



2022
número
32
2ª série

Lisboa_INSA, IP

publicação quadrimestral_maio-agosto

ISSN: 2183-8873 (em linha)

Observações

Boletim Epidemiológico

sumário

_Editorial

Reorientação do sistema de saúde para a promoção da saúde através da prescrição social p03

Health system reorientation for health promotion through social prescribing

Cristiano Figueiredo, Luciana Costa

_Artigos breves

_Doenças transmitidas por vetores

1_Vigilância automatizada e remota de mosquitos na Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE): implementação de armadilhas com um novo sistema de sensores óticos para a classificação automática de mosquitos p05

Automated and remote surveillance of mosquitoes in the National Vector Surveillance Network (REVIVE): implementation of traps with a new optical sensor system for automatic classification of mosquitoes

Hugo Costa Osório, Manuel Silva, João Encarnação, Líbia Zé-Zé, Fátima Amaro, Maria João Alves

_Dislipidémias

2_Estudos funcionais no recetor das lipoproteínas de baixa densidade: Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar p13

Functional studies in the low-density lipoprotein receptor: Portuguese Study of Familial Hypercholesterolemia

Ana Catarina Alves, Mafalda Bourbon

_Farmacogenómica

3_Avaliação do posicionamento e expectativas dos farmacêuticos portugueses face à farmacogenómica p19

Assessment of the position and expectations of Portuguese pharmacists towards pharmacogenomics

Maria Luís Cardoso, Alexandra Costa, Célia Rasga, Ana Rita Marques, Astrid Vicente

_Hemoglobinopatias

4_Prealvência ao nascimento da drepanocitose nos distritos de Lisboa e Setúbal: resultados preliminares do estudo-piloto de rastreio a 24.130 recém-nascidos p25

Birth prevalence of sickle cell disease in Lisbon and Setúbal districts: preliminary results of the screening study of 24,130 newborns in Portugal

Diogo Rodrigues, Ana Marcão, Lurdes Lopes, Laura Vilarinho

5_Alfa-talassémia deletional e fenótipo hematológico: parâmetros associados às diferentes deleções na casuística de 2015 a 2019 p32

Deletional alpha-thalassemia and hematological phenotype: indicative parameters of the different deletions in the series from 2015 to 2019

Gisela Gaspar, Rita de Mira Ramalho, Filomena Seuanes, Carla Feliciano, Guida Duarte, Sandra Copeto, Alcina Costa, João Xavier Santos, Armandina Miranda

_Alimentação e nutrição

6_Avaliação dos teores de sal e açúcar em refeições servidas em refeitórios da Administração Pública: um estudo conjunto entre o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge e os Serviços Sociais da Administração Pública p37

Assessment of salt and sugar content in meals served in public administration cafeterias: a joint study between National Institute of Health Dr Ricardo Jorge of Portugal and Social Services of Public Administration in Portugal

Mariana Simão, Ana Cláudia Nascimento, Susana Santiago, Ana Cristina Bento, Susana Santos, Mariana Santos, Isabel Castanheira

7_Avaliação das características nutricionais de hambúrgueres e iogurtes de base vegetal disponíveis no mercado português em 2022 p42

Assessment of the nutritional characteristics of plant-based hamburgers and yogurts available in the Portuguese market in 2022

Roberto Brazão, Paulo Fernandes, Andreia Lopes, M. Graça Dias

8_Caracterização do perfil de iodo em alimentos consumidos por vegetarianos p47

Characterization of the iodine profile in foods consumed by vegetarians

Inês Delgado, Cátia Patrício, Dina Ribeiro, Marta Ventura, Sandra Gueifão, Andreia Rego, Mariana Ribeiro, Isabel Castanheira, Inês Coelho



_Toxicologia

9_ Toxicidade da nanocelulose em modelos *in vitro*: um contributo para a avaliação da sua segurança para a saúde humana **p 51**

Nanocellulose toxicity in vitro models: contributing to its safety assessment to human health

Célia Ventura, Fátima Pinto, Catarina Marques, João Cadete, Madalena Vilar, Ana Filipa Lourenço, Jorge F. S. Pedrosa, Susete N. Fernandes, Rafaela R. da Rosa, Maria Helena Godinho, Paulo J.T. Ferreira, Henriqueta Louro, Maria João Silva

_Lesões e acidentes

10_ Acidentes domésticos e de lazer em crianças e jovens durante a pandemia da Covid-19, 2019-2021 **p 57**

Home and leisure accidents in children and young people during the COVID-19 pandemic, 2019-2021

Tatiana Alves, Susana Silva; Paula Braz, Emanuel Rodrigues, Mariana Neto, Ricardo Mexia, Carlos Matias Dias

Reorientação do sistema de saúde para a promoção da saúde através da prescrição social

Health system reorientation for health promotion through social prescribing

A criação de uma rede integrada de serviços de saúde, sociais, ocupacionais e culturais centrada no indivíduo e de abordagem comunitária, constitui uma oportunidade inovadora de gerar ganhos em saúde e reorientar o sistema de saúde português para a promoção da saúde. O Serviço Nacional de Saúde (SNS) conseguiu ao longo dos últimos 43 anos melhorar o estado de saúde da população, notoriamente ao nível da esperança média de vida e da mortalidade por causas tratáveis, colocando Portugal numa posição acima da média europeia nestes indicadores (1,2). No entanto, os portugueses continuam a sentir-se mais doentes do que a grande maioria dos cidadãos europeus, vivendo comparativamente menos anos de vida saudável (2,3). Este desencontro pode evidenciar um insucesso na promoção da saúde da população, com implicações que transbordam os limites do sector da saúde e graves consequências individuais, sociais e económicas. Neste contexto, a solução para este cenário pode passar pelo envolvimento de todos os atores implicados, a começar pelo indivíduo na sua comunidade. Quando apenas 20% dos resultados em saúde da população dependem da ação do sistema de saúde (4), é necessário criar redes colaborativas de proximidade com sectores que contribuem para a saúde e bem-estar, incluindo a administração local, os serviços públicos (educação, emprego, segurança social, etc.), o terceiro sector (associações, instituições particulares de solidariedade social, organizações não governamentais, etc.) e muitos outros agentes que promovem ativamente e continuamente a saúde da população através da participação social, desporto, cultura, natureza e artes sem uma ligação concreta e efetiva ao setor da saúde.

A Prescrição Social concretiza e efetiva a ligação entre o SNS e todos estes agentes promotores da saúde na sociedade, conseguindo assim atuar nos determinantes sociais da saúde, que fora da esfera de atuação do Ministério da Saúde contribuem para 80% da saúde dos portugueses. Na prática, é um modelo que permite aos profissionais de saúde detetar em consulta situações de vulnerabilidade social ou necessidades ao nível do estilo de vida e referenciar o utente para um profissional de ligação (*social prescribing link worker*), que coordena uma rede local integrada de recursos comunitários de promoção de saúde e codesenha com o utente uma prescrição não-clínica, capaz de atuar positivamente no seu contexto de vida com benefícios para a sua saúde e bem-estar. Desde 2018, duas Unidades de Saúde Familiar (USF) do Agrupamento de Centros de Saúde Lisboa Central – USF da Baixa e USF Almirante – implementam este modelo da Prescrição Social ao nível dos cuidados de saúde primários (CSP), com os seus assistentes sociais a assumir o papel de profissional de ligação entre os utentes e os *stakeholders* comunitários. Este modelo de prestação de cuidados de proximidade assume assim um carácter diferenciado e inovador no SNS, estimulando uma real intervenção local de promoção de saúde. Este projeto inovador antecipou-se a várias recomendações internacionais de implementação da Prescrição Social ao nível dos CSP, sendo atualmente a Escola Nacional de Saúde Pública responsável pela monitorização da sua implementação tendo em vista a sua avaliação (5). Numa altura de reestruturação do SNS, no qual se discute o baixo orçamento dedicado à promoção da saúde – três vezes inferior à média da União Europeia – a Prescrição Social surge como uma linha orientadora, mais colaborativa, sustentável e concretizável de melhorar o bem-estar e a saúde duma população longa, mas que se sente doente.

Neste cenário, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge no seio das suas atribuições na área da promoção da saúde, do estudo dos determinantes da saúde



e fatores de risco e de proteção, pode assumir um papel importante no desenvolvimento e advocacia de ações concertadas de cooperação nacional e internacional para a implementação sustentável da Prescrição Social em Portugal. A recente integração desta instituição no SNS constitui provavelmente uma oportunidade estratégica no complexo processo de reorientação da ação em saúde numa perspetiva integrada de saúde em todas as políticas, no sentido da promoção de uma sociedade mais equitativa, resiliente, inclusiva e saudável.

