, direcionou o estudo molecular para a análise do gene globínico alterado. A correta identificação de cada variante é essencial para um adequado acompanhamento clínico e aconselhamento genético do doente e seus familiares.

### Abstract

Hemoglobinopathies are genetic diseases related to hemoglobin deficiency, the vital protein for the transport of oxygen in the body. Among them, the most significant is Sickle Cell Anemia caused by homozygosity for the hemoglobin variant S (HbS). The aim of this work was to identify hemoglobin variants with electrophoretic mobility similar to HbS. In this study we analysed 660 cases of variants with HbS-like mobility in isoelectric focusing. For the presumptive identification the solubility test was performed followed by ion-exchange HPLC and reversed phase-HPLC. The rare variants identification was performed by Sanger sequencing of the corresponding globin gene. Among the evaluated cases, 467 were confirmed as HbS (70.8%), 101 HbD (15.3%) and 74 HbLepore (11.2%). The remaining 18 cases (2.7%) were classified as rare variants and 11 of them were identified by DNA sequencing. We can conclude that the methodological combination used allows the correct diagnosis of the more

frequent and clinical relevant variants (HbS, HbD and HbLepore) and, in the other cases, helps to direct the molecular study for the analysis of the affected globin gene. The correct laboratorial diagnosis of each variant is essential for the adequate clinical follow-up and genetic counselling of the patients and their relatives.

### Introdução

As hemoglobinopatias são um grupo heterogéneo de doenças hereditárias autossómicas recessivas, relacionadas com défice quantitativo ou qualitativo da hemoglobina, a proteína vital para o transporte de oxigénio no organismo. No primeiro grupo enquadram-se as talassémias e, no segundo, as variantes estruturais da hemoglobina. Estas são, geralmente, causadas por mutações nos genes globínicos que dão origem a substituição de um aminoácido na proteína e, conseqüentemente, alteram as propriedades físicas, químicas ou funcionais da molécula de hemoglobina.

Estão descritas atualmente mais de 1000 variantes de hemoglobina, mas a mais frequente em Portugal, e também a nível mundial, é a denominada hemoglobina S (HbS; *HBB:c.20A>T*) (1,2). O indivíduo portador de uma variante de hemoglobina (heterozigótico) é na maior parte das vezes assintomático. No entanto, a presença da variante em homozigotia ou em associação com um determinante genético de outra hemoglobinopatia poderá originar uma patologia grave. No caso da HbS, quando esta se apresenta em homozigotia causa Drepanocitose, uma anemia hemolítica crónica de elevada morbidade e mortalidade, embora clinicamente muito heterogénea.

As hemoglobinopatias são doenças genéticas em que a deteção de portadores é possível por testes hematológicos e bioquímicos pelo que a sua identificação é frequentemente presuntiva, com base em tempos de retenção e padrões de migração eletroforética das hemoglobinas. Uma vez que o perfil eletroforético da HbS é partilhado com outras variantes de hemoglobina com ponto isoelétrico semelhante, é imprescindível que sejam efetuados testes laboratoriais confirmatórios para a sua correta identificação. Essas variantes poderão ser fonte de confusão na interpretação dos resultados laboratoriais favorecendo falsos resultados positivos de HbS. Em determinadas situações poderá ser necessário o prosseguimento para a análise molecular do respetivo gene globínico para a identificação definitiva da variante em causa.

### \_Objetivos

Neste estudo pretendeu-se identificar as variantes de hemoglobina cujo padrão de migração é semelhante ao da HbS quando se usam os métodos comuns de diagnóstico laboratorial, eletroforese ou focagem isoelétrica. Pretende-se ainda sensibilizar os laboratórios que realizam rastreio de hemoglobinopatias para a importância da correta identificação deste tipo de variantes.

### \_Materiais e métodos

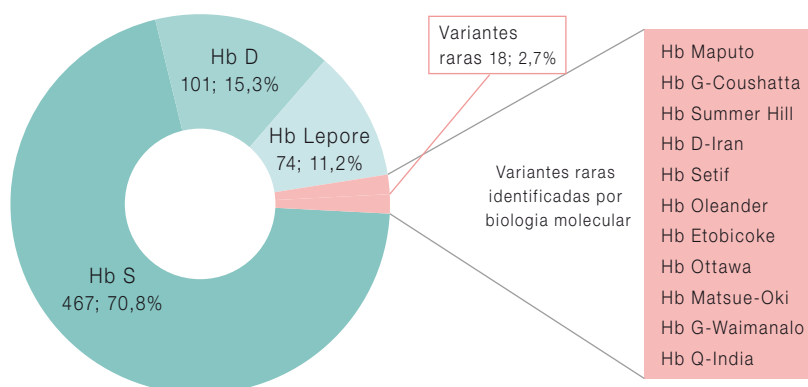
O diagnóstico laboratorial de 660 casos de variantes de hemoglobina foi efetuado na Unidade Laboratorial de Referência do Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doen-

ças Não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge com base na marcha analítica implementada, que faz uso de técnicas de primeira linha e técnicas de confirmação do diagnóstico (3,4). O procedimento iniciou-se com os testes de rastreio, o eritograma e a focagem isoelétrica (FI) em gel de poliacrilamida seguindo-se a cromatografia de HPLC de troca iónica. A HbS foi confirmada pelo teste de solubilidade (3,4). As cadeias de globina variantes foram caracterizadas segundo a sua hidrofobicidade, e classificadas em tipo alfa ou tipo beta, por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC). A identificação definitiva das variantes de hemoglobina raras foi realizada usando metodologia convencional de genética molecular (PCR e sequenciação de Sanger).

### \_Resultados e discussão

Foram analisados, retrospectivamente, os casos de variantes de hemoglobina com mobilidade eletroforética semelhante à da HbS, estudados no laboratório no período compreendido entre janeiro de 2010 e agosto de 2017 (n=660). Os procedimentos analíticos utilizados seguiram as diretrizes internacionais (4) e foram baseados, no mínimo, em duas metodologias com princípios de separação de hemoglobinas diferentes, adequados para a deteção e identificação presuntiva das variantes de hemoglobina clinicamente mais significativas. Assim, dos 660 casos, 467 foram confirmados como sendo efetivamente HbS (70,8%). Outras duas variantes também clinicamente relevantes, a HbD e a Hb Lepore, foram detetadas em, respetivamente, 101 (15,3%) e 74 (11,2%) casos (gráfico 1).

Gráfico 1: ▾ Espectro das variantes da hemoglobina com mobilidade eletroforética semelhante à Hb S detetadas em 660 casos analisados.



Este resultado confirmou o já descrito predomínio da HbS no espectro de variantes encontradas em Portugal seguido da HbD (*HBB*: c.364G>C) (2), também esta uma variante comum com dispersão mundial (5). A variante que ocupou o terceiro lugar foi a Hb Lepore. Esta tem por base uma lesão molecular invulgar, uma deleção que dá origem a um gene híbrido  $\delta\beta$ -globina, e é uma variante relativamente comum no centro de Portugal e Alta Extremadura Espanhola (6).

Os restantes 18 casos analisados foram classificados como variantes raras da hemoglobina (2,7%), tendo sido 11 deles identificados por estudos de genética molecular: Hb Maputo, Hb G-Coushatta, Hb Summer Hill, Hb D-Iran, Hb Setif, Hb Oleander, Hb Etobicoke, Hb Ottawa, Hb Matsue-Oki, Hb G-Waimanalo e Hb Q-India (gráfico 1 e quadro 1).

A variante Hb Matsue-Oki foi detetada em heterozigotia composta com a deleção  $\alpha$ -talassémica de 3,7Kb e a Hb Q-India foi detetada em dupla heterozigotia com  $\beta^0$ -talassémia (c.316-149\_\*342delinsAAGTAGA). Em ambos os casos, verificou-se a presença de anemia microcítica e hipocrômica que poderá ser explicada pela coexistência, respetivamente, da alfa- e da beta-talassémia. Todas as outras variantes raras foram detetadas em heterozigotia e encontram-se descritas na *Globin gene server database* (1) como sendo assintomáticas nessa condição. Contudo, é desconhecido se a sua a co-herança com HbS, com outra variante da hemoglobina, ou com talassémia, se traduz em alterações hematológicas ou clínicas relevantes. O largo espectro de variantes raras da hemoglobina que identificámos, e que já tinham sido descritas noutros locais do globo (1), poderá ser explicado pela vinda para Portugal de imigrantes provenientes de diversas regiões do mundo com elevada prevalência de hemoglobinopatias.

Quadro 1: Caracterização das variantes raras da hemoglobina.

