



2019
número
24
2ª série



Lisboa_INSA, IP

publicação quadrimestral_ janeiro-abril

ISSN: 2183-8873 (em linha)

Observações

— Boletim Epidemiológico

sumário_

_Editorial

Dia Mundial da Saúde 2019 – Cobertura universal de saúde: p03
para todos, em toda a parte

World Health Day 2019 – Universal health coverage: everyone, everywhere

João Lavinha

_Artigos breves

_Incapacidade auditiva

1_ Incapacidade auditiva autodeclarada na população portuguesa: p04
comparação entre os Inquéritos Nacionais de Saúde
2005/2006 e 2014

Self-reported hearing loss in Portugal: a cross-sectional comparison using evidence from National Health Surveys 2005/2006 and 2014

Ana Rita Torres, Baltazar Nunes, Rita Roquette, Carlos Dias

_Saúde ambiental

2_ Análise do conforto térmico em estruturas residenciais para p09
idosos em clima atlântico

Analysis of thermal comfort in nursing homes in the Atlantic climate

Pedro Torres, Livia Aguiar, Cristiana Pereira, Nuria Forcada,
Blanca Tejedor, Maria Paula Neves, João Paulo Teixeira,
Ana Mendes

_Alimentação e nutrição

3_ Avaliação do conhecimento de uma amostra da população p16
portuguesa sobre o bisfenol A

Evaluation of knowledge of a sample of the Portuguese population on bisphenol A

Fernanda Vilarinho, Ana van der Kellen, Mariana Andrade,
M Eduardo Figueira, M Fátima Vaz, Ana Sanches Silva

4_ Teor das vitaminas A e E em géneros alimentícios consumidos p21
em Portugal

Content of vitamins A and E in foodstuffs consumed in Portugal

Francisco Ravasco, Elsa Vasco, Maria da Graça Dias

5_ Pão do norte de Portugal: um estudo interventivo com vista a p28
reduzir o teor de sal no pão

Salt reduction in different bread types: an intervention study in the Northern Portugal

Ana C Nascimento, Susana Santiago, Mariana Santos,
José Mesquita-Bastos, Joana Gomes da Silva,
Maria Antónia Calhau

6_ Preocupação com o consumo de sal em Portugal: compara- p31
ção entre os inquéritos ECOS de 2014 e 2018

Salt consumption awareness in Portugal: comparison between the ECOS surveys of 2014 and 2018

Joana Santos, Ana Rita Torres, Mariana Neto

7_ Nanomateriais ingeridos: impacto biológico e relação com as p35
suas características físico-químicas

Ingested nanomaterials: biological impact in relation to their physicochemical characteristics

Ana Catarina Gramacho, Maria João Silva, Henriqueta Louro

_Infeções fúngicas

8_ Etiologia das infeções fúngicas invasivas e subcutâneas: p39
análise dos dados da Rede Nacional de Vigilância Laborato-
rial das Infeções Fúngicas Invasivas e Subcutâneas (IFIs),
2013-2018

Etiology of invasive and subcutaneous fungal infections: analysis of data from the National Network for Laboratory Surveillance of Invasive and Subcutaneous Fungal Infections (IFIs), 2013-2018

Cristina Veríssimo, Cristina Toscano, Teresa Ferreira,
Gabriela Abreu, Helena Simões, José Diogo, Ana Maria Queirós,
Felicidade Santiago, Ana Lima, Raquel Sabino

9_ Algoritmo para o diagnóstico laboratorial das infeções p45
fúngicas profundas

Algorithm for the diagnosis of deep fungal infections

Raquel Sabino, Helena Simões, Cristina Veríssimo



Instituto **Nacional de Saúde**
Doutor Ricardo Jorge

Doenças genéticas e condições de base genética

10_ Espectro mutacional da cistinose em Portugal, 1998-2017 p 49

Mutational Spectrum of Cystinosis in Portugal, 1998-2017

Filipa Ferreira, Inês Leal, David Sousa, Teresa Costa, Conceição Mota, Ana Marta Gomes, Daniela Lopes, Maria do Carmo Macário, Isabel Tavares, Helena Pinto, João Paulo Oliveira, Rita Magriço, Célia Carmona; Sónia Ramos; Raquel Neiva, Ana Marcão, Laura Vilarinho

11_ Colesterol Total, nem oito(enta) nem (duzentos e) oitenta: p 55

Parte 2 – Hipolipidemias primárias – alterações do metabolismo das lipoproteínas

Cholesterol, low is not always the best: Part 2 – Alterations in Lipoprotein Metabolism causing low lipid levels

Ana Catarina Alves, Sílvia Sequeira, Maria Luís Cardoso, Oana Moldovan, Raquel Espírito Santo, Renata Oliveira, António Guerra, Mafalda Bourbon

Dia Mundial da Saúde 2019 – Cobertura universal de saúde: para todos, em toda a parte

World Health Day 2019 – Universal health coverage: everyone, everywhere



O presente número do *Boletim Epidemiológico Observações* veicula, entre outras contribuições, resultados do trabalho recentemente realizado no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) sobre perigos ambientais reais ou potenciais (sal na alimentação, desconforto térmico, infeções fúngicas profundas e nanomateriais), doenças raras (hipolipidemias primárias e cistinose) ou literacia em saúde ambiental. Da autoria de dezenas de profissionais de saúde (incluindo alguns promissores jovens investigadores e técnicos), o conjunto dos artigos agora publicados é representativo da vitalidade e pertinência do conceito subjacente à criação do Instituto, por Ricardo Jorge há 120 anos atrás, que sucessivas reformas e leis orgânicas (1971, 1993, 2007 e 2012) têm, no essencial, confirmado: ser um bem apetrechado braço laboratorial e uma isenta consciência crítica do sistema de saúde (no sentido mais amplo e mais contaminante de todas as outras políticas setoriais) que possa gerar a base de conhecimento cientificamente validado para a tomada de decisão política, legislativa, regulamentar, administrativa e técnica. Afinal, a missão típica dos atuais Laboratórios do Estado em ambos os lados do Atlântico e a nível global.

Em plena execução do Roteiro para a Reforma e Modernização do INSA lançado em 2017, é legítimo esperar que, no final deste exercício complexo e muito participado (por trabalhadores, *stakeholders* e pares), o Instituto passe a estar dotado dos recursos necessários e suficientes para responder com sucesso aos desafios (demográficos, climáticos, económicos, ...) sempre novos, transnacionais e muitas vezes inesperados que não deixarão de o continuar a pôr à prova como organização indispensável à proteção da saúde.

A poucos meses de concluir uma longuíssima carreira no Instituto Ricardo Jorge, tenho amplos motivos para me orgulhar de ter servido e representado esta casa em praticamente todos os papéis, desde bolseiro a tempo parcial (1974) até Diretor (2000-2004). Os textos que se seguem ilustram muito bem essa experiência para mim tão rica. De facto, foi um privilégio estar inserido num ambiente científico e técnico institucional multifacetado, tanto em termos das funções a desempenhar (investigação e desenvolvimento, observação e vigilância, referência, capacitação de recursos humanos e promoção da cultura científica) como das áreas temáticas a explorar, sempre na perspetiva de obter ganhos em saúde, qualidade de vida e bem-estar para os indivíduos e as populações. Perspetiva que, indo muito para além da prestação de cuidados curativos, dá um sentido novo e mais abrangente ao mote do Dia Mundial da Saúde deste ano que intitula este editorial: “para todos, em toda a parte”.

João Lavinha

*Investigador do Departamento de Genética Humana
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP*

Incapacidade auditiva autodeclarada na população portuguesa: comparação entre os Inquéritos Nacionais de Saúde 2005/2006 e 2014

Self-reported hearing loss in Portugal: a cross-sectional comparison using evidence from the National Health Surveys 2005/2006 and 2014

Ana Rita Torres, Baltazar Nunes, Rita Roquette, Carlos Dias

a.rita.torres@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

A incapacidade auditiva atinge grande parte da população com mais de 65 anos, diminuindo a sua qualidade de vida. Por conseguinte, é essencial caracterizar a sua prevalência de modo a remover barreiras incapacitantes, e promover a participação dos indivíduos afetados na vida em sociedade. Utilizando a informação recolhida no âmbito do 5º Inquérito Nacional de Saúde em 2014, e os dados apurados relativamente ao 4º Inquérito Nacional de Saúde em 2005/2006, pretendeu-se estimar a prevalência de incapacidade auditiva na população portuguesa em 2014, analisar a sua evolução face a 2005/2006, e examinar as respetivas diferenças regionais. Os resultados do presente estudo revelam que a incapacidade auditiva afeta uma proporção considerável da população portuguesa, especialmente nos grupos etários mais elevados. A prevalência de incapacidade auditiva aumentou de 2005/2006 para 2014, e entre a maioria das regiões, sendo mais elevada na região Norte. As menores prevalências registaram-se na R.A. da Madeira, embora esta região, conjuntamente com a R.A. dos Açores tenha sido a que registou um maior aumento proporcional da prevalência de incapacidade auditiva.

_Abstract

Hearing impairment affects a large part of the population over 65 year old, diminishing their life quality. Therefore, it is crucial to examine the prevalence of hearing impairment, in order to remove disabling barriers and promote social inclusion. By using data gathered for the 5th National Health Survey in 2014, and data gathered for the 4th National Health Survey in 2005/2006, this study aimed to estimate the prevalence of hearing impairment in the Portuguese population in 2014, analyse its evolution against 2005/2006, and examine regional differences. Through the two years under analysis, it can be seen that hearing impairment affects a considerable proportion of the Portuguese population, especially in higher age groups. The prevalence of hearing impairment increased from 2005/2006 to 2014, and between most regions, being higher in the North. The lowest prevalence was recorded in Madeira, although this region, together with Azores, was the one with highest proportional increase in hearing impairment prevalence.

_Introdução

Estima-se que entre 30% a 46% da população com mais de 65 anos seja afetada por algum tipo de incapacidade auditiva de forma crónica (1-3), facto que pode ser explicado pela presbiacusia, o efeito da atividade profissional (1,4,5), o uso de certo tipo de medicamentos (6), e algumas morbilidades, como a diabetes (7-9), hipertensão (10), ou reumatismo (11). A incapacidade auditiva interfere na comunicação, integração, e bem-estar dos indivíduos (12), limitando a nível social e diminuindo a qualidade de vida (13,14). Adicionalmente, está descrita uma frequência aumentada de sintomas depressivos (15,16), quedas (17) e necessidade precoce de cuidados continuados no caso de idosos com incapacidade auditiva (3,18).

Como tal, existem esforços crescentes para caracterizar a prevalência desta doença, sendo que a realização de inquéritos para a recolha de informação autodeclarada, se revela uma alternativa rápida e económica face às medidas quantitativas com medição por audiometria (19). A validade deste método foi comprovada por vários estudos que compararam os resultados obtidos por aplicação de testes audiométricos e por questionários de autoavaliação para perceção da incapacidade auditiva (3,20,21), observando-se prevalências similares em ambos os métodos.

Compreender a distribuição de indivíduos com incapacidade auditiva na população, bem como as suas circunstâncias, pode ajudar a remover barreiras incapacitantes, e promover a participação das pessoas com este tipo de incapacidade na vida em sociedade (22). Num estudo realizado em 2009, com o objetivo de analisar a incapacidade auditiva na população portuguesa (23), e em que se utilizaram dados recolhidos no

âmbito do 4º Inquérito Nacional de Saúde de 2005/2006 (INS 2005/2006), verificou-se uma maior prevalência de incapacidade auditiva na região Norte e no sexo masculino. Reveste-se assim, de particular importância estudar como evoluíram estas tendências volvidos nove anos, através da análise da informação apurada em 2014 aquando da realização do 5º INS, de modo a adequar medidas de saúde pública a vários níveis de prevenção.

_Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram: i) estimar a prevalência de incapacidade auditiva na população portuguesa estratificada por variáveis sociodemográficas em 2014, ii) comparar essas prevalências com os valores obtidos para 2005/2006, e iii) examinar as respetivas diferenças regionais.

_Material e métodos

As amostras, com delineamento probabilístico e multi-etápico, foram constituídas por todos os residentes em 19.950 unidades de alojamento no 4º INS, e 22.538 unidades de alojamento no 5º INS, seleccionadas de modo a serem representativas das populações das principais regiões (NUTS II de 1989 (24) de Portugal – Norte, Centro, Lisboa e Vale do Tejo, Alentejo, Algarve, Região Autónoma dos Açores (R.A. Açores) e Região Autónoma da Madeira (R.A. Madeira) (25,26). Dado que em 2005/2006, a pergunta sobre acuidade auditiva foi operacionalizada apenas durante o primeiro trimestre do ano de 2005/2006, enquanto que em 2014 foi aplicada durante todo o período de aplicação do questionário, o número de efetivos incluídos neste estudo corresponde a 9110 indivíduos e 18.197 indivíduos, para o 4º e 5º INS, respetivamente. Contudo, o facto de ter sido utilizada uma subamostra em 2005/2006, não é suscetível de introduzir viés nas estimativas, já que, tanto quanto sabemos, não está descrita sazonalidade para a distribuição de incapacidade auditiva.

Todas as entrevistas foram realizadas ao domicílio, por pessoal treinado de acordo com um protocolo uniformizado, embora as versões dos questionários diferissem entre si. O questionário aplicado no 5º INS foi reformulado de modo a correspon-

der a normas europeias (Inquérito Europeu de Saúde por Entrevista, EHIS). Para permitir a comparabilidade entre os dois questionários foi considerado como tendo incapacidade auditiva: quem no 4º INS respondesse '*Só consegue ouvir com o volume alto*' ou '*Não consegue ouvir mesmo com o volume alto*' à questão '*Consegue ouvir um programa de TV ou de rádio?*'; e quem no 5º INS respondesse '*Tem alguma dificuldade*' ou '*Tem muita dificuldade*' ou '*Não consegue de todo*' à questão '*Num quarto ou sala silenciosos, mesmo usando a prótese ou implante auditivo, tem dificuldade em ouvir o que é dito por outra pessoa numa conversa?*'.

As estimativas de prevalência foram obtidas com ponderação para a idade, sexo e região (NUTS II) e desenho amostral. Os ponderadores utilizados foram calculados e disponibilizados pelo Instituto Nacional de Estatística (25,26). Uma vez que a prevalência de incapacidade auditiva está fortemente associada à idade, a comparação entre as populações das várias NUTS foi feita através de um valor síntese padronizado para a idade com eliminação do efeito associado à existência de diferenças nas estruturas etárias das amostras. Para tal, utilizou-se uma técnica de padronização direta pela idade, dividida em quatro grupos etários, em que a população padrão é a que resulta da distribuição da própria amostra em estudo (27,28).

Por outro lado, a comparação entre as populações residentes nas várias NUTS foi feita por grupo etário o que elimina o efeito das diferentes estruturas etárias das populações. Os resultados são apresentados sob a forma de frequências relativas, com e sem padronização pela idade. Foram realizadas comparações bivariadas entre 2005/2006 e 2014 utilizando o teste do qui-quadrado de Pearson, e definindo o nível de significância $p < 0.05$. A análise estatística foi realizada no programa informático STATA, versão 11.2 para Windows® (Stata Corp, College Station, TX, USA).

_Resultados

A **tabela 1** contem a distribuição das prevalências de incapacidade auditiva por região, ano e sexo. No conjunto dos dois sexos, verifica-se que a prevalência bruta de incapacidade auditiva aumentou em todas as regiões do país en-

tre 2005/2006 e 2014, excetuando Lisboa e Vale do Tejo (7,8% em 2005/2006 para 7,7% em 2014), Alentejo (10,2% em 2005/2006 para 9,9% em 2014) e Algarve (8,5% em 2005/2006 para 7,8% em 2014). Todavia, este aumento apenas foi estatisticamente significativo para a R.A. da Madeira ($p=0,019$) e R.A. dos Açores ($p=0,032$). Em cada um dos anos em análise, a prevalência de incapacidade auditiva revela uma tendência crescente com a idade, em ambos os sexos.

Em 2005/2006, verifica-se que, à exceção do Algarve, R.A. dos Açores e R.A. da Madeira, as prevalências são mais elevadas no sexo masculino do que no sexo feminino, especialmente a partir do grupo etário 25-44 anos. Em 2014, porém, observa-se uma inversão deste padrão, e nas regiões de Lisboa e Vale do Tejo, Alentejo, Algarve, R.A. dos Açores e R.A. da Madeira, a prevalência de incapacidade auditiva é superior no sexo feminino.

Em 2005/2006 (tabela 1 e figura 1), após padronização pela idade, os valores mais elevados para o conjunto dos dois sexos observam-se na região Norte (11,6%), seguida pelo Alentejo (9,7%). Contudo, analisando os dois géneros separadamente, verificamos que nos homens as prevalências mais elevadas foram observadas nas regiões Norte e Alentejo (13,8% e 11,2%, respetivamente), enquanto que nas mulheres as prevalências mais elevadas se observaram na região Norte (9,9%) e Algarve (9,2%). Ainda relativamente a 2005/2006, na R.A. da Madeira registaram-se as menores prevalências, em qualquer dos sexos e no seu conjunto.

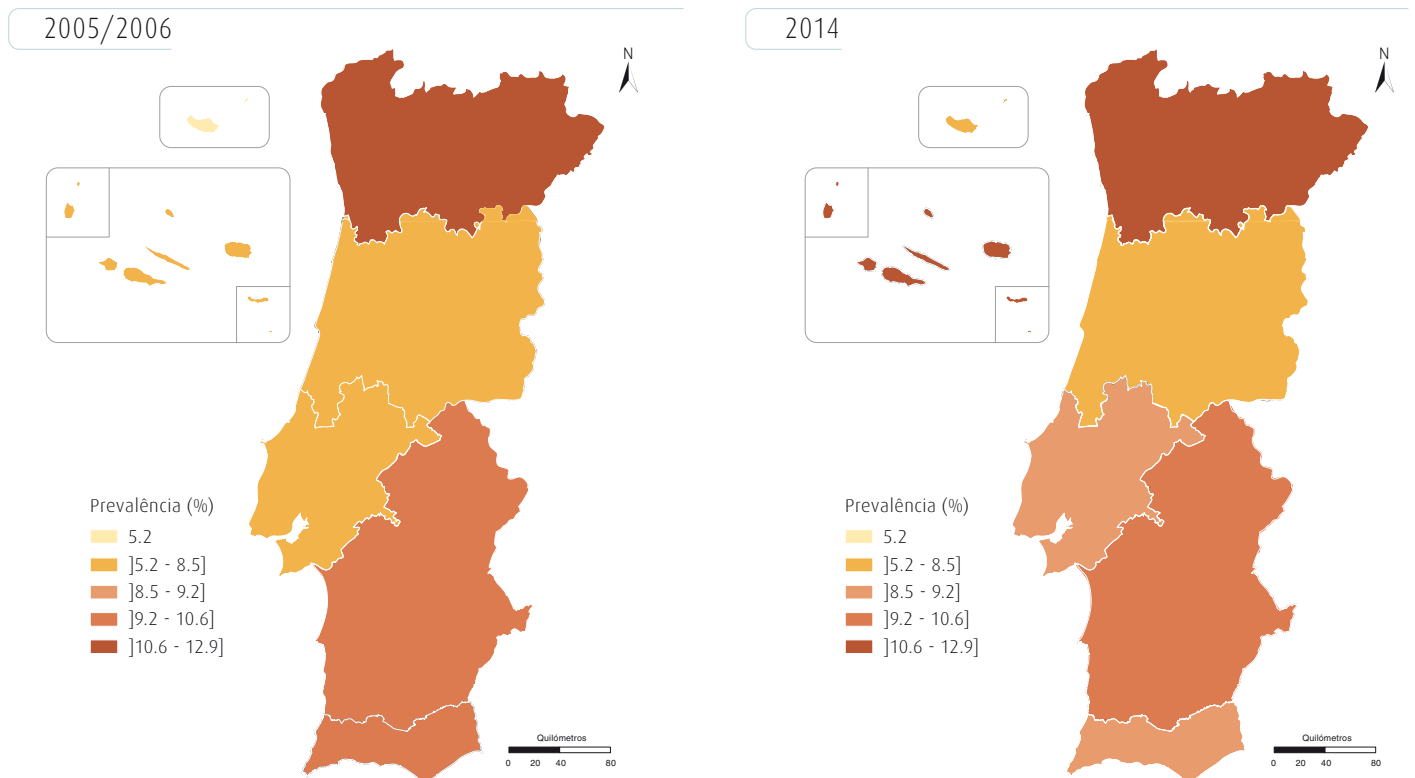
Em 2014 (tabela 1 e figura 1), a região Norte teve os valores mais elevados de incapacidade auditiva para o conjunto dos dois sexos (12,9%). No entanto, neste ano, o segundo valor mais elevado observou-se na R.A. dos Açores (11,3%), que registou um aumento estatisticamente significativo ($p=0,015$) de prevalência de incapacidade auditiva comparativamente a 2005/2006. Este padrão manteve-se em ambos os sexos. Num outro extremo, a R.A. da Madeira continuou a registar as menores prevalências a nível nacional (8,2%) e nos indivíduos do sexo masculino (7,1%), embora tenha sido uma das regiões que registou um maior aumento de prevalência de incapacidade auditiva no período em análise. Para as mulheres, as menores prevalências observaram-se na região Centro (8,3%).

Tabela 1: ▾ Prevalência de Incapacidade auditiva (%) segundo a região (NUTS II 1989), grupo etário, ano e sexo, segundo os dados dos Inquéritos Nacionais de Saúde 2005/2006 e 2014.

	Grupo etário	HM		H		M	
		2005/2006	2014	2005/2006	2014	2005/2006	2014
Norte	15-24	1,5	1,7	0,8	2,3	0,9	1,1
	25-44	2,8	1,7	2,6	1,7	1,7	1,7
	45-64	10,5	10,9	13,2	11,6	9,0	10,2
	≥65	29,7	27,7	36,1	30,4	24,7	25,8
	Total	9,6	10,3	10,5	10,6	8,4	10,1
	Total Padr.	11,6	12,9	13,8	13,3	9,9	12,6
Centro	15-24	0,5	0,8	1,0	0,9	0,0	0,7
	25-44	1,8	1,9	2,3	2,2	1,2	1,7
	45-64	5,3	5,8	6,2	7,2	4,5	4,5
	≥65	22,5	19,2	24,8	19,8	20,9	18,7
	Total	7,5	7,7	7,9	7,9	7,1	7,5
	Total Padr.	7,8	8,5	8,8	8,7	6,9	8,3
Lisboa e Vale do Tejo	15-24	0,6	1,7	1,1	2,4	0,0	1,0
	25-44	0,5	1,5	1,1	1,1	0,0	1,8
	45-64	9,8	8,8	11,8	8,5	8,0	9,1
	≥65	22,5	17,5	24,3	18,4	21,2	16,9
	Total	7,8	7,7	8,4	7,4	7,2	8,0
	Total Padr.	8,8	9,0	10,1	8,7	7,7	9,2
Alentejo	15-24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	25-44	2,7	2,8	3,3	2,4	2,0	3,2
	45-64	9,2	6,3	12,7	6,8	5,8	5,7
	≥65	24,6	24,7	25,4	24,2	23,9	25,1
	Total	10,2	9,9	11,0	9,1	9,5	10,7
	Total Padr.	9,7	10,6	11,2	9,7	8,2	11,4
Algarve	15-24	1,5	2,5	0,0	2,0	3,1	3,1
	25-44	1,8	1,3	3,1	1,5	0,5	1,1
	45-64	9,3	5,6	7,9	4,4	10,7	6,8
	≥65	22,3	21,7	23,6	21,7	21,4	21,8
	Total	8,5	7,8	8,2	7,0	8,9	8,5
	Total Padr.	9,1	9,2	9,1	8,4	9,2	10,0
R. A. Açores	15-24	1,1	1,2	0,8	2,3	1,3	0,0
	25-44	1,1	2,5	1,7	3,4	0,5	1,6
	45-64	5,8	10,1	7,9	9,5	3,7	10,6
	≥65	21,6	22,9	19,8	22,7	22,8	23,0
	Total	5,5	7,8	5,47	7,7	5,52	8,0
	Total Padr.	7,6	11,3	8,0	10,6	7,1	11,9
R.A. Madeira	15-24	0,5	0,3	1,0	0,0	0,0	0,7
	25-44	0,9	1,8	1,1	2,6	0,6	1,0
	45-64	1,9	5,5	1,3	4,9	2,4	6,0
	≥65	16,9	18,7	17,0	18,3	16,8	19,0
	Total	3,6	5,8	3,1	5,1	4,1	6,4
	Total Padr.	5,0	8,2	5,0	7,1	5,0	9,1

HM - Homens e Mulheres H - Homens M - Mulheres
Padr. - Prevalência padronizada para a idade

Figura 1: Distribuição da prevalência (%) de Incapacidade auditiva padronizada para a idade (método direto, utilizando a população total da amostra como padrão, em 2005/2006 e 2014, por NUTS II (1989).



Discussão e conclusões

Os resultados da análise dos dados dos INS 2005/2006 e 2014 revelam que a incapacidade auditiva afeta uma proporção considerável da população portuguesa, especialmente nos grupos etários mais elevados. A prevalência de incapacidade auditiva aumentou de 2005/2006 para 2014, e entre a maioria das regiões, sendo mais elevada na região Norte, quer em 2005/2006, quer em 2014. De modo análogo, as menores prevalências registaram-se na R.A. da Madeira, embora esta região, conjuntamente com a R.A. dos Açores tenha sido a que registou um maior aumento proporcional da prevalência de incapacidade auditiva entre os dois anos em estudo.

Importa notar que o aumento observado na frequência de incapacidade auditiva pode refletir um eventual maior acesso a cuidados de saúde e não um aumento real na incidência

desta incapacidade, uma vez que a presença de morbilidade autodeclarada está fortemente dependente do padrão de acesso aos serviços de saúde, que difere regional, e socialmente (29).

Outra explicação para estas diferenças, em conjunto com a inversão do padrão de distribuição de prevalência de incapacidade auditiva entre os dois sexos, nas regiões de Lisboa e Vale do Tejo e Alentejo (nas quais a prevalência de incapacidade auditiva era superior no sexo masculino em 2005/2006), poderá estar relacionada com a maior exposição a fontes de ruído ocupacional e ambiental. De facto, apesar de as mulheres estarem historicamente sujeitas a menores níveis de ruído ocupacional (uma vez que representam uma menor proporção dos trabalhadores no setor fabril, ou de construção (30), alguns hábitos pessoais, como ouvir música em volumes elevados, poderão estar a aumentar a prevalência de incapacidade auditiva esbatendo as diferenças entre os dois sexos (31).

Por último, a disparidade entre os instrumentos de inquérito utilizados no 4º e no 5º INS podem explicar algumas das diferenças observadas neste trabalho.

Esta e outras questões carecem de uma investigação mais aprofundada, em que se analisem variáveis socioeconómicas, ou ambientais. Tal análise, poderá ajudar a esclarecer diferenças entre várias regiões e sexos, bem como a estudar a presença de gradientes sociais.

Referências bibliográficas:

- (1) Cruickshanks KJ, Wiley TL, Tweed TS, et al. Prevalence of hearing loss in older adults in Beaver Dam, Wisconsin. The Epidemiology of Hearing Loss Study. *Am J Epidemiol.* 1998;148(9):879-86.
- (2) Davis AC. The prevalence of hearing impairment and reported hearing disability among adults in Great Britain. *Int J Epidemiol.* 1989;18(4):911-7.
- (3) Sindhusake D, Mitchell P, Smith W, et al. Validation of self-reported hearing loss. The Blue Mountains Hearing Study. *Int J Epidemiol.* 2001;30(6):1371-8.
- (4) E. C. Alexopoulos, T. Tsouvaltzidou, A. E., and T. T., "Hearing loss in shipyard employees," *Indian J. Occup. Environ. Med.*, vol. 19, no. 1, pp. 14-18, 2015.
- (5) Helmkamp JC, Talbott EO, Margolis H. Occupational noise exposure and hearing loss characteristics of a blue-collar population. *J Occup Med.* 1984;26(12):885-91.
- (6) Jacob LC, Aguiar FP, Tomiasi AA, et al. Auditory monitoring in ototoxicity. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006;72(6):836-44. [https://doi.org/10.1016/S1808-8694\(15\)31053-3](https://doi.org/10.1016/S1808-8694(15)31053-3)
- (7) Bainbridge KE, Hoffman HJ, Cowie CC. Diabetes and hearing impairment in the United States: audiometric evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. *Ann Intern Med.* 2008;149(1):1-10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2803029/>
- (8) Rolim LP, Rabelo CM, Lobo IFN, et al. Interação entre diabetes mellitus e hipertensão arterial sobre a audição de idosos. *CoDAS.* 2015;27(5):428-32. <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1782/20152014101>
- (9) Ferreira JM, Sampaio FMO, Coelho JMS, et al. Perfil audiológico de pacientes com diabetes mellitus tipo II. *Rev Soc Bras Fonoaudiol.* 2007;12(4):292-7. <http://www.scielo.br/pdf/rsbf/v12n4/v12n4a07.pdf>
- (10) de Moraes Marchiori LL, de Almeida Rego Filho E, Matsuo T. Hypertension as a factor associated with hearing loss. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006;72(4):533-40. [https://doi.org/10.1016/S1808-8694\(15\)31001-6](https://doi.org/10.1016/S1808-8694(15)31001-6)
- (11) Oztürk A, Yalçın S, Kaygusuz I, et al. High-frequency hearing loss and middle ear involvement in rheumatoid arthritis. *Am J Otolaryngol.* 2004;25(6):411-7.
- (12) Tesch-Römer C. Psychological effects of hearing aid use in older adults. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci.* 1997;52(3):P127-38.
- (13) Lin FR, Yaffe K, Xia J, et al.; Health ABC Study Group. Hearing loss and cognitive decline in older adults. *JAMA Intern Med.* 2013;173(4):293-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3869227/>
- (14) Pichora-Fuller MK. Cognitive Decline and Hearing Health Care for Older Adults. *Am J Audiol.* 2015;24(2):108-11. <http://liu.diva-portal.org/smash/get/diva2:847551/FULLTEXT01.pdf>
- (15) Arlinger S. Negative consequences of uncorrected hearing loss-a review. *Int J Audiol.* 2003 Jul;42 Suppl 2:2S17-20.
- (16) Li CM, Zhang X, Hoffman HJ, et al. Hearing impairment associated with depression in US adults, National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2010. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;140(4):293-302. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102382/>
- (17) Lin FR, Ferrucci L. Hearing loss and falls among older adults in the United States. *Arch Intern Med.* 2012;172(4):369-71. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3518403/>
- (18) Schneider J, Gopinath B, Karpa MJ, et al. Hearing loss impacts on the use of community and informal supports. *Age Ageing.* 2010;39(4):458-64.
- (19) Valete-Rosalino CM, Rozenfeld S. Triagem auditiva em idosos: comparação entre auto-relato e audiometria. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2005;71(2):193-200. <http://www.scielo.br/pdf/rboto/v71n2/a13v71n2.pdf>
- (20) Nondahl DM, Cruickshanks KJ, Wiley TL, et al. Accuracy of self-reported hearing loss. *Audiology.* 1998;37(5):295-301.
- (21) Hashimoto H, Nomura K, Yano E. Psychosomatic status affects the relationship between subjective hearing difficulties and the results of audiometry. *J Clin Epidemiol.* 2004;57(4):381-5.
- (22) Organização Mundial da Saúde; Secretaria dos Direitos da Pessoa com Deficiência do Governo do Estado de São Paulo (trad). Relatório Mundial sobre a Deficiência. São Paulo: SEDPCD, 2012. https://www.who.int/disabilities/world_report/2011/en/
- (23) De Almeida SP, Falcão JM. Incapacidade auditiva autodeclarada na população portuguesa: uma análise aos dados do quarto Inquérito Nacional de Saúde. *Acta Med Port.* 2009;22:223-32. <http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/1702/1282>
- (24) Decreto-Lei n.º 46/89, de 15 de fevereiro. DR 1ª Série 1989-02-15, nº 38:590-94. Estabelece as matrizes de delimitação geográfica da Nomenclatura de Unidades Territoriais para Fins Estatísticos (NUTS). <https://dre.pt/application/file/a/611263>
- (25) 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&PUBLICACOESpub_boui=69365215&PUBLICACOESmodo=2&xlang=pt
- (26) 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&PUBLICACOESpub_boui=263714091&PUBLICACOESmodo=2&xlang=pt
- (27) Klein RJ, Schoenborn CA. Age adjustment using the 2000 projected U.S. population. *Healthy People 2010 Stat Notes.* 2001;(20):1-10.
- (28) Levy PS, Lemeshow S. Sampling of populations: methods and applications. 4th ed. New York: Wiley, 2011.
- (29) M. B. de A. Barros, P. M. S. B. Francisco, L. M. Zanchetta, and C. L. G. César, "Tendências das desigualdades sociais e demográficas na prevalência de doenças crônicas no Brasil, PNAD: 2003- 2008," *Cien. Saude Colet.*, 2011.
- (30) Instituto Nacional de Estatística. Estatísticas do emprego. [Em linha]. (consul. 15/03/2019). https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESTipo=ea&PUBLICACOEScolecao=5685773&selTab=tab0&xlang=pt
- (31) Murphy MP, Gates GA. Hearing Loss: Does Gender Play a Role? *Medscape Womens Health.* 1997;2(10):2.