Cristiano Figueiredo

Médico de Família
Cofundador e coordenador do Projeto-piloto de Prescrição Social de Lisboa, USF da Baixa, ACES Lisboa Central

Assistente convidado
Coordenador do NOVA PSOA - Grupo de Investigação para a Implementação e Avaliação da Prescrição Social Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade NOVA de Lisboa

Luciana Costa

Investigadora
Unidade de Promoção da Saúde do Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, INSA
Instituto de Biosistemas e Ciências Integrativas, Faculdade de Ciência, Universidade de Lisboa

Referências bibliográficas:

- (1) Ministério da Saúde. Retrato da Saúde, Portugal. Lisboa, MS, 2018. <https://www.sns.gov.pt/retrato-da-saude-2018/>
- (2) OCDE/Observatório Europeu dos Sistemas e Políticas de Saúde. Portugal: Perfil de Saúde do País 2021, Estado da Saúde na UE. Paris: OECD Publishing, 2021. <https://doi.org/10.1787/766c3111-pt>
- (3) União Europeia. Eurostat. Healthy life years at birth: infographic 2019. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/images/0/0a/Healthy_life_years_at_birth_infographic_2019.png
- (4) Hood CM, Gennuso KP, Swain GR, et al. County Health Rankings: Relationships Between Determinant Factors and Health Outcomes. *Am J Prev Med.* 2016 Feb; 50(2):129-35. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2015.08.024>. Epub 2015 Oct 31.
- (5) Hoffmeister LV, Nunes MF, Figueiredo CEM, et al. Evaluation of the Impact and Implementation of Social Prescribing in Primary Healthcare Units in Lisbon: A Mixed-Methods Study Protocol. *Int J Integr Care.* 2021 Jun 21;21(2):26. <https://doi.org/10.5334/ijic.5592>

Vigilância automatizada e remota de mosquitos na Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE): implementação de armadilhas com um novo sistema de sensores óticos para a classificação automática de mosquitos

Automated and remote surveillance of mosquitoes in the National Vector Surveillance Network (REVIVE) in Portugal: implementation of traps with a new optical sensor system for automatic classification of mosquitoes

Hugo Costa Osório¹, Manuel Silva¹, João Encarnação², Líbia Zé-Zé¹, Fátima Amaro¹, Maria João Alves¹

hugo.osorio@insa.min-saude.pt

(1) Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas. Departamento de Doenças Infeciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) IRIDEON S.L., Barcelona, Espanha

Resumo

No âmbito da Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE), é realizada a vigilância entomológica em mosquitos desde 2008 em Portugal. O projeto REVIVE é uma componente dos programas de vigilância epidemiológica indispensável à avaliação do risco de transmissão de agentes patogénicos transmitidos por vetores e é fundamental para a implementação de uma estratégia integrada de controlo de vetores e prevenção de doenças. As atividades previstas nos programas de vigilância entomológica e doenças associadas exigem elevados custos com recursos humanos especializados e com a logística que é investida nas inspeções periódicas das armadilhas de insetos. É essencial o desenvolvimento de estratégias sustentáveis para a monitorização de vetores. O projeto VECTRACK propõe o desenvolvimento de um método inovador na vigilância de mosquitos vetores de agentes de doença que vai possibilitar a identificação da espécie, sexo, idade e potencial de infeção das populações de mosquitos, mas de forma automatizada e remota. Neste artigo apresentamos os principais protocolos usados no projeto VECTRACK para a configuração de um sensor acoplado a uma armadilha que proceda à identificação automatizada de mosquitos através de *machine learning*.

Abstract

Within the scope of the Vector Surveillance Network (REVIVE), entomological surveillance of mosquitoes has been carried out since 2008 in Portugal. REVIVE project is an essential component of epidemiological surveillance programs to assess the risk of transmission of vector-borne pathogens and is essential for the implementation of an integrated strategy for vector control and disease prevention. The activities foreseen in the entomological surveillance programs and associated diseases demand high costs with specialized human resources and with the logistics that are invested in the periodic inspections of insect traps. The development of sustainable strategies for vector monitoring is essential. The VECTRACK project proposes the development of an innovative method in the surveillance of mosquito vectors of disease agents that will make it possible to identify the species, sex, age and infection potential of mosquito populations, but in an automated and remote way. In this manuscript, we present the main protocols used in the VECTRACK project for the configuration of a sensor coupled to a trap that performs the automated identification of mosquitoes through *machine learning*.

Introdução

Os programas tradicionais de vigilância de mosquitos, nos quais a Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE) se insere envolvem várias atividades que têm como principais objetivos 1) a identificação das espécies presentes, 2) a monitorização da composição e abundância das populações, 3) a deteção de espécies invasoras/exóticas, 4) a pesquisa de agentes transmitidos e 5) a avaliação de medidas de intervenção que contribuam para uma estratégia integrada de controlo de mosquitos vetores. De um modo geral, a vigilância entomológica dirigida aos mosquitos vetores baseia-se em armadilhas coletoras que são inspecionadas regularmente e analisadas no laboratório (1).

As principais limitações deste sistema de vigilância tradicional são 1) o custo e o tempo relativo aos recursos humanos, técnicos operacionais que são responsáveis pelas inspeções das armadilhas instaladas no exterior e envio das amostras para o laboratório para identificação e análise, e 2) o atraso criado entre o momento em que a armadilha é colocada e inspecionada. Esta discrepância pode ser crucial e levar a que a análise da dinâmica das populações de mosquitos no campo não seja precisa e produzida em tempo útil para uma intervenção eficaz ou para uma interpretação correta e atempada da epidemiologia de um agente, no caso de surto epidémico.

O projeto VECTRACK (*Earth observation service for preventive control of insect disease vectors* – Sistema de observação terrestre para a monitorização e controlo de mosquitos vetores de doença), integrado no programa de



apoio à inovação do Conselho Europeu de Inovação e no programa Horizonte 2020, propõe o desenvolvimento de um método inovador na vigilância de mosquitos vetores de agentes de doença que vai possibilitar a identificação da espécie, sexo, idade e potencial de infeção das populações de mosquitos, de uma forma completamente automatizada e remota. Este sistema, associado a um serviço sentinela por satélite, propõe-se a obter mapas de distribuição geográfica e temporal em tempo-real para vigilância dos mosquitos vetores e avaliação de risco das doenças associadas. Este projeto, ainda em curso (2019-2023), conta com a participação de quatro entidades de três países europeus: Bélgica, Espanha e Portugal, este último representado pelo Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

As “armadilhas inteligentes” e sistemas de monitorização remota produzem dados totalmente interoperáveis e, portanto, disponíveis para a execução automática de modelos de previsão, para a realização de avaliações de risco, a emissão de alertas e a realização de análises históricas de áreas infestadas. Deste modo, podem ser estabelecidos programas de vigilância automática com precisão e agilidade, superando o problema dos custos de mão de obra relacionados com as inspeções manuais. Além desta vantagem, as espécies de mosquitos vetores de agentes de doença podem ser detetadas mais cedo e com maior precisão, permitindo um melhor controlo de surtos e uma maior proteção da população contra doenças.

O plano de trabalho do projeto VECTRACK tem como objetivo a colheita de diferentes espécies de mosquitos selvagens para análise com um protótipo de sensor ótico acoplado a uma armadilha para mosquitos em ambiente de laboratório. Os mosquitos identificados e categorizados em cinco variáveis (espécie, sexo, idade, tamanho e estado fisiológico) são colocados em gaiolas com as armadilhas equipadas com o sensor e cada captura que é feita pela armadilha é registada em tempo real. Cinco características fundamentais são extraídas de cada registo, correspondente ao voo de um mosquito, para produzir no final um conjunto de dados que vão ser usados no processo de

avaliação de cinco algoritmos de *machine learning* que vão servir para construir o modelo com melhor performance na identificação da espécie de mosquito testada (2,3).

Após a fase de *machine learning* em laboratório, testes de campo foram e estão a ser executados em paralelo com os vários parceiros de projeto, para demonstrar a eficácia do novo sistema de monitorização em ambiente operacional. Os sensores são configurados para o trabalho de campo e o acompanhamento do registo de dados é feito por uma aplicação *online Sandscape Hub*, com a classificação das amostras (mosquitos colhidos) e análise de dados em tempo real. Esta tarefa corresponde a uma fase de trabalho-piloto que tem como objetivo coletar periodicamente as amostras nos sacos de colheita das armadilhas de mosquito para contar e classificar todos os insetos para comparar com a contagem automática e classificação de amostras individuais pela tecnologia do sensor.