Caso nº	Identificação presuntiva				Identificação definitiva		
	Focagem isoelétrica	Teste de solubilidade	HPLC-troca iónica (zona de migração da variante)	HPLC-fase reversa (cadeia globínica afetada)	Sequenciação de Sanger (alteração genética)	Alteração de aminoácido	Nome da variante de hemoglobina*
1	Mobilidade eletroforética semelhante à da Hb S	Negativo	Em zona da HbD	Beta-globina	<i>HBB</i> :c.142G>T	p.(Asp47Tyr)	Hb Maputo
2			Em zona da HbA <sub>2</sub>	Beta-globina	<i>HBB</i> :c.68A>C	p.(Glu22Ala)	Hb G-Coushatta
3			Em zona da HbS/HbD	Beta-globina	<i>HBB</i> : c.157G>C	p.(Asp52His)	Hb Summer Hill
4			Em zona da HbA <sub>2</sub>	Beta-globina	<i>HBB</i> :c.67G>C	p.(Glu22Gln)	Hb D-Iran
5			Em zona não identificada	Beta-globina	<i>HBA2</i> :c.283G>T	p.(Asp94Tyr)	Hb Setif
6			Em zona da HbD	Alfa-globina	<i>HBA2</i> : c.349G>C	p.(Glu116Gln)	Hb Oleander
7			Em zona não identificada	Alfa-globina	<i>HBA2</i> :c.255C>A	p.(Ser84Arg)	Hb Etobicoke
8			Em zona da HbS	Alfa-globina	<i>HBA2</i> :c.46G>C	p.(Gly15Arg)	Hb Ottawa
9			Em zona da HbS	Não detetada	<i>HBA2</i> :c.226G>A	p.(Asp75Asn)	Hb Matsue-Oki
10			Em zona da HbS	Não detetada	<i>HBA2</i> :c.193G>A	p.(Asp64Asn)	Hb G-Waimanalo
11			Em zona não identificada	Alfa-globina	<i>HBA1</i> :c.193G>C	p.(Asp64His)	Hb Q-India

\* Segundo *Globin Gene Server Database* (1)

## \_Conclusão

Concluimos que a combinação metodológica utilizada é adequada uma vez que permitiu o correto diagnóstico das variantes mais frequentes e com relevância clínica (HbS, HbD e Hb Lepore) e orientou o estudo molecular para a análise do gene globínico afetado, facilitando assim a identificação das variantes raras. A correta identificação de cada variante é essencial para um adequado acompanhamento clínico e aconselhamento genético dos doentes e dos seus familiares.

### Referências bibliográficas:

- (1) Globin gene server database [Em linha]. (consul. 13/11/2018). Disponível em: <http://globin.cse.psu.edu/>
- (2) Martins MC, Olim G, Melo J, et al. Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *J Med Genet.* 1993;30(3):235-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1016307/>
- (3) Ryan K, Bain BJ, Worthington D, et al.; British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol.* 2010;149(1):35-49.
- (4) Traeger-Synodinos J, Hartevelde CL, Old JM, et al.; EMQN haemoglobinopathies best practice meeting. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(4):426-37. Epub 2014 Jul 23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4666573/>
- (5) Patel DK, Mashon RS, Patel S, et al.  $\beta$ -globin gene haplotypes linked with the Hb D-Punjab [ $\beta$ 121(GH4)Glu→Gln, GAA>CAA] mutation in eastern India. *Hemoglobin.* 2010;34(6):530-7.
- (6) Ribeiro ML, Cunha E, Gonçalves P, et al. Hb Lepore-Baltimore (delta 68Leu-beta 84Thr) and Hb Lepore-Washington-Boston (delta 87Gln-beta IVS-II-8) in central Portugal and Spanish Alta Extremadura. *Hum Genet.* 1997;99(5):669-73.

## CNVs em loci de suscetibilidade com penetrância incompleta: da certeza no diagnóstico à incerteza no prognóstico

*Susceptibility loci CNVs with incomplete penetrance: from an accurate diagnosis to an uncertain prognosis*

Sílvia Serafim, Bárbara Marques, Hildeberto Correia

[hildeberto.correia@insa.min-saude.pt](mailto:hildeberto.correia@insa.min-saude.pt)

Unidade de Citogenética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

### \_Resumo

O teste genético de *array* é a primeira linha no diagnóstico genético pós-natal de situações como défice cognitivo, autismo e anomalias congénitas. Em pré-natal, este teste está indicado em gravidezes com anomalias ecográficas. Comparativamente ao cariótipo possibilita um aumento no diagnóstico entre 10-20% em pós-natal e 5-10% em pré-natal. No entanto, também identifica alterações associadas a fenótipos variáveis, com penetrância incompleta (CNVs-LS), conferindo aumento da suscetibilidade a doenças do neuro-desenvolvimento, mas com prognóstico incerto. Neste estudo pretendemos definir um conjunto de CNVs-LS e a sua penetrância, estimada com dados da literatura, aferindo a sua ocorrência na *coorte* com teste genético de *array* realizado no INSA-DG-UCI. Definiram-se 21 CNVs-LS e dum total de 835 diagnósticos em pós-natal e 317 em pré-natal, identificaram-se 36 casos pós-natal e 11 em pré-natal, correspondendo a 4,3% e 3,5% do total, respetivamente. A penetrância estimada para as CNVs-LS apresenta variabilidade inter-publicações, e inter-fenótipo na população estudada, embora seja concordante para algumas variantes. Aferir a penetrância por variante é uma tarefa complexa e a análise por teste genético de *array* acarreta ainda incertezas no diagnóstico e aconselhamento genético, dificuldades apenas superadas com o decorrer do tempo, estudo de mais *coortes* e conhecimento das interações genótipo-ambiente-fenótipo.

### \_Abstract

*Chromosomal microarray analysis (CMA) is the first-tier test for developmental delay, autism spectrum disorders, and congenital abnormalities in postnatal diagnosis and for ultrasound abnormalities in prenatal diagnosis. CMA when compared to karyotype can increase the detection of variants with clinical significance up to 10-20% in postnatal diagnosis and up to 5-18% in prenatal diagnosis. Nevertheless CMA also detects incomplete penetrance neuro-susceptibility loci variants (CNV-SL), with clinical significance but uncertain outcome. The aim of this study is to identify from the literature a set of CNV-SL, and the corresponding penetrance, determining the occurrence in the cohort from INSA-DG-UCI. From a total number of 835 postnatal samples and 317 prenatal samples we have identified 36 and 11 cases, respectively, with a variant in the 21 CNV-SL set obtained from the literature. The estimated penetrance presents some inter-publication variability, especially when concerning samples with different phenotypes, with some variants showing concordance, nevertheless. Estimating penetrance for CNV-SL is a complex task and clarifying uncertainty in these cases is still far from being accomplished.*

*Only time, analysis of larger cohorts, and future knowledge of genotype-environment-phenotype interactions will overcome this difficulty allowing to improve the estimation of clinical impact for the subject or carriers in the family.*

### \_Introdução

Anomalias cromossómicas, como a trissomia 21, e algumas microdeleções ou microduplicações, como a microdeleção em 22q11.2, são alterações genéticas reconhecíveis e claramente identificáveis no contexto do diagnóstico de doenças genéticas.

Desde a introdução do estudo global do genoma por *microarray*, com uma resolução muito superior ao cariótipo, que muitas alterações no número de cópia (*Copy Number Variants* – CNVs) têm vindo a ser identificadas. Estas CNVs podem ser variantes benignas ou polimórficas, encontradas em indivíduos saudáveis, ou serem a causa de situações sindrómicas ou de patologias específicas.

A maior capacidade de identificar CNVs com significado clínico patogénico tornou o teste genético de *array* a primeira linha no diagnóstico genético de uma diversidade de situações como perturbações do desenvolvimento intelectual (PDI), perturbações do espectro do autismo (PEA) e anomalias congénitas (AC) (1,2). Neste grupo de doentes o teste genético de *array* possibilita um aumento entre 10 a 20% de diagnósticos quando comparado ao cariótipo (3,4). Em diagnóstico pré-natal (DPN), o teste genético de *array* está indicado em gravidezes onde se identificam anomalias ecográficas no feto, possibilitando um aumento de diagnósticos entre 5 a 10% nos casos em que o cariótipo é normal (5-7).