Análise do conforto térmico em estruturas residenciais para idosos em clima atlântico

Analysis of thermal comfort in nursing homes in the Atlantic climate

Pedro Torres¹, Lívia Aguiar², Cristiana Pereira^{1, 2}, Nuria Forcada³, Blanca Tejedor³, Maria Paula Neves², João Paulo Teixeira^{1, 2}, Ana Mendes^{1, 2}

a.sofia.mendes@insa.min-saude.pt

(1) Instituto de Saúde Pública, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

(2) Unidade do Ar e Saúde Ocupacional. Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal.

(3) Group of Construction Research and Innovation. Department of Project and Construction Engineering, Universitat Politècnica de Catalunya, Terrassa (Barcelona), Espanha.

Resumo

A esperança média de vida da população mundial tem vindo a aumentar, incrementando a faixa etária acima dos 65 anos. Nesse sentido, determinados serviços experimentam maior demanda em resposta às necessidades crescentes desta população, como é o caso dos serviços de cuidados a longo prazo, nomeadamente, centros de dia (CD) e estruturas residenciais para idosos (ERPI). Neste âmbito de serviços para a comunidade idosa, os parâmetros de qualidade e conforto são apresentados como fatores cruciais para o bem-estar dos utentes/residentes, sendo que o conforto térmico (CT) é um fator determinante na monitorização do bem-estar desta população. Para que os valores ótimos de CT sejam alcançados e mantidos nos edificadados com esta tipologia de serviços, elevados gastos energéticos são despendidos para retificar as condições estruturais dos edifícios. A fim de estruturar um modelo matemático viável que permita definir as características estruturais otimizadas na fase de construção e reabilitação dos edifícios para CD ou ERPI, torna-se necessário analisar o CT dos utentes e prever quais as condições térmicas aceitáveis ou preferenciais para esta população. Este estudo, ainda em curso e integrante do programa ConTerMa, analisa as variáveis de CT na zona climática continental atlântica, monitorizando 8 ERPI e CD situados em 5 concelhos da área metropolitana do Porto, e 5 ERPI e CD na área metropolitana de Barcelona, representativas do clima mediterrânico.

Abstract

In recent years, the average life expectancy of the world's population has been rising, resulting in a steady increase in the elderly population. With the older age group increasing, certain services are in greater demand in response to the growing needs of this population, such as the case of long-term care services, i.e. Day Centres (DC) and Nursing Homes (NH). In this service area, quality and comfort parameters are presented as crucial factors for the well-being of the users, with thermal comfort being one of the most important quality parameters of well-being of this population. It takes high energy costs in order for optimum values of thermal comfort (TC) to be achieved and maintained in buildings built for this type of service, since structural conditions of buildings are often degraded. In order to structure a viable mathematical model that allows to define the optimized structural characteristics in the construction phase of the buildings for permanent or temporary geriatric residences, it is necessary to analyse, in an initial phase, the TC of the users of this type of service and to predict which are the acceptable or preferred thermal conditions for this popula-

tion. The TC analyses, in this study, will focus on an area of continental Mediterranean climate, addressing 8 NH and DC in the metropolitan area of Porto, representative of the Atlantic climate zone in Portugal, and 5 NH and DC in the metropolitan area of Barcelona, exemplifying of the Mediterranean climate.

Introdução

Segundo as Nações Unidas (2017), as estimativas apresentam 962 milhões de pessoas com 60 anos ou mais no mundo, representando 13% da população mundial, apresentando um crescimento a uma taxa de cerca de 3% ao ano (1).

Atualmente, a Europa tem a maior percentagem (25%) de população com mais de 60 anos. Espera-se também que o número de pessoas com 80 anos ou mais triplicará até 2050, e que até 2100 aumentará para quase sete vezes o seu valor comparado com 2017, como apresentado nos gráficos 1 e 2.

Em Portugal, em dez anos, a esperança média de vida aumentou 2,28 anos para a população em geral (2).

Essa tendência explica a crescente demanda por serviços de cuidado de longo prazo (4), como os centros de dia (CD) e estruturas residenciais para idosos (ERPI). Além disso, considerando que pessoas com mais de 65 anos passam boa parte do seu tempo em ambientes interiores, o consumo de energia necessário para manter ambientes interiores com temperaturas de conforto nesses centros é elevado (5,6). Nesse sentido, é necessário determinar os parâmetros que influenciam no conforto térmico (CT), tanto para projetar espaços agradáveis, como para garantir o bem-estar e a saúde dos ocupantes dos edifícios. Uma boa conceção e gestão dos edifícios constru-

Gráfico 1: ↘ Perfis demográficos da população de Portugal para o ano 2017 e projeção do ano 2050 (adaptado ⁽¹⁾).

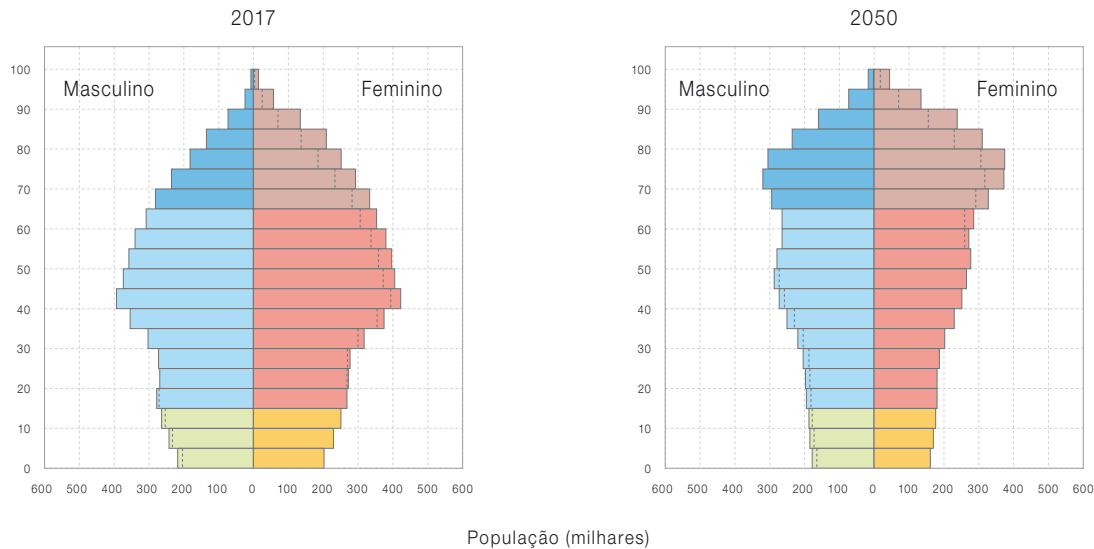
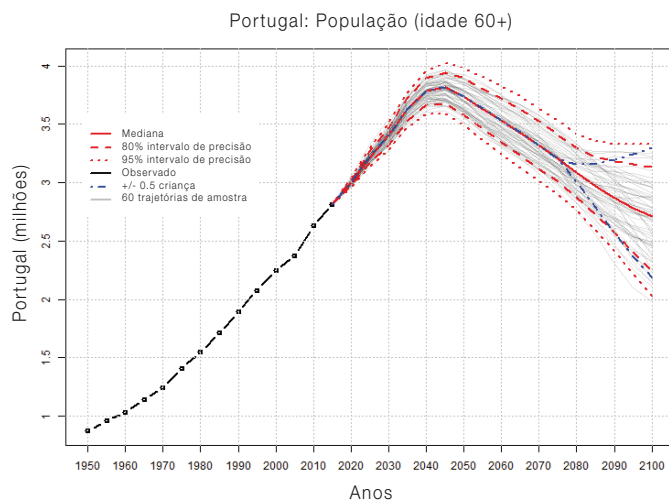


Gráfico 2: ↘ Estimativas e projeções probabilísticas da população portuguesa com 60 ou mais anos, entre 1950-2100 (adaptado ⁽³⁾).



idos não só oferece uma sensação térmica confortável para os ocupantes, mas também determina a quantidade de energia consumida pelos sistemas de refrigeração e aquecimento do edifício. No atual contexto de mudanças climáticas e aquecimento global, a inclusão do conceito de CT adaptativo nos padrões de CT permite adotar novas estratégias de eficiência e economia de energia e atender consistentemente às exigências do desenvolvimento sustentável.

As condições de conforto podem variar substancialmente dependendo da meteorologia. Este projeto irá, portanto, concentrar-se na análise deste conforto na zona climática do Atlântico. Em simultâneo uma equipa parceira de investigação da *Universitat Politècnica de Catalunya*, coordenadora do programa ConTerMa, monitoriza 5 ERPI representativas do clima mediterrânico.

_Objetivo

Este estudo, ainda em curso e integrante do programa ConTerMa, analisa as variáveis de conforto térmico (CT) na zona climática continental atlântica, monitorizando 8 estruturas residenciais para idosos (ERPI) e centros de dia (CD) situados em 5 concelhos da área metropolitana do Porto, e 5 ERPI e CD na área metropolitana de Barcelona, representando o clima mediterrânico.

No geral, o projeto pretende analisar o CT em ambientes de ERPI e CD ocupados por idosos, localizados na zona climática do Atlântico e prever quais as condições térmicas aceitáveis ou preferidas para esse grupo de pessoas. Com esses dados, serão analisados os fatores influentes no CT das pessoas idosas e serão desenvolvidos modelos analíticos para determinar as características de CT para esse grupo populacional dentro das diferentes zonas climáticas. O desenvolvi-

artigos breves_ n. 2

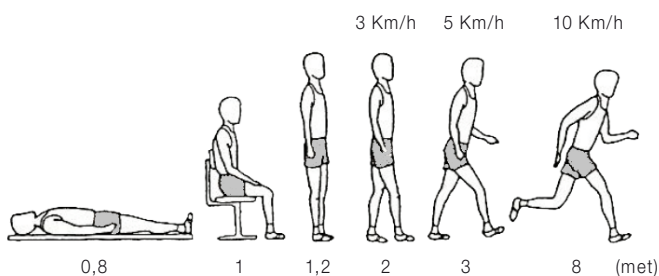
mento dos modelos analíticos adaptativos de CT irá modelar especificações estruturais do edificado necessárias para otimização de CT, quer para construções de novos edificados, quer para adaptação das estruturas pré-existentes. Integrante do Programa ConTerMa, decorre em simultâneo, a mesma metodologia de estudo liderado pela equipa de investigação da *Universitat Politècnica de Catalunya* (Espanha), para monitorização das mesmas variáveis em clima mediterrânico.

_Metodologia

O CT pode ser descrito como as características do ambiente que afetam a troca de calor entre o corpo humano e o meio ambiente (7). O CT depende tanto de parâmetros físicos, tais como questões fisiológicas, afetados pelo estilo de vida, atividade, idade, estado de saúde, género e adaptação ao clima e ao ambiente local do indivíduo e espaço (8).

As normas internacionais ISO 7730:2005 (9), ASHRAE Standard 55:2013 (7) e EN 15251:2007 (9) visam especificar as condições ambientais adequadas ao conforto térmico. Estudos de campo mostram que as atuais regulamentações existentes podem não ser aplicáveis a pessoas acima dos 65 anos porque as suas respostas térmicas são diferentes da população ativa. Este segmento populacional tem características muito específicas, como níveis mais baixos de metabolismo, não sendo capaz de alterar facilmente o seu nível de atividade ou o vestuário, bem como a falta de vasoconstrição, que pode diminuir a sensação térmica ou aumentar a tolerância ao calor, que pode causar desidratação durante o verão.

Figura 1: Representação gráfica da atribuição de valores relativos à taxa metabólica no método do voto médio previsto (adaptado (10)).



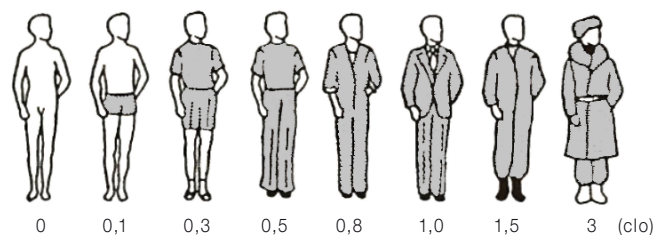
Ao discutir a avaliação do CT, existem dois modelos principais que podem ser usados: o modelo de voto médio previsto (PMV) (10) e o modelo adaptativo.

O modelo habitualmente utilizado para avaliar o CT geral ou corporal é o modelo de voto médio previsto (PMV) de Fanger (1973) (10). De acordo com esse modelo, para que um determinado ambiente possa ser considerado termicamente confortável, deve ser satisfeita uma condição básica, que permita que os mecanismos fisiológicos responsáveis pela termorregulação atinjam o equilíbrio térmico; isto é, que o corpo é capaz de equilibrar o calor ganho (de origem metabólica, como apresentado na figura 1, ou do meio ambiente) e o calor perdido por diferentes mecanismos.








O modelo Fanger PMV é amplamente utilizado e aceite no campo da avaliação do CT. No entanto, é um modelo estacionário (modelo estático), portanto, não leva em conta as variações de temperatura ao longo do dia. É o resultado de investigações em câmaras térmicas, só é aplicável a seres humanos expostos a um longo período em condições constantes, com uma taxa metabólica constante e isolamento térmico do vestuário estável (figura 2), e não considera a adaptação dos ocupantes para alcançar condições de conforto (10).

Relativamente aos questionários sobre sensação térmica, aos utentes dos edificados em estudo, várias questões foram propostas, atribuindo um sistema de pontuação. Para a atribuição de valores e utilização de escalas, foram selecionadas escalas conhecidas como apresentado no quadro 1.

Figura 2: Representação gráfica da atribuição de valores relativos ao isolamento térmico relacionado com o vestuário no método do voto médio previsto (PMV) (adaptado (10)).



Quadro 1: Escalas relacionadas com conforto térmico: escala oficial ASHRAE, preferência e aceitabilidade térmicas.

Representação gráfica ASHRAE *	Valor da escala	Descrição – Escalas		
		Sensação térmica (ASHRAE) (7)	Preferência térmica	Aceitabilidade térmica
	3	Muito quente	Mais fresco	Inaceitável
	2	Quente		
	1	Ligeiramente quente		
	0	Neutro	Sem mudança	Aceitável
	-1	Ligeiramente fresco		
	-2	Fresco	Mais quente	Inaceitável
	-3	Frio		

* Representação gráfica da escala da *American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers* (ASHRAE), utilizadas nos questionários aos utentes das instituições participantes no estudo.

A aplicação de modelos de conforto ambiental para pessoas idosas oferece a possibilidade de melhorar a qualidade de vida e, ao mesmo tempo, oferece um grande potencial para economizar energia e, portanto, reduzir custos. Nesse sentido, com base no modelo analítico desenvolvido, serão comparados dados ambientais históricos das instituições participantes para, por um lado, capacitar e criar boas práticas que melhorem a qualidade de vida dos utentes/residentes e, por outro lado, objetivar a eficiência energética. Essa economia energética traduz-se aproximadamente em 30% da carga de refrigeração, comparada com a de um ponto de ajuste de temperatura fixo, conforme indicado pela teoria do conforto convencional (11).

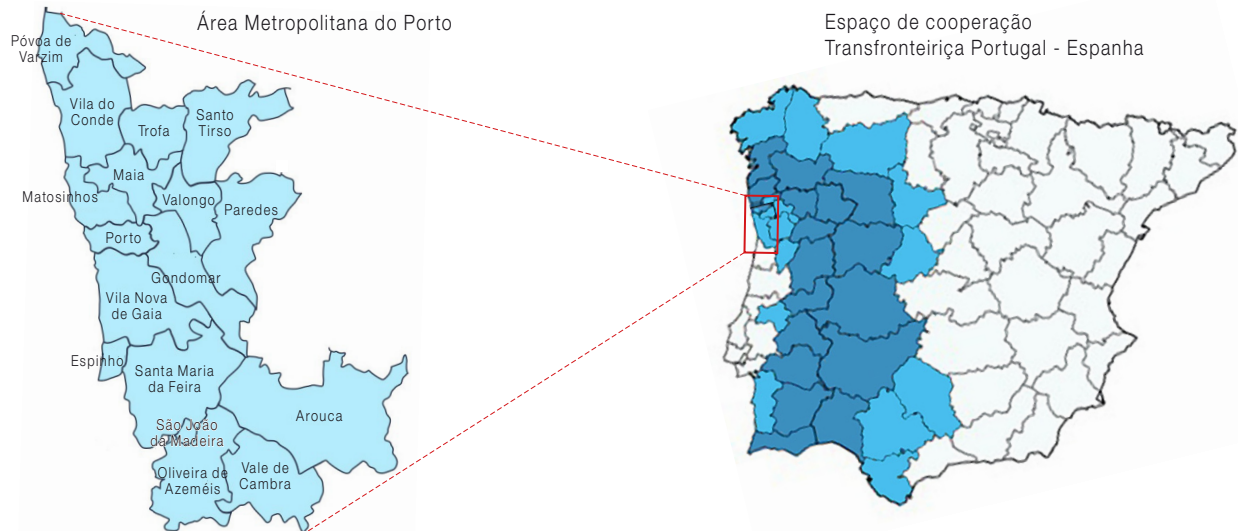
O método adaptativo é o resultado das monitorizações *real-time* nas instituições participantes em que se analisa a real aceitabilidade dos ambientes térmicos, que depende muito do contexto, do comportamento dos ocupantes e das suas expectativas (12).

Em contraste com o modelo estático de CT, no modelo adaptativo as pessoas desempenham um papel instrumental criando as suas próprias preferências térmicas pela maneira como interagem com o ambiente, modificam o seu próprio comportamento ou gradualmente adaptam as suas expectativas, dependendo do ambiente térmico onde estão inseridas (12).

Este projeto, na sua fase inicial de recolha de dados, compilará dados relativos a parâmetros ambientais (temperatura do ar, temperatura radiante média, velocidade do ar e humidade do ar), condições externas (temperatura e humidade relativa do ar exterior, atividade física, vestuário e sensação térmica dos residentes/utentes das ERPI e CD. Foram selecionadas 8 ERPI e CD localizados em áreas com clima atlântico e pertencentes a 5 concelhos da área metropolitana do Porto, apresentada na figura 3.

Em cada uma destas instituições participantes será realizada uma análise longitudinal ao longo das diferentes estações do ano, nas áreas comuns de atividades e convívio. Em simultâneo com cada uma das monitorizações, os residentes serão questionados para determinar a sua sensação térmica no âmbito da escala *American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers* (ASHRAE) (quadro 1). Com esses dados, serão analisados os fatores que influenciam o CT dos idosos e serão desenvolvidos modelos analíticos para determinar as características de CT e conforto adaptativo para este grupo populacional, dentro da respetiva zona climática.

Figura 3: Representação da área metropolitana do Porto e sua localização geográfica na Península Ibérica.



_Resultados esperados

No final deste projeto será criado um modelo analítico de interpretação de parâmetros ambientais e estruturação de medidas de adaptação de edifícios para o propósito em estudo. De estudos realizados na área do CT, destaca-se a necessidade de modelos específicos de conforto para idosos. Em geral, as normas de conforto não se aplicam atualmente à população de idade avançada, apenas determinando limites restritos mais altos de Percentagem Prevista de Insatisfação (PPD), em vez de determinar as condições ambientais e físicas que afetam o CT.

A abordagem do voto médio previsto (PMV) proposta por Fanger (10) utiliza uma câmara climática uniforme estável e bem controlada para estabelecer um índice de avaliação do conforto térmico. Padrões de conforto térmico, baseados no modelo PMV, quer ao nível de planeamento de construção dos edifícios, quer ao nível da manutenção das condições térmicas interiores, foram amplamente aceites pela comunidade científica (13).

A variedade de ambientes, níveis de atividade, resistência térmica do vestuário e outros fatores humanos levam a resultados diferentes. Muitos grupos de pesquisa orientaram os seus trabalhos para o desenvolvimento de estratégias avançadas de controlo baseadas no índice PMV (14).

A abordagem de controlo baseada no índice PMV poderia reduzir simultaneamente o consumo de energia e manter o conforto térmico dentro de uma faixa de conforto aceitável.

O modelo PMV obtém os parâmetros sob condição de estado estacionário, portanto a sua aplicabilidade em ambientes dinâmicos tem sido controversa. Recomenda-se usar o índice PMV somente para valores de PMV entre -2 e + 2.

A ISO 7730:2005 propõe o uso do modelo PMV se uma ou mais variáveis tiverem pequenas flutuações, desde que sejam utilizadas as médias ponderadas no tempo por hora das variáveis, na última hora (9).

Os índices de PMV fornecem uma avaliação do ambiente térmico através de cálculos usando a medição de seis parâmetros: duas variáveis pessoais, ou seja, vestuário isolante (I_{cl} em "clo") e taxa metabólica (M), e quatro parâmetros ambientais, ou seja, temperatura do ar (t_a em "°C"), temperatura radiante média (t_{mrt} em "°C"), velocidade do ar (v em "m/s") e humidade relativa (p_a).

A equação a seguir mostra a relação entre os parâmetros:

$$PMV = f(I_{cl}, M, t_a, t_{mrt}, v, p_a) \quad (1)$$

O PPD é um índice que estabelece uma previsão quantitativa da percentagem de pessoas termicamente insatisfeitas que sentem muito frio ou calor. Tanto o índice PMV como o

artigos breves_ n. 2

índice PPD foram considerados altamente relevantes como ferramentas na avaliação da perda de produtividade face a alterações no conforto térmico (15).

O índice PPD é determinado pela equação seguinte, que depende do índice PMV:

$$PPD = 100 - 95 \times \exp(-0.003353 \times PMV^4 - 0.2179 \times PMV^2) \quad (2)$$

Com o cálculo dos índices relacionados com o conforto térmico, análises comparativas serão realizadas, confrontando os valores obtidos no clima atlântico e no clima mediterrânico, possibilitando assim um estudo mais consistente e com uma visão mais alargada da temática, atendendo às diferenças climáticas encontradas nos dois climas em estudo.

As tabelas 2, 3 e 4 apresentam os resultados da campanha/estação de inverno relativos à amostra de utentes que participaram no estudo respondendo aos questionários de sensação térmica (n=31).

A amostra de utentes elegíveis para participação no estudo na estação de inverno, apresenta uma maioria de utentes/residentes do sexo feminino (74,1%).

Os resultados dos questionários feitos aos utentes (recurso à tabela 1), apresentam respostas homogêneas entre os utentes. Relativamente à sensação térmica propriamente dita, a maioria dos utentes apresentou a resposta de Neutro (0 na escala de ASHRAE) como a mais precisa, não apresentando quaisquer preferências de mudança (0 na escala de preferência térmica), considerando as condições térmicas como aceitáveis (1 na escala de aceitabilidade).

A tabela 5 apresenta os resultados preliminares dos índices PMV e PPD realizados nos espaços comuns das instituições em estudo, resultantes das monitorizações (n=76).

Atendendo ao intervalo recomendado de valores de PMV para o conforto térmico ideal (entre -0,2 e +0,2), verifica-se que apenas a instituição P07 apresenta o valor PMV em conformidade com esse intervalo de valores.

Tabela 2: Distribuição por intervalos de anos de idades dos utentes.

Idades	<60	[60;70[[70;80[[80;90[≥90	Subtotal
Sexo						
Masculino	1	1	0	6	0	8
Feminino	1	1	6	13	2	23
Subtotal	2 (6,45%)	2 (6,45%)	6 (19,35%)	19 (61,3%)	2 (6,45%)	31 (100%)

Tabela 3: Distribuição por escolaridade dos utentes.

Escolaridade	Analfabeto	Sabe ler/Sabe escrever	1º - 4º	5º - 6º	7º - 9º	10º - 12º	Ensino Superior	Subtotal
Sexo								
Masculino	0	5	1	2	0	0	0	8
Feminino	8	8	0	0	2	1	4	23
Subtotal	8 (25,8%)	13 (41,94%)	1 (3,23%)	2 (6,45%)	2 (6,45%)	1 (3,23%)	4 (12,90%)	31 (100%)

Tabela 4: Distribuição dos utentes por anos de residência na instituição.

Anos de Residência	Sem Info.	[0;2[[2;4[[4;6[[6;8[[8;10[≥10	Subtotal
Sexo								
Masculino	0	3	2	2	0	0	1	8
Feminino	2	2	13	0	0	1	5	23
Subtotal	2 (6,45%)	5 (16,13%)	15 (48,38%)	2 (6,45%)	0 (0%)	1 (3,23%)	6 (19,35%)	31 (100%)

Amostra de utentes participantes, n=31

Tabela 5: ↓ Valores médios por instituição de PMV e PPD relativos às condições térmicas na estação de inverno, resultantes das monitorizações efetuadas (n=76).

Instituição (código)	PMV	PPD (%)
P02	-0,44	9,68
P03	0,63	13,66
P04	0,49	11,46
P05	0,25	8,25
P06	-0,79	10,34
P07	0,05	8,47

PMV - modelo de voto médio previsto
PPD - percentagem prevista de insatisfação

Os dados recolhidos e resultados obtidos serão também comunicados às instituições participantes, servindo de base de estudo para a melhoria das condições ambientais térmicas e melhoria da qualidade das instituições residenciais e de apoio a idosos. O projeto tem em agenda a monitorização de todas as instituições participantes ao longo de todas as estações do ano. Nesse sentido, estão já a decorrer as monitorizações da campanha da primavera.

Financiamento

Projeto financiado ao abrigo do Anúncio de Seleção de Trabalhos de Investigação Multidisciplinar sobre o Envelhecimento 'Fondo Europeo de Desarrollo Regional en el marco del Programa de Cooperación Interreg V-A España – Portugal, (POCTEP) 2014-2020, Expediente: 6/2018_CIE_6', no âmbito do Programa Coordenado 'ConTerMa- Análisis del confort térmico en residencias de ancianos en el espacio de cooperación transfronterizo de España-Portugal'.

Referências bibliográficas:

- (1) United Nations. Department of Economic and Social Affairs. Population Division. World Population Prospects: The 2017 Revision, Volume II: Demographic Profiles (ST/ESA/SER.A/400). New York: United Nation, 2017. https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/wpp2017_volume-ii-demographic-profiles.pdf
- (2) Instituto Nacional de Estatística. Tábuas de Mortalidade em Portugal 2015 – 2017: Esperança de vida atingiu 80,78 anos à nascença e 19,45 anos aos 65 anos. (INE destaque, 29 maio 2018). https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaques&DESTAQUESdest_boui=316114129&DESTAQUESmodo=2&xlang=pt

- (3) United Nations. Department of Economic and Social Affairs. Population Division. World Population Prospects: The 2017 Revision [Em linha]. Probabilistic Projections. <https://population.un.org/wpp/Download/Probabilistic/Population/>
- (4) Damiani G, Colosimo SC, Sicuro L, et al. An ecological study on the relationship between supply of beds in long-term care institutions in Italy and potential care needs for the elderly. BMC Health Serv Res. 2009;9:174. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2762968/>
- (5) Mendes A, Bonassi S, Aguiar A, et al., Indoor air quality and thermal comfort in elderly care centers. Urban Climate. 2015;14(part 3):486-501. <https://doi.org/10.1016/j.uclim.2014.07.005>
- (6) Mendes A, Papoila AL, Carreiro-Martins P, et al. The Influence of Thermal Comfort on the Quality of Life of Nursing Home Residents. J Toxicol Environ Health A. 2017;80(13-15):729-739.
- (7) American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers. Standard 55-2013 user's manual: ANSI/ASHRAE standard 55-2013, thermal environmental conditions for human occupancy. Atlanta, GA: ASHRAE Research, 2016.
- (8) Vandentorren S, Bretin P, Zeghnoun A, et al. August 2003 heat wave in France: risk factors for death of elderly people living at home. Eur J Public Health. 2006;16(6):583-91.
- (9) ISO 7730:2005. Ergonomics of the thermal environment - Analytical determination and interpretation of thermal comfort using calculation of the PMV and PPD indices and local thermal comfort criteria.
- (10) Fanger PO. Assessment of man's thermal comfort in practice. Br J Ind Med. 1973;30(4):313-24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1069471/>
- (11) Palma Pedro. Mapeamento das necessidades de energia para aquecimento e arrefecimento ao nível das freguesias em Portugal: implicações para a análise do conforto térmico nas habitações. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Nova de Lisboa, 2017. <https://run.unl.pt/handle/10362/30791>
- (12) Brager GS, de Dear RJ, Thermal adaptation in the built environment: a literature review. Energy and Buildings. 1998;27(1):83-96.
- (13) Zare S, Hasheminezhada N, Sarebanzadeh K, et al. Assessing thermal comfort in tourist attractions through objective and subjective procedures based on ISO 7730 standard: a field study. Urban Climate. 2018;26: 1-9.
- (14) Široký J, Oldewurtel F, Cigler J, et al., Experimental analysis of model predictive control for an energy efficient building heating system. Applied Energy. 2011;88(9):3079-87.
- (15) Kosonen R, Tan F, Assessment of productivity loss in air-conditioned buildings using PMV index. Energy and Buildings. 2004;36(10):987-93.