O mosquito invasor *Aedes albopictus* foi reportado pela primeira vez em Portugal em 2017 em dois locais distintos, numa empresa de pneus localizada no Norte, Penafiel (região do Porto) (4); e nas proximidades de um *resort* de golfe no Sul, região do Algarve (5). Desde então, sua presença tem sido reportada pelo REVIVE nos mesmos locais, bem como o aumento gradual da sua dispersão (6). A presença de *Ae. albopictus* em Portugal é uma grande ameaça à saúde pública, aumentando a preocupação com a introdução de várias arboviroses em Portugal continental ao nível previamente reconhecido na Ilha da Madeira. Na verdade, *Ae. aegypti* presente na Madeira desde 2005 (7), foi associado ao maior surto de dengue até agora relatado na Europa em 2012 (8). O reforço das ações de vigilância e monitorização de mosquitos vetores é essencial no nosso país.

_Objetivos

Neste trabalho faz-se a descrição dos protocolos aplicados no âmbito do projeto VECTRACK sobre: 1) os procedimentos laboratoriais, 2) as técnicas de campo para a colheita dos mosquitos a testar em laboratório, e 3) a instalação das primeiras “armadilhas inteligentes”. A análise preliminar dos dados coletados até ao momento é também apresentada.




_Materiais e métodos

Protocolos operacionais de campo para colheita de mosquitos no âmbito VECTRACK

A colheita de mosquitos para o processo operacional do projeto VECTRACK tem sido realizada desde maio de 2020. A seleção dos locais de amostragem foi efetuada de acordo com a espécie-alvo e estágio de vida. Alguns dos locais de colheita foram selecionados tendo em consideração os dados de diversidade e abundância das populações de mosquitos produzidos em 2019 pela REVIVE. O critério utilizado para definir o estágio de vida durante a amostragem foi dependente da espécie, uma vez que algumas são difíceis ou mesmo refratárias à reprodução com colonização da espécie em condições de insetário.

Colheitas de mosquitos adultos com armadilhas de luz tipo CDC com isco de dióxido de carbono em forma de gelo seco

Mosquitos adultos de espécies nativas foram capturados usando armadilhas luminosas tipo CDC (Centers for Disease Control – CDC-LT, J. W. Hock Co., Gainesville, FL, EUA), iscadas com 0,5-1 kg de gelo seco por um período mínimo de 12h (figura 1). As armadilhas foram colocadas ao final da tarde, cobrindo os períodos do pôr e do nascer do sol, 1,5 a 3 metros acima do solo, e coletadas na manhã

Figura 1:  Armadilha luminosa tipo CDC iscada com dióxido de carbono na forma de gelo seco.



do dia seguinte. O tempo de operação deste tipo de armadilha em campo é limitado pelo fornecimento de CO₂ ou pela capacidade da bateria (bateria de 6 V). As redes e/ou copos de colheita foram removidos após o período de amostragem e os mosquitos imediatamente transferidos para o laboratório.

Estas armadilhas para mosquitos são frequentemente usadas em programas de monitorização e são altamente eficazes na captura de fêmeas de mosquitos de muitas espécies que procuram hospedeiros para se alimentar de sangue quando são operadas com gelo seco ou outra fonte de CO₂. Quando a armadilha luminosa tipo CDC está corretamente configurada e as condições ambientais são favoráveis, os insetos capturados são coletados vivos. O uso destas armadilhas no âmbito do projeto VECTRACK foi direcionado às espécies de mosquitos não-alvo *Culex theileri* e *Ae. caspius* e outros insetos da família Chironomidae.

Armadilha BG-Sentinel (Biogents) com isco BG lure e dióxido de carbono

Mosquitos adultos de espécies invasoras foram capturados usando armadilhas sentinela BG (BG-ST, Biogents, Regensburg, Alemanha), iscadas com BG lure e CO₂ por um período mínimo de 12h (figura 2). As armadilhas BG-ST foram instaladas em locais previamente definidos para a

Figura 2:  Armadilha BG sentinela iscada com dióxido de carbono na forma de gelo seco.





presença de espécies invasoras. Dado que essas armadilhas podem operar continuamente quando há energia elétrica, a periodicidade de colheita dos mosquitos pode variar de diária a uma vez por semana. No entanto, para coletar os mosquitos vivos, as inspeções devem ser realizadas diariamente.

As BG-ST são frequentemente utilizadas na monitorização de pontos de entrada, como aeroportos, portos, regiões de fronteira, empresas de pneus com comércio internacional e locais onde mosquitos invasores como *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* já tenham sido introduzidos e se encontrem estabelecidos localmente. Estas armadilhas foram projetadas especificamente para atrair estas espécies e geralmente são iscadas com um composto químico específico (BG-Lure ou Sweetscent). No entanto, se a BG-ST for iscada com dióxido de carbono (CO₂), a armadilha atrai uma ampla variedade de espécies de mosquitos, como *Culex* sp. e *Anopheles* sp., além de capturar mosquitos machos, fêmeas alimentadas com sangue e grávidas. O seu uso no âmbito do projeto VECTRACK foi direcionado a uma ampla diversidade de espécies de mosquitos não-alvo, como *Cx. theileri* e as espécies-alvo *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*.

Colheita de adultos em repouso com aspiradores

Mosquitos adultos de espécies não atraídas pelas armadilhas CDC-LT ou BG-ST foram capturados com aspiradores elétricos em paredes internas de abrigos de animais. As colheitas foram realizadas geralmente no período da manhã com um pequeno aspirador mecânico e uma lanterna elétrica para iluminar as superfícies. Mosquitos adultos em repouso ou em voo foram coletados por um período de 30 minutos em cada local. A utilização de aspiradores para recolha de mosquitos no âmbito do projeto VECTRACK foi direcionada para uma vasta gama de espécies de mosquitos não-alvo, como as espécies do género *Anopheles*, nomeadamente *An. atroparvus*.

Colheita de larvas com caços

O primeiro passo para a colheita dos estágios larvares do mosquito é a identificação dos habitats larvais e dos criadouros. Diferentes classes de habitats de larvas podem ser identificadas e a metodologia usada para a amostragem depende do tamanho e tipo do local do criadouro.

As larvas foram coletadas principalmente em 1) corpos de água temporários estagnados, como lagoas, pântanos, valas, canais, 2) corpos de água semipermanentes com vegetação, como pântanos e lagoas com vegetação e 3) recipientes artificiais, como pequenos contentores. Os criadouros foram amostrados com caços ou com rede de tamanho apropriado dependendo do tamanho e profundidade do corpo de água. Foram realizadas cinco a 20 imersões em cada local. As larvas coletadas no método de imersão foram primeiramente transferidas para uma bandeja branca e em seguida, com uma pipeta, transferidas para um frasco de 50 ml. A amostragem de larvas no âmbito do projeto VECTRACK foi direcionada para uma vasta gama de espécies de mosquitos não-alvo, como as espécies dos géneros *Culex* e *Culiseta*, nomeadamente *Cx. laticinctus*, *Cx. hortensis*, *Culiseta longiareolata* e outros insetos da família Chironomidae.

Colheita de ovos armadilhas de ovos – ovitraps

Para a colheita de ovos de mosquitos foram usadas *ovitraps*. As *ovitraps* foram instaladas em locais previamente definidos pela presença de espécies invasoras. Estas armadilhas não requerem energia e operam continuamente. As *ovitraps* consistem em um suporte de oviposição (geralmente papel de germinação em uma vara de madeira ou um pedaço de poliestireno) e um pequeno balde de plástico preto que é preenchido com água (0,5 a 1,5 litros) até dois terços. Foram realizadas inspeções semanais das *ovitraps*. Nas *ovitraps* com a presença de ovos de mosquito o papel de germinação ou suporte de madeira foi colocado em frascos de transferência e encaminhado ao laboratório para confirmação e contagem de ovos. O papel de germinação ou vara de madeira e a água são substituídos após a limpeza e manutenção das *ovitraps* (figura 3).



Figura 3: Exemplo de armadilha *ovitrap*s instalada no campo.



As *ovitrap*s são indicadas na monitorização de pontos de entrada, como aeroportos, portos, regiões de fronteira, empresas de pneus com comércio internacional e locais onde os mosquitos invasores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* já foram introduzidos e estão estabelecidos localmente. A configuração de uma rede de *ovitrap*s é geralmente complementada com armadilhas BG-ST para monitorizar a abundância e distribuição de populações de mosquitos invasores. A utilização de *ovitrap*s no âmbito do projeto VECTRACK foi direcionada às espécies invasoras *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*.

Manuseio e transporte de amostras de campo

Mosquitos adultos: os mosquitos coletados foram transportados para o laboratório nas bolsas coletoras ou transferidos para frascos de transporte por aspiração. Em ambos os métodos, os mosquitos foram mantidos refrigerados até à chegada ao laboratório. Os dados ambientais foram registados pelo inspetor de campo. No laboratório, os mosquitos foram identificados com recurso a chaves de identificação taxonómica. Os mosquitos vivos foram transferidos para uma gaiola-rede em ambiente insetário de 28°C, 70% de humidade relativa e fotoperíodo de 12h:12h.