No entanto, o teste genético de *array* também possibilita a identificação de CNVs de significado clínico incerto e de CNVs não solicitadas. Existe, ainda, a possibilidade de identificar CNVs que, apesar de serem classificadas por alguns autores como patogénicas, na verdade conferem um aumento da suscetibilidade a doenças do neuro-desenvolvimento, sendo designadas de CNVs associadas a *loci* de suscetibilidade (CNVs-LS) (8,9). Algumas destas variantes são identificadas em *coortes* associadas a diferentes patologias, apresentando uma grande variabilidade fenotípica, podendo também ser identificadas em progenitores fenotipicamente normais, apresentando assim penetrância incompleta, por vezes baixa (10,11). Penetrância é definida como a proporção, ou percentagem, de indivíduos com um genótipo (ou CNV) associado a uma patologia e que mostram sinais ou sintomas dessa patologia (12).

As CNVs-LS, especialmente no âmbito do DPN, são de difícil interpretação já que as implicações clínicas não são possíveis de prever.

### \_Objetivos

O propósito deste estudo é definir um conjunto de CNVs-LS, que sejam consensuais na literatura, e a penetrância estimada para cada uma, aferindo a sua ocorrência e percentagem na *coorte* com teste genético de *array* da Unidade de Citogenética do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA-DG-UCI), no âmbito do diagnóstico pré-natal (DPN), entre janeiro de 2015 e agosto de 2018, e no diagnóstico pós-natal (PN), entre janeiro de 2012 e agosto de 2018.

### \_Material e métodos

Para a seleção das CNVs-LS foram pesquisadas na literatura publicações que incluíssem referências a este tipo de CNVs, em contexto de DPN e/ou PN. Das publicações identificadas foram excluídas as que usavam apenas dados do mesmo artigo (14).

Foram selecionadas quatro publicações, duas das quais estabelecem uma metodologia para atingir a estimativa da penetrância para CNVs-LS (13,14), e outras duas que referem a identificação de CNVs-LS no contexto do DPN (8,15).

Com base nestes quatro artigos, foram selecionadas as CNVs-LS a incluir neste estudo e, seguidamente, analisada a *coorte* com teste genético de *array* realizados no âmbito de DPN e de PN no INSA-DG-UCI, estabelecendo a ocorrência para cada.

A penetrância estimada para cada CNVs-LS foi compilada de artigos (13,14) e reunida na tabela final com resultados.

### \_Resultados

Foi definido um total de 21 CNVs-LS, entre deleções e duplicações, que incluem 12 regiões genómicas distribuídas ao longo de cinco cromossomas diferentes.

De um total de 835 diagnósticos em PN e 317 em DPN, foram identificados 341 casos anormais (40,1%) e 56 casos anormais (17,8%), respetivamente. Destes foram selecionadas os que apresentavam alterações correspondentes às 21 CNVs-LS definidas anteriormente.

Na [tabela 1](#) e [gráfico 1](#) encontram-se representadas as várias CNVs, com a penetrância estimada nos artigos consultados, o número de casos em DPN e PN identificados em cada uma e, quando possível, o tipo de herança.

Tabela 1: CNVs em LS, penetrâncias estimadas em diferentes publicações e dados da *coorte* do INSA-DG-UCI

CNVs em LS	Nº cópia	C.G. (hg 19/GRCh37) (aprox.)	% penetrância Rosenfeld (14) (PDI/PEA/AC)	% penetrância Kirov (13)				INSA-DG-UCI_PN (janeiro 2012 – agosto 2018)			INSA-DG-UCI_DPN (janeiro 2015 – agosto 2018)		
				Kirov (PDI/PEA/AC)	Kirov (SCZ)	Kirov Total	Vassos (SCZ)	Nº	% total	Herança	Nº	% total	Herança
1q21.1 (proximal) <i>RBM8A</i>	dup	145.0-145.0	17,3	–	–	–	–	0	–	–	0	–	–
1q21.1 (distal) <i>GJA5</i>	del	146.5-147.4	36,9	35,0	5,2	40,0	6,1	0	–	–	0	–	–
	dup		29,1	18	2,9	21	–	0	–	–	0	–	–
15q11.2 <i>NIPA1</i>	del	22.8-23.09	10,4	10,7	2,0	13,0	2,0	5	0,59	3h; 2nd	3	0,94	1h; 2nd
	dup		–	–	–	–	–	7	0,84	1h; 6nd	1	0,32	nd
15q13.3	del	31.13-32.48	–	35,0	4,7	40,0	7,4	0	–	–	0	–	–
	dup		–	8,0	1,8	9,8	–	3	0,36	3h	0	–	–
15q13.3 <i>CHRNA7</i>	del	32.01-32.45	–	–	–	100	–	0	–	–	0	–	–
	dup		–	3,1	0,9	4,0	–	2	0,24	nd	1	0,32	nd
16p13.11 <i>MYH11</i>	del	15.51-16.30	13,1	14,0	1,7	15,0	–	0	–	–	0	–	–
	dup		–	8,4	2,2	10,6	2,4	4	0,48	1h; 3nd	1	0,32	1h
16p12.1	del	21.94-22.46	12,3	13,0	13,1	16,0	–	0	–	–	0	–	–
	dup		–	3,9	0,7	4,8	–	0	–	–	0	–	–
16p11.2 (distal) <i>SH2B1</i>	del	28.82-29.05	62,4	23,0	2,6	26,0	–	1	0,12	nd	1	0,32	nd
	dup		11,2	5,3	0,7	6,0	–	0	–	–	0	–	–
16p11.2 <i>TBX6</i>	del	29.64-30.20	46,8	31,0	0,5	31,0	–	5	0,59	1dn; 4nd	0	–	–
	dup		27,2	26,0	8,0	34,0	6,9						
17q12 <i>HNF1B</i>	del	34.81-36.20	34,4	39,0	4,0	43,0	–	1	0,12	nd	1	0,32	nd
	dup		21,1	17,0	1,7	19,0	–	2	0,24	1h; 1nd	2	0,63	nd
22q11.21 <i>TBX1</i>	dup	19.02-20.26	21,9	14,0	0,2	14,0	–	1	0,12	nd	1	0,32	nd
			3	0,36	nd	0	–	–					
22q11.2	dup	21.91-23.65	–	16,0	0,0	17,0	–	2	0,24	nd	0	–	–
<b>Total</b>								<b>36</b>	<b>4,3</b>		<b>11</b>	<b>3,5</b>	

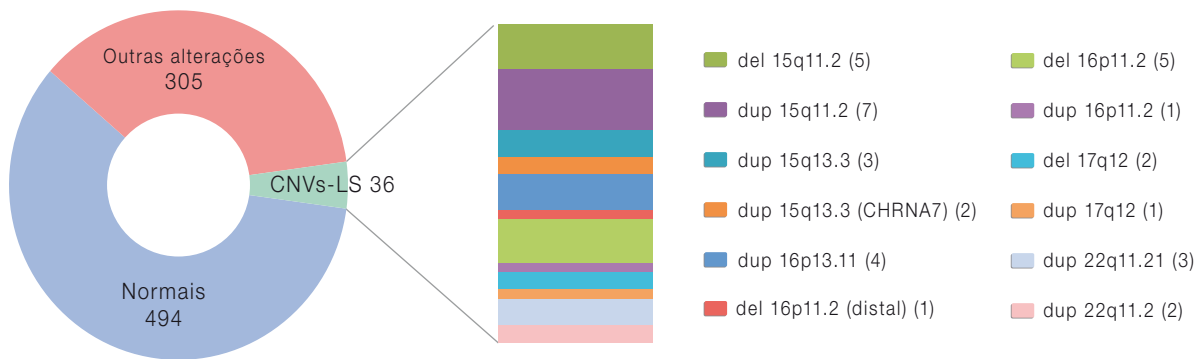
CNVs = Copy Number Variation; CG = Coordenadas Genómicas; PDI/PEA/AC = Perturbações do Desenvolvimento Intelectual, Perturbações do Espectro do Autismo e Anomalias Congénitas; SCZ = Esquizofrenia; LS = Loci de susceptibilidade; DPN = Diagnóstico Pré-Natal; PN = Diagnóstico Pós-Natal; dn = de novo; h = herdada (materna ou paterna); nd = não disponível.