Avaliação do conhecimento de uma amostra da população portuguesa sobre o bisfenol A Evaluation of knowledge of a sample of the portuguese population on bisphenol A

Fernanda Vilarinho¹, Ana van der Kellen^{1,2}, Mariana Andrade¹, M. Eduardo Figueira², M. Fátima Vaz³, Ana Sanches Silva^{4,5}

fernanda.vilarinho@insa.min-saude.pt

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

(2) Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

(3) Departamento de Engenharia Mecânica, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

(4) Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Vila do Conde, Portugal.

(5) Centro de Estudos de Ciência Animal, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

_Resumo

O bisfenol A (BPA) é um composto orgânico, de origem industrial, com atividade estrogénica. A sua principal utilização encontra-se na produção de plásticos policarbonatos e resinas epóxi, aplicados a embalagens alimentares e produtos médicos. Devido aos perigos associados à ingestão repetida e a longo prazo deste xenoestrogénio, é importante avaliar a perceção e o conhecimento da população portuguesa acerca do BPA e dos seus efeitos para a saúde. Deste modo, foi elaborado um questionário sobre este composto e aplicado a uma amostra da população portuguesa. A amostra foi constituída por 249 indivíduos de diversas zonas do país, pertencentes a diversas faixas etárias e com vários níveis de escolaridade. O questionário compilou questões que permitem reunir dados socioeconómicos e obter informação acerca do conhecimento dos inquiridos sobre este composto químico. Os resultados obtidos mostram que 64% dos inquiridos nunca ouviram falar do BPA. Apesar de 92% dos inquiridos (dos que conheciam o BPA) terem conhecimento que a exposição a este químico produz efeitos negativos para a sua saúde, e que estes, estão maioritariamente associados à utilização de materiais plásticos em contacto com alimentos, 50% mostram desconhecimento de quais os tipos de riscos a que estão sujeitos. Concluiu-se que nesta amostra da população portuguesa o conhecimento sobre o bisfenol A (BPA) é escasso, e que a maioria dos inquiridos não conhece o composto.

_Abstract

Bisphenol A (BPA) is an organic compound, of industrial origin, with estrogenic activity. Its main use is in the production of plastic polycarbonates and epoxy resins, applied to food packaging and medical products. Due to the dangers associated with repeated and long-term ingestion of this xenoestrogen, it is important to assess the perception and knowledge of the Portuguese population about BPA and its health effects. Thus, a questionnaire was elaborated on this compound and applied to a sample of the Portuguese population. The sample was made up of 249 individuals from different parts of the country, belonging to different age groups and with different education levels. The questionnaire compiled questions that allow us to gather socioeconomic data and obtain information about the knowledge of the participants about this chemical. The results show that 64% of the participants never heard of BPA. Although 92% of the respondents (from those who knew BPA) knew that exposure to this chemical agent had negative effects on their health and that these were mostly associated with the use of plastic materials in contact with food,

50% showed lack of knowledge of the types of risks to which they are subjected. It was concluded that among this sample of the Portuguese population the knowledge about BPA is scarce, and the majority do not know the compound.

_Introdução

De acordo com o Decreto-Lei n.º 366-A/97, de 20 de dezembro, do Ministério do Ambiente, considera-se como embalagem “todos e quaisquer produtos feitos de materiais de qualquer natureza utilizados para conter, proteger, movimentar, manusear, entregar e apresentar mercadorias, tanto matérias-primas como produtos transformados, desde o produtor ao utilizador ou consumidor, incluindo todos os artigos «descartáveis» utilizados para os mesmos fins” (1).

As três principais funções de uma embalagem são: conter, proteger e identificar (2,3). As embalagens funcionam como uma barreira química, biológica e física ao ambiente envolvente, uma vez que protegem o alimento de fatores externos; conservam os efeitos benéficos adquiridos com o possível processamento a que o alimento foi sujeito e prolongam o tempo de armazenamento deste. Desta forma, melhoram a qualidade e a segurança dos alimentos até chegarem ao consumidor final (4).

Os principais materiais utilizados na produção de embalagens destinados a entrar em contacto com alimentos são: o papel e seus derivados, o vidro, o metal (alumínio, folhas e laminados, folha-de-flandres e aço livre de estanho) e o plástico. O plástico destaca-se como o material mais utilizado, e mais eficaz, nos dias de hoje, para contacto com alimentos, devido às suas versáteis propriedades, custo e disponibilidade (4).

Os materiais em contacto são objeto de interação com o alimento. Existem três principais tipos de fenómenos de interação embalagem-alimento: adsorção, permeabilidade e migração. O fenómeno de adsorção ocorre quando certos compostos presentes no alimento são retidos pela embalagem (ex.: carotenóides dos alimentos que ficam adsorvidos na embalagem alterando a sua cor original); a permeabilidade é a passagem de substâncias através da embalagem, quer no sentido alimento-meio envolvente quer no sentido contrário (ex.: oxigénio ou vapor de água); o fenómeno de migração caracteriza-se pela transferência química de substâncias presentes na embalagem para o alimento (5,6).

Assim, aquando da ingestão de alimentos, o consumidor pode estar exposto a vários compostos contaminantes, devido à migração destes das embalagens alimentares para os alimentos que irá ingerir. Dependendo do material utilizado, e da forma como é utilizado, são múltiplos os compostos que podem migrar para o alimento. Estes compostos podem encontrar-se na composição da embalagem; serem adicionados intencionalmente através de tintas de impressão, colas, adesivos; ou serem formados não intencionalmente durante o processamento dos materiais (7). Dado que estes compostos migram, na maioria dos casos, em baixas quantidades, não deveriam apresentar riscos para o consumidor. No entanto, o problema reside no facto dos alimentos embalados serem uma grande faixa da alimentação da população, e a exposição continuada a estes agentes poder ter efeitos a longo prazo (7).

Entre os compostos com probabilidade de migrar para os alimentos encontra-se o bisfenol A (BPA) (8). É utilizado na indústria alimentar, nomeadamente na produção de embalagens alimentares de plástico, película aderente, recipientes para *Grab & Go*, *tupperwares* e garrafas de plástico para bebidas. O BPA pode ser utilizado na produção de resinas epóxi, utilizadas como revestimento interno de latas de metal – latas de conserva, latas de refrigerantes e latas para armazenamento de fórmulas para lactentes. O BPA também pode ser utilizado para produzir papéis reciclados utilizados para armazenar alimentos e em papel de cozinha, caixas de cartão/ cartão para contacto com alimentos e sacos de papel (9,10). Para além das utilizações descritas, o BPA foi utilizado em grande escala

na produção de biberões de plástico. No entanto, a sua utilização na produção dos mesmos foi proibida em 2011 na União Europeia, de acordo com o Regulamento de Execução (UE) n.º 321/2011, de 1 de abril, da Comissão (11), que altera o Regulamento (UE) n.º 10/2011 (12) no que respeita à restrição da utilização de BPA em biberões de plástico.

Esta proibição deveu-se ao facto de este composto ser um desregulador endócrino, podendo os seus efeitos para os lactentes, ter repercussões mais graves, em comparação com a restante população. O BPA, sendo um xenostrogénio, com uma estrutura química idêntica ao 17 β -estradiol, interage com os recetores estrogénicos humanos (13), o que faz com que este se enquadre nesta denominação (14).

Para proteger a população é importante saber que a exposição a este composto ocorre através de várias vias, sendo que a principal via de exposição a este químico é a ambiental e a alimentar.

_Objetivos

Elaboração de um questionário para aferir o conhecimento de uma amostra da população portuguesa acerca do BPA, analisando o conhecimento da mesma sobre os riscos a que está sujeita, e de quais as medidas que podem ser tomadas para diminuir a exposição a este composto (por exemplo, uma correta utilização das embalagens plásticas para embalar alimentos em ambiente doméstico).

_Material e métodos

Foi elaborado um questionário aplicável à população portuguesa em geral, divulgado *online* e num evento sobre alimentação (evento “COME”) realizado no Pavilhão do Conhecimento - Centro Ciência Viva, que decorreu em Lisboa no Parque das Nações em março de 2017. Tendo sido aplicado a 249 indivíduos, encontrava-se dividido em quatro seções: i) dados sociodemográficos, ii) noções sobre o BPA (só respondida pelos indivíduos inquiridos que já tinham ouvido falar do BPA), iii) tipos de embalagens alimentares mais utilizadas e iv) conhecimento da simbologia existente nas embalagens alimentares plásticas.

Procedeu-se à análise estatística dos dados obtidos.

Resultados e discussão

A maioria dos inquiridos encontra-se na faixa etária dos 20 aos 35 anos e cerca de 70% possuem pelo menos a licenciatura como nível de escolaridade (gráfico 1).

Quando questionados se já tinham ouvido falar do BPA, a maioria (64%) dos inquiridos respondeu que nunca tinha ouvido falar deste composto (gráfico 2).

Apenas os inquiridos que já tinham ouvido falar do BPA avançaram para a segunda parte do inquérito “Noções sobre o BPA”.

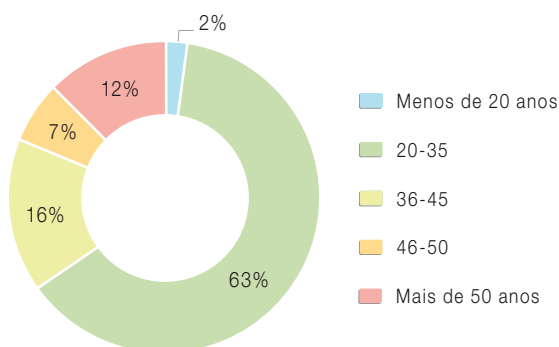
Dos inquiridos que têm conhecimento do BPA, 90 % sabem que é uma substância química utilizada na produção de plástico policarbonato e latas de conserva.

Constata-se, que dos 249 inquiridos somente 81 indivíduos sabem efetivamente o que é o BPA, demonstrando assim, uma falha na informação prestada ao consumidor, diminuindo a possibilidade deste se proteger através da prevenção da sua ingestão. O BPA pode estar presente em plásticos produzidos a partir de policarbonato e no revestimento feito de resinas epóxi, que se encontram no interior das latas de conserva (15).

As respostas ao questionário demonstram que 96% da população que já ouviu falar do BPA, reconhece-o como um agente com efeito negativo na sua saúde. Contudo, a maioria dos inquiridos reconhece não saber, ou assinala incorretamente, os efeitos patológicos provocados pela contaminação por BPA. Apenas 41% sabem que os mesmos se podem refletir a nível de doenças oncológicas.

Gráfico 1: Caracterização da amostra da população (em %) relativamente à faixa etária e ao grau de escolaridade dos inquiridos (n=249).

Idade



Grau de escolaridade

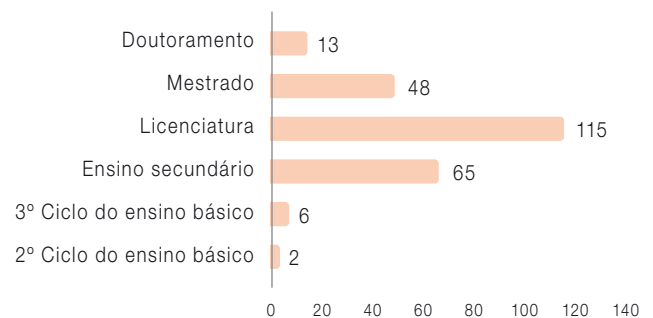
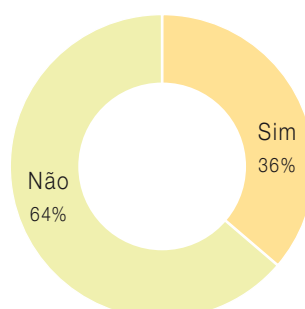


Gráfico 2: Distribuição de respostas (em %) relativamente ao número de inquiridos que ouviram ou não falar do BPA (n=249).

Já ouviu falar do BPA?



Ainda que os seus efeitos oncológicos sejam pouco prováveis de se manifestar (16), 67% dos indivíduos que já ouviram falar do BPA pensam que as suas consequências negativas na saúde têm uma elevada probabilidade de acontecer. Esta pergunta demonstra o alarmismo em que este químico está envolto, existindo pouca informação direcionada para a população geral.

O BPA encontra-se proibido na produção de biberões, esta proibição deve-se ao facto das crianças ainda não terem um sistema de eliminação do BPA tão desenvolvido como o de um adulto (11). Temos que, 71% dos inquiridos que conhecem o BPA estão informados sobre a proibição do uso deste na produção de biberões (11).

No que se refere à escolha do material de embalagem para armazenamento de alimentos, parte 3 do inquérito “Tipos de embalagens alimentares mais utilizadas”, respondida por a amostra total de inquiridos (n=249), 50% destes preferem embalagens de plástico enquanto que os restantes 50% optam, na maioria das vezes, por utilizar embalagens alimentares de outros tipos de materiais, revelando assim algum cuidado em evitar a contaminação por migrantes dos plásticos, o que é um aspeto que indica a grande preocupação atual do consumidor com a segurança alimentar.

No que respeita à frequência de utilização de embalagens de plástico para armazenamento de alimentos, podemos observar que as respostas se encontram bastante divididas:

43% dos indivíduos utilizam estas embalagens frequentemente, 27% diariamente e 27% raramente, contra 3% que nunca utilizam embalagens de plástico.

Quanto à utilização das embalagens de plástico, 48% da população em estudo declara procurar e cumprir as indicações de utilização propostas pelo fabricante, e 28% destes dizem conhecer os riscos a que estão sujeitos. Contudo, a maioria dos inquiridos não tem por hábito cumprir as recomendações do fabricante, 12% por não conhecerem o significado da simbologia, 24% não a procuram e 16% procuram-na, mas escolhem não a cumprir.

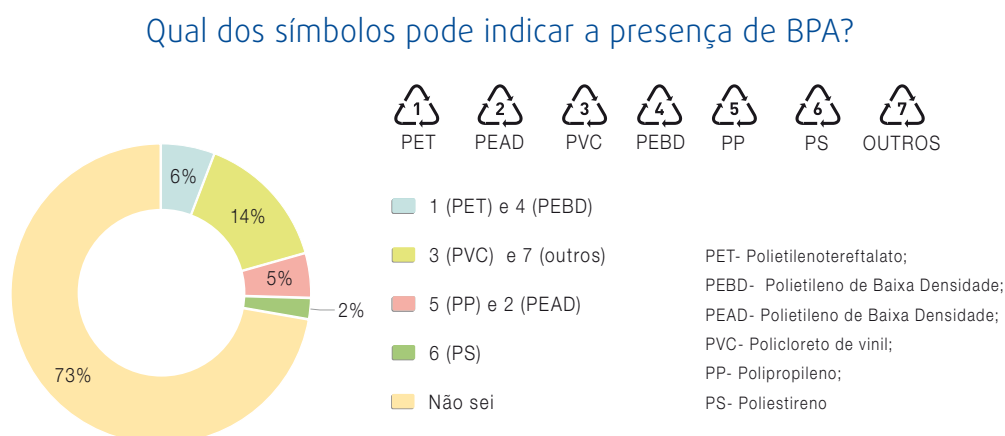
Como tal, é importante trabalhar no sentido de informar o consumidor para que conheça a simbologia e a importância do seu cumprimento.

Relativamente à quarta parte do inquérito “Conhecimento da simbologia existente nas embalagens alimentares plásticas”, respondida pela amostra total dos indivíduos (n=249), a maioria (73%), confessa não saber identificar a simbologia indicativa da presença de BPA, sendo que apenas 14%, selecionaram a opção correta (3 (PVC) e 7 (outros) (gráfico 3).

É fundamental que o consumidor seja capaz de identificar com exatidão a presença de BPA nas embalagens de uso alimentar para que possa tomar uma decisão informada e responsável.

No entanto, pode-se observar que apesar da maioria dos inquiridos não ser capaz de identificar quais os materiais

Gráfico 3: Distribuição de respostas (em %) relativamente ao conhecimento dos inquiridos sobre os símbolos que indicam o polímero que constitui o plástico que podem indicar a presença de BPA (n=249).



que potencialmente podem conter BPA, sabe que a utilização mais correta das embalagens de plástico passa por seguir as indicações propostas pelo fabricante. Oitenta e sete por cento (87%), de um total de 249 inquiridos, responderam acertadamente a esta questão, o que revela que, no geral, encontram-se bem informados e capazes de prevenir a contaminação dos alimentos por compostos químicos que possam migrar das embalagens para os mesmos.

Conclusões

O questionário desenvolvido e aplicado, com a finalidade de analisar o conhecimento da população portuguesa acerca do BPA, mostrou que a maioria dos indivíduos não tem qualquer conhecimento sobre a existência deste químico. A maioria dos indivíduos que conhecem este composto, apresenta falta de conhecimento sobre quais os materiais em contacto com alimentos em que este pode estar presente. Assim sendo, a amostra da população portuguesa em análise, mostrou não possuir conhecimento suficiente para se proteger desta exposição.

Como podemos observar, através da amostra da população portuguesa que respondeu a este questionário, existe informação importante que ainda não chegou ao consumidor. Existem ainda algumas lacunas na informação, apesar de existirem artigos divulgados *online* com informação de notoriedade científica, adaptada à população geral (17,18).

Apesar de 64% dos inquiridos nunca terem ouvido falar do BPA, apenas 47% dos indivíduos se mostraram disponíveis para saber mais. A estes foi enviado um folheto informativo sobre o BPA. Conclui-se que, provavelmente, a informação não chega ao consumidor, também por falta de interesse do mesmo.

Agradecimentos:

Trabalho realizado no âmbito do projeto "Development of methodologies for the evaluation of polymeric food packaging components and determination of their structural and mechanical properties" (2016DAN 1289) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. A autora MFV agradece o financiamento da FCT, através do IDMEC, LAETA, projeto UID/EMS/50022/2019.

Referências bibliográficas:

- (1) Decreto-Lei n.º 366-A/97, de 20 de dezembro. DR n.º 293/1997, 1ª Série-A (3º Supl) 1997-12-20:6732-(498)-(503). Estabelece os princípios e as normas aplicáveis ao sistema de gestão de embalagens e resíduos de embalagens (revoga o Decreto-Lei n.º 322/95, de 28 de novembro). <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/366-a/1997/12/20/p/dre/pt/html>
- (2) Robertson GL. Food packaging: principles and practice. 3rd ed. CRC Press, 2012.
- (3) Risch SJ. Food packaging history and innovations. J Agric Food Chem. 2009;57(18):8089-92.
- (4) Marsh K, Bugusu B. Food packaging--roles, materials, and environmental issues. J Food Sci. 2007;72(3):R39-55. Review.
- (5) Hotchkiss JH. Food-packaging interactions influencing quality and safety. Food Addit Contam. 1997;14(6-7):601-7.
- (6) Hernandez RJ, Gianci JR. Factors affecting permeation, sorption, and migration processes in package-product systems. IN: Taub IA, Singh RP (eds). Food Storage Stability. CRC Press, 1998, pp. 269-330.
- (7) Poças MF, Hogg T. Exposure assessment of chemicals from packaging materials in foods: a review. Trends Food Sci Technol. 2007;18(4):219-30.
- (8) Berhane TM, Levy J, Krekeler MPS, et al. Adsorption of bisphenol A and ciprofloxacin by palygorskite-montmorillonite: effect of granule size, solution chemistry and temperature. Appl Clay Sci. 2016;132-133:518-27.
- (9) Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, et al. Human exposure to bisphenol A (BPA). Reprod Toxicol. 2007;24(2):139-77.
- (10) Barbonetti A, Castellini C, Di Giammarco N, et al. In vitro exposure of human spermatozoa to bisphenol A induces pro-oxidative/apoptotic mitochondrial dysfunction. Reprod Toxicol. 2016;66:61-7.
- (11) Comissão Europeia. Regulamento de Execução (UE) n.º 321/2011, de 1 de abril de 2011, que altera o Regulamento (UE) n.º 10/2011 no que respeita à restrição da utilização de bisfenol A em biberões de plástico Texto relevante para efeitos do EE. JO 2.4.2011: L 8/1-2. http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2011/321/oj
- (12) Comissão Europeia. Regulamento (UE) n.º 10/2011, de 14 de janeiro, relativo aos materiais e objectos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos Texto relevante para efeitos do EEE. JO 15.1.2011:L 12/1-89. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/10/oj>
- (13) Luzio A, Monteiro SM, Rocha E, et al. Development and recovery of histopathological alterations in the gonads of zebrafish (Danio rerio) after single and combined exposure to endocrine disruptors (17 α -ethinylestradiol and fadrozole). Aquat Toxicol. 2016;175:90-105.
- (14) Suglia A, Chianese R, Migliaccio M, et al. Bisphenol A induces hypothalamic down-regulation of the the cannabinoid receptor 1 and anorexigenic effects in male mice. Pharmacol Res. 2016; 113(Pt A):376-38.
- (15) Cheng Y, Nie X, Wu H, et al. A high-throughput screening method of bisphenols, bisphenols diglycidyl ethers and their derivatives in dairy products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Chim Acta. 2017;950:98-107.
- (16) Vandenberg LN, Ehrlich S, Belcher SM, et al. Low dose effects of bisphenol A: an integrated review of in vitro, laboratory animal, and epidemiology studies. Endocr Disruptors. 2013;1(1):e26490. <https://doi.org/10.4161/endo.26490>
- (17) Plásticos sob suspeita [Em linha]. Revista Prevenir. 2017. (consul. 5/02/2019). <https://lifestyle.sapo.pt/saude/peso-e-nutricao/artigos/plasticos-sob-suspeita>
- (18) Plásticos Seguros [Em linha]. Revista Prevenir. 2017. (consul. 5/02/2019). <https://lifestyle.sapo.pt/saude/saude-e-medicina/artigos/plasticos-seguros>

Teor das vitaminas A e E em géneros alimentícios consumidos em Portugal

Content of vitamins A and E in foodstuffs consumed in Portugal

Francisco Ravasco, Elsa Vasco, Maria da Graça Dias

m.graca.dias@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

As vitaminas lipossolúveis, A, E, D e K são compostos orgânicos indispensáveis para o crescimento normal, manutenção e desenvolvimento de organismos vivos. A vitamina A (*all-trans-retinol* e *13-cis-retinol*) está naturalmente presente nos produtos de origem animal, sendo armazenada nos tecidos sob a forma de retinol. A vitamina E (*dl- α -tocoferol*) ocorre naturalmente em alimentos de origem vegetal, principalmente nos vegetais verde-escuros, nas sementes oleaginosas, nos óleos vegetais e no germe de trigo, e também em alimentos de origem animal, nomeadamente na gema do ovo e no fígado. Com vista à avaliação da ingestão das vitaminas A e E pela população portuguesa, no âmbito do Projeto TDSEXPOSURE (*Total Diet Study Exposure* – Estudo da dieta total para avaliação da exposição), financiado no âmbito do 7º Programa Quadro da União Europeia, determinaram-se os teores das vitaminas A e E em 228 amostras alimentares compostas, representativas do consumo da população. Estas amostras, distribuídas em 18 grupos de alimentos (sistema de classificação FoodEx2), foram recolhidas entre 2014 e 2015 na Área Metropolitana de Lisboa (municípios a norte do rio Tejo), de acordo com a metodologia dos Estudos de Dieta Total. De acordo com os resultados obtidos, os alimentos com maior teor de vitamina A, a Manteiga com sal e o Queijo flamengo, pertencem aos grupos 3 e 14, respetivamente. Em relação à vitamina E os teores mais elevados foram encontrados no Azeite, e na Maionese e Molhos diversos, alimentos dos grupos 3 e 16, respetivamente.

_Abstract

The fat-soluble vitamins A, E, D and K are organic compounds indispensable for the normal growth, maintenance and development of living organisms. Vitamin A (*all-trans-retinol* and *13-cis-retinol*) is naturally present in animal products and is stored in the tissues as retinol. Vitamin E (*dl- α -tocopherol*) occurs naturally in foods of plant origin, especially dark green vegetables, oilseeds, vegetable oils and wheat germ, as well as in foods of animal origin, such as egg and liver. In order to evaluate the intake of vitamins A and E by the Portuguese population, as part of the TDSEXPOSURE (*Total Diet Study Study*) project, financed under the 7th Framework Program of the European Union, the levels of vitamins A and E were determined in 228 composite samples of foodstuffs representative of the population consumption. These samples, distributed in 18 food groups (FoodEx2 classification system), were collected between 2014 and 2015 in the Metropolitan Area of Lisbon (municipalities to the north of the Tagus River), according to the methodology of the Total Diet Studies. According to the results, the foods with the highest vitamin A content, the Butter and the Flemish cheese, belong to groups 3 and 14, respectively. In relation to vitamin E the highest levels were found in Olive oil, and Mayonnaise and Various sauces, foods of groups 3 and 16, respectively.

_Introdução

As vitaminas são substâncias orgânicas necessárias, em quantidades muito reduzidas (mg ou μ g por dia), para muitos dos processos essenciais do nosso organismo. As vitaminas não podem ser sintetizadas pelos seres humanos, pelo que têm de ser obtidas a partir dos alimentos (1,2), com exceção da vitamina D, que pode ser sintetizada a nível cutâneo, e da vitamina K que é sintetizada a partir da flora bacteriana intestinal, proporcionando grande parte das necessidades diárias.

As vitaminas A e E são lipossolúveis, destacando-se entre as suas múltiplas funções o papel importante que a vitamina A desempenha nos mecanismos associados à visão e o comportamento da vitamina E como antioxidante (1,2).

A vitamina A pré-formada é obtida a partir de alimentos de origem animal, especialmente fígado e produtos lácteos que são ricos em gordura. No entanto, os precursores da vitamina A (carotenoides provitamina A, principalmente o β -caroteno), que se encontram em alimentos vegetais, especialmente nos de cor laranja e verde escura, também constituem uma importante fonte indireta desta vitamina, particularmente no caso das dietas vegans. A vitamina E ocorre naturalmente em alimentos de origem vegetal, principalmente nos vegetais verde-escuros, nas sementes oleaginosas, nos óleos vegetais e está também presente em alimentos de origem animal, como a gema do ovo e o fígado (1). As quantidades de vitaminas que o nosso organismo necessita variam de indivíduo para indivíduo, de acordo com a idade, género, atividade física e estado de saúde (1,3). As doses diárias de referência (DDR) para os indivíduos adultos são para a vitamina A, 800 μ g e para a vitamina E, 12 mg (4).

Os Estudos de Dieta Total (TDS) são uma ferramenta de saúde pública utilizada para determinar a exposição da

população a substâncias químicas, benéficas e prejudiciais, resultante da alimentação, analisando os alimentos tal como consumidos (5,6). No âmbito do projeto europeu TDSExposure financiado no âmbito do 7º Programa-Quadro de Investigação e Desenvolvimento Tecnológico da Comunidade Europeia, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) participou num TDS piloto que visou a harmonização de metodologias a nível europeu. Assim, de acordo com o plano de amostragem previamente estabelecido, foram recolhidas e preparadas amostras compostas representativas dos hábitos/consumos alimentares da população portuguesa com vista à determinação de diferentes componentes para posterior avaliação da exposição/ingestão, pela população portuguesa, a contaminantes/nutrientes. Neste trabalho apresentam-se os resultados obtidos para a vitamina A (pré-formada) e para a vitamina E nas amostras recolhidas.

_Objetivo

Determinar os teores em vitaminas A (*all-trans*-retinol e *13-cis*-retinol) e E (*dl-α*-tocoferol) das 228 amostras compostas representativas dos hábitos/consumos alimentares da população portuguesa, preparadas de acordo com a metodologia dos Estudos de Dieta Total.

_Materiais e métodos

O planeamento da amostragem, a recolha das amostras e sua preparação foram realizados no âmbito de um Estudo de Dieta Total (TDS) piloto enquadrado no projeto europeu TDSExposure (5), em que se harmonizaram metodologias para avaliar a exposição das populações a contaminantes e/ou nutrientes. Assim, cada uma das 228 amostras analisadas foi constituída a partir de 12 subamostras, correspondendo à recolha de 2736 subamostras na área metropolitana de Lisboa (municípios a norte do rio Tejo) entre os anos de 2014 e 2015, de forma a que os valores analíticos fossem representativos do consumo da população portuguesa, tendo em consideração os respetivos hábitos, sazonalidade e as quotas de mercado dos diferentes produtos. As subamostras, para constituição da amostra a analisar, foram obtidas a partir da parte edível dos alimentos preparados na forma como são ingeridos.

As amostras foram classificadas utilizando o sistema FoodEx2 (7) e distribuídas em 18 grupos: Grupo 2 – Bebidas alcoólicas, Grupo 3 - Gorduras e óleos animais e vegetais, Grupo 4 – Café, cacau, chá e infusões, Grupo 5 – Pratos compostos, Grupo 6 – Ovos e produtos à base de ovo, Grupo 7 – Peixe, produtos da pesca, anfíbios, répteis e invertebrados, Grupo 9 – Fruta e produtos da fruta, Grupo 10 – Sumos e néctares de fruta e produtos hortícolas, Grupo 11 – Cereais e produtos à base de cereais, Grupo 12 – Leguminosas, frutos secos, sementes oleaginosas e especiarias, Grupo 13 – Carne e produtos cárneos, Grupo 14 – Leite e produtos lácteos, Grupo 15 – Produtos para dietas não padronizadas, substitutos e suplementos alimentares ou agentes fortificantes, Grupo 16 – Temperos, molhos e condimentos, Grupo 17 – Raízes ou tubérculos amiláceos e produtos derivados, plantas sacarina, Grupo 18 – Açúcar, confeitaria e sobremesas doces à base de água, Grupo 19 – Produtos hortícolas e derivados, Grupo 20 – Água e outras bebidas à base de água.

As determinações dos teores de vitamina A (*all-trans*-retinol, *13-cis*-retinol) e vitamina E (*dl-α*-tocoferol) foram efetuadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase normal com detetor de fluorescência com comprimento de onda variável, utilizando um método acreditado pela norma ISO/IEC 17025:2005 (8), baseado nas normas EN 12822:2000 (9) e 12823-1:2000 (10), no Laboratório de Química do Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA. As quantificações foram feitas por calibração externa recorrendo a padrões de *all-trans*-retinol, *13-cis*-retinol e *dl-α*-tocoferol preparados em 6 níveis de concentrações. As amostras foram saponificadas numa solução metanólica contendo ácido ascórbico e utilizando uma solução de hidróxido de potássio, foram extraídas com uma mistura de éter de petróleo e éter etílico e reconstituídas em fase móvel para injeção no sistema de HPLC, para separação dos analitos de interesse e respetiva quantificação.

Resultados e discussão

Os teores de vitamina A e de vitamina E das amostras analisadas apresentam-se nos [gráficos 1 a 3](#).

Nos alimentos do grupo 3, a Manteiga com sal apresentou teores de vitamina A e de vitamina E de 440 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ e 1,2 mg/100 g, respetivamente, o Azeite apresentou um teor de vitamina E de 9,2 mg/100 g ([gráfico 1](#)). No grupo 5, o Bacalhau (Brás, Gomes de Sá) e a Omelete são os pratos com maior teor de vitamina E, 6,0 mg/100 g e 2,7 mg/100 g, respetivamente. A Salada russa, as Açordas e migas, o Bacalhau com natas, a Desfeita de bacalhau e a Sopa de tomate são fontes de vitamina E. Neste grupo, as Saladas de leguminosas e pescado e os Hambúrgueres são os pratos com maior teor de vitamina A, 40 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, seguidos da Omelete com 31 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. A Francesinha, o Cozido à portuguesa e o Bacalhau (Brás, Gomes de Sá), são também fonte de vitamina A ([gráfico 1](#)). Os Ovos, pertencentes ao grupo 6, são também uma importante fonte de vitamina A (59 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) e vitamina E (2,8mg/100g) ([gráfico 1](#)).