Larvas: as larvas coletadas foram transportadas para o laboratório em frascos de colheita de 50 ml. As larvas foram identificadas através de chaves de identificação taxonó-

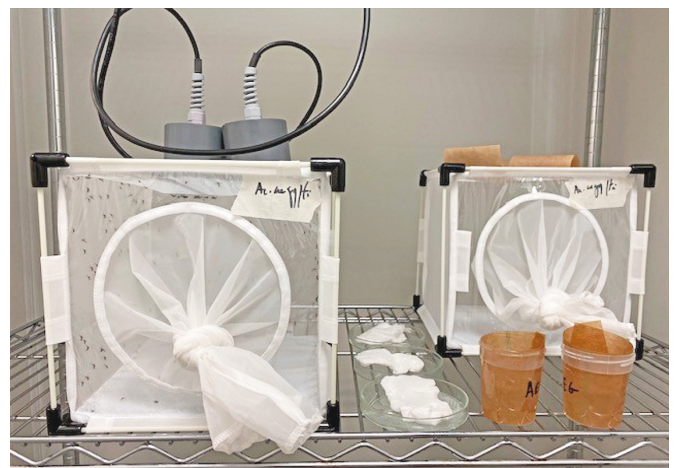
mica e separadas por espécie, local e data. Após identificação e triagem das espécies, as larvas foram transferidas para bandejas brancas de 60 cm X 30 cm e alimentadas com ração para peixes (TetraMin®) até à fase de pupa em condições de insetário (28°C). As pupas foram então transferidas para um frasco e colocadas em gaiolas-rede para a emergência dos adultos.

Ovos: suportes de oviposição coletados com ovos de *Aedes* spp. foram colocados num saco plástico fechado e transportados para o laboratório. Os ovos em cada suporte de oviposição foram contados e colocados em água em condições de insetário para permitir a eclosão das larvas.

Protocolos operacionais de laboratório para instalação e gestão de colónias de mosquitos no âmbito VECTRACK

As espécies de mosquito que são capazes de se instalar em condições de insetário foram estabelecidas em colónias de laboratório. Os adultos das espécies-alvo *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* foram mantidos em gaiolas de 30 x 30 x 30 cm num insetário privado de luz natural, sob condições padrão e constantes de 28°C ± 1°C, e 70 ± 5% de humidade relativa, 12h:12h fotoperíodo claro: escuro incluindo os períodos de transição crepúsculo (1h) e amanhecer (1h) (figura 4).

Figura 4: Colónia de *Aedes aegypti* em ambiente de insetário, com dispositivo Hemotek para alimentação dos mosquitos com sangue e copos preparados para a ovipostura.





Uma solução de sacarose (10%) foi fornecida aos mosquitos adultos. Sangue bovino fresco desfibrinado foi fornecido a mosquitos fêmeas duas vezes por semana usando o sistema de alimentação por membrana da Hemotek (*Discovery Workshop*, Inglaterra) (figura 5). As fêmeas foram deixadas para colocar os ovos num copo cilíndrico de plástico preenchido com 1/3 com água e forrado com papel de germinação.

A eclosão dos ovos foi estimulada usando água destilada fervida e depois arrefecida em frascos com água a 3/4 (figura 6). As larvas eclodidas foram transferidas para bandejas brancas em número pré-determinado de acordo com

Figura 5: Alimentação de sangue usando o sistema de alimentação por membrana Hemotek (*Discovery Workshop*, Inglaterra).



Figura 6: Protocolo de incubação de ovos.



as condições de desenvolvimento e alimentadas com ração para peixes suplementada com levedura de cerveja. Após 5-7 dias, as pupas foram transferidas para gaiolas de rede.

_Resultados

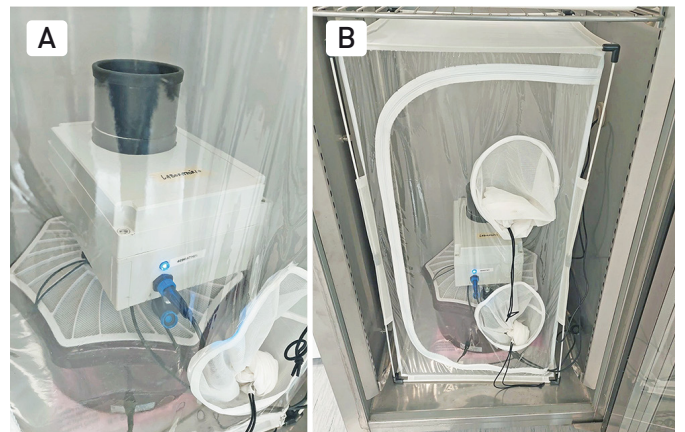
Resultados dos ensaios de Laboratório

Um total de 10621 mosquitos, pertencentes a sete espécies, foram testados, resultando em 227 testes realizados no protótipo do sensor bioacústico desenvolvido pela IRIDEON (figura 7a e 7b).

As espécies foram divididas duas categorias: espécies-alvo (*target species*), que incluem *Ae. albopictus* (4015 mosquitos testados), *Ae. aegypti* (4170 mosquitos testados) e *An. gambiae* (857 mosquitos testados), espécies estas que são as principais espécies vetoras de arbovírus e parasitas importantes em saúde pública; e espécies não-alvo (*non-target species*), que incluem *Cs. longiareolata* (989 mosquitos testados), *Cx. theileri* (390 mosquitos testados), *Cx. laticinctus* (189 mosquitos testados) e *Cx. hortensis* (11 mosquitos testados), espécies não invasoras no território nacional.

Os testes para as espécies-alvo foram realizados utilizando duas densidades larvares diferentes (50 larvas por litro e

Figura 7: A - Sensor bioacústico criado pela IRIDEON para a identificação de mosquitos B - Sensor montado numa armadilha BG Mosquitair dentro da câmara climática onde são feitos os testes.





250 a 300 larvas por litro), quatro temperaturas distintas (18, 23, 28 e 33°C), com dois intervalos de idade para os machos (2-4 e 7-9 dias de idade) e três intervalos de idade para as fêmeas (2-4, 7-9 e 14-16 dias de idade).

Para *Ae. albopictus* foi possível adquirir voos suficientes para a criação de conjunto de dados equilibrado para *machine learning*. Para *Ae. aegypti* existem categorias (nomeadamente os testes a temperatura de 18º) onde é necessário obter mais voos, mas prevê-se que estejam todos adquiridos até outubro de 2022. Quanto a *Anopheles gambiae* não irá ser possível fazer mais ensaios dos que os já realizados uma vez que estes requerem a presença de um sensor na Guiné-Bissau, o que não vai ser possível por uma questão logística no período em que decorre o projeto.

Os testes para as espécies não-alvo foram realizados com critérios mais simples, sendo apenas utilizada uma densidade larvar (200 larvas por litro) e uma temperatura (23°C), sendo os intervalos de idades quer para os machos quer para as fêmeas iguais às das espécies-alvo. O número reduzido de voos para algumas destas espécies deve-se a serem pouco comuns nas capturas do REVIVE, limitando assim a realização de mais testes. Contudo, prevê-se que seja possível obter todos os voos necessários para uma análise de dados equilibrada até ao final do projeto.

Os resultados preliminares deste trabalho indicam a capacidade de o sensor conseguir distinguir machos de fêmeas com mais de 99% de fiabilidade e de distinguir os diferentes géneros de mosquitos com mais de 90% de fiabilidade.

_Discussão e conclusões

A necessidade de prevenir e controlar as doenças transmitidas por vetores, e em especial mosquitos, é amplamente reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que desenvolveu uma estratégia para fortalecer o controlo de vetores a nível mundial até 2030 (9). Uma das metas não alcançadas do programa *Global Vector Control Response 2017-2030* (GVCR) era que 50% dos países completassem em 2020 uma avaliação das necessidades de controlo de vetores (meta atingida apenas por 27% dos países), sendo uma das fragilidades mais importantes apontadas a falta de

capacidade entomológica. Os desafios enfrentados pelos países da região do mediterrâneo, com a presença de mosquitos invasores do género *Aedes* são destacados, sendo essencial o aumento das ações de vigilância, monitorização e controlo, com o envolvimento integrado da comunidade (10). A implementação de um sistema de vigilância em tempo real com os sensores desenvolvidos no âmbito do projeto VECTRACK será uma mais-valia de grande impacto para atingir as metas propostas pelo GVCR.