Total de todas as amostras no período de tempo: 1401; PN = 835; DPN = 317; Total de PN Anormais = 341; Total de DPN Anormais = 56

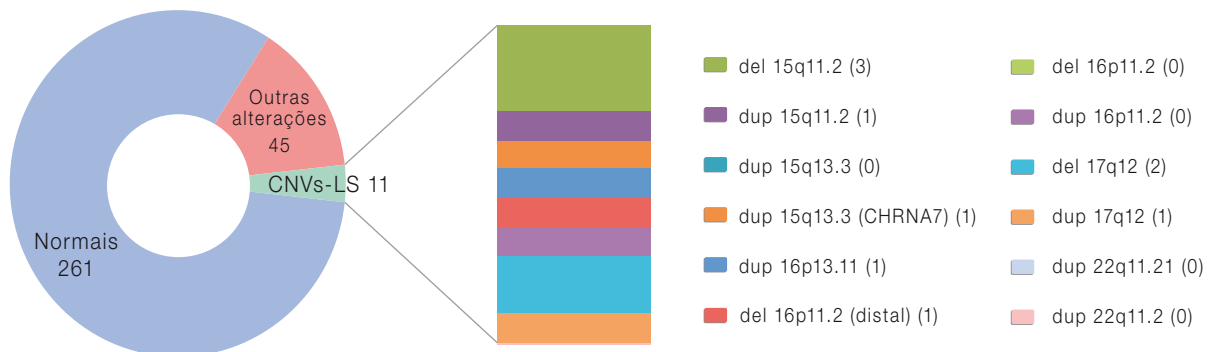
Nota: Foi identificado um progenitor com del 16p12.1 no decurso do estudo familiar de uma CNV não incluída neste estudo. Esse resultado não está representado na tabela.

Gráfico 1: ↓ *Coorte* com teste genético de *array* realizado no INSA-DG-UCI no âmbito do diagnóstico pós-natal (A) e pré-natal (B).

A – pós-natal



B – pré-natal



Outras alterações=CNVs patogênicas, provavelmente patogênicas e incertas, excluindo as CNVs-LS

CNVs-LS=CNVs em *loci* de susceptibilidade. Em destaque à direita encontram-se as CNVs-LS subdividas por região cromossômica.

**\_Discussão e conclusão**

Apesar da diferença do número de amostras no grupo PN e DPN, em que um corresponde ao dobro do espaço temporal do outro, a percentagem de casos com CNVs-LS é muito semelhante nos dois grupos (~4%). A partir dos dados da **tabela 1** pode-se extrapolar, em média, a identificação de 4 indivíduos afetados por cada 100 testados. Se considerarmos que a indicação clínica para DPN apenas inclui alterações identificáveis ecograficamente, o equivalente a AC no PN, e sabendo que a maioria das CNVs-LS fenotipicamente estão associadas a al-

terações neuro-cognitivas, coloca-se a questão sobre a real prevalência destas alterações na população em geral. O valor de 4%, se incluirmos todas as CNVs-LS identificadas neste estudo, pode ser considerado relativamente frequente, embora nem todas as CNVs-LS tenham idêntica representação na nossa *coorte*, nem grau de penetrância estabelecido (**tabela 1**). Relativamente à penetrância, existe alguma variabilidade entre as publicações, particularmente quando selecionam a amostra com base num fenótipo (*coortes* com esquizofrenia *versus coortes* com PDI, PEA e AC), embora para algumas variantes exista maior concordância inter-publicações (**tabela 1**).

Aferir a estimativa do grau de penetrância por variante é uma tarefa complexa, quer pela identificação do real número de indivíduos fenotipicamente normais, quer pela própria designação de “normal”. Se por um lado alguns indivíduos apenas são diagnosticados como afetados no decurso de estudos familiares, por outro, a identificação de uma CNV familiar pode induzir alguma subjetividade na avaliação clínica dos indivíduos portadores (12).

Igualmente, situações em que se identificam, no decurso de estudos familiares para outras variantes, progenitores portadores de uma CNVs-LS (nota na [tabela 1](#)), colocam outras questões no aconselhamento genético, em que a variante foi um achado incidental, não existindo ainda indivíduos aparentemente afetados. Nessas situações, existe risco de recorrência numa futura gravidez, mas com um desfecho incerto, independentemente do grau de penetrância da variante, não sendo possível determinar se o feto será afetado. No entanto, uma penetrância mais elevada confere um risco maior de um indivíduo ter alguma manifestação clínica. Assim CNVs-LS encontram-se entre o tipo de alterações que mais desafios representam no aconselhamento genético, quer devido à penetrância incompleta quer pelo fenótipo variável, não permitindo prever a dimensão das implicações clínicas no indivíduo ou familiares portadores.

O estudo de alta resolução do genoma por teste genético de *array*, tal como o exoma clínico num futuro próximo, traz ainda muitas incertezas. Assim, é importante realizar mais estudos de *coortes*, no sentido de esclarecer as interações genótipo-ambiente na determinação do fenótipo, com vista à melhoria do diagnóstico de alta resolução e aconselhamento genético.

#### Referências bibliográficas:

- (1) Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86(5):749-64. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2869000/>
- (2) Shen Y, Dies KA, Holm IA, et al. ; Autism Consortium Clinical Genetics/DNA Diagnostics Collaboration. Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders. *Pediatrics.* 2010;125(4):e727-35. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4247857/>
- (3) Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 2011;43(9):838-46. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3171215/>
- (4) Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, et al. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med.* 2009;11(3):139-46.
- (5) Shaffer LG, Dabell MP, Fisher AJ, et al. Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5000 pregnancies. *Prenat Diagn.* 2012;32(10):976-85. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3491694/>
- (6) Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012;367(23):2175-84. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3549418/>
- (7) de Wit MC, Srebniak MI, Govaerts LC, et al. Additional value of prenatal genomic array testing in fetuses with isolated structural ultrasound abnormalities and a normal karyotype: a systematic review of the literature. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;43(2):139-46.
- (8) Srebniak MI, Joosten M, Knapen MFCM, et al. Frequency of submicroscopic chromosomal aberrations in pregnancies without increased risk for structural chromosomal aberrations: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018;51(4):445-52.
- (9) Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, et al. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N Engl J Med.* 2008;359:1685-1699.
- (10) Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, et al. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med.* 2012;367(14):1321-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3494411/>
- (11) Girirajan S, Campbell CD, Eichler EE. Human copy number variation and complex genetic disease. *Annu Rev Genet.* 2011;45:203-26.
- (12) Benn PA. Prenatal counseling and the detection of copy-number variants. *Genet Med.* 2013;15(4):316-7.
- (13) Kirov G, Rees E, Walters JT, et al. The penetrance of copy number variations for schizophrenia and developmental delay. *Biol Psychiatry.* 2014;75(5):378-85. Epub 2013 Aug 28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4229045/>
- (14) Rosenfeld JA, Coe BP, Eichler EE, et al. Estimates of penetrance for recurrent pathogenic copy-number variations. *Genet Med.* 2013;15(6):478-81. Epub 2012 Dec 20.
- (15) Brabbing-Goldstein D, Reches A, Svirsky R, et al. Dilemmas in genetic counseling for low-penetrance neuro-susceptibility loci detected on prenatal chromosomal microarray analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218(2):247.e1-247.e12. Epub 2017 Nov 14.

## Espectro de alterações moleculares detetadas no gene *CYP21A2* associadas a deficiência em 21 hidroxilase

### Spectrum of molecular alterations detected in the *CYP21A2* gene associated with 21-hydroxylase deficiency

Susana Gomes<sup>1</sup>, Iris Pereira-Caetano<sup>1</sup>, Maria Lurdes Lopes<sup>2</sup>, Catarina Limbert<sup>2</sup>, Daniela Amaral<sup>2</sup>, Rosa Pina<sup>2</sup>, Diana Antunes<sup>3</sup>, Inês Carvalho<sup>3</sup>, Teresa Kay<sup>3</sup>, Lurdes Sampaio<sup>4</sup>, Carla Pereira<sup>4</sup>, Oana Moldovan<sup>5</sup>, Ana Berta<sup>5</sup>, Irene Rebelo<sup>6</sup>, Isabel Gaspar<sup>7</sup>, Helena Cardoso<sup>8</sup>, José Cidade Rodrigues<sup>9</sup>, Lina Ramos<sup>10</sup>, Fabiana Ramos<sup>10</sup>, Isabel Dinis<sup>11</sup>, Rita Cardoso<sup>11</sup>, Alice Mirante<sup>11</sup>, João Gonçalves<sup>1,12</sup>

joao.goncalves@insa.min-saude

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

(2) Serviço de Endocrinologia Pediátrica. Hospital Dona Estefânia, Centro Hospitalar de Lisboa Central, Lisboa, Portugal.

(3) Serviço de Genética Médica. Hospital Dona Estefânia, Centro Hospitalar de Lisboa Central, Lisboa, Portugal.

(4) Serviço de Endocrinologia Pediátrica. Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal.

(5) Serviço de Genética Médica. Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal.

(6) Serviço de Pediatria. Hospital São Francisco Xavier, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Lisboa, Portugal.