No grupo 7, dos produtos com maior teor de vitamina A destacam-se as Lulas e o Safio com 130 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ e 105 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, respetivamente. A Perca do Nilo, as Conquilhas e amêijoas, o Mexilhão, o Polvo e a Sardinha apresentaram valores importantes de vitamina A. Neste grupo, os Douradinhos, o Polvo, o Salmão e o Safio são os produtos analisados com um teor mais elevado de vitamina E, 5,2 mg/100 g, 1,9 mg/100 g, 1,7 mg/100 g e 1,6 mg/100 g, respetivamente. Lulas, Perca do Nilo, Bodião, Faneca, Goraz e Pargo são fontes de vitamina E ([gráfico 2](#)). No grupo 9 destacou-se o teor de vitamina E em Passas de uva, 0,9 mg/100 g, na Marmelada, 0,8 mg/100 g e nas Conservas de frutos e no Quivi com 0,6 mg/100 g ([gráfico 2](#)). No grupo 11, os produtos analisados com maior teor de vitamina A foram as Tartes à base de leite e chocolate com 103 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, os Bolos de frutos com 53 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ e o Pão de ló e os Croissants com 52 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. Os Bolos de chocolate e os Bolos diversos foram os produtos analisados com maior teor de vitamina E, 5,7 mg/100 g e 4,4 mg/100 g, respetivamente ([gráfico 2](#)).

No grupo 12 as Azeitonas e o Amendoim apresentaram os valores de vitamina E mais elevados, 4,9 mg/100 g e 1,0 mg/100 g, respetivamente, sendo que a Fava, a Ervilha e o Grão são também uma fonte de vitamina E ([gráfico 3](#)). No grupo 13 foram analisadas 11 amostras, tendo-se obtido teores mais elevados de vitamina A para o Coelho, 142 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ e o Frango, 32 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. A Vaca, o Porco e os Enchidos apresentaram os maiores teores de vitamina E, 0,6 mg/100 g ([gráfico 3](#)). No grupo 14, o Queijo flamengo apresentou o teor mais elevado de vitamina A, 203 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ e de vitamina E, 0,7 mg/100 g e o grupo Sobremesas lácteas apresentou um valor de 49 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de vitamina A e 0,4 mg/100g de vitamina E. O Leite, os Iogurtes e os Leites fermentados probióticos são também uma importante fonte de vitamina A ([gráfico 3](#)). No grupo 15, a amostra composta por Pratos diversos à base de soja, e a das Bebidas vegetais, são ambas fontes de vitamina E, sendo que as Bebidas vegetais apresentaram um teor de vitamina A de 18 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ([gráfico 3](#)), correspondendo à adição feita pelos fabricantes. No grupo 16, a Maionese apresentou o teor de vitamina E mais elevado, 10,5 mg/100g seguindo-se os Molhos diversos e o Ketchup com 7,9 e 1,0 mg/100 g, respetivamente ([gráfico 3](#)). No grupo 19, Produtos hortícolas e derivados, foram analisadas 52 amostras, das quais se destacam com maiores teores de vitamina E, os Grelos e as Nabijas com 2,2 mg/100 g e os Cogumelos com 1,8 mg/100 g ([gráfico 3](#)).

Gráfico 1: Teores de vitaminas A e E, em amostras dos Grupos 2, 3, 4, 5 e 6.

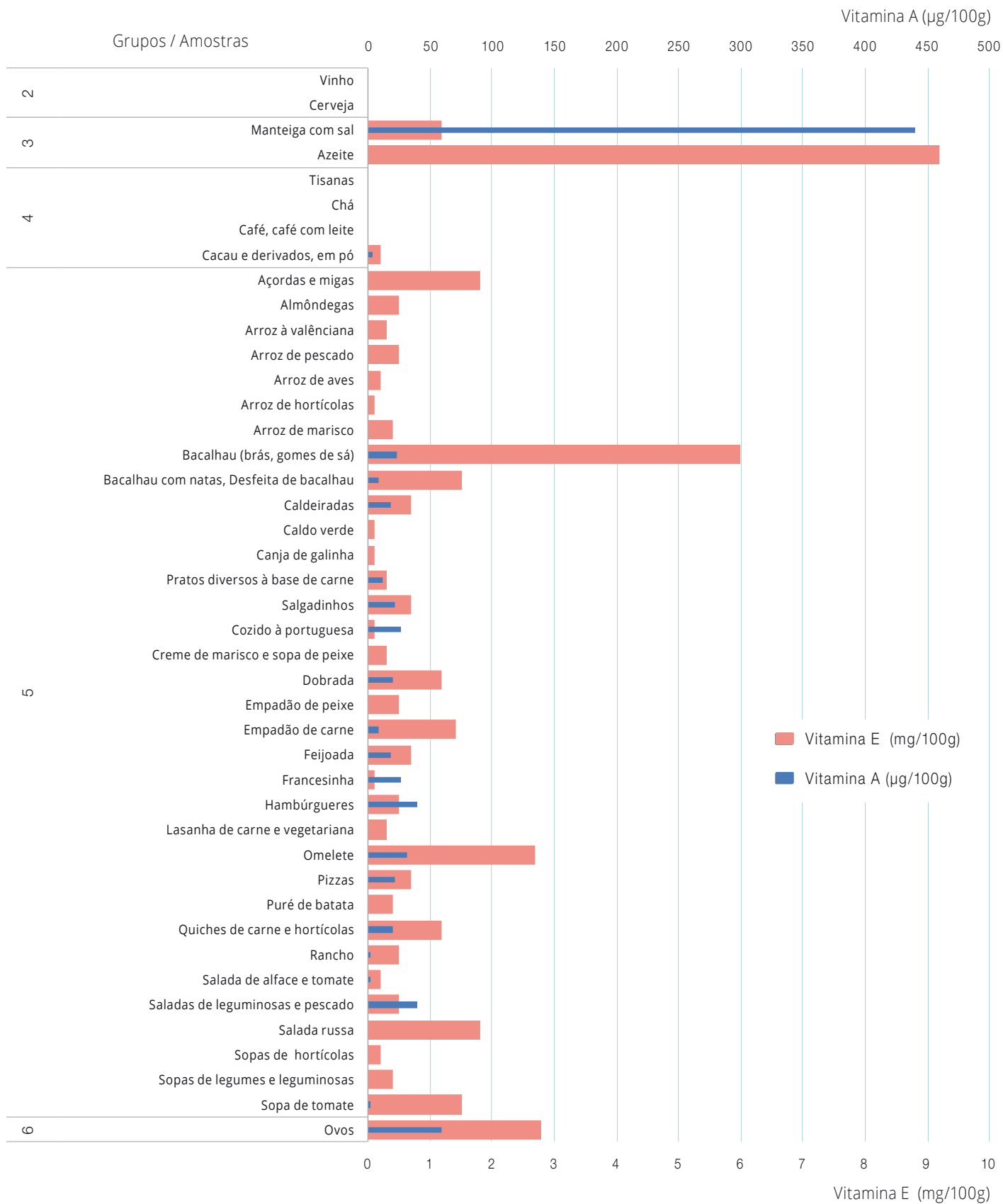


Gráfico 2: Teores de vitaminas A e E, em amostras dos Grupos 7, 9, 10 e 11.

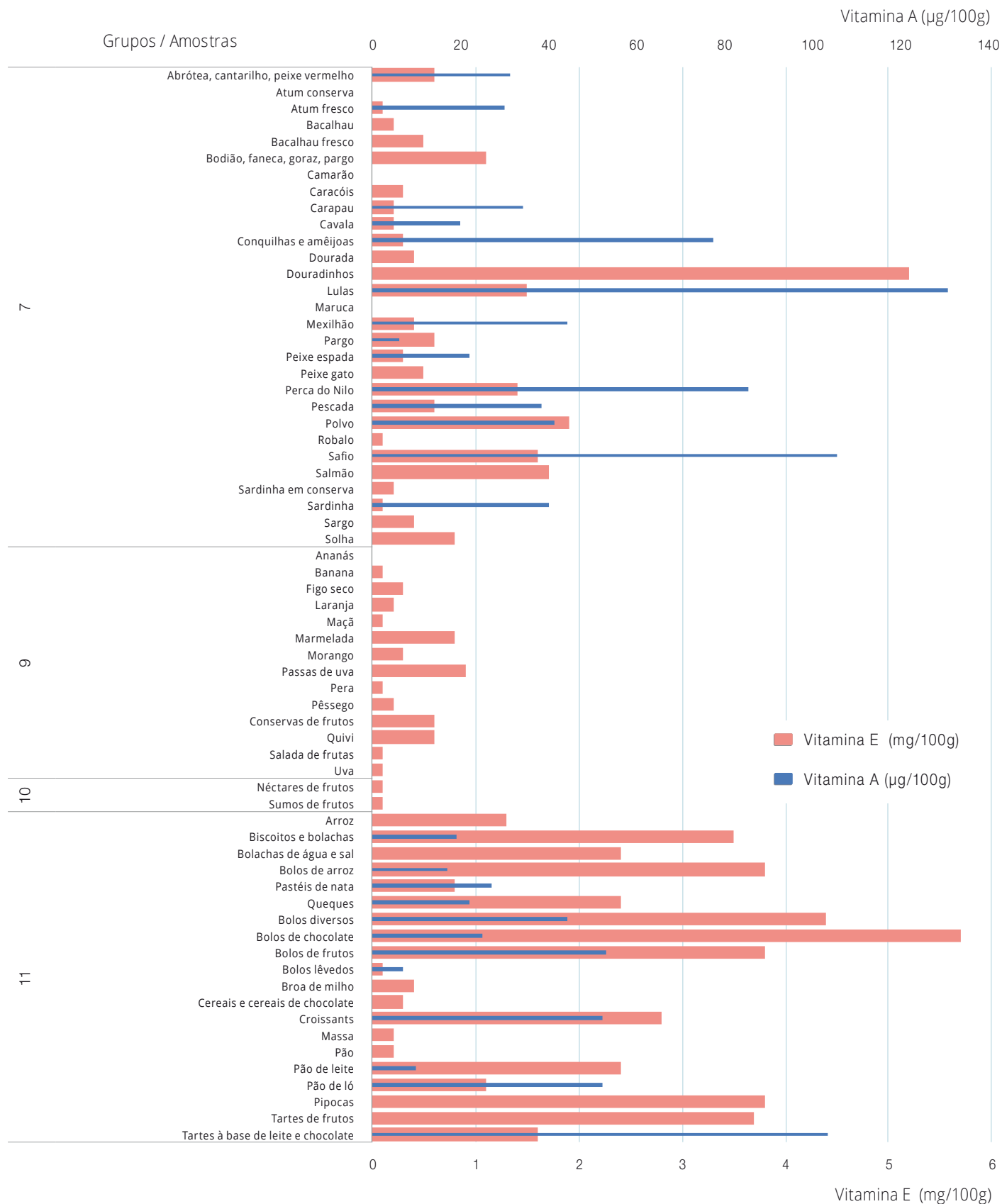
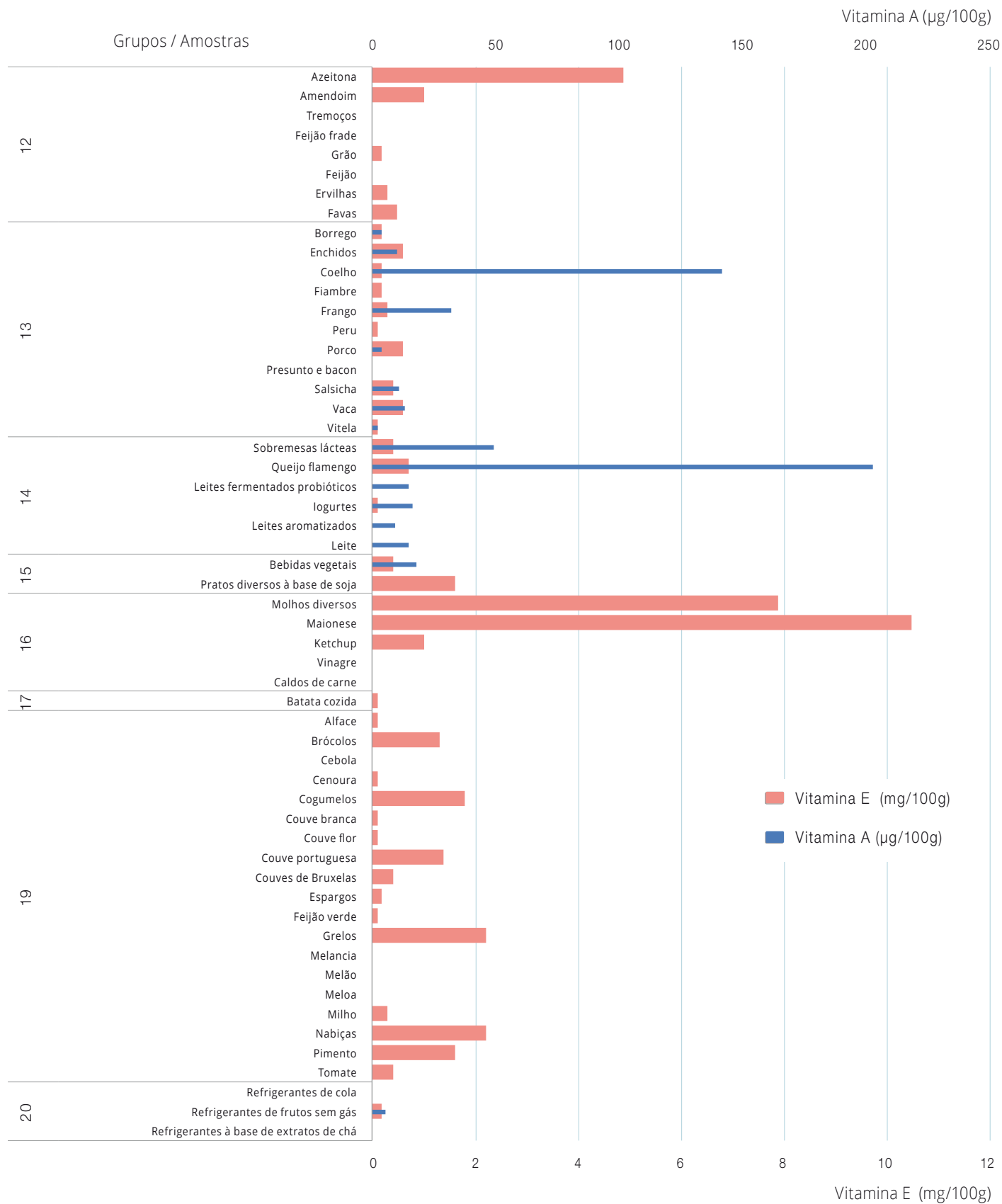


Gráfico 3: Teores de vitaminas A e E, em amostras dos Grupos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19 e 20.



_Conclusões

De acordo com os resultados obtidos os alimentos com maior teor de vitamina A foram a Manteiga com sal e o Queijo flamengo. Em relação à vitamina E os teores mais elevados foram encontrados no Azeite, na Maionese e nos Molhos diversos.

Tendo em consideração os teores obtidos, a adoção de uma alimentação variada, sem restrições, permite a ingestão das doses recomendadas destas vitaminas sem necessitar de suplementação. No entanto, apesar da vitamina E estar distribuída pela grande maioria dos alimentos, a vitamina A está apenas presente nos alimentos de origem animal, pelo que, indivíduos com dietas restritivas, com ausência de alimentos de origem animal, deverão incluir na sua alimentação elevadas quantidades de alimentos vegetais contendo β -caroteno, ou recorrer a suplementação.

Este estudo será complementado com a combinação dos teores obtidos nos diferentes alimentos para avaliação da ingestão destas vitaminas pela população portuguesa.

Referências bibliográficas:

- (1) Ball GM. Vitamins: their role in the human body. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2004.
- (2) Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins, lycopene and beta-carotene in tomato samples and pharmaceutical formulations: double injection single run by reverse-phase liquid chromatography with UV detection. *J Food Compost Anal.* 2018;70:9-17.
- (3) Csapó J, Albert Cs, Prokisch J. The role of vitamins in the diet of the elderly I. Fat-soluble vitamins. *Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria.* 2017;10:127-45. <http://www.acta.sapientia.ro/acta-alim/C10/alim10-09.pdf>
- (4) União Europeia. Regulamento n. o 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n. o 1924/2006 e (CE) n. o 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Directivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) n. o 608/2004 da Comissão Texto relevante para efeitos do EEE. JO 22.11.2011: L 304/18-63. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>
- (5) Dias MG, Vasco E, Pité M, et al. Estudo de dieta total piloto para avaliação da ingestão de nutrientes e da exposição a contaminantes: amostragem. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2015;4(Supl 5):7-9. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/3008>
- (6) European Food Safety Authority, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Towards a harmonised Total Diet Study approach: a guidance document. *EFSA Journal* 2011; 9(11):2450. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2011.2450>
- (7) European Food Safety Authority. The food classification and description system FoodEx2 (revision 2). Parma: EFSA, 2015. (EFSA Supporting publication 2015:EN-804). <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2015.EN-804>
- (8) NP EN ISO/IEC 17025:2005. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.
- (9) BS EN 12822: 2014. Foodstuffs - Determination of vitamin E by high performance liquid chromatography - Measurement of α -, β -, γ - and δ - tocopherols.
- (10) BS EN 12823-1:2000. Foodstuffs - Determination of vitamin A by high performance liquid chromatography - Part 1: Measurement of all-trans-retinol and 13-cis-retinol.

Pão do norte de Portugal: um estudo interventivo com vista a reduzir o teor de sal no pão *Salt reduction in different bread types: an intervention study in the Northern Portugal*

Ana C. Nascimento¹, Susana Santiago¹, Mariana Santos¹, José Mesquita-Bastos²⁻⁴, Joana Gomes da Silva³,
Maria Antónia Calhau¹

mariana.coelho@insa.min-saude.pt

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

(2) Sociedade Portuguesa de Hipertensão, Lisboa, Portugal.

(3) Escola Superior de Saúde. Universidade de Aveiro, Aveiro Portugal.

(4) Serviço de Cardiologia. Centro Hospitalar do Baixo Vouga, Aveiro Portugal.

_Resumo

O pão é um dos alimentos mais antigos e consumidos em todo o Mundo, sendo considerado uma boa fonte de diversos nutrientes fundamentais para o desenvolvimento e saúde do organismo. Os dados do Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física IAN-AF (2015/2016), em Portugal, identificam o pão como sendo considerado um dos principais alimentos a contribuir para a ingestão de sal dos portugueses. A Sociedade Portuguesa de Hipertensão, em colaboração com a Associação dos Industriais de Panificação, Pastelaria e Similares do Norte e o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, desenvolveram um estudo interventivo com vista a reduzir o teor de sal no pão sem alterar as suas propriedades organolépticas. O objetivo deste estudo foi avaliar o teor de sal em 4 tipos de pão tradicional: carcaça, regueifa, broa e pão da avó, antes e depois da intervenção planeada. Antes da intervenção verificou-se que os valores de teor de sal encontrados, em todos os tipos de pão analisados, estavam abaixo de 1,4 g de sal por 100 g de pão (valor estabelecido pelo Decreto-Lei n.º 75/2009, de 12 de agosto) e que, após intervenção, foi possível reduzir para valores entre 0,96 e 1,1 g de sal por 100 g de pão, sem alterar as características organolépticas. O estudo realizado demonstrou ser possível a redução do teor de sal no pão, sem alterações adicionais no processo de produção, constituindo uma medida de baixo custo que permite a melhoria da saúde pública, relativamente à prevenção de doenças crónicas associadas ao consumo excessivo de sal.

_Abstract

Bread is a key staple in the Portuguese diet and provides many of the nutrients required for normal development and good health. The National Food and Physical Activity Survey IAN-AF (2015/2016), in Portugal, identify bread as one of the main foods contributing to Portuguese salt intake. The Portuguese Society of Hypertension, in collaboration with the Portuguese Bakeries Association from North and the National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, planned an intervention study to reduce the content of salt in the bread, without changing its organoleptic properties. The objective of this study was to evaluate the salt content in four types of traditional bread: "carcaça", "regueifa", "broa" e "pão da avó", before and after the planned intervention. It was found that the values of salt content before the intervention were below the value established in legislation n.º 75/2009 of 1.4 g of salt per 100 g of bread and that, after intervention it was possi-

ble to reduce the salt content to values between 0.96 and 1.1 g of salt per 100 g of bread, without changing the organoleptic characteristics. The study showed that it is possible to reduce the salt content in bread without additional changes in the production process, and it is a low-cost measure allowing the improvement of public health in relation to the prevention of chronic diseases associated with excessive salt consumption.

_Introdução

O pão é um dos alimentos mais antigos e consumidos em todo o Mundo. Este alimento destaca-se pelo seu valor nutricional sendo considerado uma boa fonte de hidratos de carbono, ferro, magnésio, fibras alimentares e vitaminas do complexo B, fundamentais para o desenvolvimento e saúde do organismo. É ainda acessível a grande parte da população e apresenta uma grande variedade de escolha ⁽¹⁾.

O sal contribui de forma fundamental para o sabor do pão. É importante pela sua natureza iónica, contribuindo para o controlo da atividade da água (aW) e, portanto, para o tempo de vida útil do pão.

O cloreto de sódio (NaCl) desempenha um papel importante no controlo do processo de panificação, regula a taxa de fermentação, fortalece o glúten e contribui para o sabor salgado, muito apreciado, do pão. É difícil reduzir o teor de sódio do pão sem comprometer o sabor ou textura dos produtos de panificação. Estratégias diferentes têm sido propostas para reduzir o teor de sal de alimentos, como por exemplo através do recurso a outros sais orgânicos, tais como cloreto de potássio e cloreto de magnésio ⁽²⁾.

Os dados do Inquérito Alimentar Nacional e de Actividade Física IAN-AF (2015/2016), em Portugal, identificam um consumo elevado associado ao pão e seus subprodutos, sendo considerados um dos principais alimentos a contribuir para a ingestão de sal dos portugueses (3).

Deste modo, o pão tem sido alvo de preocupação, sobretudo pela relação entre as quantidades ingeridas e o desenvolvimento da Hipertensão Arterial, um dos maiores riscos de saúde pública em Portugal e aquele que mais contribui para a perda de anos de vida saudáveis (4).

A Sociedade Portuguesa de Hipertensão (SPH), em colaboração com a Associação dos Industriais de Panificação, Pastelaria e Similares do Norte (AIPAN) e o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), desenvolveram um estudo interventivo com vista à reformulação da receita, de forma a reduzir o teor de sal no pão sem alterar as propriedades organoléticas.

_Objetivo

A finalidade deste estudo foi avaliar os teores de sódio, e correspondentes teores de sal, em pães da região norte do país, antes e depois de uma intervenção planeada para reduzir o teor de sal nas amostras de pão em estudo, com o objetivo de motivar os associados da Associação de Padarias do Norte de Portugal (AIPAN) a reduzir voluntariamente o teor de sal no pão produzido.

_Materiais e métodos

Foram analisadas 180 amostras de 4 tipos de pão tradicional: carcaça, regueifa, broa e pão da avó, colhidas em dez padarias (5 padarias controlo e 5 padarias intervenção) de cinco distritos do norte de Portugal (Aveiro, Braga, Porto, Viana do Castelo e Vila Real), entre julho e novembro de 2016.

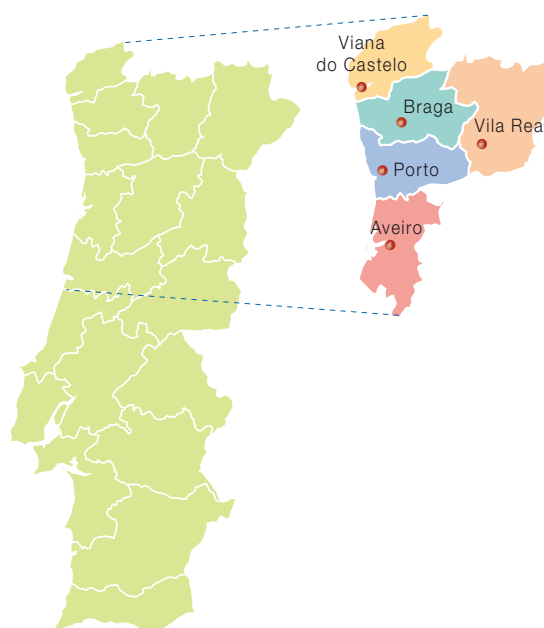
Depois da quantificação inicial, que serviu como linha de base, foi efetuada uma intervenção diretamente nas padarias de forma a diminuir o teor de sal na receita dos quatro tipos de pão, sem qualquer alteração adicional no processo industrial.

As amostras foram submetidas a uma digestão ácida por micro-ondas, tendo os teores de sódio sido analisados por espectrometria de emissão atómica acoplada com plasma indutivo (ICP-OES). As análises decorreram de acordo com o sistema de garantia da qualidade, cumprindo os requisitos descritos na norma EN ISO/IEC 17025:2005 (5).

Os teores de sal, em g por 100 g de pão, foram calculados pela fórmula: sal = sódio × 2,5.

Para avaliar a variável em estudo, teor de sal, antes e após intervenção, foi aplicado o teste t para amostras emparelhadas com um nível de significância estatística de 5% ($p=0,05$).

Figura 1: Região de amostragem do estudo do norte de Portugal.



_Resultados e discussão

Verificou-se que os valores de teor de sal obtidos antes da intervenção estavam de acordo com a Lei n.º 75/2009, de 12 de agosto, que estabelece o teor máximo permitido para o conteúdo de sal no pão, após confeção, em 1,4 g por 100 g de pão (6).

Tabela 1: ↓ Valores médios (e desvios padrão) do teor de sal no pão (g NaCl/100 g pão), nos diferentes tipos de pão, antes e pós-intervenção, e respetivos valores de p obtidos no teste de t-Student efetuado.

Tipo de pão	Antes - intervenção (n=120)		Pós-Intervenção (n=60)		Valor p^*
	Teor médio de sal (g/100 g)	Desvio padrão	Teor médio de sal (g/100 g)	Desvio padrão	
Carcaça	1,23	0,133	1,10	0,111	0,002
Pão da avó	1,13	0,134	1,00	0,118	0,005
Broa	1,05	0,160	0,96	0,102	0,044
Regueifa	1,22	0,155	1,02	0,096	0,000

* Teste t para amostras emparelhadas

Pela análise estatística (teste t) observou-se que os resultados obtidos antes e depois da intervenção divergem significativamente ($p < 0,05$).

Os teores médios de sal obtidos para os diferentes tipos de pão antes da intervenção foram de: carcaça- 1,23 g, pão da avó- 1,13 g, broa- 1,05 g e regueifa- 1,22 g, por 100 g de pão. Após a intervenção verificou-se um decréscimo no teor de sal nos 4 tipos de pão analisados ($p < 0,05$), com teores entre 0,96 (broa) e 1,1 (carcaça) g de sal/100 g.

Conclusões

O estudo realizado demonstra que é possível reduzir o teor de sal para valores entre 0,96 e 1,1 g de sal por 100 g de pão, valores inferiores ao estipulado por lei, sem alterar as características organolépticas.

O consumo de sal observado no IAN-AF (2015/2016) facilmente ultrapassa a dose diária recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (<5 g de sal/dia). O pão, pelo seu elevado consumo, tem uma contribuição significativa para o teor de sal ingerido diariamente pela população portuguesa. Assim, a redução do teor de sal no pão, sem alterações adicionais no processo de produção, pode ser uma estratégia de baixo custo, e elevada eficácia, para a melhoria da saúde pública, relativamente à prevenção de doenças crónicas, como as doenças cardiovasculares e hipertensão arterial associadas ao consumo excessivo de sal.

Referências bibliográficas:

- (1) Associação Portuguesa de Nutrição. Melhor grão, melhor pão: uma análise nutricional sobre o pão. Porto: APN, 2018. https://www.apn.org.pt/documentos/ebooks/E-book_pao_Final.pdf
- (2) Noort MWJ, Bult JHF, Stieger M, et al. Saltiness enhancement in bread by inhomogeneous spatial distribution of sodium chloride. J. Cereal Sci. 2010;52(3):378-86.
- (3) Lopes C, Torres D, Oliveira A, et al. Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, IAN-AF 2015-2016: relatório de resultados - Parte II (versão atualizada v.1.5 setembro 2017). Porto: Universidade do Porto, 2017. <https://ian-af.up.pt/resultados>
- (4) 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&PUBLICACOESpub_boui=263714091&PUBLICACOESmodo=2&xlang=pt
- (5) NP EN ISO/IEC 17025:2005. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.
- (6) Lei n.º 75/2009, de 12 de Agosto. DR n. 155 1ª Série 2009-08-12:5225-26. Estabelece normas com vista à redução do teor de sal no pão bem como informação na rotulagem de alimentos embalados destinados ao consumo humano. <https://data.dre.pt/eli/lei/75/2009/08/12/p/dre/pt/html>

Preocupação com o consumo de sal em Portugal: comparação entre os inquéritos ECOS de 2014 e 2018

Salt consumption awareness in Portugal: comparison between the ECOS surveys of 2014 and 2018

Joana Santos, Ana Rita Torres, Mariana Neto

joana.santos@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

O consumo excessivo de sal aumenta o risco de doenças crónicas, pelo que a sensibilização da população é uma medida recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Direção-Geral da Saúde (DGS) para a diminuição do seu consumo. O objetivo deste estudo foi estimar a prevalência relativa à preocupação com o consumo de sal, em 2014 e 2018 em Portugal, avaliar a sua evolução e caracterizar o perfil sociodemográfico dos participantes que manifestaram preocupação com o consumo de sal nos dois anos em análise. Os dados foram recolhidos no âmbito do inquérito telefónico ECOS (Em Casa Observamos Saúde) para esses anos. Em 2014, 77% dos inquiridos referiram ter preocupação quanto ao consumo de sal face a 75% em 2018. Em ambos os anos, as mulheres revelaram uma maior preocupação quanto ao consumo de sal, comparativamente ao sexo masculino, embora essa diferença fosse mais evidente em 2014. Adicionalmente, verificou-se que a preocupação com o consumo de sal aumenta com a idade, sendo o grupo etário com mais de 65 anos o que registou uma maior preocupação relativamente ao consumo do sal, nos dois anos em análise. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de escolaridade ou as regiões.

_Abstract

Excessive salt consumption increases the risk of chronic diseases. Thus raising awareness is a measure to reduce its consumption, recommended by the World Health Organization (WHO) and the Portuguese Directorate General of Health. The aim of this study was to estimate the prevalence of individuals who reported awareness regarding their salt consumption in 2014 and 2018, and to investigate its distribution among several socio-demographic characteristics. Data was collected by means of a national representative panel telephonic survey, ECOS. In 2014, 77% of respondents reported watching or reducing salt consumption, compared to 75% in 2018, but this difference between years was not significant. In both years, women were more aware of salt intake than men, although this difference was more significant in 2014. Additionally, awareness regarding salt consumption increased with age, with the age group over 65 years old being the most aware, in the two years under analysis. No statistically significant differences were found among the different educational level groups, or regions.