Com o avanço destes métodos e tecnologia, irá ser possível monitorizar os pontos de entrada de um país, como portos, aeroportos, fronteiras e algumas indústrias, para deteção de espécies invasoras do género *Aedes* em tempo real, melhorando em grande parte o tempo de resposta, de maneira a prevenir a disseminação e instalação destas espécies de vetores de arbovírus, como dengue, Zika e chikungunya, e a mitigação do seu impacto em saúde pública.

Referências bibliográficas:

- (1) Osório HC, Zé-Zé L, Amaro F, et al. Mosquito surveillance for prevention and control of emerging mosquito-borne diseases in Portugal – 2008-2014. *Int J Environ Res Public Health*. 2014 Nov 12;11(11):11583-96. <https://doi.org/10.3390/ijerph11111583>
- (2) González-Pérez MI, Faulhaber B, Williams M, et al. A novel optical sensor system for the automatic classification of mosquitoes by genus and sex with high levels of accuracy. *Parasit Vectors*. 2022 Jun 6;15(1):190. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05324-5>
- (3) González MI, Encarnação J, Aranda C, et al. 11. The use of artificial intelligence and automatic remote monitoring for mosquito surveillance. In: Gutiérrez-López R, Logan JG, Martínez-de la Puente J (eds). *Ecology of diseases transmitted by mosquitoes to wildlife*. Wageningen Academic Publishers, 2022, pp. 211-223. (*Ecology and Control of Vector-borne Diseases*; 7). https://doi.org/10.3920/978-90-8686-931-2_11
- (4) Osório HC, Zé-Zé L, Neto M, et al. Detection of the Invasive Mosquito Species *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Portugal. *Int J Environ Res Public Health*. 2018 Apr 21;15(4):820. <https://doi.org/10.3390/ijerph15040820>
- (5) Marabuto E, Rebelo MT. The Asian tiger mosquito, *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse), a vector of dengue, chikungunya and zika viruses, reaches Portugal (Diptera: Culicidae). *Zootaxa*. 2018 Apr 20;4413(1):197-200. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4413.1.10>
- (6) Osório HC, Zé-Zé L, Amaro F, et al. REVIVE 2021 – Culicídeos. In: Relatório REVIVE 2021 – Culicídeos e Ixodídeos: Rede de vigilância de vetores. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2022, pp. 7-31. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/8004>
- (7) Margarita Y, Grácio AJ, Lencastre I, et al. First record of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) in Madeira Island – Portugal. *Acta Parasitol Port*. 2006;13:59-61.
- (8) European Centre for Disease Prevention and Control. Dengue outbreak in Madeira, Portugal, March 2013. Stockholm: ECDC, 2014. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/dengue-madeira-ECDC-mission-2013.pdf>



artigos breves_ n. 1

- (9) World Health Organization. Global vector control response 2017-2030: A strategic approach to tackle vector-borne diseases. Geneva: WHO, 2017.
<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTM-GVCR-2017.01>
- (10) World Health Organization. Genuine intersectoral collaboration is needed to achieve better progress in vector control. Geneva: WHO, 2022.
<https://www.who.int/news/item/11-04-2022-genuine-intersectoral-collaboration-is-needed-to-achieve-better-progress-in-vector-control>

Estudos funcionais no recetor das lipoproteínas de baixa densidade: Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Functional studies in the low-density lipoprotein receptor: Portuguese Study of Familial Hypercholesterolemia

Ana Catarina Alves^{1,2}, Mafalda Bourbon^{1,2}

catarina.alves@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) BioISI – Biosystems & Integrative Sciences Institute, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

A hipercolesterolemia familiar (FH) é uma doença comum do metabolismo dos lípidos. Os indivíduos com FH apresentam níveis elevados de colesterol no sangue desde o nascimento, tendo um elevado risco cardiovascular. A presença de uma variante patogénica no gene *LDLR* é a principal causa de FH, havendo mundialmente mais de 3000 variantes descritas neste gene. Contudo, apenas 15% destas apresentam estudos funcionais *in vitro*, demonstrando que afetam a função do recetor das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). O objetivo deste trabalho é apresentar um resumo de todas as variantes caracterizadas funcionalmente no Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF). Em 980 indivíduos com diagnóstico clínico de FH, 426 casos com suspeita e 554 familiares, foram encontradas 157 variantes diferentes no gene *LDLR*. No EPHF foram desenvolvidos 2 tipos de estudos funcionais para caracterizar alterações no *LDLR*. Um total de 56 variantes foram já estudadas funcionalmente o que contribuiu para obter um diagnóstico definitivo para 245 indivíduos. Os estudos funcionais permitem aumentar a evidência para a classificação correta das variantes no gene *LDLR*, influenciando assim o diagnóstico, tratamento, bem como o prognóstico dos indivíduos com FH. Estes ensaios contribuem para um diagnóstico mais especializado e de referência nesta área.

_Abstract

Familial hypercholesterolemia (FH) is a common disorder of lipid metabolism. Individuals with FH are at high cardiovascular risk due to having high blood cholesterol levels from birth. The presence of a pathogenic variant in the *LDLR* gene is the main cause of FH, with more than 3000 variants described in this gene worldwide. However, only 15% of them have functional studies *in vitro*, showing that they affect the function of the LDL receptor. The aim of this paper is to present a summary of all functionally characterized variants in the Portuguese Study of Familial Hypercholesterolemia (EPHF). In 980 individuals with a clinical diagnosis of FH, 426 index cases and 554 relatives, 157 different variants in the *LDLR* gene were found. In the EPHF, two types of functional studies were developed to characterize alterations in the *LDLR*. A total of 56 variants have been functionally studied, which contributed to obtain a definitive diagnosis for 245 individuals. Functional studies allow to increase the evidence for the correct classification of variants in the *LDLR* gene, thus influencing the diagnosis, treatment, as well as the prognosis of individuals with FH. These assays contribute to a more specialized and reference diagnosis in this area.

_Introdução

A Hipercolesterolemia familiar (FH) (OMIM 143890) é uma das doenças mais comuns do metabolismo lipídico (1/300 indivíduos) (1), apresenta uma hereditariedade autossómica dominante e foi a primeira doença genética do metabolismo lipídico a ser caracterizada do ponto de vista molecular (2). Os doentes com FH apresentam, desde o nascimento, concentrações elevadas de colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (c-LDL) na circulação sanguínea, acima do percentil 95 para a idade e sexo, dando origem ao aparecimento de doença cardiovascular (DCV) prematura, nomeadamente enfarte agudo do miocárdio (EAM) (2,3).

A FH é diagnosticada com base em critérios clínicos estabelecidos (4), no entanto, apenas o diagnóstico genético confirma a suspeita clínica (5). Existem três principais genes associados à FH: gene recetor das LDL (*LDLR*), responsável por mais de 90% dos casos, gene apolipoproteína B (*APOB*), responsável por 5-8% dos casos e gene pró-proteína convertase subtilisina/quexina tipo 9 (*PCSK9*), responsável por cerca de 1% dos casos (5).

Até agosto de 2022, foram descritas mais de 3000 variantes no gene *LDLR* na base de dados da ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), sendo a maioria variantes *missense*. Apesar do número elevado de variantes reportadas, cerca de 85% necessitam de estudos funcionais para avaliar qual o impacto no ciclo do recetor das LDL (6). Para ultrapassar este obstáculo de falta de evidência funcional para classificar uma variante, o *American College of Medical Genetics and Genomics* e a *Association for Molecular Pathology* (ACMG/AMP) publicou em 2015, um conjunto



de diretrizes para a classificação geral de variantes genéticas (7). Estas diretrizes contribuíram significativamente para uma maior padronização e consistência na interpretação do efeito das variantes e o seu significado clínico. Contudo, estas diretrizes foram concebidas para abordar todas as doenças Mendelianas, e não especificamente a FH. Uma vez que eram necessárias adaptações específicas para uma classificação clara das variantes no *LDLR*, foram publicadas recentemente diretrizes específicas para a classificação de variantes neste gene (8). As variantes podem ser classificadas como "patogénicas", "provavelmente patogénicas", "variantes de significado incerto" (VUS), "provavelmente benignas" e "benignas". Seguindo estas diretrizes, apenas os indivíduos portadores de variantes patogénicas e provavelmente patogénicas podem ter o seu diagnóstico clínico confirmado; os indivíduos com VUS precisam de aguardar que se reúna mais evidência para comprovar a patogenicidade da variante.

No entanto, verificou-se que mesmo com algumas adaptações específicas, 40% das variantes são classificadas como VUS; para estas variantes os estudos funcionais são importantes para avaliar qual o impacto destas variantes no ciclo do recetor das LDL (6).