(7) Serviço de Genética Médica. Hospital Egas Moniz, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental Lisboa, Portugal.

(8) Serviço de Endocrinologia Pediátrica, Hospital de Santo António, Porto, Portugal.

(9) Serviço de Cirurgia Pediátrica, Hospital de Santo António, Porto, Portugal.

(10) Serviço de Genética Médica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal.

(11) Serviço de Endocrinologia Pediátrica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal.

(12) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal.

### \_Resumo

A maioria dos doentes com hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) apresenta alterações moleculares no gene *CYP21A2*, o qual codifica a enzima 21-hidroxilase (21-OH). Os doentes com a forma clássica de deficiência em 21-OH (21-OHD) apresentam a síntese de cortisol diminuída no córtex adrenal e, os casos mais graves, também apresentam deficiência de aldosterona. As mulheres com 21-OHD grave apresentam excesso de andrógenos desde a sua vida fetal conduzindo à virilização dos órgãos genitais externos. Tanto homens como mulheres com 21-OHD completa não sintetizam a aldosterona e, conseqüentemente, logo após o nascimento, podem desenvolver crises de perda de sal se não forem corretamente diagnosticados e tratados. A 21-OHD não clássica é devida à deficiência parcial em 21-OH, os fenótipos clínicos são menos graves, as mulheres não apresentam virilização dos genitais externos ao nascimento, e geralmente os sinais relativos a excesso de andrógenos podem surgir durante a infância ou até mais tarde (durante ou após a puberdade). Neste trabalho descrevem-se as alterações e os genótipos mais frequentes encontrados em doentes portugueses não adultos com 21-OHD. As alterações mais frequentes encontradas na forma clássica da HSC são c.293-13C>G, diferentes deleções/quimeras/conversões génicas do gene *CYP21A2* e c.518T>A, enquanto na 21-OHD não-clássica a variante c.844G>T é a mais frequente. Estes resultados contribuem para um diagnóstico correto e uma melhor gestão clínica dos doentes, para o seu aconselhamento genético e para oferecer o diagnóstico pré-natal a casais com risco de ter filhos afetados com a forma clássica de 21-OHD.

### \_Abstract

Most of the patients with congenital adrenal hyperplasia (CAH) have molecular alterations in the *CYP21A2* gene, which encodes the enzyme 21-hydroxylase (21-OH). Patients with the classic form of 21-OH deficiency (21-OHD) have the synthesis of cortisol impaired in the adrenal cortex and,

the most severe cases also have aldosterone deficiency. Females with severe 21-OHD, starting their fetal life have excess of androgens leading to external genitalia virilization at birth. Both males and females with complete 21-OHD are not able to synthesize aldosterone, consequently soon after birth may develop salt wasting crises if not correctly diagnosed and treated. Non-classic 21-OHD is due to partial deficiency of 21-OH, the clinical phenotypes are less severe, females don't present ambiguity of the external genitalia at birth, usually signs of androgen excess may be present during childhood or even later in life (during or after puberty). We present here the most frequent alterations and genotypes found in non adult Portuguese patients with 21-OHD. The most frequent alterations found in the classic form of CAH are c.293-13C>G, different *CYP21A2* deletions/quimeras/gene conversions and c.518T>A, while in non-classic 21-OHD the variant c.844G>T is the most frequent. These results contribute to a correct patient diagnosis, to a better clinical care, genetic counseling and to offer pre-natal diagnosis to couples at risk of having affected babies with the classic form of 21-OHD.

### \_Introdução

A hiperplasia suprarrenal congénita (HSC), embora possa ser devida à deficiência de uma entre sete enzimas diferentes implicadas na esteroidogénese, corresponde em 90 a 95% dos casos a deficiência (parcial ou completa) em 21-hidroxilase (D21-OH). A D21-OH tem como causa a existência de alterações patogénicas no gene *CYP21A2*. Clinicamente, de acordo com as manifestações fenotípicas da HSC associada a D21-OH, esta patologia é classificada em duas formas, tra-

dicionalmente designadas por “forma clássica” e “forma não clássica”. Ambas estão diretamente relacionadas tanto com a atividade da 21-OH, como com a consequente ineficiência de biossíntese de cortisol e de aldosterona e com a acumulação de androgénios suprarrenais. A forma clássica, de acordo com a gravidade dos sintomas subdivide-se em “Perdedora de Sal” (PS) e em forma “Simplesmente Virilizante” (SV) (1,2).

A forma PS está predominantemente associada a deficiência completa em cortisol e em aldosterona pelo que os doentes (independentemente do sexo) geralmente manifestam, entre a primeira e quarta semanas de vida, hipercalemia, hiponatremia, hiperrreninemia, hipoglicemia, letargia, recusa alimentar e vômitos, podendo entrar em choque hipovolémico. Os fetos do sexo feminino afetados, devido ao excesso de androgénios suprarrenais que ocorre desde a oitava semana de gestação, apresentam predominantemente virilização dos órgãos genitais externos podendo exibir ambiguidade sexual (com gravidade variável) ou até genitais externos aparentemente similares aos masculinos com criptorquidismo bilateral. Nos recém-nascidos do sexo masculino, dada a ausência de ambiguidade sexual, o diagnóstico poderá ser mais tardio e, caso não seja atempadamente disponibilizada assistência médica, esta deficiência completa em 21-OH poderá, em alguns casos, ser letal.

A forma SV em recém-nascidos 46,XX pode ser diagnosticada após o nascimento até cerca dos dois anos devido essencialmente a ambiguidade sexual ou a virilização dos órgãos genitais externos. A deficiência em 21-hidroxilase é parcial, só afeta a biossíntese de cortisol, pelo que os níveis de aldosterona são normais e consequentemente não ocorre perda de sal. Nas crianças do sexo masculino o diagnóstico geralmente ocorre entre os 2 e 4 anos devido a virilização precoce. Ambos os sexos manifestam idade óssea avançada até final da infância e pubarca precoce. Por seu lado, a forma não clássica (NC) é caracterizada pelos indivíduos do sexo feminino apresentarem androgenização pronunciada durante a puberdade com hirsutismo segundo o padrão masculino, podendo surgir posteriormente amenorreia primária ou secundária e ovários poliquísticos. A acne exuberante é comum a ambos os sexos, assim como a puberdade precoce e a idade óssea avançada culminando em baixa estatura na idade adulta. Nos rapazes

o diagnóstico clínico está dificultado devido aos já elevados níveis de androgénios de origem testicular e algumas mulheres, em que o fenótipo não é tão pronunciado, também podem não chegar a ser diagnosticadas clinicamente (1,3).

O diagnóstico de HSC, para além de se basear nos sinais e sintomas característicos da doença, deve ser confirmado pelo doseamento matinal (antes das 8 horas da manhã) da 17-hidroprogesterona (17-OHP) basal. Na forma clássica a concentração da 17-OHP é superior a 100 ng/mL e na não clássica varia de 2 a 100 ng/mL. Caso os valores sejam duvidosos/*borderline*, deve ser realizado o teste de estimulação com ACTH, continuando a forma clássica a apresentar valores superiores a 100 ng/mL enquanto que para a forma não clássica podem variar entre 10 e 100 ng/mL, valores inferiores a 9,9 ng/mL correspondem provavelmente a indivíduos não afetados ou a heterozigóticos. Existindo dúvidas quanto à deficiência enzimática associada a HSC é recomendada a determinação do perfil adrenocortical completo a fim de confirmar qual a enzima que está a afetar a esteroidogénese (4).

A caracterização molecular do gene *CYP21A2* em doentes com HSC, para além de contribuir para identificar os genótipos e estabelecer correlações com a gravidade da doença, tem permitido identificar o espectro de alterações e a frequência com que as mesmas ocorrem. Dada a existência do pseudogene *CYP21A1P*, caracterizado por possuir diversas alterações que o tornam não funcional, e por possuir elevada homologia com o gene funcional *CYP21A2* (ambos localizados em 6p21.3) devido a fenómenos de recombinação ilegítima (conversões génicas e *crossing over* desigual), as alterações patogénicas pontuais mais frequentes em *CYP21A2* também existem no pseudogene. Por outro lado, as deleções, quimeras e conversões génicas extensas que afetam o *CYP21A2* tornando-o não funcional são características deste agrupamento génico.

### \_Objetivo

Apresentar o espectro das alterações moleculares mais frequentes, detetadas no gene *CYP21A2* em doentes portugueses (com idades inferiores a 18 anos) e associadas às três formas da HSC: PS, SV e NC.