_Introdução

O consumo excessivo de sal aumenta o risco de doenças crónicas, nomeadamente hipertensão, acidente cardiovascular cerebral (AVC), doença coronária e obesidade (1-4), pelo que a sensibilização da população é uma medida recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Direção-Geral da Saúde (DGS) para a diminuição do seu consumo. O sódio (principal componente do sal) está presente no sal de mesa e em diversos alimentos, nomeadamente carnes processadas, produtos panificados como pão ou bolos, e comidas de confeção rápida (1,5). A alteração dos padrões alimentares que tendem a favorecer o aumento da frequência e oferta de alimentos desta natureza, a par com limitações na leitura e interpretação de rótulos no momento da compra, contribui para o aumento da prevalência de patologias crónicas (1,6-12).

_Objetivos

O presente estudo tem como objetivos: i) estimar a prevalência relativa à preocupação da população residente em Portugal continental com o consumo de sal, em 2014 e 2018, e avaliar a evolução deste indicador entre os dois anos em análise; ii) caracterizar o perfil sociodemográfico dos participantes que manifestaram preocupação com o seu consumo de sal, em 2014 e 2018.

_Material e métodos

Os dados utilizados são provenientes dos inquéritos ao painel ECOS (Em Casa Observamos Saúde), conduzidos pelo Departamento de Epidemiologia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) nos anos de 2014 e 2018, respetivamente. As amostras, com delineamento probabilístico e multi-etápico, tiveram como base as Unidades

de Alojamento (UA) de Portugal com telefone fixo e móvel, e foram selecionadas de modo a serem representativas das populações das regiões (NUTS II de 1989 (13)) de Portugal continental em 2014 e de Portugal em 2018. Por esta razão, este estudo foi restringido aos respondentes residentes em Portugal continental, respetivamente, 795 indivíduos em 2014 e 962 indivíduos em 2018.

A preocupação com o consumo de sal foi avaliada através da pergunta: "Atualmente tem atenção, ou está a tentar reduzir o seu consumo de sal?", pelo que consideramos que a pergunta abrange o sal adicionado durante a confeção doméstica de refeições, ou o sal contido pela ingestão de alimentos já confeccionados. As estimativas de prevalência foram obtidas com ponderação para a idade, sexo, região e desenho amostral. Uma vez que existe evidência científica que aponta para que o consumo de sal esteja associado à idade e ao género (14), as comparações entre os estratos de nível de escolaridade e região, foram feitas através da prevalência padronizada para a idade e sexo, pelo método directo, utilizando como população padrão a distribuição da população portuguesa do Continente por sexo e grupo etário, em 2014 e 2017 (dados Instituto Nacional de Estatística, INE (15)). Foram ainda, realizadas comparações bivariadas entre 2014 e 2018 utilizando o teste do qui-quadrado de Pearson, e definindo o nível de significância <0.05. Todas as análises estatísticas utilizaram o programa STATA, versão 15.1 para Windows® (Stata Corp, College Station, TX, USA).

_Resultados

Em 2014, verificou-se que 77,3% da população manifestou ter preocupação quanto ao seu consumo de sal, sendo que em 2018, este valor diminuiu para 75,2%, ainda que de forma não estatisticamente significativa. Todavia, esta variação não foi sentida de forma igual entre todos os grupos etários, sexos, níveis de escolaridade, ou regiões.

Em ambos os anos, a prevalência de mulheres preocupadas com o seu consumo de sal foi mais elevada do que nos homens: 82,3% para o sexo feminino face a 71,6% para o sexo masculino em 2014, e 77,6% para o sexo feminino face a 72,4% para o sexo masculino em 2018 (tabela 1). Contudo,

apenas no ano de 2014, esta diferença entre géneros foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A preocupação com o consumo de sal revelou uma tendência crescente e estatisticamente significativa com o aumento da idade, nos dois anos em análise. Em 2014, no grupo etário 65 ou mais anos 83,5% dos indivíduos referiu ter preocupação com o consumo de sal, seguido pelo grupo etário dos 45 aos 64 anos com 82,4% e por último, pelo grupo etário dos 15 aos 44 anos com 70,2% (tabela 1). Em 2018, também se verificou este padrão, muito embora o grupo com idades compreendidas entre os 45 e os 64 anos tenha sofrido uma redução (73,1%) e o grupo sénior um ligeiro aumento (86,4%).

Tabela 1: Estimativas de prevalência de preocupação com o consumo de sal na população residente em Portugal continental, por sexo e grupo etário, em 2014 e 2018.

	2014		2018	
	%	IC 95%	%	IC 95%
Sexo				
Masculino	71,6	[62,8; 79,0]	72,4	[65,3; 78,5]
Feminino	82,3	[75,9; 87,3]	77,7	[71,9; 82,6]
Grupo etário				
15-44	70,2	[61,1; 78,0]	70,1	[61,4; 77,6]
45-64	82,4	[74,2; 88,3]	73,1	[66,6; 78,8]
65+	83,5	[73,0; 90,4]	86,4	[81,2; 90,3]

Ainda que de forma não significativa, quer em 2014, quer em 2018, a preocupação com a ingestão de sal foi mais frequente na população com menor nível de escolaridade (ensino básico) comparativamente à população com maior nível de escolaridade (ensino superior): 81,1% face a 73,3%, respetivamente em 2014, e 77,3% face a 70,5%, respetivamente em 2018. Este padrão não se alterou com a padronização para o sexo e idade (tabela 2).

Entre 2014 e 2018 não se observaram diferenças estatisticamente significativas para a preocupação com o consumo de sal entre as cinco NUTSII do Continente (tabela 2). Após padronização para o sexo e a idade, a região de Lisboa obteve os valores mais elevados (86,1%), em 2014, e a região Centro o menor valor (71,3%). Em 2018, observou-se uma alteração

Tabela 2: Estimativas de prevalência (bruta e padronizada) de preocupação com o consumo de sal em Portugal continental, por nível de escolaridade e região NUTS II, em 2014 e 2018.

	Sem padronização				Com padronização			
	2014		2018		2014		2018	
	%	IC 95%	%	IC 95%	%	IC 95%	%	IC 95%
Escolaridade								
Básico	81,1	[73,3; 87,0]	77,3	[71,5; 82,2]	79,3	[69,0; 86,9]	75,6	[68,1; 81,8]
Secundário	76,0	[64,5; 84,6]	74,8	[65,6; 82,2]	77,4	[67,2; 85,1]	75,4	[67,7; 81,7]
Superior	73,3	[62,9; 81,7]	70,5	[59,5; 79,6]	74,9	[66,5; 81,8]	75,7	[66,7; 82,9]
Região								
Norte	75,0	[64,1; 83,5]	72,7	[63,7; 80,2]	76,2	[66,3; 83,9]	74,0	[66,0; 80,7]
Centro	70,7	[58,4; 80,5]	78,8	[70,6; 85,2]	71,3	[60,3; 80,3]	78,1	[69,9; 84,6]
Lisboa	84,4	[76,4; 90,0]	74,1	[64,8; 81,7]	86,1	[79,0; 91,0]	73,3	[63,8; 81,1]
Alentejo	76,5	[66,0; 84,5]	81,8	[74,0; 87,7]	72,3	[59,2; 82,4]	81,0	[73,3; 87,0]
Algarve	78,3	[65,5; 87,3]	73,1	[64,3; 80,4]	81,1	[72,8; 87,3]	72,2	[63,6; 79,4]

deste padrão, sendo que 81,0% dos indivíduos da região Alentejo referiu ter preocupação com o sal, contra 72,2% de inquiridos no Algarve.

_Discussão e conclusões

Os resultados mostram que não existiram diferenças significativas na preocupação com o consumo de sal, entre 2014 e 2018. Segundo um estudo da responsabilidade da Sociedade Portuguesa de Hipertensão, realizado em 2013, com o intuito de avaliar a prevalência de hipertensão e o consumo de sal na população portuguesa, apesar de se terem verificado melhorias no espaço de uma década relativamente a este indicador, o consumo de sal em Portugal (10,7g sal/dia) ainda permanecia praticamente o dobro do preconizado pela OMS (5,5-6,0g sal/dia) (16).

Relativamente à distribuição por género, em 2014 as mulheres tinham, de forma significativa, maior preocupação com o consumo de sal do que os homens. Este dado é coerente com outros estudos (14,17) que revelam que as mulheres demonstram maior preocupação com a sua saúde do que os homens, nomeadamente, em relação a comportamentos e fatores de risco que podem ser modificados.

Também se verificou que a preocupação com o consumo de sal aumenta com a idade, de forma significativa entre 2014 e 2018, o que poderá estar relacionado com o facto da prevalência de doenças crónicas e, consequentemente, o controlo alimentar como forma de tratamento e prevenção, aumentar nos estratos etários mais velhos. Um estudo realizado na população australiana (14), quanto à sua percepção e comportamentos autorreportados no consumo de sal, mostrou que os mais idosos são mais propensos a não adicionar sal na comida, a comprar comida com baixo teor de sal, e têm mais conhecimentos sobre os efeitos adversos deste elemento, o que corrobora os resultados encontrados neste trabalho.

Após padronização pela idade e género, não se encontraram diferenças entre os estratos de escolaridade e região, para cada um dos anos em análise. Contudo, à luz da evidência atual sobre o efeito da escolaridade na adopção de atitudes mais protetivas na saúde (17-19), será de considerar uma análise estatística mais complexa, com o intuito de avaliar se existe uma maior prevalência de doenças crónicas nos indivíduos com menor escolaridade que poderá estar a condicionar a sua atenção ao consumo de sal como forma de tratamento da doença.

De notar que outras questões deverão ser exploradas no futuro. Em particular: i) averiguar factores que possam ter contribuído para a diminuição da preocupação com o consumo de sal, no grupo etário dos 44 os 65 anos; ii) a nível do género seria útil investigar fatores que explicassem as diferenças encontradas para a preocupação com o sal nas mulheres, entre 2014 e 2018, tais como a quantidade de refeições preparadas em casa; iii) por fim, seria interessante perceber se existe um possível aumento de doenças crónicas nos indivíduos com escolaridade mais baixa, que poderá estar a influenciar a sua preocupação relativamente ao consumo de sal.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Guideline: sodium intake for adults and children. Geneva: WHO, 2012. https://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sodium_intake/en/
- (2) He FJ, MacGregor GA. Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;(3):CD004937.
- (3) He FJ, MacGregor GA. Salt reduction lowers cardiovascular risk: meta-analysis of outcome trials. *Lancet.* 2011;378(9789):380-2.
- (4) Ma Y, He FJ, MacGregor GA. High salt intake: independent risk factor for obesity? *Hypertension.* 2015;66(4):843-9. <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05948>
- (5) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Tabela da Composição de Alimentos [Em linha]. (consult. 15/03/2019). <http://portfir.insa.pt/#>
- (6) Appel LJ, Anderson CA. Compelling evidence for public health action to reduce salt intake. *N Engl J Med.* 2010;362(7):650-2.
- (7) Grimes CA, Riddell LJ, Nowson CA. Consumer knowledge and attitudes to salt intake and labelled salt information. *Appetite.* 2009;53(2):189-94
- (8) Durão C, Severo M, Oliveira A, et al. Association between dietary patterns and adiposity from 4 to 7 years of age. *Public Health Nutr.* 2017;20(11):1973-1982.
- (9) Correia-Costa L, Cosme D, Nogueira-Silva L, et al. Gender and obesity modify the impact of salt intake on blood pressure in children. *Pediatr Nephrol.* 2016; 31(2):279-88.
- (10) Barros R, Moreira A, Padrão P, et al. Dietary patterns and asthma prevalence, incidence and control. *Clin Exp Allergy.* 2015;45(11):1673-80.
- (11) Schneider BC, Dumith Sde C, Lopes C, et al. How Do Tracking and Changes in Dietary Pattern during Adolescence Relate to the Amount of Body Fat in Early Adulthood? *PLoS One.* 2016;11(2):e0149299. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4764358/>
- (12) Moreira P, Santos S, Padrão P, et al. Food patterns according to sociodemographics, physical activity, sleeping and obesity in Portuguese children. *Int J Environ Res Public Health.* 2010;7(3):1121-38. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2872303/>
- (13) Decreto-Lei n.º 46/89, de 15 de fevereiro. DR 1ª Série 1989-02-15, nº 38:590-94. Estabelece as matrizes de delimitação geográfica da Nomenclatura de Unidades Territoriais para Fins Estatísticos (NUTS). <https://dre.pt/application/file/a/611263>
- (14) Webster JL, Li N, Dunford EK, et al. Consumer awareness and self-reported behaviours related to salt consumption in Australia. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2010;19(4):550-4. <http://apjcn.nhri.org.tw/server/APJCN/19/4/550.pdf>
- (15) Instituto Nacional de Estatística. Estimativas anuais da população residente [Em linha]. (consult. 15/03/2019). https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&contecto=pi&indOcorrCod=0008273&selTab=tab0&xlang=pt
- (16) Polonia J, Martins L, Pinto F, et al. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension and salt intake in Portugal: changes over a decade. The PHYSA study. *J Hypertens.* 2014;32(6):1211-21.
- (17) Johansson L, Thelle DS, Solvoll K, et al. Healthy dietary habits in relation to social determinants and lifestyle factors. *Br J Nutr.* 1999;81(3):211-20.
- (18) Miyaki K, Song Y, Taneichi S, et al. Socioeconomic status is significantly associated with dietary salt intakes and blood pressure in Japanese workers (J-HOPE Study). *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(3):980-93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3709298/>
- (19) Don Nutbeam. Health literacy as a public health goal: a challenge for contemporary health education and communication strategies into the 21st century. *Health Promot Int.* 2000;15(3):259-67. <https://doi.org/10.1093/heapro/15.3.259>

Nanomateriais ingeridos: impacto biológico em relação com as suas características físico-químicas

Ingested nanomaterials: biological impact in relation to their physicochemical characteristics

Ana Catarina Gramacho^{1,2}, Maria João Silva¹⁻³, Henriqueta Louro¹⁻³

henriqueta.louro@insa.min-saude.pt

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

(2) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana (ToxOmics), NOVA Medical School/Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal;

(3) PTO-NANO, Lisboa, Portugal

_Resumo

A utilização de nanomateriais (NMs) em setores variados, designadamente, agricultura e indústria alimentar, encontra-se amplamente disseminada. Assim, muitos produtos alimentares contêm NMs, sendo provável a sua ingestão pelo homem. Torna-se, pois, essencial garantir que esses NMs ingeridos não produzem efeitos adversos, nomeadamente, genotoxicidade que se relaciona com carcinogénese. Neste estudo, pretendemos avaliar uma possível associação entre as propriedades físico-químicas de NMs com a mesma constituição química, dióxido de titânio (TiO₂), e os seus efeitos biológicos em células humanas e, por outro lado, identificar as propriedades que determinam a sua toxicidade. Para tal, analisou-se a citotoxicidade de um conjunto de quatro NMs de TiO₂ tendo-se observado que apenas um deles induzia morte celular. Relativamente aos efeitos genotóxicos, apesar de nenhum NM ter induzido alterações cromossómicas (ensaio do micronúcleo), observou-se que apenas os NMs na forma cristalina anatase (mas não rutilo) induziam efeitos lesivos no DNA (ensaio do cometa). Neste último ensaio, verificou-se ainda a existência de uma correlação inversa entre o tamanho do NM em meio de cultura e a sua genotoxicidade. Futuramente, investigaremos o efeito do processo de digestão nas características destes NMs, bem como nos seus efeitos genotóxicos *in vitro*, visando a tradução dos resultados em potenciais implicações na saúde humana.

_Abstract

The use of nanomaterials (NMs) in a variety of sectors, e.g., agriculture and the food industry, is widely disseminated. Thus, many food products contain NMs that are likely to be consumed by humans. It is therefore essential to ensure that these ingested NMs do not produce adverse effects, namely genotoxicity which is related to carcinogenesis. In this study, we intended to evaluate a possible association between the physicochemical properties of NMs with the same chemical constitution, titanium dioxide (TiO₂), and their biological effects on human cells and, on the other hand, to identify the properties that determine their toxicity. For this purpose, the cytotoxicity of a set of four TiO₂ NMs was analysed and the results showed that only one of them was able to induce cell death. Regarding the genotoxic effects, although none of them induced chromosomal changes (micronucleus assay), the NMs in the anatase (but not rutile) crystalline form were able to induce DNA damage (comet assay). In the latter assay the existence of an inverse correlation between the NM size in culture medium and its genotoxicity was also verified. In the future, we will investigate the effect of the digestion process on the characteristics of these NMs, as well as on their genotoxic effects *in vitro*, with the goal of translating the results into potential implications for human health.

_Introdução

A tecnologia baseada nos nanomateriais (NMs) é uma tecnologia-chave facilitadora, com potencial para melhorar a qualidade de muitos tipos de produtos e processos com aplicações variadas, designadamente, na agricultura e na indústria alimentar (1). Muitos produtos de consumo atualmente disponíveis contêm NMs, por exemplo, na forma de nano-encapsulados ou de aditivos alimentares com dióxido de titânio (TiO₂) ou sílica amorfa sintética na forma nanoparticulada (1). Para além destes, muitos outros NMs estão em desenvolvimento, como a nanocelulose (2) e nanoformulações de pesticidas (3). A exposição humana a NMs por via oral pode ocorrer quer diretamente, através do consumo de produtos ou medicamentos que os contêm, quer indiretamente, através da ingestão de alimentos contaminados com NMs provenientes do meio ambiente ou cedidos por materiais de embalagem (4).

Uma das maiores preocupações para a saúde pública assenta no facto de alguns dos NMs ingeridos poderem produzir efeitos adversos (*Adverse Outcome*, AO) no organismo, tais como genotoxicidade, que se relaciona com o seu potencial de induzir o desenvolvimento de processos cancerígenos. Embora os potenciais efeitos deletérios dos NMs tenham sido alvo de investigação alargada nos últimos anos, os resultados gerados têm sido contraditórios, possivelmente devido a diferenças nas suas propriedades físico-químicas primárias que influenciam a sua toxicidade, ou nos testes e condições experimentais utilizados. Para além desses fatores, deverá ter-se ainda em conta que as propriedades dos NMs podem ser modificadas por influência da matriz circundante, por exemplo, o seu conteúdo em proteínas, sendo que as denominadas propriedades secundárias dos NMs são, por esse motivo, consideradas como dependentes do contexto (5).

_Objetivo

O presente estudo integra-se no Projeto INGESTnano, recentemente iniciado, cujo objetivo principal consiste em investigar as interações nano-bio através da elucidação de acontecimentos-chave ao nível celular e molecular despoletados por NMs de dióxidos de titânio (TiO_2) utilizados em alimentos – na cadeia de relação entre a exposição e o AO, de acordo com o enquadramento perspetivado pelo “Adverse Outcome Pathway” da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico OCDE (6). Assim, pretende-se avaliar se NMs com a mesma constituição química, mas propriedades físico-químicas distintas, podem produzir efeitos biológicos distintos em células humanas e identificar qual/ quais dessas propriedades serão determinantes para o efeito toxicológico observado.

_Materiais e métodos

Selecionou-se um grupo de nanomateriais de TiO_2 (fornecidos pelo *Joint Research Centre*, JRC: NM-101, NM-102; ou *Fraunhofer Institute*: NM-100, NM-103) de propriedades físico-químicas previamente descritas (7). Dispersaram-se estes NMs em meio aquoso (8), analisou-se a distribuição de tamanhos dos NMs nesse meio por *dynamic light scattering* (DLS). Expuseram-se as células humanas aos NMs para análise dos

efeitos citotóxicos (ensaio MTT) e genotóxicos *in vitro* (ensaio do cometa e ensaio do micronúcleo), conforme descrito em Louro *et al.* (2019) (9).

_Resultados e discussão

A análise da dispersão dos NMs demonstrou que, para todos os NMs à exceção do NM-103, se obtiveram dispersões homogêneas, mesmo após diluição em meio de cultura onde, para além das partículas, se detetaram também agregados do NM (10).

Por sua vez, através do ensaio do MTT não se verificou alteração da viabilidade celular, após exposição a cada NM durante 24h, com exceção do NM-102 que induziu morte celular em relação direta com a sua concentração no meio de cultura (gráfico 1). Embora não se tenham também observado alterações nos cromossomas, isto é, efeitos clastogénicos/aneugénicos, através do ensaio do micronúcleo (9), o ensaio do cometa permitiu a deteção de lesões na molécula do DNA, em células expostas apenas durante 3h aos NMs na forma cristalina anatase (NM-100, NM-101 e NM-102), mas não nas expostas à forma rutilo (NM-103; gráfico 2). Assim, a fase cristalina do NM de TiO_2 poderá ser determinante do seu efeito genotóxico, no que diz respeito à indução de quebras de cadeia dupla e simples no DNA.

Gráfico 1: Efeitos citotóxicos dos NMs de TiO_2 em estudo, expressos em termos da viabilidade celular relativa ao valor do controlo, caracterizados através do ensaio de MTT em células expostas por 24h.

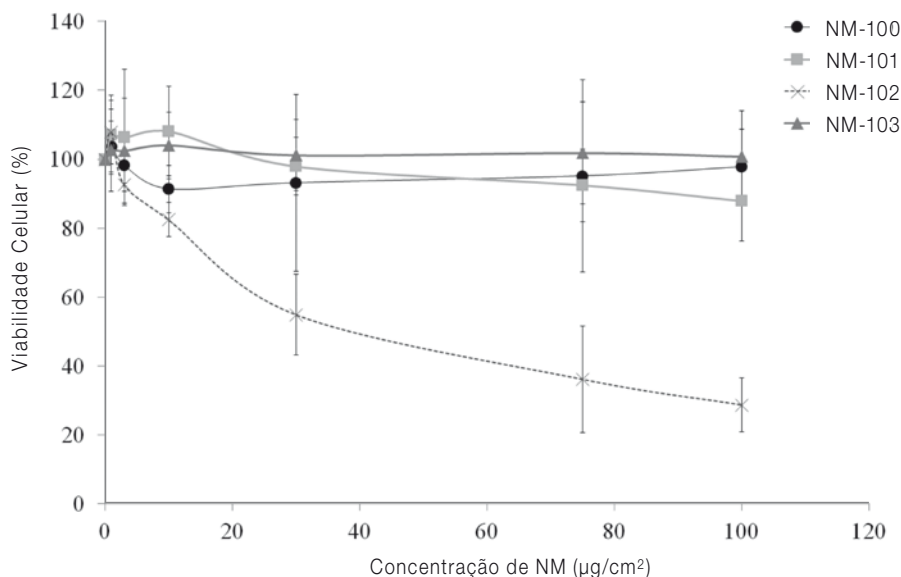
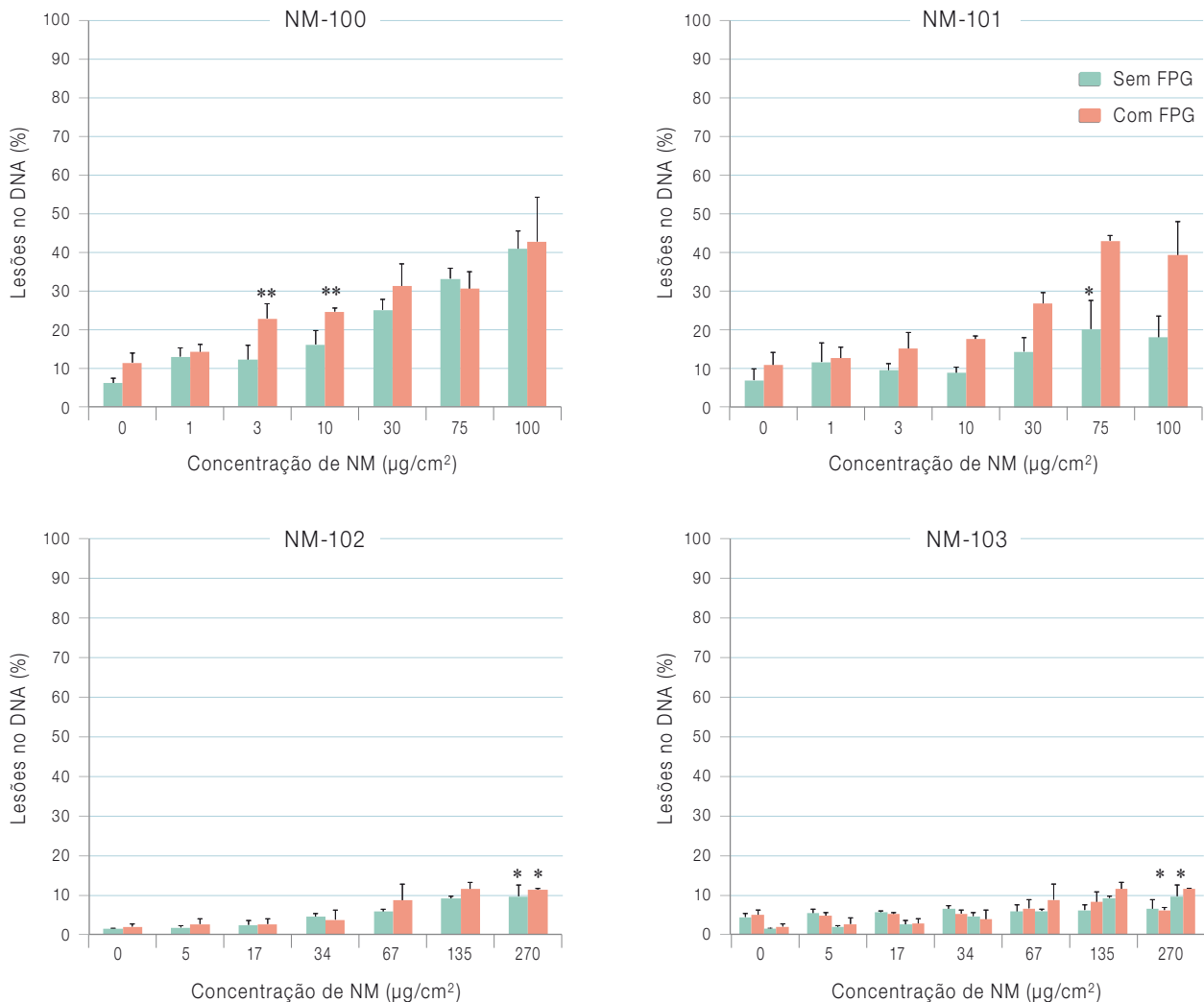


Gráfico 2: ↓ Lesões no DNA (quebras de cadeia simples e dupla) quantificadas através do ensaio do cometa em células expostas por 3h a cada NM de TiO₂.



FPG - enzima formamidopirimidina DNA glicosilase que permite a deteção de lesões oxidativas no DNA.

* Significativamente diferentes do controlo (p < 0,05); ensaio sem FPG; ** Significativamente diferentes do controlo: ensaio com FPG.

No entanto, uma exposição de 24h não evidenciou lesões significativas no DNA, possivelmente devido à reparação das lesões imediatamente induzidas (detetadas às 3h de exposição), através da atuação dos mecanismos de reparação nesta janela temporal.

A aplicação de uma análise de correlação entre as propriedades físico-químicas de cada NM e os seus efeitos genotóxicos (quebras no DNA) sugeriu que o tamanho médio dos NMs em meio de cultura, um meio complexo com elevado conteúdo proteico, se relaciona inversamente com a sua genotoxici-

dade, podendo considerar-se também como um determinante relevante da genotoxicidade de cada NM ($r=0.721$, $p=0.004$; análise de correlação de Pearson). Nesta perspetiva, um aumento do tamanho médio dos NMs de TiO₂, favorecerá a sua segurança.

Futuramente, os novos estudos a desenvolver incluirão a aplicação de um modelo de digestão simulada (11) para investigar o efeito do processo de digestão nas características dos NMs de TiO₂, bem como nos seus efeitos genotóxicos in vitro, por forma a inferir as suas implicações na saúde humana.

Agradecimento:

Trabalho realizado com o apoio financeiro da FCT/MCTES através de fundos nacionais (PIDDAC), PTDC/SAU-PUB/29481/2017 e através do Centre for Toxicogenomics and Human Health (ToxOmics), UID/BIM/00009/2013.

Referências bibliográficas:

- (1) Peters R, Weigel S, Marvin H, et al. Inventory of Nanotechnology applications in the agricultural, feed and food sector. Parma: European Food Safety Authority, 2014. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2014.EN-621>
- (2) Gómez HC, Serpa A, Velásquez-Cock J, et al. Vegetable nanocellulose in food science: a review. *Food Hydrocoll.* 2016. 57:178-86. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.023>
- (3) Kumar S, Bhanjana G, Sharma A, et al. Development of nanoformulation approaches for the control of weeds. *Sci Total Environ.* 2017;586:1272-78.
- (4) Mercier-Bonin M, Despax B, Raynaud P, et al. Mucus and microbiota as emerging players in gut nanotoxicology: The example of dietary silver and titanium dioxide nanoparticles. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(6):1023-32.
- (5) Lynch I, Weiss C, Valsami-Jones E. A strategy for grouping of nanomaterials based on key physico-chemical descriptors as a basis for safer-by-design NMs. *Nano Today.* 2014;9(3):266-70.
- (6) Organisation for Economic Cooperation and Development. Users' Handbook supplement to the Guidance Document for developing and assessing Adverse Outcome Pathways. Paris: OCDE, 2016. <https://dx.doi.org/10.1787/5jiv1m9d1g32-en>
- (7) Rasmussen K, Mast J, Temmerman P, et al. Titanium Dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM-104, NM-105: characterisation and Physico- Chemical Properties. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2014. <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/titanium-dioxide-nm-100-nm-101-nm-102-nm-103-nm-104-nm-105-characterisation-and-physico>
- (8) Jensen KA, Kembouche Y, Christiansen E, et al. Final protocol for producing suitable manufactured nanomaterial exposure media: report. NANOGENOTOX Joint Action, 2011. https://www.anses.fr/en/system/files/nanogenotox_deliverable_5.pdf
- (9) Louro H, Saruga A, Santos J, et al. Biological impact of metal nanomaterials in relation to their physicochemical characteristics. *Toxicol In Vitro.* 2019;56:172-183.
- (10) Louro H. Relevance of Physicochemical Characterization of Nanomaterials for Understanding Nano-cellular Interactions. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1048:123-42.
- (11) Brodkorb A, Egger L, Alminger M, et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc.* 2019;14(4):991-1014.

Etiologia das infeções fúngicas invasivas e subcutâneas: análise dos dados da Rede Nacional de Vigilância Laboratorial das Infeções Fúngicas Invasivas e Subcutâneas (IFIs), 2013-2018

Etiology of invasive and subcutaneous fungal infections: analysis of data from the National Network for Laboratory Surveillance of Invasive and Subcutaneous Fungal Infections (IFIs), 2013-2018

Cristina Veríssimo¹, Cristina Toscano², Teresa Ferreira³, Gabriela Abreu⁴, Helena Simões¹, José Diogo⁵, Ana Maria Queirós⁶, Felicidade Santiago⁷, Ana Lima⁸, Raquel Sabino¹

cristina.verissimo@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência para Infeções Parasitárias e Fúngicas. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Laboratório de Microbiologia. Hospital Egas Moniz, Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, Lisboa, Portugal.

(3) Centro Hospitalar Lisboa Central, Lisboa, Portugal.