O diagnóstico molecular da FH é importante para a obtenção de um diagnóstico definitivo e precoce, bem como, para a implementação de uma terapêutica efetiva e direcionada para a gravidade do efeito da variante detetada. Estas medidas podem levar a uma redução da mortalidade, bem como da morbidade neste grupo de indivíduos (9). A implementação generalizada de estudos funcionais, um dos mais fortes níveis de evidência para a classificação de variantes, pode contribuir muito para a melhoria do diagnóstico da FH, contribuindo desta forma também para a prevenção cardiovascular.

O Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar teve início em 1999 e é coordenado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). No âmbito deste estudo foi implementado o diagnóstico molecular da FH em Portugal e são desenvolvidos métodos de referência na área, de forma a melhorar o diagnóstico da FH em Portugal, bem como, no mundo.

_Objetivo

O objetivo deste trabalho é apresentar um resumo de todas as variantes caracterizadas no âmbito do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar, descrevendo os diferentes tipos de ensaios funcionais que podem ser realizados no ciclo do recetor das lipoproteínas de baixa densidade.

_Métodos

O diagnóstico molecular da FH no INSA, como instituto de referência, é altamente especializado e inclui a caracterização funcional de variantes nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*. Neste trabalho iremos apenas apresentar resultados de estudos funcionais no *LDLR*.

Ao longo dos últimos 35 anos, dois tipos de ensaios têm sido utilizados para comprovar a patogenicidade das variantes no *LDLR*, avaliando todo o ciclo do *LDLR*. O primeiro método, desenvolvido por Brown e Goldstein, baseia-se na determinação dos níveis de ligação, internalização e degradação de LDL marcado radioativamente com ¹²⁵I na porção proteica da LDL e eram inicialmente realizados em fibroblastos e linfoblastos de indivíduos com FH homocigótica (10,11). Através deste método foi possível estudar o efeito das diferentes variantes detetadas ao longo do gene *LDLR*, avaliando as diferentes fases do ciclo do recetor das LDL (2).

O segundo método, baseado no primeiro, utiliza a citometria de fluxo para determinar a taxa de ligação e internalização de LDL marcado com um fluoróforo lipofílico (Dil ou FITC), ou com recurso a anticorpos específicos para o *LDLR*, marcados secundariamente com fluoróforos, de forma a avaliar os níveis de expressão do recetor na superfície celular (12,13). Com a utilização deste tipo de marcação é também possível analisar a expressão do recetor por microscopia de fluorescência. Vários estudos já demonstraram que este método é fiável para caracterizar mutações no recetor das LDL (13-15), sendo também, mais seguro por não utilizar radioatividade. Este é o método que tem sido desenvolvido no EPHF e que é utilizado para estudar as variantes *missense* no *LDLR*, através de expressão heteróloga *in vitro* em células CHO IdIA7, sem expressão

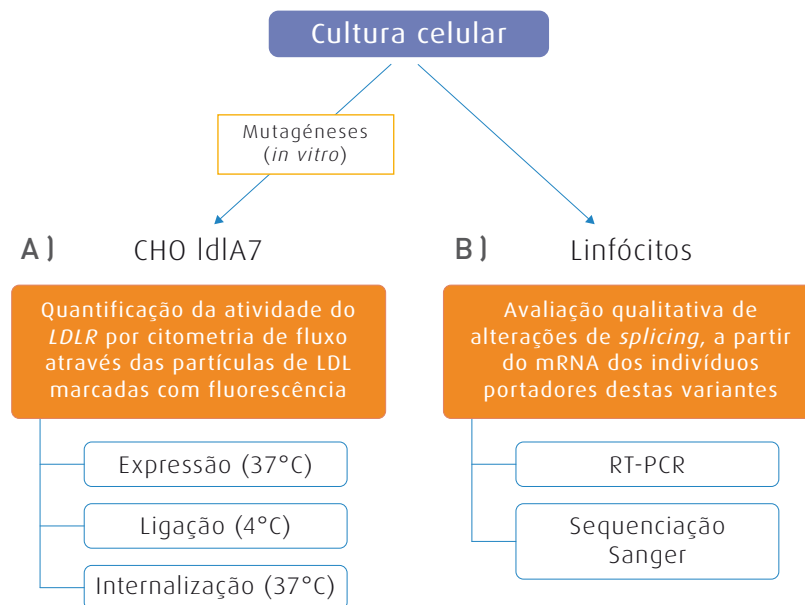


do *LDLR* (figura 1a). O protocolo laboratorial encontra-se descrito em artigos do grupo de investigação cardiovascular (13,16).

Para o estudo de variantes de *splicing* no *LDLR*, o grupo de investigação cardiovascular (17) desenvolveu uma metodologia, através do isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PMBC) dos indivíduos portadores das

das variantes de interesse. A partir das PMBC é isolado o mRNA dos indivíduos e posteriormente sintetizado o cDNA. Através da amplificação do cDNA das zonas de interesse, é possível avaliar se a variante altera o correto processamento do RNA, afetando assim a proteína. (figura 1b). O protocolo laboratorial encontra-se descrito em Bourbon *et al.* (17).

Figura 1: Estudos funcionais realizados no EPHF no gene *LDLR*. A) estudos funcionais para a caracterização de variantes *missense*; B) estudos funcionais para a caracterização de variantes de *splicing*.



_Resultados e discussão

Até setembro de 2021, foram referenciados ao EPHF 1115 indivíduos com diagnóstico clínico de FH e 2081 familiares. Foram encontradas, em 426 casos índices e 554 familiares, 157 variantes no gene *LDLR*, incluindo 40 variantes nulas, 62 variantes com estudo funcional que afetam a função do *LDLR* e 26 variantes que não afetam o ciclo do *LDLR*. As restantes 29 variantes, incluindo 12 variantes classificadas como VUS, não foram ainda estudadas funcionalmente, estando o seu estudo previsto para o próximo ano.

Foram caracterizadas funcionalmente, até agosto de 2022, um total de 56 variantes no grupo de investigação cardiovascular. Com base nesta caracterização funcional, e de acordo com as diretrizes da ACMG, foi criada nova evidência científica tendo sido as variantes novamente classificadas. Foram reclassificadas 36 variantes, incluindo 19 variantes que antes tinham uma classificação de VUS e agora tem uma classificação definitiva.