## \_Materiais e métodos

A análise molecular do gene *CYP21A2* foi efetuada usando DNA genómico (obtido a partir de sangue periférico) e compreendeu a minisequenciação para pesquisa direta de alterações conhecidas, amplificação enzimática de DNA (PCR) de longa distância, PCR-nested, restrição enzimática, sequenciação cíclica de Sanger e MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*).

## \_Resultados e discussão

Atendendo às alterações mais frequentes detetadas no conjunto dos doentes analisados com cada uma das formas de HSC ([tabela 1](#)) verifica-se que, relativamente aos alelos associados a PS, a maioria possui alterações com atividade enzimática nula (66,4%, n=75).

Contudo, a alteração mais frequente, c.293-13C>G, é uma alteração de *splicing* que ocorre no intrão 2 e nem sempre está associada a perda de sal. Esta é também frequente em doentes com a forma SV, tal como demonstram os genótipos relativos aos doentes com PS ou com a forma SV presentes na [tabela 2](#). Esta alteração é particularmente difícil de interpretar em contexto de diagnóstico pré-natal dado que, por vezes, está associada a uma atividade enzimática considerada moderada (~3%), sendo esta suficiente para que a biosíntese da aldosterona não seja significativamente afetada pelo que, nestas condições, não causa perda de sal. No entanto, está sempre associada à forma clássica da doença.

No grupo dos alelos SV predomina a alteração *missense* c.518T>A, p.(Ile173Asn), a qual está presente, em homozigotia ou em heterozigotia composta, na grande maioria dos genótipos ([tabela 2](#)). Esta alteração está sempre associada à forma clássica sem perda de sal, correlação concordante com os dados da literatura internacional.

Quanto ao grupo dos alelos NC, a grande maioria (n=195, 86,7%), tal como seria de esperar, corresponde a alterações suaves. Destaca-se a alteração c.844G>T p.Val282Leu, presente em 81,3% dos alelos, a qual é também a mais frequente noutras populações caucasianas. Por outro lado, neste grupo, verifica-se que 13% dos alelos (n=30) correspondem

a alterações graves, as quais estão representadas nos genótipos mais frequentes dos respetivos doentes ([tabela 2](#)). Ou seja, estes resultados demonstram que um número significativo de doentes que manifestam a forma menos grave da HSC, possuem alelos graves (associados a uma atividade enzimática nula ou moderada) pelo que, caso estes utentes pretendam procriar, o seu cônjuge deverá ser também analisado de forma a determinar o risco do casal ter descendência afetada com a forma clássica da doença (PS ou SV).

Os resultados apresentados na [tabela 2](#) para os doentes com a forma NC permitem verificar que a correlação genótipo/fenótipo é concordante para 75,7% (n=87) dos doentes/genótipos, ou seja, nestes casos um dos alelos corresponde sempre a uma alteração suave, o que justifica a concordância com o fenótipo. Neste grupo existem ainda 28 doentes heterozigóticos para a alteração c.844G>T, p.Val282Leu, não se tendo detetado no outro alelo qualquer alteração patogénica. Embora nestes casos o genótipo não justifique plenamente o fenótipo (dado que se trata de uma doença autossómica recessiva), sabe-se que a alteração c.844G>T possui um efeito dominante negativo, ou seja, quando presente provavelmente impede que a 21-OH normal (proveniente do alelo sem alterações) atue quantitativamente a níveis normais, refletindo-se esta deficiência parcial nos sinais de androgenização manifestados por algumas mulheres heterozigóticas para a alteração em causa ([5,6](#)). Nestes casos, os doseamentos da 17-OHP geralmente não ultrapassam 9 ng/mL após o teste de estimulação com ACTH.

Evidencia-se ainda que a alteração c.\*13G>A, localizada 13 nucleótidos após o codão de terminação, embora no passado não fosse considerada patogénica, estudos *in vitro* recentes revelaram que a mesma está associada a uma atividade enzimática parcialmente diminuída devido a redução da expressão génica, a qual está relacionada com a diminuição da estabilidade do respetivo RNA. Estes estudos estão concordantes com o fenótipo de doentes que possuíam a alteração em causa em heterozigotia composta ou em homozigotia e apresentavam 17-OHP elevada, pubarca prematura, idade óssea avançada, acne e/ou hirsutismo ([7](#)). Assim, a alteração c.\*13G>A deve ser considerada patogénica, embora associada a um fenótipo suave da forma NC da HSC.

Tabela 1: ↘ Compilação das oito alterações mais frequentes, com o respetivo número de alelos, detetadas no gene *CYP21A2* em cada uma das formas de HSC.

PS			SV			NC		
Alteração patogénica	Nº de alelos	Natureza da alteração	Alteração patogénica	Nº de alelos	Natureza da alteração	Alteração patogénica	Nº de alelos	Natureza da alteração
c.293-13C>G	38	gm	c.518T>A	33	m	c.844G>T	183	s
c.CDQ	35	g	c.293-13C>G	9	gm	c.293-13C>G	10	g
c.923dupT	12	g	c.923dupT	8	g	c.CDQ	8	g
c.955C>T	12	g	c.CDQ	8	g	c.518T>A	7	g
c.332_339del	6	g	c.955C>T	5	g	c.1360C>T	7	s
c.1069C>T	4	g	c.844G>T	4	s	c.955C>T	5	g
c.518T>A	4	g	c.92C>T	3	s	c.92C>T	3	s
c.844G>T;1069C>T	2	g	c.1273G>A	3	m	c.*13G>A	2	s
	Total 113			Total 73			Total 225	

**CDQ** = Alelo com atividade enzimática nula com Conversão/Deleção/Quimera envolvendo diversos exões do gene *CYP21A2*. **g** = alteração grave associada à atividade enzimática nula e à forma PS; **gm** = alteração associada à atividade enzimática que pode variar entre grave (<<1%) a moderada (≤3%) tanto pode estar associada à forma PS como à SV; **m** = alteração associada à atividade enzimática moderada (~3%) e à forma SV; **s** = alteração suave predominantemente associada à atividade enzimática ≥10% e <75% e à forma NC. Atividades enzimáticas referidas tendo por substrato a 17OHP, dados disponíveis em: <https://www.pharmvar.org/htdocs/archive/cyp21.htm>; Sequência de referência NCBI: NM\_000500.9

Tabela 2: ↘ Genótipos mais frequentes detetados em doentes com HSC relativamente a cada uma das formas da doença.

Genótipos mais frequentes associados à forma PS	Natureza da alteração	Nº doentes com PS (n=32)	Genótipo mais frequentes associados à forma SV	Natureza da alteração	Nº doentes com SV (n=28)	Genótipo mais frequentes associados à forma NC	Natureza da alteração	Nº doentes com NC (n=115)
c.[293-13C>G];[293-13C>G]	gm/gm	8	c.[518T>A];[923dupT]	m/g	7	c.[844G>T];[844G>T]	s/s	60
c.[293-13C>G];[CDQ]	gm/g	7	c.[518T>A];[518T>A]	m/m	6	c.[844G>T];[=]	s/n	28
c.[293-13C>G];[955C>T]	gm/g	5	c.[293-13C>G];[518T>A]	gm/m	5	c.[293-13C>G];[844G>T]	gm/s	7
c.[CDQ];[CDQ]	g/g	4	c.[518T>A];[844G>T]	m/s	2	c.[518T>A];[844G>T]	m/s	6
c.[293-13C>G];[844G>T;1069C>T]	gm/g	2	c.[293-13C>G];[293-13C>G]	gm/gm	2	c.[844G>T];[CDQ]	s/g	4
c.[293-13C>G];[DQ.Ex1_3]	gm/g	2	c.[518T>A];[955C>T]	m/g	2	c.[844G>T];[955C>T]	s/g	4
c.[923dupT];[923dupT]	g/g	2	c.[518T>A];[CDQ]	m/g	2	c.[844G>T];[1360C>T]	s/s	3
c.[955C>T];[CDQ]	g/g	2	c.[955C>T];[CDQ]	g/g	2	c.[1360C>T];[=]	s/n	3

**CDQ** = Alelo com atividade enzimática nula com Conversão/Deleção/Quimera envolvendo diversos exões do gene *CYP21A2*. **g** = alteração grave associada à atividade enzimática nula e à forma PS; **gm** = alteração associada à atividade enzimática que pode variar entre grave (<<1%) a moderada (≤3%) tanto pode estar associada à forma PS como à SV; **m** = alteração associada à atividade enzimática moderada (~3%) e à forma SV; **s** = alteração suave predominantemente associada à atividade enzimática ≥10% e <75% e à forma NC. Atividades enzimáticas referidas tendo por substrato a 17OHP, dados disponíveis em: <https://www.pharmvar.org/htdocs/archive/cyp21.htm>; Sequência de referência NCBI: NM\_000500.9

## \_Conclusões

No contexto do diagnóstico molecular, para que este se reflita na sua plenitude em benefício dos doentes, os dados clínicos/fenotípicos e hormonais são indispensáveis para a interpretação das alterações/genótipos encontrados.