(4) Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia/Espinho, Vila Nova de Gaia, Portugal.

(5) Laboratório de Microbiologia. Hospital Garcia de Orta, Almada, Portugal.

(6) Laboratório de Microbiologia, Centro Hospitalar Tondela Viseu, Viseu, Portugal.

(7) Centro Hospitalar de Leiria, Leiria, Portugal.

(8) Laboratório de Microbiologia, Centro Hospitalar de entre Douro e Vouga, Santa Maria da Feira, Portugal.

_Resumo

A epidemiologia das infeções fúngicas invasivas tem vindo a alterar-se com o surgimento de novos agentes etiológicos. A Rede Nacional de Vigilância Laboratorial de Infeções Fúngicas Invasivas e Subcutâneas (IFI) teve início em 2013 com o objetivo de melhor compreender a epidemiologia destas infeções em Portugal. O objetivo deste estudo é analisar os dados obtidos através da Rede entre junho de 2013 e setembro de 2018. Os laboratórios participantes asseguram a comunicação dos casos de IFIs ao Laboratório Nacional de Referência do INSA, enviando amostras biológicas ou isolados, acompanhados de um inquérito contendo informações demográficas, laboratoriais e avaliações clínicas dos doentes com suspeita de infeção fúngica. O estudo incluiu: i) casos de infeção fúngica invasiva (IFI) por fungos filamentosos/dimórficos, ii) casos de IFI provável, de acordo com os critérios estabelecidos pelo EORTC/MSG 2008, e iii) casos de infeções fúngicas subcutâneas. As infeções por leveduras não foram incluídas. Entre junho de 2013 e setembro de 2018, foram incluídos 52 casos, distribuídos da seguinte forma: IFI comprovada (por fungos filamentosos) (n=9); Infeção fúngica subcutânea (n=17); Infeção por fungos dimórficos endémicos (n=9), totalizando 67% de casos de IFI comprovados (n=35) e 33% de casos IFI provável (n=17). Os dados obtidos chamam a atenção para a grande diversidade de espécies envolvidas em infeções fúngicas profundas, com implicações para o diagnóstico clínico/laboratorial bem como para o tratamento destas infeções.

_Abstract

The epidemiology of deep fungal infections has been changing with the emergence of new species as etiological agents. The National Laboratory Surveillance Network for Invasive and Subcutaneous Fungal Infections (IFIs) began in 2013 with the aim of better understanding the epidemiology of invasive and subcutaneous fungal infections in Portugal. The goal of this study is to analyse the data obtained from this Network between June 2013 and September 2018. The participating laboratories ensured the reporting of

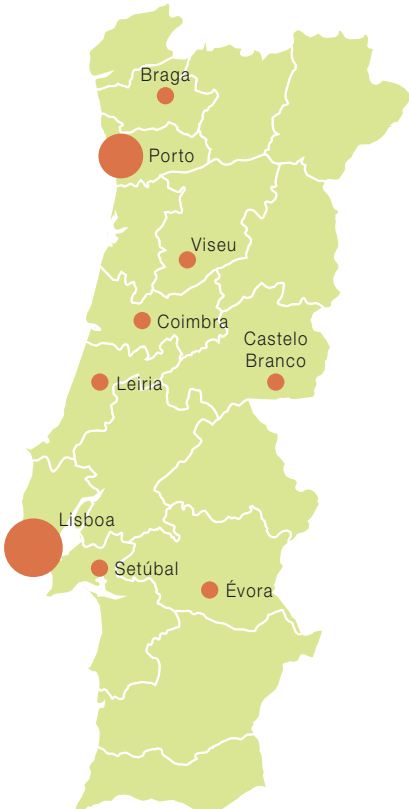
suspected or confirmed IFIs cases to the National Reference Laboratory of INSA, by sending biological samples or isolates, accompanied by a survey containing demographic information, laboratory and clinical evaluation of patients with suspicion of having an IFIs. The study included: i) cases of invasive fungal infection (IFI) caused by filamentous/dimorphic fungi, ii) cases of probable IFI, according to the criteria established by EORTC/MSG 2008, and iii) cases of subcutaneous fungal infections. Yeast infections were not included. Between June 2013 and September 2018, 52 cases were included. The cases were distributed as follows: Proven IFI (by filamentous fungi) (n=9); Subcutaneous fungal infection (n=17); Infection due to endemic dimorphic fungi (n=9), totalizing 67% of proven IFI cases (n=35) and 33% of probable IFI cases (n=17). The obtained data raise the awareness to the great diversity of species involved in deep fungal infections, with implications to the clinical/laboratory diagnosis of these infections as well as their treatment.

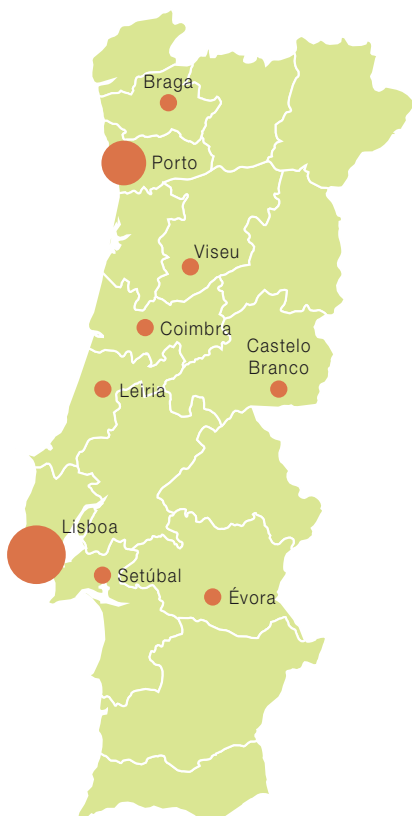
_Introdução

Nas últimas décadas tem-se observado um aumento da incidência de infeções fúngicas profundas, devido principalmente a uma maior utilização de procedimentos invasivos e ao aumento da prescrição de terapêutica ⁽¹⁾. A epidemiologia destas infeções tem vindo a modificar-se com a emergência de novas espécies enquanto agentes de infeção fúngica ⁽²⁾.

A Rede Nacional de Vigilância Laboratorial das Infeções Invasivas e Subcutâneas (IFIs) iniciou-se em 2013 com o objetivo de melhor conhecer a epidemiologia das infeções fúngicas invasivas e subcutâneas em Portugal.

A componente laboratorial da Rede IFIs é assegurada por 15 laboratórios de microbiologia de unidades hospitalares pertencentes ao Serviço Nacional de Saúde (SNS) (figura1). Os laboratórios participantes asseguram a comunicação dos casos suspeitos e/ou confirmados de IFIs ao Laboratório Nacional de Referência para Infeções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), com o envio de amostras biológicas e/ou isolados fúngicos, acompanhadas de um inquérito no qual consta informação demográfica, laboratorial e clínica dos doentes com IFIs. O Laboratório do INSA efetua a caracterização fenotípica e molecular dos isolados recebidos e analisa os casos obtidos da Rede IFIs.

Figura 1:  Distribuição geográfica das unidades hospitalares participantes na Rede Nacional para Vigilância Laboratorial das Infeções Fúngicas Invasivas e Subcutâneas (5 distrito de Lisboa; 3 distrito do Porto e 1 laboratório nos restantes distritos assinalados).



_Objetivo

Análise dos dados de obtidos através da Rede Nacional para Vigilância Laboratorial das Infeções Fúngicas Invasivas e Subcutâneas entre junho de 2013 e setembro de 2018.

_Material e métodos

Recolha de dados

Cada unidade hospitalar designou um responsável por reunir a informação clínica, laboratorial e epidemiológica, dos casos a notificar à Rede através do preenchimento de inquérito desenhado para o efeito. O formulário inclui os dados demográficos do doente, os dados clínicos, micológicos e fatores do hospedeiro que podem potenciar o aparecimento de IFIs. Do inquérito constam ainda questões relativas a fatores de risco para infeção fúngica invasiva, bem como questões sobre a terapêutica e o *outcome* 30 dias após tratamento.

Os fatores de risco foram divididos em três grupos: 1) fatores de imunossupressão (quimioterapia, transplante de medula hematopoiética, transplante de medula óssea alogénico, transplante de órgão sólido, infeção HIV/SIDA, outro distúrbio com necessidade de imunossupressão); 2) trauma/intervenção (internamento na unidade de cuidados intensivos (UCI), cirurgia invasiva, queimadura, traumatismo penetrante); 3) doenças crónicas/fatores comportamentais (alcoolismo, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), diabetes mellitus, doença renal/hepática crónica, viagem a região de infeções fúngicas endémicas, nascimento prematuro).

Crítérios de inclusão

Foram incluídos nesta análise: i) casos de infeção fúngica invasiva (IFI), causadas por fungos filamentosos/dimórficos, comprovadas por microscopia ou cultura positiva a partir de amostras estéreis, colhidas por biópsia ou por punção, ii) casos com diagnóstico de IFI provável segundo os critérios estabelecidos pelo EORTC/MSG (*European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group*) (3), quando devidamente fundamentados, nomeadamente: iso-

lamento de fungos filamentosos a partir de amostras respiratórias, provenientes de doentes com fatores de risco para IFI (de acordo com os critérios estabelecidos e devidamente referenciados no inquérito clínico) e iii) casos de infeções fúngicas subcutâneas. Não foram incluídos no estudo as infeções por leveduras.

Identificação dos fungos isolados em cultura

Sempre que se observou uma cultura positiva, os fungos isolados foram enviados ao INSA para identificação da espécie/género. Numa primeira fase, os fungos isolados foram identificados com base na observação da sua morfologia macro e microscópica, de acordo com o descrito no atlas de identificação (4). Para confirmação da identificação ao nível da espécie, efetuou-se extração do DNA total das colónias fúngicas por sequenciação da região ITS (*internal transcribed spacer*) do DNA ribossomal (5) ou, no caso do género *Aspergillus*, sequenciando a região codificante para a proteína calmodulina. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas em bases de dados *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) – *National Center for Biotechnology Information/US National Institutes of Health e Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*.

_Resultados

No período compreendido entre junho 2013 e setembro de 2018 foram incluídos 83% dos casos notificados à Rede (52/63) provenientes de 13 distritos de residência do doente, sendo a maioria do distrito de Lisboa (gráfico 1).

Os casos declarados à Rede distribuíram-se do seguinte modo: IFI comprovada (por fungos filamentosos) (n=9), infeção subcutânea comprovada (excluindo fungos dimórficos) (n=17); infeção por fungos dimórficos endémicos (n=9), totalizando 67% de IFI comprovadas (n=35) e 33% de IFI prováveis (n=17) (tabela 1).

Em geral, as infeções fúngicas foram mais frequentemente notificadas nos indivíduos do género masculino (n=36), não se tendo observado, no entanto diferença quanto ao género

nas infeções fúngicas subcutâneas. A mediana das idades do total de doentes foi de 59 anos (3-90 anos).

A análise dos casos revelou uma predominância de infeções localizadas (n=46), tendo-se observado infeções disseminadas em apenas 6 casos. Destes, 3 foram classificados como IFI provada, 1 como IFI provável e 2 doentes com infeção por fungos dimórficos endémicos.

Relativamente ao *outcome*, foi possível ter resposta em 40% (n=21) dos casos, tendo-se verificado resposta parcial/completa à terapia (n=12), sem resposta à terapia (n=2) ou óbito devido a infeção fúngica (n=7). Nestes 21 casos a letalidade relacionada a IFI foi de 33,3% (7/21) (tabela 1).

Em 67% dos casos (n=35) obteve-se resposta para a questão relativa aos fatores de risco, tendo-se observado que a maioria dos casos (n=27) apresentou apenas um fator de risco, enquanto oito casos apresentaram dois ou mais fatores de risco. Os fatores de risco do grupo “Doenças crónicas/Fatores comportamentais”, foram os mais frequentemente assinalados nas infeções por fungos dimórficos endémicos (*Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*), sendo os fatores “Estadia em zonas de fungos endémicos” e “Alcoolismo” os predominantes, pelo que todas as infeções por fungos dimórficos endémicos foram consideradas como casos de importação.

Nas infeções comprovadas e prováveis por fungos filamentosos, os fatores de risco mais referenciados foram associados à imunossupressão sendo o fator “Outros distúrbios com necessidade de imunossupressão incluindo esteroides” o fator mais referenciado, seguido de “Transplante de medula/órgão sólido” No gráfico 2 encontram-se apresentados e discriminados os fatores de risco anteriormente descritos quer para a IFI provada quer para a IFI provável. Nas infeções subcutâneas, o fator de risco “Traumatismo penetrante” foi referenciado em 24% (4/17) dos casos.

Gráfico 1: Distribuição dos casos de infeções invasivas e subcutâneas (IFIs) por distrito de residência, 2013-2018 (n=52).

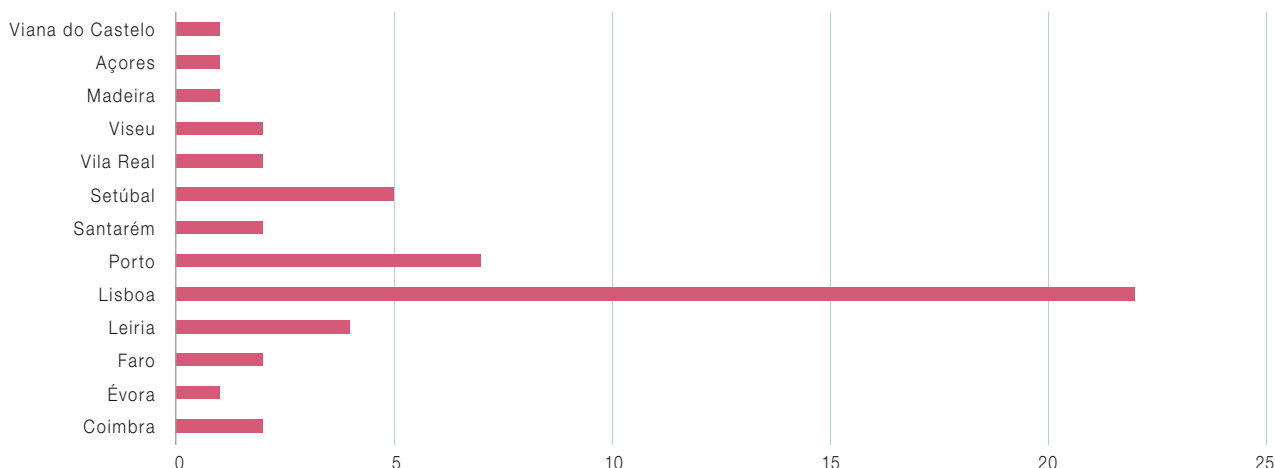
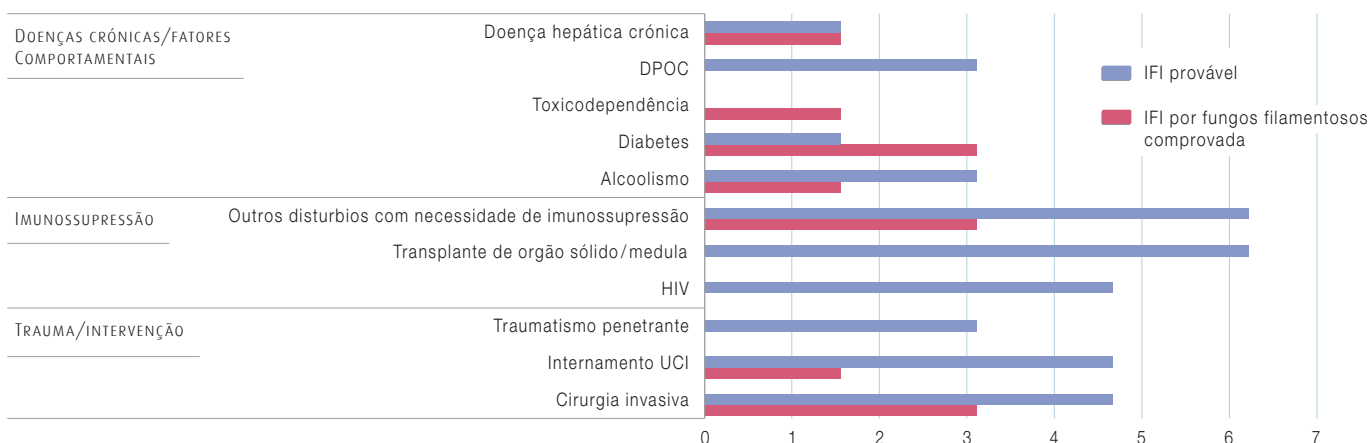


Tabela 1: Distribuição de casos por tipo de infeção fúngica, de acordo com género, idade (mediana), fatores de risco associados localização de infeção e outcome (n=52).

	Infeções fúngicas invasivas (IFI) comprovadas			IFI provável	
	IFI (por fungos filamentosos)	IFI (por fungos dimórficos endémicos)	IFI Subcutânea		
Total de casos	9	9	17	17	
Dados demográficos	Sexo masculino (36)	6	8	8	14
	Sexo feminino (16)	3	0	9	4
	Mediana das idades	63 anos	64 anos	65 anos	54 anos
Fatores de risco	Trauma/Intervenção (18)	3	0	7	8
	Imunossupressão (19)	2	3	6	8
Tipo de infeção	Doenças crónicas/comportamentais (28)	5	16	1	6
	Infeção localizada (46)	6	7	17	16
	Infeção disseminada (6)	3	2	0	1
Outcome	Resposta ao tratamento	2/3	4/6	4/5	2/5
	Óbito devido a infeção fúngica (7)	2	2	sem informação	3

Gráfico 2: Fatores de risco referenciados nos casos de infeção fúngica invasiva por fungos filamentosos comprovada e provável, 2013-2018.



Na análise da distribuição das espécies por tipo de infeção, observou-se que nas IFIs comprovada e provável (por fungos filamentosos) o género *Aspergillus* foi o mais frequente (n=8) correspondendo a 30,7% (8/26) dos agentes responsáveis por este tipo de infeção, tendo-se identificado apenas duas espécies: *A. fumigatus* (secção) (n=7) e *A. flavus* (secção) (n=1). As infeções por fungos asseptados da ordem Mucorales corresponderam a 19,2% (5/26) das infeções IFI comprovada e provável (por fungos filamentosos), observando-se maior variedade de espécies implicadas, tais como *Mucor velutinosus* (n=1), *Rhizopus microsporus* (n=1), *Cunninghamella bertholletiae* (n=1) e fungos asseptados sem isolamento (n=2) (confirmação por histologia). Os fungos do género *Fusarium* spp. (n=4) corresponderam a 15% (4/26) dos agentes identificados nas IFIs comprovada e provável (por fungos filamentosos), bem como fungos do género *Scedosporium* spp. (n=4). Para além das espécies/géneros descritos foram ainda notificados outras espécies/géneros responsáveis por infeção fúngica comprovada/provável, nomeadamente *Cladophialophora bantiana* (n=1) descrito como agente de feohifomicose cerebral em indivíduos imunocompetentes, *Exophiala* spp. (n=1) e *Paecilomyces* spp. (n=1).

Os fungos do género *Alternaria* (n=7), foram os agentes mais frequentemente implicados nas infeções fúngicas subcutâneas, representando 41% (7/17) dos agentes responsáveis por este tipo de infeção, sendo a espécie *Alternaria infectoria* predominante (n=6). O segundo género mais frequentemente implicado neste tipo de infeções foi o género *Scedosporium*, nomeadamente as espécies do complexo *Scedosporium apiospermum* (n=4) que corresponderam a 24% (4/17) das infeções subcutâneas. Os restantes 35% (6/17) corresponderam a fungos dos géneros *Trichosporon* (n=2), *Trichophyton* (n=1), *Saksenaea* (n=1), *Fusarium* (n=1), *Schizophyllum* (n=1).

As infeções por fungos dimórficos endémicos foram causadas por duas espécies: *Histoplasma capsulatum* (n=6) e *Paracoccidioides brasiliensis* (n=3). A variedade *H. capsulatum duboisii* (variedade africana) foi a mais frequente (n=4).

_Discussão e conclusão

Os resultados apresentados não traduzem a realidade nacional por falta de cobertura de algumas regiões e por o número de laboratórios que integram a Rede IFIs não ser representativo da realidade nacional. No entanto, os dados obtidos chamam a atenção para a grande diversidade de espécies envolvidas nas infeções fúngicas profundas, o que tem implicações, quer ao nível do diagnóstico clínico/laboratorial, quer no tratamento destas infeções, uma vez que as diferentes espécies/géneros de fungos apresentam diferentes padrões de suscetibilidade aos antifúngicos, sendo algumas destas espécies resistentes a mais do que uma classe de antifúngicos (6).

Os doentes com patologia hematológica e tumor sólido, bem como os doentes transplantados de medula óssea alogénica e doentes transplantados de órgão sólido, são considerados os principais grupos de risco para infeção fúngica invasiva e subcutânea devido à imunossupressão subjacente a estas patologias (7). No entanto, nos casos analisados observou-se que o fator de risco mais frequentemente referenciado foi “*Outros distúrbios com necessidade de imunossupressão incluindo esteróides*”, e só depois é referido o fator “*Transplante de órgão sólido/medula*”. Apesar das limitações inerentes ao presente estudo, este facto chama a atenção para a emergência de outros grupos de risco para além dos atrás descritos, o que está de acordo com diversas publicações que apontam, por exemplo, os doentes com DPOC (doença pulmonar obstrutiva crónica), doença hepática crónica, doentes críticos, como grupos em cuja incidência de IFIs tem vindo a aumentar (8).

As infeções fúngicas invasivas apresentam uma elevada taxa de letalidade associada (8). Neste estudo a letalidade associada a estas infeções foi 33% (7/21) que apesar de elevada é inferior à habitualmente descrita para as infeções invasivas por fungos filamentosos. Esta letalidade poderá, no entanto, estar afetada pela baixa representatividade da amostra, uma vez que apenas foi possível obter resposta a esta questão em 21 do total de casos incluídos.

No que se refere à etologia das IFIs, os resultados obtidos estão de acordo com a maioria dos estudos publicados,

tendo-se observado predominância de *A. fumigatus* (Secção) enquanto agente das IFI provável e comprovada, seguido dos fungos asseptados da ordem Mucorales e pelas espécies do género *Fusarium*. A epidemiologia das IFIs varia com a localização geográfica, sendo, por exemplo, a espécie *A. flavus* descrita como mais frequente nos climas tropicais e *A. terreus* mais frequente noutras regiões (9).

A representatividade dos casos neste estudo é afetada por diversos fatores, nomeadamente pelas limitações referentes à *guideline* utilizada para a inclusão dos casos, que foi desenhada tendo em vista o doente hematológico, podendo, portanto, não se adequar aos doentes críticos internados nas unidades de cuidados intensivos ou a outros grupos de risco para IFIs. A dificuldade de diagnóstico laboratorial, nomeadamente a baixa sensibilidade dos métodos convencionais, microscopia e cultura, poderão também ter contribuído para a não inclusão de alguns casos de IFIs, pelo que a utilização de novas metodologias, nomeadamente a deteção por métodos moleculares, poderá auxiliar no diagnóstico laboratorial destas infeções e contribuir para um melhor conhecimento da epidemiologia das IFIs em Portugal.

Agradecimentos:

Aos restantes representantes das unidades hospitalares: Filomena Reis (Hospital Santa Maria Maior); Maria Dolores Pinheiro (Centro Hospitalar São João); Catarina Lameiras (Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil); Dinah Carvalho (Centro Hospitalar Lisboa Norte); Sandra Paulo (Centro Hospitalar Cova da Beira); Adriana Coutinho (Hospital Espírito Santo de Évora); Maria Alexandra Mendes (Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil).

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Slavin M, van Hal S, Sorrell TC, et al.; Australia and New Zealand Mycoses Interest Group. Invasive infections due to filamentous fungi other than *Aspergillus*: epidemiology and determinants of mortality. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(5):490.e1-10. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.12.021>
- (2) Lamoth F, Calandra T. Early diagnosis of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(suppl 1):i19-i28.
- (3) De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JPet al.; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008;46(12):1813-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2671227/>
- (4) Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi: the ultimate benchtool for diagnosis (version 4.1.4) [Em linha]. Utrecht, The Netherlands, 2016.
- (5) White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. IN: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. (eds). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press, 1990, pp. 315-22.
- (6) Wiederhold NP. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect Drug Resist*. 2017;10:249-259. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5587015/>
- (7) Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, et al. Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(Suppl 1):i5-14.
- (8) Ruiz-Camps I, Aguado JM, Almirante B, et al; GEMICOMED (Medical Mycology Study Group of SEIMC). Guidelines for the prevention of invasive mould diseases caused by filamentous fungi by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(Suppl 2):1-24. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03477.x>
- (9) Pagano L, Mayor S. Invasive fungal infections in high-risk patients: report from TIMM-8 2017. *Future Sci OA*. 2018;4(6):FSO307. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6060393/>

Algoritmo para o diagnóstico laboratorial das infeções fúngicas profundas

Algorithm for the diagnosis of deep fungal infections

Raquel Sabino, Helena Simões, Cristina Veríssimo

raquel.sabino@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Infeções Parasitárias e Fúngicas. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

_Resumo

Amostras de tecidos de doentes com suspeita de infeções fúngicas profundas ou subcutâneas foram analisadas no Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas do INSA, de acordo com um algoritmo de diagnóstico desenvolvido que apresenta uma abordagem polifásica, que tem por objetivo permitir um diagnóstico laboratorial mais rápido das infeções fúngicas profundas. Quarenta e seis amostras de tecido de 39 doentes com suspeita de infeções fúngicas profundas ou subcutâneas foram analisadas durante um período de 26 meses (janeiro de 2015-fevereiro de 2017) pelo laboratório do INSA, usando uma abordagem laboratorial que incluiu cultura, PCR panfúngica e PCR dirigida a *Aspergillus*. Do total de amostras estudadas, 23 foram positivas para fungos (PCR, cultura e/ou histologia). Das 46 amostras, 16 apresentaram resultados positivos para DNA fúngico. Em 12 amostras foi detetado um sinal positivo por PCR panfúngica e em 6 por PCR dirigida a *Aspergillus* (em 2 das amostras ocorreu deteção pelas duas metodologias). Em 61% (22/36) das amostras estudadas, houve concordância entre os métodos moleculares e culturais. Os agentes etiológicos identificados foram *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Trichosporon montevidense*, *Alternaria* spp., *Exophiala* sp., *Trichoderma* sp., *Histoplasma* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Os resultados obtidos mostraram que a abordagem polifásica proposta parece ser uma boa estratégia na deteção de fungos em amostras de tecidos, permitindo eventualmente um melhor prognóstico. Em estudos posteriores, pretende-se estudar um maior número de amostras clínicas e implementar mais metodologias moleculares que permitam a deteção dirigida a determinados géneros fúngicos.

_Abstract

Tissue specimens from patients with suspicion of having deep or subcutaneous fungal infections were analyzed at the National Reference Laboratory for Parasitic and Fungal Infections of INSA, according to a developed diagnostic algorithm comprising a polyphasic approach. This algorithm might allow a faster laboratory diagnosis of deep fungal infections. Forty-six tissue samples from 39 patients suspected of having deep or subcutaneous fungal infections were analyzed during a 26-month period (January 2015-February 2017) by the laboratory of INSA, using a laboratory approach that includes culture, panfungal PCR and *Aspergillus*-directed PCR. From the total samples studied, 23 were positive for fungi (PCR, culture and/or histology). From the 46 samples, 16 showed positive results for fungal DNA. In 12 samples a positive signal was detected by panfungal PCR and in 6 by *Aspergillus*-directed PCR (in 2 samples, there was positive detection using both methods). In 61% (22/36) of the samples studied,

there was concordance between molecular and cultural methods. The etiological agents identified were *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Trichosporon montevidense*, *Alternaria* spp., *Exophiala* sp., *Trichoderma* sp., *Histoplasma* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum* and *Paracoccidioides brasiliensis*. The results showed that the proposed polyphasic approach seems to be a good strategy for the detection of fungi in tissue samples, possibly allowing a better prognosis. In subsequent studies, it is intended to study a higher number of clinical samples and to establish more directed PCRs, allowing the detection of specific fungal genera.

_Introdução

As infeções fúngicas invasivas estão a aumentar em todo o mundo. Esta tendência parece dever-se ao aumento do número de pessoas imunocomprometidas e/ou sujeitas a procedimentos invasivos. Acresce-se que estas infeções são difíceis de diagnosticar e tratar, representando um desafio para o laboratório e para os clínicos (1).

De acordo com as definições do EORTC/MSG (*European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group*) (2), uma infeção fúngica invasiva comprovada é definida pela observação de estruturas fúngicas ou cultura positiva de uma amostra biológica colhida de local habitualmente estéril, paralelamente a um quadro clínico compatível de infeção. No entanto, o procedimento necessário para a execução do exame histopatológico requer experiência técnico-científica do executante e, por vezes, as culturas permanecem negativas após várias semanas de incubação, o que representa uma grande desvantagem quando se pretende um diagnóstico precoce. De facto, exame histológico e cultura negativos não permitem a classificação de uma infeção invasiva como comprovada,

e na maioria dos casos, essas infeções são classificadas como possíveis ou prováveis. Contudo, a classificação de uma infeção fúngica invasiva é sempre baseada em fatores do hospedeiro, critérios clínicos e micológicos (2).

_Objetivos

Com a finalidade de contribuir para uma futura discussão e padronização do diagnóstico laboratorial das infeções fúngicas profundas, este estudo apresenta a experiência do Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) no diagnóstico de infeções fúngicas invasivas e subcutâneas, utilizando para o efeito uma abordagem laboratorial polifásica que inclui metodologias culturais e moleculares no tecido, sugerindo-se ainda a inclusão da deteção de biomarcadores em simultâneo.

Especificamente, o presente trabalho teve como objetivo estudar as metodologias de amplificação do DNA fúngico (PCR

panfúngica e PCR dirigida a *Aspergillus*), através da análise descritiva dos resultados moleculares e do exame micológico cultural obtidos nas amostras analisadas.