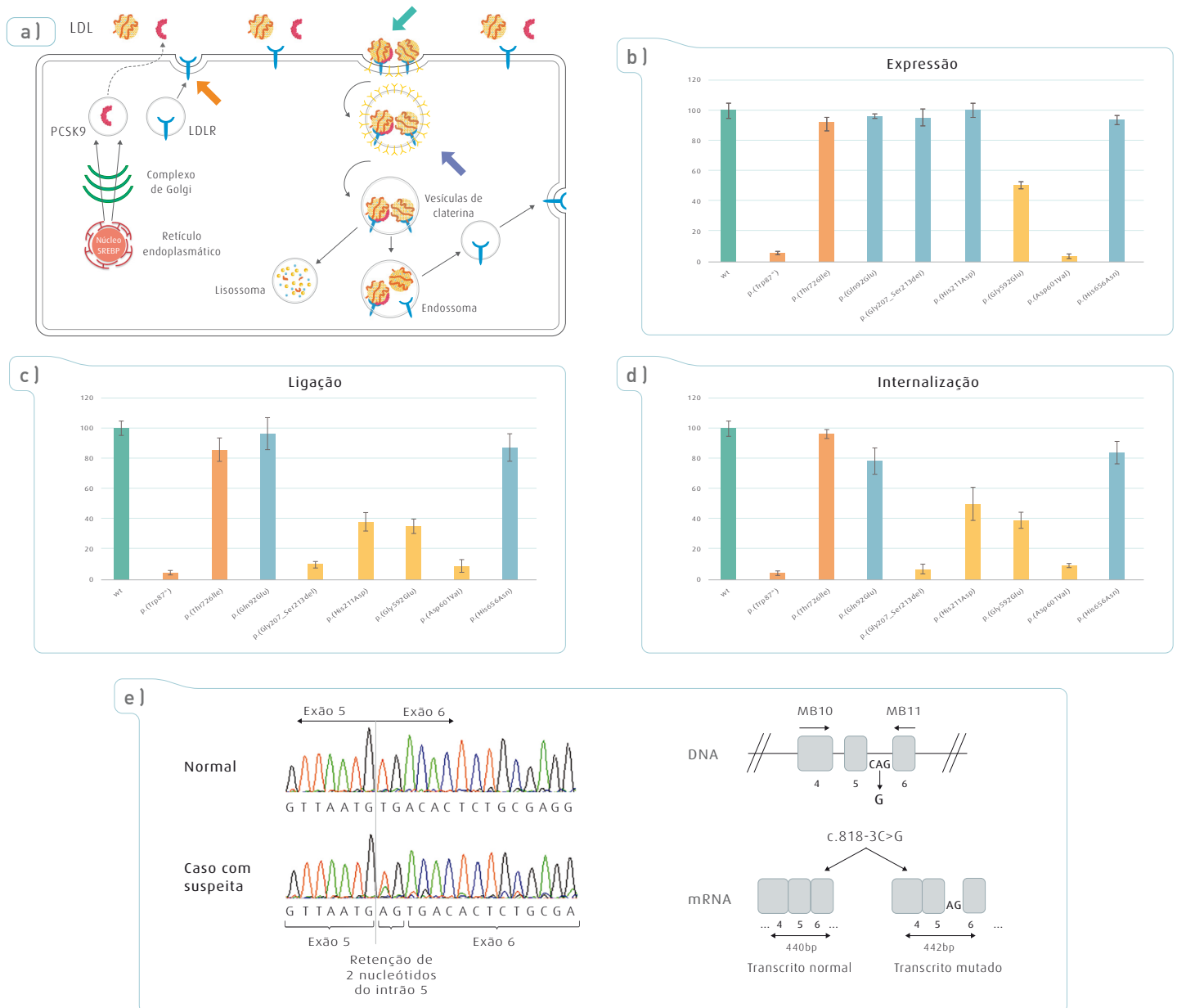


Na **figura 2** pode-se ver exemplos de resultados da caracterização funcional, tanto para variantes *missense* (**figura 2b, 2c, 2d**) como para variantes de *splicing* (**figura 2e**)

Com base nos estudos funcionais no gene *LDLR* desenvolvidos no INSA foi possível obter um diagnóstico defi-

nitivo para 245 indivíduos, que desta forma têm agora um diagnóstico definitivo, o qual deve ser agora incorporado nas decisões terapêuticas.

Figura 2: Caracterização funcional de variantes no gene *LDLR*.



(a) ciclo do *LDLR*; (b) resultado do ensaio de expressão do *LDLR* em células CHO-IdIA7 transfetadas com diferentes variantes do *LDLR* (seta laranja no ciclo); (c) resulta do ensaio de ligação de diferentes variantes no *LDLR*, transfetadas em células CHO-IdIA7 (seta verde no ciclo); (d) resultado ensaio de internalização de diferentes variantes de *LDLR* transfetadas em células CHO-IdIA7 (seta azul no ciclo); (e) Estudo funcional de um caso-índice (CI) com a variante c.818-3C>G. Na parte esquerda, encontra-se a sequência nucleotídica de parte do fragmento amplificado do cDNA do CI onde se verificou a retenção de 2 nucleótidos do intrão 5 que leva a introdução de um códon de terminação prematuro. Na parte direita, encontra-se a representação esquemática da localização dos primers utilizados e os 2 fragmentos obtidos.



_Conclusão

As variantes descritas no gene *LDLR* são heterogêneas, quer na população portuguesa (18-21), como na população mundial (22-28). Das mais de 3000 variantes reportadas na base de dados ClinVar, só cerca de 15% foram comprovadas por estudos funcionais como causa de FH, ou seja, que têm um efeito deletério no metabolismo das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) afetando o normal funcionamento do ciclo do recetor das LDL (6,29).

Até agosto de 2022, foram caracterizadas funcionalmente 220 variantes no gene *LDLR* em todo o mundo. No grupo de investigação cardiovascular foram realizados estudos funcionais em 56 destas variantes. Com base nesta caracterização funcional, e de acordo com as diretrizes da *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG), foi criada nova evidência científica, tendo sido as variantes novamente classificadas. Com base na evidência criada, foram reclassificadas 164 variantes, incluindo 98 variantes que antes tinham uma classificação de "variantes de significado incerto" (VUS). Destas 164 variantes, 74 foram encontradas em doentes portugueses e estes estudos contribuíram para um diagnóstico definitivo de 712 doentes.

Uma classificação correta das variantes no gene *LDLR*, influenciará o diagnóstico, tratamento, bem como o prognóstico dos indivíduos com hipercolesterolemia familiar (FH). O grupo de investigação cardiovascular é um dos poucos a nível mundial que realiza estes ensaios contribuindo desta forma para um diagnóstico mais especializado e de referência nesta área.

Qualquer que seja o resultado obtido no estudo funcional, este é importante para o diagnóstico dos indivíduos com diagnóstico de FH, por um lado pode levar ao diagnóstico definitivo do doente, por outro se a variante encontrada não for a causa de doença, levará ao aconselhamento de uma análise mais aprofundada para encontrar a causa genética subjacente ao fenótipo da FH.

O número de novas variantes raras reportadas em indivíduos com FH continuará a aumentar, quer como resultado de uma melhor e mais ampla utilização das novas tecnologias de sequenciação clínica, quer como resultado de uma

melhor caracterização das causas de FH. Sem estudos funcionais, a maioria destas variantes será classificada como variante de significado incerto e a falta de evidência continuará a ser uma grande lacuna no diagnóstico da FH. Desta forma, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge contribui com o desenvolvimento de estudos funcionais no *LDLR*, para um melhor diagnóstico da FH em Portugal, bem como, a nível mundial uma vez que as variantes encontradas em Portugal são, na sua grande maioria, também detetadas em todo o mundo.

Referências bibliográficas:

- (1) Beheshti SO, Madsen CM, Varbo A, et al. Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia: Meta-Analyses of 11 Million Subjects. *J Am Coll Cardiol*. 2020 May 26;75(20):2553-66. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.03.057>
- (2) Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia: a genetic receptor disease. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1985 Nov 15;20(11):35-41, 45-6. <https://doi.org/10.1080/21548331.1985.11703185>
- (3) Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al.; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 2013 Dec;34(45):3478-90a. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehd273>
- (4) Al-Rasadi K, Al-Waili K, Al-Sabti HA, et al. Criteria for Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia: A Comprehensive Analysis of the Different Guidelines, Appraising their Suitability in the Omani Arab Population. *Oman Med J*. 2014 Mar;29(2):85-91. <https://doi.org/10.5001/omj.2014.22>
- (5) Sturm AC, Knowles JW, Gidding SS, et al.; Convened by the Familial Hypercholesterolemia Foundation. Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Aug 7;72(6):662-80. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.044>
- (6) Chora JR, Medeiros AM, Alves AC, et al. Analysis of publicly available *LDLR*, *APOB*, and *PCSK9* variants associated with familial hypercholesterolemia: application of ACMG guidelines and implications for familial hypercholesterolemia diagnosis. *Genet Med*. 2018 Jun;20(6):591-98. Epub 2017 Oct 26. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.151>
- (7) Richards S, Aziz N, Bale S, et al.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- (8) Chora JR, Iacocca MA, Tichý L, et al.; ClinGen Familial Hypercholesterolemia Expert Panel. The Clinical Genome Resource (ClinGen) Familial Hypercholesterolemia Variant Curation Expert Panel consensus guidelines for *LDLR* variant classification. *Genet Med*. 2022 Feb;24(2):293-306. Epub 2021 Nov 30. <https://doi.org/10.1016/j.gim.2021.09.012>
- (9) Besseling J, Hovingh GK, Huijgen R, et al. Statins in Familial Hypercholesterolemia: Consequences for Coronary Artery Disease and All-Cause Mortality. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Jul 19;68(3):252-60. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.04.054>. Erratum in: *J Am Coll Cardiol*. 2016 Oct 4;68(14):1607.
- (10) Brown MS, Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: model for genetic receptor disease. *Harvey Lect*. 1979;73:163-201