A deficiência em 21-OH está frequentemente associada a alelos com mais do que uma alteração patogénica em fase, ou a alelos mais complexos, nomeadamente, conversões génicas e deleções/quimeras. Dado que este tipo de alterações estão predominantemente associados a atividades enzimáticas nulas, a sua completa caracterização é indispensável para o aconselhamento genético e requer geralmente o estudo dos progenitores dos casos índice.

Os resultados obtidos, em particular a natureza das alterações identificadas, assim como a caracterização dos genótipos dos doentes, para além de confirmarem o diagnóstico, proporcionam dados indispensáveis para que se ofereça aos doentes, respetivos familiares e aos casais em risco um aconselhamento genético correto.

### Referências bibliográficas:

- (1) White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev.* 2000;21(3):245-91.
- (2) Gonçalves J, Friães A, Moura L. Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency. *Expert Rev Mol Med.* 2007;9(11):1-23.
- (3) New MI. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(11):4205-14.
- (4) Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, et al. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(11):4043-88.
- (5) Bacheega TA, Brenha EM, Billerbeck AE, et al. Variable ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone values in 21-hydroxylase deficiency carriers are not related to the different CYP21 gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Feb;87(2):786-90.
- (6) Félix-López X, Riba L, Ordóñez-Sánchez ML, et al. Steroid 21-hydroxylase (P450c21) naturally occurring mutants I172N, V281L and I236N/V237E/M239K exert a dominant negative effect on enzymatic activity when co-expressed with the wild-type protein. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2003;16(7):1017-24.
- (7) Menabò S, Balsamo A, Baldazzi L, et al. A sequence variation in 3'UTR of CYP21A2 gene correlates with a mild form of congenital adrenal hyperplasia. *J Endocrinol Invest.* 2012;35(3):298-305. Epub 2011 Apr 26.

## Informação disponível sobre transplantação renal: Portugal na União Europeia a 28

### Available information on renal transplantation: Portugal within the European Union of 28

Bruno A Lima<sup>1</sup>, Helena Alves<sup>2</sup>

helena.alves@insa.min-saude.pt

(1) Oficina de Bioestatística, Ermesinde, Portugal.

(2) Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

#### \_Resumo

A disponibilização de dados e informação precisa e transparente relativa às atividades de transplantação renal permitiria a monitorização e avaliação dos cuidados de saúde prestados nesta área. No entanto, os dados disponíveis, em Portugal, são escassos e de utilidade questionável. Neste trabalho procuramos identificar a informação disponibilizada pelos 28 países da União Europeia (UE) relativamente às suas atividades de transplantação renal. Para esta análise, as autoridades dos 28 países da UE com responsabilidades de coordenação na transplantação de órgãos foram identificadas a partir da lista de contactos de transplantação disponibilizada pela Comissão Europeia. Identificamos 30 indicadores da atividade de transplantação que foram agrupados em 3 tipos. A cada um dos 28 países da EU atribuímos um valor de transparência (numa escala de 1 a 7) conforme a quantidade de informação disponibilizada por cada país. Os países que englobam o Eurotransplant (ET) foram classificados com o valor mais alto da nossa escala de transparência. O registo do ET para além de disponibilizar indicadores sobre dadores e doentes disponibiliza também os dados abertos correspondentes. Portugal, à imagem de outros países do Sul e do Leste europeu, foi classificado nos níveis mais baixos de transparência. A disponibilização de dados abertos em saúde será um grande avanço para corrigir esta situação e um facilitador na criação de informação por parte de investigadores, profissionais de saúde e sociedade civil.

#### \_Abstract

Accurate and transparent data and information availability regarding renal transplantation activities would allow the monetization and evaluation of health care provided in this area. However, data available in Portugal are scarce and of questionable utility. In this work we try to identify information made available by the 28 European Union (EU) countries regarding their renal transplantation activities. For this analysis, authorities in the 28 EU countries with coordination responsibilities in organ transplantation were identified from European Commission transplant contact list. We identified 30 transplantation activity indicators grouped into 3 types. To each of the 28 EU members we assign a transparency value (on a scale of 1 to 7) depending on the amount of information made available by each one. Eurotransplant (ET) countries were classified with the highest value of our transparency scale. In addition to providing indicators on donors and patients, ET registry also provides the corresponding open data. Portugal, as other Southern and Eastern European countries, was ranked at the lowest levels of transparency. Health open data availability will be a major step forward in addressing this situation and a facilitator in the creation of information by researchers, health professionals and civil society.

#### \_Introdução

Neste trabalho procuramos identificar a informação disponibilizada pelos 28 países da União Europeia (UE) relativamente às suas atividades de transplantação renal, que reflectam a eficiência dos tratamentos (1). A definição das melhores métricas que descrevam esta atividade é uma condição fundamental para que se possam tomar as melhores decisões baseadas na evidência dos dados. A transparência tem sido apontada como um fator que pode influenciar positivamente os resultados do transplante. Neste contexto, transparência traduz-se na disponibilização de dados clínicos, de custos dos cuidados de saúde, ou relativos aos serviços que prestam os cuidados de saúde (2). Em dezembro de 2017, Portugal passou a ser membro do *Open Government Partnership* (OGP), uma iniciativa que procura o comprometimento dos governos dos seus países membros na promoção da transparência, no comprometimento dos seus cidadãos, na luta contra a corrupção e no aproveitar das novas tecnologias para fortalecer a governação (3). Na sua carta de intenção para se juntar ao OGP, o governo português identificou o portal de dados abertos da Administração Pública portuguesa - dados.gov (http://www.dados.gov.pt) como uma das medidas que materializam o comprometimento de Portugal para com esta iniciativa. Este sítio identifica o portal da transparência do Serviço Nacional de Saúde (https://www.sns.gov.pt/transparencia/) para a disponibilização de dados em saúde, no entanto, aqui os dados relativos à atividade de transplantação de órgãos são escassos e de utilidade questionável.

#### \_Objetivo

Neste trabalho procuramos identificar a informação disponibilizada pelos 28 países da União Europeia (UE) relativamente às suas atividades de transplantação renal.

## \_ Métodos

Para esta análise, as autoridades dos 28 países da UE com responsabilidades de coordenação na transplantação de órgãos foram identificadas a partir da lista de contactos de transplantação disponibilizada pela Comissão Europeia (4). Também através do sítio *web* do *Global Observatory on Donation and Transplantation* (GODT) (5) podemos identificar páginas *web* dos países da UE que disponibilizam informações sobre atividade de transplantação renal. Pesquisados os referidos sítios *web* identificamos 30 indicadores da atividade de transplantação que foram agrupados em 3 tipos: informações de doadores cadáver; informações de candidatos em lista ativa para transplante; e informações de doentes transplantados renais. Além destes, identificamos também um 31º indicador relativo aos sítios *web* com formulários para a disponibilização de dados quando pedidos. A cada um dos 28 países da EU atribuímos um valor de transparência (numa escala de 1 a 7) para classificar os países, desde os que disponibilizam menos informação (valor 1) aos que disponibilizam mais informação (valor 7) sobre as atividades de transplantação renal.

As análises e representações gráficas foram realizadas com recurso ao *software* RStudio para a linguagem e ambiente de programação R.

## \_ Resultados

Espanha foi o país classificado com o menor valor da nossa escala de transparência (figura 1) uma vez que foi o único país para o qual não encontramos informação quanto ao número de doentes em lista ativa para transplante de rim, ou o número de novas inscrições em lista, ou o número de mortes de candidatos em lista ativa pra transplante.

O GODT é a entidade que compila a maior quantidade de dados e informação sobre transplante de órgãos de diversos países do mundo quer sejam informação de doadores, de candidatos a transplante, ou de doentes transplantados e os países da EU não são excepção para o GODT. Como podemos verificar na tabela 1 há um grupo de indicadores que são comuns a todos os países e que podem ser consultados nas publicações do GODT.