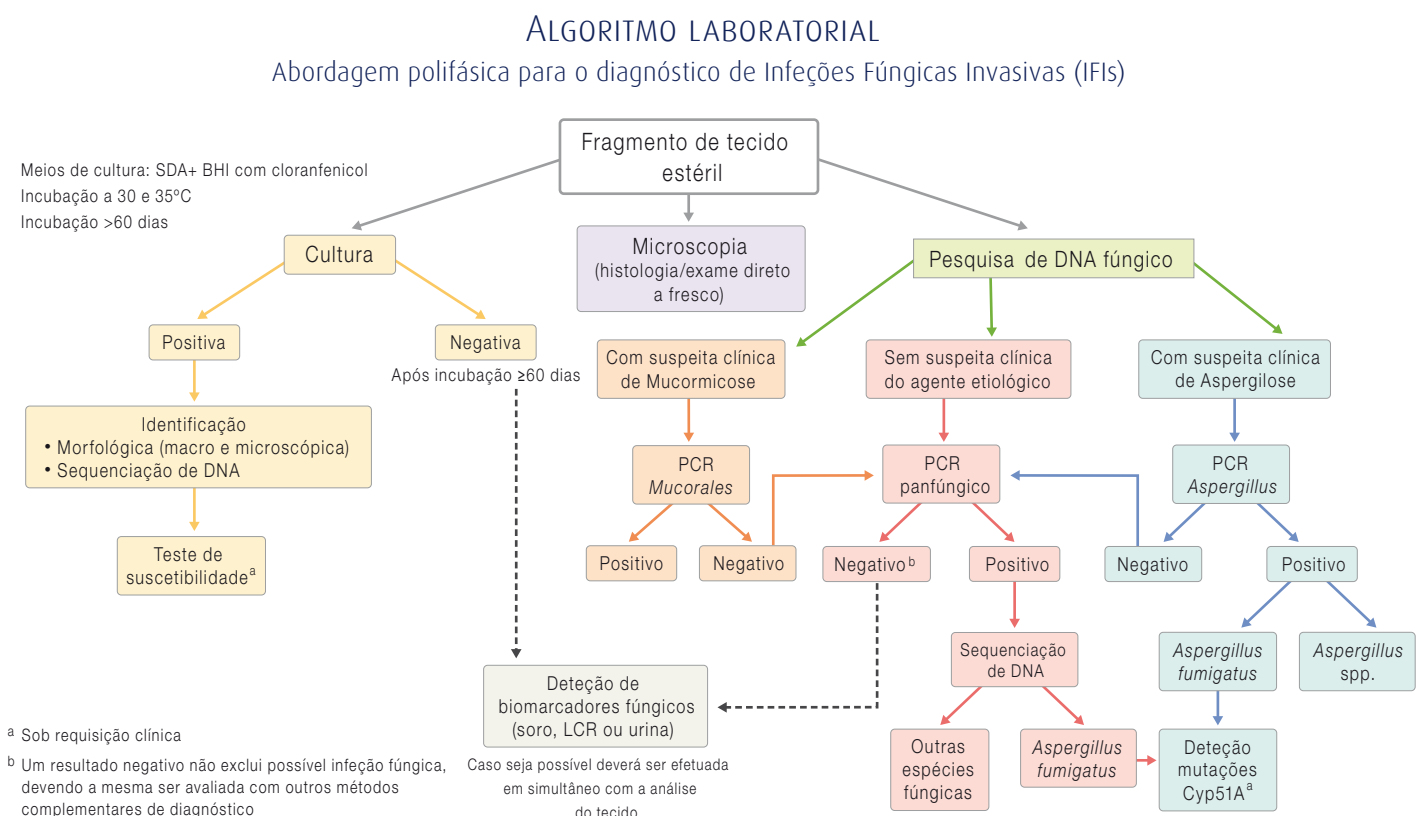
_Material e métodos

No período entre janeiro de 2015 e fevereiro de 2017 foram analisadas no Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas do INSA, amostras de tecido, colhido de local habitualmente estéril, de doentes com suspeita clínica de infeção fúngica profunda ou subcutânea. A população de doentes não foi selecionada em relação a qualquer fator ou grupo de risco. Amostras de tecido fresco são consideradas como amostras na primeira linha de escolha para o diagnóstico de infeções fúngicas profundas, face às amostras de tecido parafinadas.

O diagnóstico laboratorial das infeções fúngicas invasivas e subcutâneas (IFIs) seguiu o algoritmo indicado na figura 1.

O exame cultural foi efectuado de acordo com os procedimentos estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards*

Figura 1: Algoritmo para o diagnóstico laboratorial das infeções fúngicas profundas.



Institute (CLSI) (3). Um primeiro relatório laboratorial foi emitido após 30 dias de incubação e um relatório final ao fim de 60 dias. Nas culturas em que se obteve isolados fúngicos, foi realizada a sua identificação através da observação das suas características macroscópicas (características da colónia) e do exame microscópico com coloração azul de lactofenol, utilizando para tal um atlas laboratorial de identificação fúngica (4).

Após extração de DNA, foi realizada PCR panfúngica a todas as amostras. Para tal, utilizaram-se os primers universais ITS1 e ITS2 (5). A identificação molecular dos fungos obtidos por cultura foi realizada utilizando a mesma metodologia de extração de DNA e usando os primers universais ITS1 e ITS4 (6).

No caso de suspeita de infeção por *Aspergillus*, foi realizado uma PCR usando *AsperGenius® multiplex real-time PCR* assay de acordo com as instruções do fabricante.

_Resultados

Foram analisadas 46 amostras de tecidos durante o período em estudo. Estas amostras foram obtidas de 39 pacientes (27 homens e 12 mulheres) com idades entre 1 e 85 anos. Os tecidos analisados foram colhidos por biópsia de: pele (n=17), fígado (n=6), gânglios (n=4), intestino (n=2), osso (n=2), nariz (n=3), cérebro (n=2), olho (n=1), lábio (n=1), pulmão (n=2), mediastino (n=1), palato (n=1), amígdala (n=1), estômago (n=1), rim (n=1) e região sinovial do punho (n=1). Das 46 amostras, 23 foram positivas para fungos (cultura, PCR e/ou histologia). Doze (26,1%) das 46 amostras de tecido tinham informação sobre o exame histológico, das quais 10 foram positivas para elementos fúngicos. Nas restantes 34 amostras (73,9%), o exame histológico não foi realizado ou o resultado não foi registado no inquérito que acompanhou as amostras.

Em relação à deteção de DNA fúngico, 16 (34,8%) amostras foram positivas. Destas, 12 foram detetadas por PCR panfúngica e 6 casos por PCR dirigida a *Aspergillus* (em 2 casos, ambos os testes foram realizados). Em todas as amostras positivas para PCR panfúngica foi possível identificar os agentes etiológicos por sequenciação. Foram identificados fungos filamentosos em 10 amostras (7 *Aspergillus fumigatus*,

1 *Alternaria infectoria*, 1 *Alternaria alternata*, 1 *Trichophyton rubrum*); fungos dimórficos em 2 amostras (1 *Histoplasma duboisii* e 1 *Paracoccidioides brasiliensis*) e leveduras em 4 amostras (1 *Candida albicans* e 3 *C. tropicalis*).

A cultura foi realizada em 36 (78,3%) amostras (tabela 1). Destas 36 amostras, 29 (80,5%) culturas permaneceram negativas após o período de incubação de 60 dias recomendado (tabela 1). No que respeita às culturas positivas, em 2 delas obtiveram-se apenas leveduras (*Candida* spp. e *Trichosporon montevidense*) e 3 foram positivas apenas para fungos filamentosos (2 para *Alternaria* spp. e 1 para *Exophiala* sp.). Foram obtidas culturas mistas em duas amostras: *C. albicans* e *Histoplasma* sp. (tecido do cólon) e *C. albicans* e *Trichoderma* sp. (tecido do nariz).

Tabela 1: Resultados do exame cultural e PCR obtidos na deteção de fungos em amostras de tecido.

	PCR positiva	PCR negativa	Total
Cultura positiva	4	3	7
Cultura negativa	11	18	29
Cultura não realizada	1	9	10
Total	16	30	46

_Discussão e conclusão

Ao comparar os resultados positivos obtidos por métodos culturais e/ou moleculares (n=19), a PCR mostrou maior número de casos positivos (n=16). A concordância dos resultados obtidos pelos métodos moleculares e culturais foi de 61% (22/36).

Em 3 amostras, obteve-se resultado negativo de PCR e cultura positiva. Esta situação pode dever-se a uma extração ineficiente de DNA. Em 11 amostras, a PCR foi positiva e a cultura negativa, o que pode dever-se à profilaxia antifúngica administrada ao doente aquando da colheita da amostra, ou eventual contaminação ambiental, apesar de se assegurar as condições de assépsia durante o processamento das amostras.

Com o algoritmo apresentado na **figura 1** sugere-se que, sempre que possível, se proceda à colheita de amostras de tecido em duplicado para cultura e PCR. Aconselha-se ainda, caso se justifique, a deteção de biomarcadores fúngicos. Caso também seja efetuada histologia, é de extrema importância notificar ao laboratório de referência o resultado da mesma, uma vez que irá permitir melhor interpretar os resultados laboratoriais obtidos. Pelo mesmo motivo, é importante referir profilaxia ou terapêutica antifúngica administrada à data da colheita da amostra biológica.

Os resultados obtidos mostraram que a abordagem polifásica (**figura 1**) parece ser uma boa estratégia na deteção de fungos em amostras de tecidos. Além disso, a utilização de uma PCR em tempo real para *Aspergillus* e Mucorales reforça esta estratégia, caso já exista suspeita de infeção por estes mesmos agentes, uma vez que por serem PCR dirigidas a agentes específicos, conseguir-se-á obter um resultado positivo de forma mais célere. Devido às recomendações internacionais para realizar testes de suscetibilidade aos antifúngicos em infeções fúngicas invasivas (7), o algoritmo aqui sugerido para a deteção de infeções fúngicas profundas inclui uma segunda etapa em que se aconselha a determinação da suscetibilidade dos agentes etiológicos.

Numa época em que se prevê um aumento da prevalência das infeções fúngicas invasivas, verifica-se uma evolução no seu diagnóstico laboratorial, com um maior número de metodologias moleculares disponíveis. Apesar da deteção de DNA fúngico ainda não fazer parte dos critérios de diagnóstico laboratorial da EORTC por falta de padronização dos métodos moleculares, é já evidente a importância destes métodos como meios complementares ao diagnóstico clínico.

Agradecimento:

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Badiee P, Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. *Indian J Med Res.* 2014;139(2):195-204. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4001330/>
- (2) De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP et al.; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008;46(12):1813-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2671227/>
- (3) Clinical and Laboratory Standards Institute. Principles and procedures for detection of fungi in clinical specimens- direct examination and culture; Approved guideline. (CLSI document M54-A) Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2012-
- (4) Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi: the ultimate benchtool for diagnosis (version 4.1.4) [Em linha]. Utrecht, The Netherlands, 2016.
- (5) Buitrago MJ, Aguado JM, Ballen A, et al. Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(6):E271-7. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12110>
- (6) White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. IN: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. (eds). *PCR Protocols: a guide to methods and applications.* New York: Academic Press, 1990, pp. 315-22.
- (7) Posteraro B, Torelli R, De Carolis E, et al. Antifungal susceptibility testing: current role from the clinical laboratory perspective. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014;6(1):e2014030. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4010604/>

Espectro mutacional da cistinose em Portugal, 1998-2017

Mutational spectrum of cystinosis in Portugal, 1998-2017

Filipa Ferreira¹, Inês Leal², David Sousa², Teresa Costa³, Conceição Mota³, Ana Marta Gomes⁴, Daniela Lopes⁴, Maria do Carmo Macário⁵, Isabel Tavares⁶, Helena Pinto⁶, João Paulo Oliveira⁶⁻⁸, Rita Magriço⁹, Célia Carmona¹, Sónia Ramos¹, Raquel Neiva¹, Ana Marcão¹, Laura Vilarinho^{1,10}

filipa.ferreira@insa.min-saude.pt

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

(2) Centro Hospitalar Lisboa Norte, Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal.

(3) Centro Hospitalar Universitário do Porto, Porto, Portugal.

(4) Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia/Espinho, Portugal.

(5) Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal.

(6) Serviço de Genética Médica, Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal.

(7) Unidade de Genética. Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

(8) Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

(9) Serviço de Nefrologia, Hospital Garcia de Orta, Almada, Portugal.

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

_Resumo

A cistinose é uma doença metabólica multisistémica, autossómica recessiva caracterizada por uma acumulação de cistina em diferentes órgãos e tecidos devido a uma deficiência no transporte de cistina para o exterior dos lisossomas. O gene responsável pela doença, *CTNS*, está localizado no cromossoma 17 e codifica para uma proteína de membrana lisossomal, a cistinossina. Neste trabalho foram estudados doentes não relacionados provenientes das consultas de adultos e pediatria de diferentes hospitais de Portugal continental e ilhas, que apresentavam proteinúria não-nefrótica, hipercalcúria, hipocalcemia, hiperaminoacidúria, glicosúria e hipofosfatemia, sugestivo de síndrome de Fanconi e queixas oculares. Bioquimicamente, a cistina intraleucocitária foi quantificada, tendo-se igualmente efetuado a caracterização molecular do gene *CTNS*, inicialmente apenas direcionado para a pesquisa da deleção de 57-kb, seguida da sequenciação de todos os exões codificantes do gene *CTNS*. Desde 1998 a 2017, 21 doentes cistinóticos foram bioquimicamente caracterizados. Entretanto, 4 destes doentes faleceram e dos restantes 17, apenas 11 foram estudados para o gene *CTNS*. Verificou-se que 5 destes 11 doentes foram homocigóticos para a deleção de 57-kb (10/22; 45,5%), e outros 5 foram compostos heterocigóticos para esta mutação (15/22; 68,2%). As outras mutações identificadas foram: p.Q128X (c.721 C>T; 2/22), p.S139F (c.755 C>T; 4/22) e c.18-21delGACT (p.T7FfsX7; 1/22). Todos estes 17 doentes cistinóticos estão em tratamento, sendo que 84% são adultos, 16% são crianças jovens e 54,5% são transplantados renais. Este estudo efetuado ao longo de vários anos, reflete a experiência no diagnóstico e monitorização dos doentes cistinóticos. Além disso, a caracterização das mutações encontradas no gene *CTNS*, ressalta a importância para um *screening* inicial da deleção de 57-kb e permite um futuro aconselhamento genético aos casais de risco.

_Abstract

Cystinosis is a multisystemic autosomal recessive deficiency of the lysosomal membrane transporter protein (cystinosin) caused by mutations in *CTNS* gene. This study summarizes the Portuguese experience in the di-

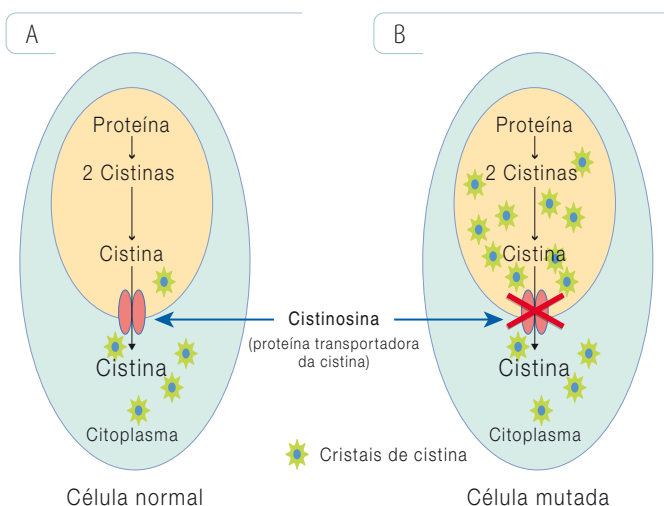
agnosis and management of patients with this rare disease over the past few years and reports recurrent mutations in the *CTNS* gene. Unrelated patients from different pediatric and adult hospitals all over Portugal with non-nephrotic proteinuria, hypercalciuria, hypokalemia impaired proximal reabsorption of amino acids, glycosuria and hypophosphatemia, suggestive of a Fanconi syndrome and ocular problems were studied. Intraleukocyte cystine levels were determined and molecular analysis performed, to determine the presence of the 57-kb deletion in *CTNS*, followed by direct sequencing of the coding exons of *CTNS*. From 1998 to 2017, 21 cystinotic patients were biochemically diagnosed. From the remaining 17 (4 deceased), 11 were studied for *CTNS* gene. Five out of 11 patients were homozygous for the 57-kb deletion (10/22; 45.5%), and other 5 were compound heterozygous for this variant (15/22; 68.2%). The other mutations found were p.Q128X (c.721 C>T; 2/22), p.S139F (c.755 C>T; 4/22) and c.18-21delGACT (p.T7FfsX7; 1/22). All of these 17 cystinotic patients are in treatment. Approximately 84% are adults, 16% are young children, and 54.5% are kidney transplant recipient. The authors would like to emphasize the importance of first screening for the 57-kb deletion since it is very common in our population. This genetic study is the first in Portugal and it could be the basis for future genetic counseling in cystinotic patients.

_Introdução

A cistinose (OMIM #606272) é uma doença metabólica rara autossómica recessiva, caracterizada por uma acumulação anormal de cistina em diferentes órgãos e tecidos devido a uma deficiência no transporte deste aminoácido para o exterior dos lisossomas, em resultado de mutações no gene *CTNS* (1). Este gene, está localizado no cromossoma 17p13, possui 12 exões, sendo que os primeiros dois exões são não-codificantes (2,3),

e os outros 10 exões codificam para uma proteína de membrana lisossomal, de 367 aminoácidos, denominada cistinosa (figura 1). A incidência desta doença estima-se ser de 1 para 100.000 – 200.000 nados-vivos, no entanto o número exato é difícil de estimar uma vez que esta doença é subestimada ou muitas vezes não diagnosticada. Um dos sinais clínicos de cistinose é a síndrome de Toni-Debré-Fanconi, o que deverá alertar o clínico para um possível diagnóstico desta doença (4). Apesar dos rins serem o primeiro órgão a ser afetado durante o primeiro ano de vida, na maioria dos casos, existe também o envolvimento de outros órgãos, nomeadamente os olhos, a tiroide, o pâncreas, as gónadas, os músculos e o sistema nervoso central (3,5). A gravidade do fenótipo clínico está correlacionada com o respetivo genótipo. A determinação da cistina intra-leucocitária é fundamental para o diagnóstico e monitorização da doença (6), sendo a concentração de cistina intra-leucocitária um marcador patognómico da cistinose.

Figura 1: Metabolismo da cistina intracelular num indivíduo normal (A) e num indivíduo doente com cistinose (B)



A deleção de 57 pares de bases (57-kb) no gene *CTNS* é a mutação mais comum na cistinose (7,8), estando representada em mais de 50% da população do norte da Europa e América do Norte (3,7-13) e igualmente correlacionada com elevadas concentrações de cistina nos leucócitos. Contudo, fora desta área geográfica, esta mutação deixa de ser prevalente, estando inclusivé em muitas regiões, ausente. Pre-

sentemente, mais de 200 mutações no gene *CTNS* têm sido identificadas (<http://www.hgmd.org/>) (13-17).

A cistinose tem três formas de apresentação clínica, que diferem na gravidade do fenótipo, idade de início dos sintomas e genótipo. A forma mais grave e também a mais frequente (em 95% dos casos) é a cistinose nefropática infantil, também denominada de cistinose nefropática clássica (MIM 219800); a forma juvenil nefropática (MIM 219900), menos severa e a forma ocular, não nefropática (MIM 219750) (18). A forma não nefropática ou também denominada cistinose ocular, apresenta-se regra geral, no adulto e manifesta-se exclusivamente pelo envolvimento ocular, através da deposição de cristais de cistina (18-20). Em alguns doentes, este envolvimento ocular precede as manifestações renais ao longo dos anos (21). Tem sido hipotetizado que as diferenças entre os diferentes fenótipos e a sua severidade se devem às diferentes mutações associadas com as três formas clínicas. Assim, parece que indivíduos com cistinose infantil apresentam mutações mais graves em ambos os alelos (ex.: perda da função da proteína), contrariamente às formas menos graves de cistinose que estão associadas a mutações menos patogénicas (7,22-24). O estudo molecular do gene *CTNS* é por isso também muito importante e ferramenta indispensável no diagnóstico pré-natal (25).

Existem presentemente, várias linhas de tratamento, que previnem ou adiam a deterioração da função renal e/ou da ocorrência de complicações extra-renais, como o hipotireoidismo, diabetes *mellitus*, retinopatia, encefalopatia e miopatia (26,27). A cistinose é um excelente exemplo de doença pediátrica cujo espectro atinge a idade adulta.

_Objetivo

Pretende-se com este trabalho divulgar a capacidade instalada de estudo desta doença rara bem como alertar para a importância do diagnóstico atempado da cistinose quer do ponto de vista bioquímico, através da quantificação da cistina intra-leucocitária, quer do ponto de vista do estudo molecular do gene *CTNS*.

_Material e métodos

Doentes

Desde 1998 até 2017, vários doentes não relacionados provenientes das consultas de pediatria e de adultos de diversos hospitais de norte a sul de Portugal continental e ilhas, foram estudados com a hipótese de diagnóstico de cistinose. Em 32 doentes, foram referidos sintomas sugestivos de síndrome de Toni-Debré-Fanconi, nomeadamente: proteinúria não-nefrótica (<3,5g proteína/24h), hipercalcúria, hipocaliemia, hiperaminoacidúria, glicosúria e hiposfosfatemia. Destes doentes estudados, 21 revelaram valores elevados de cistina intra-leucocitária no sangue ($\geq 0,5$ nmol/ $\frac{1}{2}$ cistina/mg proteína) (8 do sexo masculino e 13 do sexo feminino, com idades entre 1 e 40 anos), 4 faleceram, e em 2 perdeu-se o seguimento clínico (ex.: emigraram). Dos restantes 15, 11 foram geneticamente caracterizados.

De salientar que nestes 21 doentes confirmados com cistinose, apenas num deles o diagnóstico foi feito em idade adulta (com 40 anos), através da observação de cristais de cistina intraocular, no entanto este doente desde a idade pediátrica apresentava queixas nefropáticas (nomeadamente, proteinúria, calciúria, hipocalemia e hiperaminoacidúria).

Caracterização bioquímica

A extração da cistina intra-leucocitária foi efetuada pelo método descrito por Shotelersuk *et al.* (1998) (28) e a quantificação deste aminoácido analisada por cromatografia líquida de troca iónica num BIOCHROM 30® (figura 3).

Os valores de referência utilizados foram os seguintes:

- Indivíduos saudáveis: <0,5 nmol $\frac{1}{2}$ cistina/mg proteína.
- Indivíduos afetados sem tratamento: $\geq 0,5$ nmol $\frac{1}{2}$ cistina/mg proteína.
- Indivíduos afetados com boa adesão terapêutica: $\leq 1,0$ nmol $\frac{1}{2}$ cistina/mg proteína

Caracterização molecular

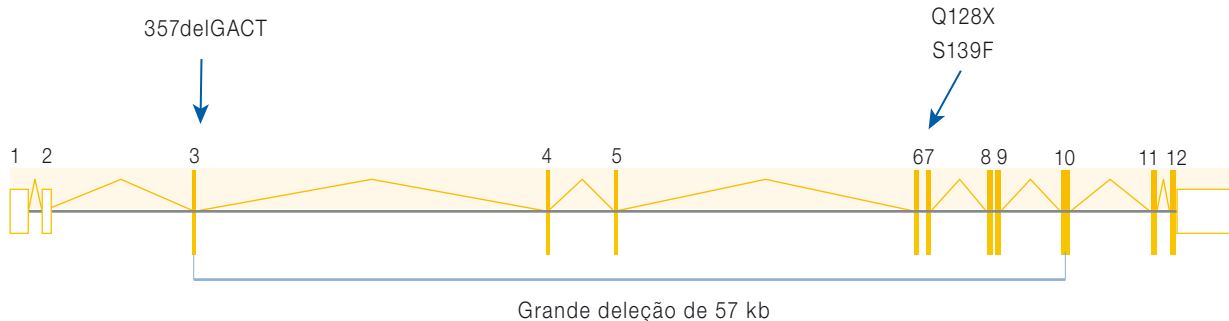
O DNA genómico foi extraído a partir de sangue total (EZ1, QIAGEN) e os 10 exões codificantes e as respetivas regiões flanqueadoras do gene *CTNS* (NM_004937) amplificadas e sequenciadas através de métodos tradicionais. Em todos os doentes estudados, a deleção de 57-kb foi a primeira mutação a ser pesquisada. Como população controlo, foram estudados 100 indivíduos saudáveis (200 alelos), não consanguíneos e de origem portuguesa.

_Resultados e discussão

Durante 19 anos, 32 doentes com suspeita de cistinose foram estudados na Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do INSA. Destes, 11 tinham uma cistina intra-leucocitária inferior a 0,5 nmol $\frac{1}{2}$ cistina/mg proteína em 2 amostras consecutivas (4) e foram assim considerados negativos para cistinose. Dos restantes 21, a concentração da cistina intra-leucocitária variou entre 0,5 e 8,0 nmol $\frac{1}{2}$ cistina/mg proteína, e em 11 destes doentes o estudo molecular do gene *CTNS* foi efetuado.

Todos os doentes estudados, acabaram por desenvolver queixas oculares que revelaram a presença de cristais de cistina intra-ocular. No gene *CTNS*, foram observadas quatro mutações patogénicas, sendo a deleção de 57-kb a mais frequente (68,2%; 15/22 alelos). Em 5 doentes, esta deleção encontrava-se em homozigotia (10/22; 45,5%) e em outros 5 doentes foram encontrados compostos heterozigóticos para a deleção de 57kb (45,5%) e para as mutações p.Q128X (c.721 C>T; 9,1%), p.S139F (c.755 C>T; 9,1%) e c.18-21delGACT (p.T7FfsX7; 4,5%) (tabela 1, figura 2). A mutação p.S139F foi observada pela primeira vez em homozigotia num doente. Neste estudo podemos concluir que doentes com mutações graves ou com mutações que originem proteínas truncadas, como a deleção de 57-kb e p.T7FfsX7 ou a mutação p.Q128X, apresentavam fenótipos severos associados com a forma infantil da doença, enquanto que a forma juvenil estava associado com fenótipos mais moderados. Os 17 doentes cistinóticos estão em tratamento, sendo que 84% são adultos, 16% são crianças e jovens e 54,4% já são transplantados renais.

Figura 2: Estrutura esquemática do gene *CTNS* (a amarelo).



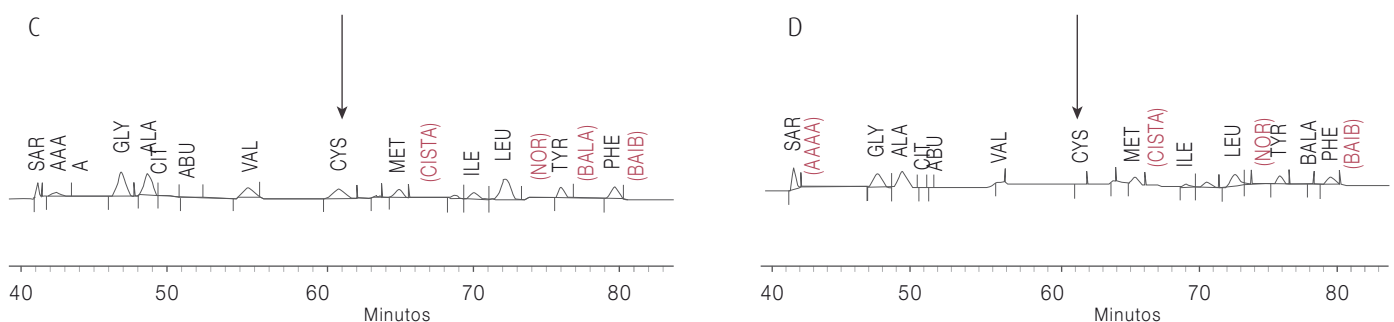
Os números indicam os exões e as setas azuis indicam as mutações encontradas nos 11 doentes cistinóticos caracterizados do ponto de vista molecular.

Também foi observado que os doentes com a deleção de 57-kb tinham valores de cistina intra-leucocitária mais elevados, o que também está de acordo com a literatura (figura 3, tabela 1), uma vez que esta mutação leva à ausência da proteína (4,8). De acordo com este estudo, em Portugal, a prevalência de cistinose está estimada em 1:92.000 recém-nascidos.

Analisando o espectro mutacional encontrado na população portuguesa com outras populações, verificamos que a deleção de 57-kb é na realidade a mutação mais prevalente, o que está de acordo com a literatura. De facto, esta mutação existe em praticamente 50% dos cromossomas de cistinose nas populações europeias (29,30). Está reportado na bibliografia que esta deleção teve um efeito fundador originado na Alemanha por volta do I milénio d.C (3,7,9). Provavelmente, através dos movimentos migratórios, esta mutação espalhou-se através da Europa e norte de África, havendo como que um gradiente

de norte para sul, à semelhança do que também aconteceu com a mutação F508del na fibrose quística. No entanto, se por um lado a deleção de 57-kb é a mais prevalente no norte da Europa e norte da América, nas populações de origem africana, no Mediterrâneo e Médio Oriente, o mesmo não acontece (14-16). Na realidade, fora desta área geográfica (Europa e norte da América), a deleção de 57-kb está praticamente ausente, havendo outras mutações prevalentes (31-34). Assim, a deleção de 57-kb deverá ser a primeira mutação a ser pesquisada, quer na população portuguesa bem como na população espanhola (4). Apesar das mutações: p.S139F e c.18-21delGACT (p.T7FfsX7), terem um efeito fundador espanhol (12), a deleção c.18-21delGACT (p.T7FfsX7) já foi encontrada em diferentes populações desde a população europeia até à população do Médio Oriente e associada a uma grande variabilidade e severidade de fenótipos.

Figura 3: Perfil cromatográfico dos aminoácidos intra-leucocitários.



A seta indica o local onde a cistina (CYS) elui (C) - Perfil de um doente com cistinose (D) - Perfil de um indivíduo normal.

Tabela 1: ↓ Correlação entre o genótipo, valor de cistina intra-leucocitária à idade do diagnóstico e forma de apresentação da cistinose nos doentes estudados.

Mutação encontrada (alelo1/alelo2)	Doentes	Valor da cistina intra-leucocitária ao diagnóstico (nmol ½ cistina/mg proteína)	Forma de apresentação da cistinose
Deleção de 57-kb/Deleção de 57-kb	(n=5)	[2,8-8,0]	Forma Infantil Nefrótica
Deleção de 57-kb/Q128X	(n=2)	[1,5 e 5,1]	Forma Infantil Nefrótica
Deleção de 57-kb/p.T7FfsX7	(n=1)	[7,3]	Forma Infantil Nefrótica
p.S139F/p.S139F	(n=1)	[1,7]	Forma Juvenil (tardia) Nefrótica
Deleção de 57-kb/S139F	(n=2)	[2,2 e 3,7]	Forma Juvenil (tardia) Nefrótica

Outro facto relevante é que na coorte estudada, não tivemos nenhum doente com a forma não nefrótica ou ocular da doença (tabela 1), o que pode por um lado sugerir, a dificuldade que é muitas vezes de diagnosticar a cistinose e levar a que muitos oftalmologistas não suspeitem logo desta doença como causa dos sintomas, e por outra, a raridade desta forma de apresentação.

De salientar também a extrema importância de um diagnóstico atempado desta doença, que poderá fazer a diferença no *outcome* dos sintomas e da resposta ao tratamento com cisteamina oral (Cystagon®) ou tópico local (Cystadrops®), atenuando assim os efeitos da síndrome de Toni-Debré-Fanconi e um substancial atraso na progressão da degradação glomerular. A progressão da doença renal, as complicações extrarenais e uma diminuição da esperança de vida são sem dúvida mais evidentes, em doentes que não aderem ao tratamento.

Conclusões

Foram identificadas quatro mutações no gene *CTNS*: uma grande deleção (57-kb), uma pequena deleção (c.18-21delGACT) que origina uma proteína truncada (p.T7FfsX7), uma mutação *missense* (p.S139F) e uma mutação *nonsense* que origina um códon *stop* prematuro (p.Q128X). A deleção de 57-kb é a mutação mais comum encontrada na população portuguesa (68,2%). Desta forma, é essencial que o rastreio desta mutação seja o primeiro a ser efetuado no estudo do gene *CTNS*, bem como a determinação da cistina intra-leucocitária uma vez que esta será

uma ferramenta indispensável na monitorização terapêutica e no diagnóstico da doença. É, no entanto, necessário ter atenção que em crianças muito pequenas a quantificação da cistina intra-leucocitária, pode originar falsos negativos. O diagnóstico precoce desta doença, é fundamental para evitar a instalação de lesões irreversíveis, pois a terapêutica específica pode retardar a progressão da doença.