Os países que englobam o registo Eurotransplant (ET) da *Eurotransplant International Foundation* (6) (Alemanha, Áustria, Bélgica, Croácia, Eslovénia, Hungria, Luxemburgo e Países Baixos) foram classificados com o valor mais alto da nossa escala de transparência. O registo do ET tem como principal função a recolha de dados sobre as atividades de transplantação disponibilizando no seu sítio *web* estatísticas periódicas sobre esta atividade. O ET para além de disponibilizar indicadores sobre doadores e doentes disponibiliza também os dados abertos correspondentes. Portugal, à imagem de outros países do Sul e do Leste europeu (figura 1), foi classificado nos níveis mais baixos de transparência uma vez que não conseguimos mais informação do que aquela que é disponibilizada pelo GODT.

Figura 1: ↓ Classificação dos países da EU a 28 quanto à transparência da informação das atividades de transplantação renal que disponibilizam.



Tons mais escuros, para os menos transparentes, a tons mais claros, para os mais transparentes.

## Discussão e conclusões

A recolha em grande escala de dados de saúde é uma prática cada vez mais comum na gestão dos doentes. Esta compilação de dados padronizados permite desenvolver informações sistemáticas e análises comparativas entre diferentes países (7). A disponibilização deste tipo de dados de forma acessível, processável e partilhável por qualquer interessado (dados abertos) é uma forma de garantir a transparência e é fundamental para avaliar os prestadores dos cuidados de saúde (8).

No caso português, a falta de informação é mais visível no que respeita aos indicadores que podem descrever a lista de espera para transplante renal. Sem uma caracterização

pormenorizar da evolução desta lista de espera ao longo dos anos não é possível avaliar políticas que visem garantir a equidade no acesso ao transplante renal. Devemos também salientar a falta de informação sobre os doentes transplantados renais para os quais apenas é possível saber qual o seu tipo de dador. Para que se possa avaliar a eficácia deste tratamento é premente a disponibilização de dados focados em *outcomes* com significado no transplante renal.

A governação aberta, enquanto estratégia chave para os países da EU, implica a disponibilização de dados que facilitem o acesso a informação, estimulem a transparência e promovam aplicações úteis à sociedade. A escassa informação que podemos recolher sobre as atividades de transplantação

artigos breves\_ n. 13

Tabela 1: Identificação dos indicadores disponibilizados por cada um dos países da EU a 28. Indicadores podem ser agrupados por três tipos: dadores cadáver (DC), doentes em lista ativa (LA), e doentes transplantados (Tx).

Informação disponibilizada	Alemanha	Áustria	Bélgica	Bulgária	Chipre	Croácia	Dinamarca	Eslováquia	Eslovênia	Espanha	Estónia	Finlândia	França	Grécia	Hungria	Irlanda	Itália	Letónia	Lituânia	Luxemburgo	Malta	Países Baixos	Polónia	Portugal	Reino Unido	República Checa	Roménia	Suécia
DC MC/SBC	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
DC sexo	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓			✓			
DC idades	✓	✓	✓			✓			✓						✓	✓				✓		✓			✓			
DC ABO	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓			✓			
DC causa morte	✓	✓	✓			✓			✓						✓	✓				✓		✓		✓	✓			
DC IMC																									✓			
DC etnia																									✓			
1ª inscrição LE	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
LA a 31/12	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
LA Mortes	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
LA ABO	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓			✓			
LA PRA	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓						
LA 1ºtx/re-tx	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓						
LA tempo Diálise	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓						
LA idade	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓			✓			
LA grau urgência	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓						
LA saída de lista	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓						
LA etnia																									✓			
Tx DC / DV	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tx pediátrico	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tx DV rel / não rel	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tx inc HLA	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓			✓			
Tx ABO	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓			✓			
Tx PRA	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓						
Tx tempo de espera	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓						
Tx tempo diálise	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓						
Tx 1ºtx/re-tx	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓			✓			
Tx grau urgência	✓	✓	✓			✓			✓						✓					✓		✓						
Tx etnia																									✓			
tempos de sobrevivência																✓												
dados a pedido							✓				✓	✓													✓			✓

DC=dador cadáver; MC=morte cerebral; SBC=sem batimento cardíaco; IMC=índice de massa corporal; LE=lista de espera; LA=lista ativa; Tx=doentes transplantados; DV=dador vivo; rel=relacionado; inc HLA=incompatibilidades Antígenos Leucocitários Humanos; PRA=pesquisa de reatividade antigénica.

renal em Portugal, colocam o nosso país, numa posição modesta da nossa escala de transparência, quando comparado com os restantes países da EU. A disponibilização de dados abertos em saúde será um grande avanço para corrigir esta situação e um facilitador na criação de informação por parte de investigadores, profissionais de saúde e sociedade civil (9). A definição de métricas objetivas e sistemáticas de utilidade clínica que permitam a melhor tomada de decisões aquando da definição de políticas de saúde (10) depende também dos dados disponíveis para análise. Esperemos que o comprometimento de Portugal com uma governação aberta se possa também constatar na transplantação renal com a disponibilização de mais dados e informações relativas às atividades desenvolvidas.

#### Referências bibliográficas:

- (1) Axelrod DA, Schold J. Measuring What Matters. *Am J Transplant*. 2016;16(12):3315-17. <https://doi.org/10.1111/ajt.14043>
- (2) Fishman JA. Metrics and Data Analysis in Transplantation: Quality Improvement via Transparency. *Am J Transplant*. 2017;17(6):1435-36. <https://doi.org/10.1111/ajt.14219>
- (3) Open Government Partnership: about OGP. [Em linha]. [consult. 10/4/2018]. <https://www.opengovpartnership.org/about/about-ogp>
- (4) European Commission. Transplantation contact list. [Em linha]. [consult. 10/4/2018]. <http://txcontactlist.eu/index.php?action=map>
- (5) Global Observatory on Donation and Transplantation. WHO-ONT global database [Em linha]. [consult. 10/4/2018]. [www.transplant-observatory.org](http://www.transplant-observatory.org)
- (6) Eurotransplant International Foundation. [Em linha]. [consult. 10/4/2018]. <https://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=monthlystats>
- (7) Nelson EC, Dixon-Woods M, Batalden PB, et al. Patient focused registries can improve health, care, and science. *BMJ*. 2016 Jul 1;354:i3319. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5367618/>
- (8) Lima BA. A call for open data of renal transplantation in Portugal. *Port J Nephrol Hypert*. 2017;31(3):155-7. [http://www.bbg01.com/cdn/rsc/spnefro/pjnh/65/n3\\_2017\\_pjnh\\_01.pdf](http://www.bbg01.com/cdn/rsc/spnefro/pjnh/65/n3_2017_pjnh_01.pdf)
- (9) Martin EG, Law J, Ran W, et al. Evaluating the Quality and Usability of Open Data for Public Health Research: A Systematic Review of Data Offerings on 3 Open Data Platforms. *J Public Health Manag Pract*. 2017;23(4):e5-e13.
- (10) Lima BA, Mendes M, Alves H. Measuring kidney transplantation activity. *Port J Nephrol Hypert*. 2014;28(2):171-6. [http://www.bbg01.com/cdn/clientes/spnefro/pjnh/49/artigo\\_13.pdf](http://www.bbg01.com/cdn/clientes/spnefro/pjnh/49/artigo_13.pdf)

## ficha técnica

**\_Título:** Boletim Epidemiológico Observações

**\_Periodicidade:** Quadrimestral

**\_ISSN:** 0874-2928, 2182-8873 (em linha)

**\_Numeração:** 2ª série

Volume 7, número 23

setembro - dezembro 2018

**\_Diretor**

Fernando de **Almeida**, Presidente do Conselho Diretivo do INSA

**\_Editores**

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia

Elvira **Silvestre**, Biblioteca da Saúde

**\_Conselho Editorial Científico**

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia

Luciana **Costa**, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis

Jorge **Machado**, Departamento de Doenças Infeciosas

Manuela **Cano**, Departamento de Saúde Ambiental

Maria João **Silva**, Departamento de Genética Humana

Rita **Batista**, Departamento de Alimentação e Nutrição

Peter **Jordan**, Conselho Científico do INSA

**\_Coordenação técnica** Elvira **Silvestre**, Biblioteca da Saúde

**\_Composição e paginação** Francisco **Tellechea**, Biblioteca da Saúde  
(segundo layout inicial de Nuno Almodovar Design, Lda.)

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2018.

Reprodução autorizada desde que a fonte seja citada, exceto para fins comerciais.

Isento de Registo na ERC ao abrigo do Decreto-Regulamento 8/99 de 9 de junho artº 12º nº1 a).

**Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge**

Av. Padre Cruz, 1649-016 **Lisboa, Portugal**

Tel.: (+351) 217 519 200

Fax: (+351) 217 529 400

E-mail: info@insa.min-saude.pt

[www.insa.pt](http://www.insa.pt)