O estudo genético da cistinose é um estudo pioneiro em Portugal e permitirá o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-natal em doentes com cistinose nefrótica na população portuguesa.

Artigo original publicado em inglês: Ferreira F, Leal I, Sousa D, et al. *CTNS Molecular Genetics Profile in a Portuguese Cystinosis Population*. *Open J Genet*. 2018 Dec 18;8(4):91-100. doi:10.4236/ojgen.2018.84008

Referências bibliográficas:

- (1) Abderhalden E. Familiare cystindiathese. *Z Physiol Chem*. 1903;38(5-6): 557-61.
- (2) Town M, Jean G, Cherqui S, et al. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet*. 1998;18(4):319-24.
- (3) Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis. *N Engl J Med*. 2002;347(2):111-21.
- (4) Ariceta G, Camacho JA, Fernández-Obispo M, et al. Cistinosis en pacientes adolescentes y adultos: recomendaciones para la atención de la cistinosis. *Nefrología*. 2015;35(3): 227-346. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2015.05.019>
- (5) Nesterova G, Gahl WA. Cystinosis [Em linha]. IN: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al (eds). *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, 1993-2019. (consult. 15/03/2019). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1400/>
- (6) Levchenko E, de Graaf-Hess A, Wilmer M, et al. Comparison of cystine determination in mixed leukocytes vs polymorphonuclear leukocytes for diagnosis of cystinosis and monitoring of cysteamine therapy. *Clin Chem*. 2004;50(9):1686-8. <http://clinchem.aaccjnl.org/content/50/9/1686.long>

artigos breves_ n. 10

- (7) Anikster Y, Lucero C, Touchman JW, et al. Identification and detection of the common 65-kb deletion breakpoint in the nephropathic cystinosis gene (CTNS). *Mol Genet Med.* 1999; 66(2):111-6.
- (8) Touchman JW, Anikster Y, Dietrich NL, et al. The genomic region encompassing the nephropathic cystinosis gene (CTNS): complete sequencing of a 200-kb segment and discovery of a novel gene within the common cystinosis-causing deletion. *Genome Res.* 2000; 10(2):165-73. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC310836>
- (9) Forestier L, Jean G, Attard M, et al. Molecular characterization of CTNS deletions in nephropathic cystinosis: development of a PCR-based detection assay. *Am J Hum Genet.* 1999;65(2):353-59.
- (10) Anikster Y, Lucero C, Guo J, et al. Ocular non-nephropathic cystinosis: clinical, biochemical, and molecular correlations. *Pediatr Res.* 2000; 47(1): 17-23.
- (11) Kiehnopf M, Schickel J, Gönne BV, et al. Analysis of the CTNS Gene in Patients of German and Swiss Origin with Nephropathic Cystinosis. *Hum Mutat.* 2002;20(3): 237.
- (12) Macías Vidal J, Rodés M, Hernández-Pérez JM, et al. Analysis of the CTNS gene in 32 cystinosis patients from Spain. *Clin Genet.* 2009;76(5):486-89.
- (13) Chkioua L, Khedhiri S, Grissa O, et al. Genetic basis of cystinosis in Tunisian patients: Identification of novel mutation in CTNS gene. *Meta Gene.* 2015;25:144-9.
- (14) Mason S, Pepe G, Dall'Amico R, et al. Mutational spectrum of the CTNS gene in Italy. *Eur J Hum Genet.* 2003;11(7):503-8.
- (15) Shahkarami S, Galehdari H, Ahmadzadeh A, et al. The first Molecular genetics analysis of individuals suffering from nephropathic cystinosis in the Southwestern Iran. *Nefrologia.* 2013;33(3):308-15. <https://www.revistanefrologia.com/es-linkresolver-primer-analisis-genetico-molecular-personas-X0211699513003255>
- (16) Ghazi F, Hosseini R, Akouchekian M, et al. CTNS molecular genetics profile in a Persian nephropathic cystinosis population. *Nefrologia.* 2017;37(3):301-10. <https://www.revistanefrologia.com/es-linkresolver-ctns-molecular-genetics-profile-in-S0211699517300061>
- (17) Kalatzis V, Nevo N, Cherqui S, et al. Molecular pathogenesis of cystinosis: effect of CTNS mutations on the transport activity and subcellular localization of cystinosin. *Hum Mol Genet.* 2004;13(13):1361-71.
- (18) Gahl WA, Thoene J, Schneider J. Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport. IN: Scriver CJ, Beaudet AL, Sly WS, et al. (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* New York: McGraw-Hill, 2001, pp. 5085-5108.
- (19) Nesterova G, Gahl WA. Nephropathic cystinosis: late complications of a multisystemic disease. *Pediatr Nephrol.* 2008;23(6):863-67.
- (20) Pintos G. Cystinosis: from cystine crystals to the cystinosin. *Nefrologia.* 2011;23(Suppl 1):60-70. <https://www.revistanefrologia.com/es/linksolver/ft/ivp/0211-6995/23%20Suppl%201/60>
- (21) Servais A, Morinière V, Grünfeld JP, et al. Late-onset nephropathic cystinosis: clinical presentation, outcome, and genotyping. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(1):27-35. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2390982/>
- (22) Attard M, Jean G, Forestier L, et al. Severity of phenotype in cystinosis varies with mutations in the CTNS gene: predicted effect on the model of cystinosin. *Hum Mol Genet.* 1999;8(13):2507-14.
- (23) Thoene J, Lemons R, Anikster Y, et al. Mutations of CTNS causing intermediate cystinosis. *Mol Genet Metab.* 1999;67(4):283-93.
- (24) Kalatzis V, Antignac C. Cystinosis: from gene to disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17(11):1883-6.
- (25) Nesterova G, Gahl WA. Cystinosis: the evolution of a treatable disease. *Pediatr Nephrol.* 2013;28(1):51-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3505515/>
- (26) Elmonem MA, Veys KR, Soliman NA, et al. Cystinosis: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2016;11:47. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC47102039/>
- (27) Ariceta G, Giordano V, Santos F. Effects of long-term cysteamine treatment in patients with cystinosis. *Pediatr Nephrol.* 2019;34(4):571-578. Epub 2017 Dec 19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6394685/>
- (28) Schneider JA, Bradley K, Seegmiller JE. Increased cystine in leukocytes from individuals homozygous and heterozygous for cystinosis. *Science.* 1967; 157(3794):1321-2.
- (29) Shotelersuk V, Larson D, Anikster Y, et al. CTNS mutations in an American-based population of cystinosis patients. *Am J Hum Genet.* 1998;63(5):1352-62. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1377545/>
- (30) Levchenko E, van den Heuvel L, Emma F, et al. Clinical utility gene card for: cystinosis. *Eur J Hum Genet.* 2014; 22(5):1-3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3992566/>
- (31) Heil SG, Levchenko E, Monnens LAH, et al. The Molecular Basis of Dutch Infantile Nephropathic Cystinosis. *Nephron.* 2001;89(1):50-5.
- (32) Soliman NA, Elmonem MA, van den Heuvel L, et al. Mutational Spectrum of the CTNS Gene in Egyptian Patients with Nephropathic Cystinosis. *JIMD Rep.* 2014;14:87-97. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4213330/>
- (33) Aldahmesh MA, Humeidan A, Almojalli HA, et al. Characterization of CTNS mutations in Arab patients with cystinosis. *Ophthalmol Genet.* 2009;30(4):185-9
- (34) Topaloglu R, Vilboux T, Coskun T, et al. Genetic basis of cystinosis in Turkish patients: a single-center experience. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(1):115-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3501933/>
- (35) Ferreira F, Leal I, Sousa D, et al. CTNS Molecular Genetics Profile in a Portuguese Cystinosis Population. *Open J Genet.* 2018;8(4):91-100.

Colesterol Total, nem oito(enta) nem (duzentos e) oitenta: Parte 2 – Hipolipidemias primárias – alterações do metabolismo das lipoproteínas

Cholesterol, low is not always the best: Part 2 – Alterations in Lipoprotein Metabolism causing low lipid levels

Ana Catarina Alves^{1,2}, Sílvia Sequeira³, Maria Luís Cardoso^{1,2}, Oana Moldovan⁴, Raquel Espírito Santo⁵, Renata Oliveira⁶, António Guerra^{7,8}, Mafalda Bourbon^{1,2}

mafalda.bourbon@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Investigação e desenvolvimento. Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

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

(3) Unidade de Doenças Metabólicas. Hospital de Dona Estefânia, Centro Hospitalar de Lisboa Central, Lisboa, Portugal.

(4) Serviço de Genética Médica. Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal.

(5) Serviço de Endocrinologia. Hospital de Faro, Centro Hospitalar Universitário do Algarve, Faro, Portugal.

(6) Serviço de Genética. Hospital de São João, Centro Hospitalar Universitário de S. João, Porto, Portugal.

(7) Serviço de Pediatria. Hospital de São João, Centro Hospitalar Universitário de S. João, Porto, Portugal.

(8) Centro de Investigação em Tecnologias e Serviços de Saúde. Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

_Resumo

A dislipidemia é um distúrbio do perfil lipídico, seja por elevação ou diminuição de uma ou mais partículas lipídicas. O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão das causas moleculares de hipolipidemias e suas consequências clínicas. São também apresentados casos com hipolipidemias raras já estudados, ou com estudo em curso no laboratório do INSA, apresentando os dados clínicos e moleculares mais relevantes. O perfil lipídico foi determinado por métodos automatizados para cada caso índice e familiares e o estudo molecular dos genes envolvidos foi realizado por amplificação por PCR e sequenciação de Sanger ou sequenciação de nova geração (NGS). Foram referenciados ao laboratório do INSA 7 casos índice, tendo sido possível até ao momento identificar a causa molecular do fenótipo apresentado em 3 casos: 2 com hipobetalipoproteinemia (1 homocigoto e 1 heterocigoto) e 1 caso índice com doença de Tangier; os restantes encontram-se ainda em estudo. Doentes com as dislipidemias raras apresentadas têm um risco elevado de ter complicações cardiovasculares, neurológicas e/ou esteatose hepática e devem, por esta razão, ser identificados o mais precocemente possível, de forma a minimizar ou prevenir os efeitos nefastos destas condições.

_Abstract

Dyslipidemia is a disorder of the lipid metabolism profile, by either elevation or decrease of lipid particles. The objective of this work is to review the molecular causes of hypolipidemia and its clinical consequences. In this study, we present cases with rare hypolipidemias already studied or with a study in progress in laboratory of INSA, presenting the most relevant clinical and molecular data. The lipid profile was determined by automated methods for each index case and relatives and the molecular study of the genes involved was performed by PCR amplification and Sanger sequencing or next generation sequencing (NGS). Seven index cases were referred to laboratory of INSA and it was possible to identify the molecular cause of the phenotype presented by 3 cases:

2 with hypobetalipoproteinemia (1 homozygous and 1 heterozygous) and 1 with Tangier's disease; the remaining cases are still under study. Patients with the rare dyslipidemias presented have a high risk of having cardiovascular, neurological complications and/or hepatic steatosis and should therefore be identified as early as possible in order to minimize or prevent the harmful effects of these conditions.

_Introdução

Este artigo é o segundo de uma série de três, dedicados à classificação e diagnóstico de hipolipidemias e elaborados com o objetivo de favorecer o reconhecimento e diagnóstico destas patologias. A primeira parte, já publicada no *Boletim Epidemiológico Observações* (1), versou sobre as síndromes polimalformativas causadas por erros hereditários da biossíntese do colesterol. Nesta segunda parte, são tratadas as formas patológicas de hipolipidemias, com manifestações pós-natais, bem como as formas benignas devidas a alterações do metabolismo das lipoproteínas e outras causas. Por último, na terceira parte irão ser referidas as formas secundárias de hipolipidemias.

Há várias patologias descritas associadas a hipolipidemias, que incluem a: abetalipoproteinemia (ABL), hipobetalipoproteinemia familiar (FHBL) e doença de retenção das quilomicras. Estas hipolipidemias caracterizam-se pela ausência de lipoproteínas contendo apolipoproteína B (apoB) na circula-

ção, incluindo quilomicras, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (2). O fenótipo associado a estas patologias monogénicas é muito semelhante, mas a causa genética de base é na verdade bastante distinta; a ABL é causada por mutações no gene *MTTP* (*microsomal triglyceride transfer protein*), que codifica uma proteína que transfere os triglicéridos para a apoB (2); a FHBL é causada por mutações no gene da *APOB*, que levam à formação de uma proteína truncada (3-5); e a doença de retenção de quilomicras é causada por mutações no gene *SAR1B* (*Secretion Associated Ras Related GTPase 1B*) (2) (tabela 1). A FHBL e a ABL são patologias que se caracterizam por níveis de apoB, colesterol LDL (LDL-C) e sobretudo triglicéridos (TG) inferiores ao percentil 5. Caracterizam-se pela incapacidade de absorver completamente as gorduras provenientes da dieta que se acumulam na parede intestinal e as vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) (3). Os sintomas surgem nos primeiros meses de vida e incluem acantocitose e diarreia com esteatorreia, com consequente má progressão ponderal. Os doentes apresentam também esteatose hepática e, como resultado do défice das vitaminas lipossolúveis, neuropatia periférica, ataxia espinocerebelar progressiva e retinite pigmentosa (com nictalopia ou mesmo cegueira) (3). Nos indivíduos com FHBL os sintomas podem ser mais atenuados comparativamente à ABL, mas os fenótipos podem ser variáveis (3). ABL é uma doença autossómica recessiva e a FHBL uma doença autossómica co-dominante (6). A doença de retenção de quilomicras ou doença de Anderson é uma doença autossómica recessiva muito rara, caracterizada pela ausência de quilomicras pós-prandiais e apoproteínaB-48 no plasma dos indivíduos afetados (2). A proteína envolvida (*sarb1b*) é uma pequena GTPase envolvida no transporte vesicular de novas partículas de lipoproteínas do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi (7) (tabela 1). Bioquimicamente caracterizam-se por níveis baixos de LDL, inexistência de quilomicras com TG normais (8). Os primeiros sintomas a aparecer podem ser confundidos com problemas gastrointestinais, como diarreia, vómitos ou distensão abdominal, problemas neurológicos, musculares, oftalmológicos e cardíacos (8). O tratamento precoce com uma dieta pobre em gorduras, suplementada com lípidos essenciais e vitaminas lipossolúveis é fundamental para a prevenção dos sintomas clínicos (8) e

pode retardar a progressão das manifestações. O diagnóstico precoce permite uma qualidade de vida razoável e o aumento da esperança de vida (3,6).

Patologias associadas a baixo HDL também são consideradas hipolipidemias. Estas incluem a doença de Tangier e a deficiência em HDL. A doença de Tangier é uma patologia rara, autossómica recessiva, onde os níveis de colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) e apoA1 são muito baixos ou mesmo indetetáveis. As manifestações mais comuns são hipertrofia das amígdalas que apresentam cor alaranjada, esplenomegalia e neuropatia periférica. Mais tarde pode ocorrer hepatomegalia, linfadenopatia e opacificação da córnea (9). O defeito celular na doença de Tangier está relacionado com o reduzido efluxo do colesterol celular nos fibroblastos da pele e nos macrófagos (10). Esta doença genética é causada por mutações no gene *ABCA1* (*ATP binding cassette A1 gene*) que codifica para uma proteína transportadora - *ABCA1 transporter* (tabela 1). Já foram descritas mais de 50 mutações no gene *ABCA1* em indivíduos com a doença de Tangier (homozigotos ou heterozigotos compostos) (10). A deficiência em HDL é uma patologia autossómica dominante causada por mutações nos genes *ABCA1* (em heterozigotia) e no gene *APOA1*. Indivíduos com deficiência em HDL apresentam sintomas muito semelhantes aos com a doença de Tangier embora os valores de HDL-C não sejam tão baixos. Estes indivíduos pelo facto de apresentarem valores de HDL-C muito baixo podem ter doença cardiovascular prematura (3).

Há ainda uma forma combinada de hipolipidemia denominada Hipolipidemia Familiar Combinada (FCH), uma patologia autossómica recessiva causada por mutações no gene *ANGPTL3* (*angiopoietin like 3*). Alterações que causam perda de função neste gene originam um aumento da atividade da lipoproteína lípase, podendo diminuir os valores de HDL-C pelo aumento da lípase endotelial. Em condições fisiológicas normais estas duas enzimas são catabolizadas pela ação da *ANGPTL3* (11). O efeito na aterosclerose é desconhecido, no entanto têm sido relatados casos de esteatose hepática (fígado gordo) (3).

Está descrita também uma forma benigna de hipocolesterolemia associada a mutações que originam perda de função do gene *PCSK9* (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*).

Tabela 1: ⚡ Hipolipidemias primárias: fenótipo, genes e prevalência.

Patologia genética	Fenótipo	Genes e hereditariedade	Prevalência
Abetalipoproteinemia (ABL) (OMIM - 200100)	Colesterol total, LDL-C e triglicéridos inferior do percentil 5	<i>MTTP</i> (proteína de transferência microssomal); Hereditariedade – autossômica recessiva	Rara (cerca de 100 casos descritos no mundo)
Hipobetalipoproteinemia familiar (FHBL) (OMIM - 615558)	Colesterol total, LDL-C e triglicéridos inferior do percentil 5	<i>APOB</i> (apolipoproteína B); Hereditariedade – autossômica co-dominante	1/1 000 - 1/3 000
Doença de retenção de quilomicras (OMIM - 246700)	Colesterol total, LDL-C e triglicéridos inferior do percentil 5	<i>SAR1B</i> (<i>Secretion Associated, Ras Related GTPase 1B</i>); Hereditariedade – autossômica recessiva	Rara (cerca de 50 casos descritos no mundo)
Deficiência em colesterol HDL-C (OMIM - 604091)	Colesterol HDL-C inferior do percentil 5	<i>ABCA1</i> (<i>ATP binding cassette A1</i>) <i>APOA1</i> (apolipoproteína A1); Hereditariedade – autossômica dominante	Desconhecida
Doença de Tangier (OMIM - 205400)	Colesterol HDL-C inferior do percentil 5	<i>ABCA1</i> (<i>ATP binding cassette A1</i>); Hereditariedade – autossômica recessiva	Rara (cerca de 100 casos descritos no mundo)
Hipolipidemia familiar combinada (OMIM - 605019)	Colesterol LDL-C e HDL-C inferior do percentil 5	<i>ANGPTL3</i> (<i>Angiopoietin-Like 3</i>); Hereditariedade – autossômica recessiva	1/1 000 000

_Objetivo

O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão das causas moleculares de hipolipidemias e suas consequências clínicas. São também apresentados casos com hipolipidemias raras referenciados à Unidade de Investigação e Desenvolvimento do Departamento de Promoção da Saúde e Doenças não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, já estudados, ou com estudo em curso no nosso laboratório, descrevendo os dados clínicos e moleculares mais relevantes.

_Métodos

No âmbito deste estudo foi determinado o perfil lipídico (CT, LDL-C, HDL-C, TG, apoA1, apoB e Lp(a)) para cada caso índice e familiares, pelos métodos colorimétrico enzimático e imunoturbidimétrico, recorrendo ao autoanalisador COBAS Integra 400 Plus (Roche).

O estudo molecular foi realizado por amplificação de todos os exões e junções exão/intrão, bem como, regiões 5' e 3' UTR de

cada gene indicado na [tabela 1](#), por PCR e sequenciação pelo método de Sanger, ou, mais recentemente, por sequenciação de nova geração (NGS), seguido de sequenciação de Sanger para confirmação do resultado obtido por NGS.

_Resultados e discussão

Foi realizado o estudo de 7 casos índice. O fenótipo clínico de cada caso índice encontra-se resumido na [tabela 2](#).

Seis dos 7 casos índice recebidos têm um diagnóstico clínico de ABL ou FHBL. No caso índice I foi possível encontrar a mutação causadora da doença, uma mutação stop em homozigotia no gene *APOB* (p.[(Trp1237*)]; [(Trp1237*)]) (12), confirmando o diagnóstico clínico de FHBL. No caso índice VII com possível ABL/FHBL foi identificada uma alteração *frameshift* no gene *APOB* em heterozigotia (p.(Gly1122Valfs*63)). Esta variante explica o fenótipo de hipolipidemia apresentado pelo doente, fenótipo este menos severo que o apresentado pelo caso I com uma alteração em homozigotia.

Nos casos índice II, III, IV e VI foram sequenciados os genes *APOB*, *MTTP*, *SAR1B*, *ANGPTL3* e *PCSK9* e não foram encontradas variantes que justifiquem o fenótipo. Estes doentes encontram-se ainda em estudo de forma a identificar a causa genética do seu fenótipo. No caso II foi possível obter amostras dos pais e irá ser realizado o estudo do exoma desta família (em trio) de forma a tentar identificar um novo gene responsável pelo fenótipo. O caso índice VI foi referenciado para estudo com um diagnóstico clínico de ABL/FHBL, apresentando com 15 anos de idade, hepatomegalia, esteatose hepática e neuropatia. Os progenitores deste caso índice apresentam fenótipos distintos, a mãe com valores normais de CT, LDL-C, HDL-C e TG, e o pai apresenta valores baixos de CT, LDL-C,

HDL-C e TG, similares ao caso índice. Nesta família, tal como na anterior, só o estudo do exoma poderá levar à identificação da causa do fenótipo apresentado pelo caso índice.

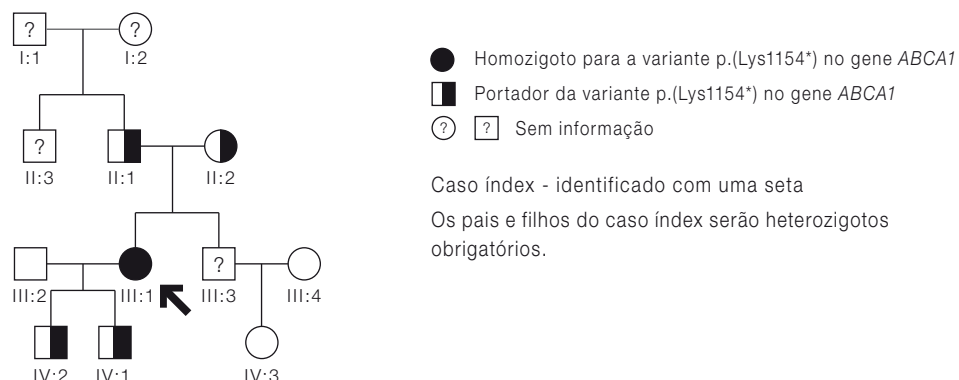
No caso índice V, referenciado com diagnóstico clínico de deficiência em HDL, identificou-se uma mutação stop em homozigotia no gene *ABCA1* (p.[(Lys1154*)];[(Lys1154*)]) (tabela 2), associada a doença de Tangier. Ambos os progenitores são heterozigotos para esta variante, assim como os seus dois descendentes. No entanto, não recebemos amostras para a realização de qualquer confirmação laboratorial (figura 1).

Tabela 2: Características clínicas e moleculares dos casos índice apresentados.

ID	Idade	CT	LDL	HDL	TG	Lp(a)	ApoA1	ApoB	Diagnóstico clínico	Diagnóstico molecular
I	16	22	*	24	6	**	**	**	ABL/FHBL	FHBL- gene <i>APOB</i> : c.[3711G>A]; [3711G>A], p.[(Trp1237*); (Trp1237*)]
II	14	24	*	22	5	9,0	49,0	10,0	ABL/FHBL	Em estudo
III	14	83	39	33	53	17	94	34	ABL/FHBL	Em estudo
IV	15	44	15	12	46	8,3	53	21	ABL/FHBL	Em estudo
V	42	73	46	3	158	<8,3	10	91	Doença de Tangier	Doença de Tangier - gene <i>ABCA1</i> : c.[3460A>T];[3460A>T], p.[(Lys1154*)];[(Lys1154*)]
VI	15	91	47	38	31	**	**	40	FHBL	Em estudo
VII	28	69	18	52	13	**	115	15	ABL/FHBL/HFC	FHBL- gene <i>APOB</i> : c.3365_3366del, p.(Gly1122Valfs*63)

Idade (anos); CT – colesterol total (mg/dL); LDL – lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); HDL – lipoproteína de alta densidade (mg/dL); TG – triglicéridos (mg/dL); Lp(a) – lipoproteína (a) (mg/dL); ApoA1 – apolipoproteína A1 (mg/dL); ApoB – apolipoproteína B (mg/dL); ABL - Abetalipoproteinemia; FHBL – hipobetalipoproteinemia familiar; FCH – hipolipidemia familiar combinada; * impossível determinar por motivos técnicos; ** Não determinado.

Figura 1: Caso índice V com diagnóstico molecular de doença de Tangier.



Os doentes com as hipolipidemias raras apresentadas têm um risco acrescido de ter outras manifestações clínicas graves: má progressão ponderal com desnutrição, alterações hematológicas, oftalmológicas ou neurológicas, esteatose hepática ou mesmo doença cardíaca. Por este motivo, deveriam ser identificados o mais precocemente possível, de forma a minimizar ou prevenir os efeitos nefastos destas condições. A caracterização genética da patologia permite uma melhor e mais personalizada abordagem terapêutica com melhoria do prognóstico do doente, bem como um aconselhamento genético adequado, com identificação de outros familiares em risco.

Em 2013 a Direção-Geral da Saúde publicou a circular normativa n.º 010/2013, onde recomenda que todas as crianças antes dos 10 anos de idade realizem um perfil lipídico. Uma vez que estas dislipidemias manifestam-se na primeira década de vida, se a circular normativa fosse aplicada na sua plenitude, o número de indivíduos identificados precocemente poderia ser maior, aumentando a possibilidade de prevenir as doenças graves associadas a estas patologias.

Sendo a dislipidemia uma das áreas de referência do Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, e na procura da melhoria constante, foram recentemente implementados quatro painéis de genes associados à dislipidemia, com recurso a sequenciação de nova geração (NGS). Esta nova abordagem permite uma resposta mais rápida e com uma sensibilidade e especificidade mais elevadas a qualquer pedido de diagnóstico molecular na área da dislipidemia (13-15). Esperamos com estes painéis conseguir identificar a mutação causadora da doença nos casos ainda em estudo e em todos os futuros casos que nos sejam referenciados para diagnóstico; caso não seja possível por esta metodologia chegar a um resultado, deverá ser equacionado o estudo do exoma (como será realizado no caso índice II apresentado), como estudo exploratório, para identificação de novos genes. Os respetivos estudos funcionais serão implementados, sempre que possível, para a comprovação do efeito do defeito genético na via metabólica afetada.

_Conclusão

As dislipidemias de origem genética raras continuam sub-diagnosticadas em Portugal. A identificação da etiologia de cada dislipidemia é importante para a implementação da correta abordagem terapêutica uma vez que a mesma depende da via metabólica afetada. Habitualmente só são valorizadas e tratadas as situações com hiperlipidemias.

Em relação às doenças que causam hipolipidemias não há muitos casos descritos, talvez por serem muito raras. Os valores de referência apresentados pelos laboratórios são normalmente baseados em valores recomendados pelas sociedades científicas e não apresentam os limites inferiores saudáveis, tornando-se assim difícil o diagnóstico destes casos.

O cumprimento da circular normativa n.º 010/2013 sobre o rastreio da dislipidemia na criança deveria ser incentivado para poder identificar atempadamente crianças com híper e hipolipidemias que requerem aconselhamento e tratamento adequado atempado e prevenir complicações. A reformulação dos boletins de análises, com a introdução de valores com intervalos de valores de referência, iria também ajudar a alertar para valores abaixo dos recomendados, permitindo identificar mais indivíduos em risco.

A caracterização bioquímica e genética determinada no laboratório do INSA enquadra-se num esforço de estratificação do risco associado a cada patologia contribuindo para a implementação de uma medicina mais personalizada.

Referências bibliográficas:

- (1) Cardoso ML, Alves AC, Bourbon M, Colesterol total, nem oito(enta) nem (duzentos e) oitenta: Parte 1 – Defeitos da biossíntese do colesterol. Boletim Epidemiológico Observações. 2018 janeiro-abril;7(21):12-16. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5548>
- (2) Tarugi P, Aversa M. Hypobetalipoproteinemia: genetics, biochemistry, and clinical spectrum. Adv Clin Chem. 2011;54:81-107.
- (3) Welty FK. Hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia. Curr Opin Lipidol. 2014;25(3):161-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4465983/>
- (4) Schonfeld G, Lin X, Yue P. Familial hypobetalipoproteinemia: genetics and metabolism. Cell Mol Life Sci. 2005;62(12):1372-8.
- (5) Moutzouri E, Elisaf M, Liberopoulos EN. Hypocholesterolemia. Curr Vasc Pharmacol. 2011;9(2):200-12.

artigos breves_ n. 11

- (6) Wang LR, McIntyre AD, Hegele RA. Complex genetic architecture in severe hypobetalipoproteinemia. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):48.
- (7) Ramasamy I. Update on the molecular biology of dyslipidemias. *Clin Chim Acta.* 2016;454:143-85.
- (8) Ferreira H, Ramos RN, Quan CF, et al. Chylomicron retention disease: a description of a new mutation in a very rare disease. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2018;21(2):134-140. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5915691/>
- (9) Kolovou GD, Mikhailidis DP, Anagnostopoulou KK, et al. Tangier disease four decades of research: a reflection of the importance of HDL. *Curr Med Chem.* 2006;13(7):771-82.
- (10) Genest J, Libby P, Gotto AM. Lipoprotein disorders and cardiovascular disease. IN: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, et al. (eds). *Braunwald's Heart disease. a textbook of cardiovascular disease.* 7th ed. Philadelphia, PA; Elsevier Saunders, 2005, p. 1013-33.
- (11) Blanco-Vaca F, Martin-Campos JM, Beteta-Vicente Á, et al. Molecular analysis of APOB, SAR1B, ANGPTL3, and MTTP in patients with primary hypocholesterolemia in a clinical laboratory setting: Evidence supporting polygenicity in mutation-negative patients. *Atherosclerosis.* 2019;283:52-60.
- (12) Di Leo E, Magnolo L, Bertolotti M, et al. Variable phenotypic expression of homozygous familial hypobetalipoproteinemia due to novel APOB gene mutations. *Clin Genet.* 2008;74(3):267-73.
- (13) Johansen CT, Dubé JB, Loyzer MN, et al. LipidSeq: a next-generation clinical resequencing panel for monogenic dyslipidemias. *J Lipid Res.* 2014;55(4):765-72. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3966710/>
- (14) Futema M, Plagnol V, Li K, et al. Whole exome sequencing of familial hypercholesterolemia patients negative for LDLR/APOB/PCSK9 mutations. *J Med Genet.* 2014;51(8):537-44. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24987033/>
- (15) Alves AC, Benito-Vicente A, Medeiros AM, et al. Further evidence of novel APOB mutations as a cause of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2018;277:448-56.

ficha técnica

_ Título: Boletim Epidemiológico Observações

_ Periodicidade: Quadrimestral

_ ISSN: 0874-2928, 2182-8873 (em linha)

_ Numeração: 2ª série

Volume 8, número 24
janeiro - abril 2019

_ 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 2019.

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