artigos breves_ n. 2

- (11) Knight BL, Patel DD, Soutar AK. Regulation of synthesis and cell content of the low-density-lipoprotein receptor protein in cultured fibroblasts from normal and familial hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Biochem.* 1987 Feb 16;163(1):189-96. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb10754.x>
- (12) Jensen HK, Jensen TG, Jensen LG, et al. Characterization of a disease-causing Glu119-Lys mutation in the low-density lipoprotein receptor gene in two Danish families with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 1994;4(2):102-13. <https://doi.org/10.1002/humu.1380040203>
- (13) Etxebarria A, Benito-Vicente A, Alves AC, et al. Advantages and versatility of fluorescence-based methodology to characterize the functionality of LDLR and class mutation assignment. *PLoS One.* 2014 Nov 11;9(11):e112677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112677>
- (14) Raungaard B, Heath F, Brorholt-Petersen JU, et al. Flow cytometry with a monoclonal antibody to the low density lipoprotein receptor compared with gene mutation detection in diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Clin Chem.* 1998 May;44(5):966-72.
- (15) Raungaard B, Heath F, Brorholt-Petersen JU, et al. Flow cytometric assessment of LDL receptor activity in peripheral blood mononuclear cells compared to gene mutation detection in diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Cytometry.* 1999 May 1;36(1):52-9. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0320\(19990501\)36:1<52::aid-cyto7>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19990501)36:1<52::aid-cyto7>3.0.co;2-1)
- (16) Alves AC, Azevedo S, Benito-Vicente A, et al. LDLR variants functional characterization: Contribution to variant classification. *Atherosclerosis.* 2021 Jul;329:14-21. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.06.001>
- (17) Bourbon M, Duarte MA, Alves AC, et al. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia: the importance of functional analysis of potential splice-site mutations. *J Med Genet.* 2009 May;46(5):352-7. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.057000>
- (18) Medeiros AM, Alves AC, Francisco V, et al.; investigators of the Portuguese FH Study. Update of the Portuguese Familial Hypercholesterolaemia Study. *Atherosclerosis.* 2010 Oct;212(2):553-8. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.07.012>
- (19) Benito-Vicente A, Alves AC, Etxebarria A, et al. The importance of an integrated analysis of clinical, molecular, and functional data for the genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Genet Med.* 2015 Dec;17(12):980-8. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.14>
- (20) Bourbon M, Alves AC, Medeiros AM, et al.; Investigators of Portuguese FH Study. Familial hypercholesterolaemia in Portugal. *Atherosclerosis.* 2008 Feb;196(2):633-42. Epub 2007 Aug 31. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.07.019>
- (21) Medeiros AM, Alves AC, Bourbon M. Mutational analysis of a cohort with clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia: considerations for genetic diagnosis improvement. *Genet Med.* 2016 Apr;18(4):316-24. Epub 2015 May 28. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.71>
- (22) Santos RD, Bourbon M, Alonso R, et al.; Ibero-American Familial Hypercholesterolemia Network. Clinical and molecular aspects of familial hypercholesterolemia in Ibero-American countries. *J Clin Lipidol.* 2017 Jan-Feb;11(1):160-66. Epub 2016 Nov 23. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.11.004>
- (23) Bourbon M, Alves AC, Alonso R, et al. Mutational analysis and genotype-phenotype relation in familial hypercholesterolemia: The SAFEHEART registry. *Atherosclerosis.* 2017 Jul;262:8-13. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.04.002>
- (24) Fouchier SW, Kastelein JJ, Defesche JC. Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. *Hum Mutat.* 2005 Dec;26(6):550-6. <https://doi.org/10.1002/humu.20256>
- (25) Grenkowitz T, Kassner U, Wühle-Demuth M, et al. Clinical characterization and mutation spectrum of German patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2016 Oct;253:88-93. Epub 2016 Aug 26. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.03>
- (26) Pirillo A, Garlaschelli K, Arca M, et al.; LIPIGEN Group. Spectrum of mutations in Italian patients with familial hypercholesterolemia: New results from the LIPIGEN study. *Atheroscler Suppl.* 2017 Oct;29:17-24. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.07.002>
- (27) Hooper AJ, Nguyen LT, Burnett JR, et al. Genetic analysis of familial hypercholesterolaemia in Western Australia. *Atherosclerosis.* 2012 Oct;224(2):430-4. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.030>
- (28) Futema M, Whittall RA, Kiley A, et al.; Simon Broome Register Group, Humphries SE. Analysis of the frequency and spectrum of mutations recognised to cause familial hypercholesterolaemia in routine clinical practice in a UK specialist hospital lipid clinic. *Atherosclerosis.* 2013 Jul;229(1):161-8. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.04.011>
- (29) Hegele RA, Berberich AJ, Ban MR, et al. Clinical and biochemical features of different molecular etiologies of familial chylomicronemia. *J Clin Lipidol.* 2018 Jul-Aug;12(4):920-27.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2018.03.093>

Avaliação do posicionamento e expectativas dos farmacêuticos portugueses face à farmacogenómica

Assessment of the position and expectations of Portuguese pharmacists towards pharmacogenomics

Maria Luís Cardoso^{1,2}, Alexandra Costa¹, Célia Rasga^{1,2}, Ana Rita Marques^{1,2}, Astrid Vicente^{1,2}

m.luis.cardoso@insa.min-saude.pt

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

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

_Resumo

A farmacogenómica (PGx) permite, com base no perfil genético do doente, selecionar o(s) fármaco(s) mais apropriado(s) para o seu tratamento e ajustar a dose terapêutica, maximizando o efeito e diminuindo a toxicidade e a ocorrência de reações adversas (RAMs). Estes testes são também chamados testes genéticos de seleção terapêutica e integram a farmacoterapia personalizada. Para aferir atitudes, opiniões, expectativas, práticas e preocupações dos farmacêuticos enquanto técnicos do medicamento, relativamente à farmacogenómica e identificar necessidades formativas e de desenvolvimento de competências em farmacogenómica, foi desenvolvido um questionário dirigido a farmacêuticos sobre farmacogenómica, o qual foi testado e ajustado recorrendo à técnica de grupo focal, e recebeu parecer favorável à implementação da Comissão de Ética para a Saúde do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. O questionário foi disponibilizado em plataforma *online* para acesso e resposta, tendo sido divulgado pelas *newsletters* da Ordem dos Farmacêuticos e da Associação Nacional de Farmácias em janeiro de 2020, e partilhado também nas redes sociais *Facebook*, *LinkedIn* e por *email*. Obtiveram-se respostas a 303 questionários: 64% completamente preenchidos e 36% incompletos. Os inquiridos são farmacêuticos com idades compreendidas entre os 23 e 77 anos, 77% do sexo feminino e 99% estão empregados. Há 46,1% de licenciados pré-Bolonha, 44,4% são mestres (38% com Mestrado Integrado em Ciências Farmacêutica, MICEF) e 9,5% são doutorados. *Opiniões*: 98% dos inquiridos considera que a farmacogenómica é uma área importante das ciências farmacêuticas, 97% que devia ser incluída na formação contínua e 96% no currículo do MICEF. *Expectativas*: 99% espera que a implementação da farmacogenómica evite a administração de medicamentos ineficazes e em doses inapropriadas e 98% que conduza a uma redução de RAMs. *Preocupações*: a venda dos testes de farmacogenómica diretamente ao utente através da *internet* (78%), 91% o acesso aos resultados por pessoa não autorizada e 58% que os resultados mostrem a inexistência de um tratamento apropriado. *Prática*: 11% sentem-se habilitados para recomendar a realização de um teste de farmacogenómica, 10% já analisaram um relatório de farmacogenómica e 25,6% conhecem fontes fidedignas de informação sobre este tema. Identificamos a existência de opiniões e expectativas altamente favoráveis à utilização dos testes de farmacogenómica, e algumas preocupações a nível de regulamentação. Tal como noutros países, os farmacêuticos portugueses estão interessados em aprender mais sobre farmacogenómica, acham que esta pode trazer benefícios aos doentes, mas não se sentem preparados para sua aplicação imediata no seu local de trabalho. Há necessidades educativas em farmacogenómica que têm de ser colmatadas para que se torne uma prática comum de rotina do ato farmacêutico.

_Abstract

Pharmacogenomics helps to select the most appropriate drug(s), based on the genetic profile of the patient and by adjusting the dose, maximizing the effect and reducing toxicity as well as adverse drug reactions (ADRs). These tests are part of personalized pharmacotherapy. A questionnaire for pharmacists was developed to assess the attitudes, opinions, expectations, practices, and concerns of pharmacists as health professionals specialised in clinical drugs, in relation to pharmacogenomics. Identification of training needs and skills development in pharmacogenomics. The questionnaire was tested and adjusted using the focus group technique and received a favorable opinion for the implementation of the Health Ethics Committee of the National Institute of Health Dr Ricardo Jorge of Portugal. The questionnaire was disseminated by the newsletters of the Pharmaceutical Society and the National Association Pharmacies of Portugal in January 2020, and it was also shared on the social networks Facebook, LinkedIn and by email. It was available online for access and response. A total of 303 pharmacists answered to the questionnaire: 64% were completely filled in and 36% were incomplete. Respondents are pharmacists aged between 23 and 77 years, 77% are female and 99% are employed. There are 46.1% pre-Bologna graduates, 44.4% are masters (38% with an Integrated Masters in Pharmaceutical Sciences, MICEF) and 9.5% are PhDs. Opinions: 98% of respondents consider that pharmacogenomics is an important area of pharmaceutical sciences, 97% that it should be included in continuing education and 96% in the MICEF curricula. Expectations: 99% expect that the implementation of pharmacogenomics will avoid the administration of ineffective drugs and in inappropriate doses and 98% that it will lead to a reduction of ADRs. Concerns: the sale of pharmacogenomics tests directly to the consumer via the internet (78%), access to the results by an unauthorized person (91%) and that the results show the absence of an appropriate treatment (58%). Practice: 11% feel qualified to recommend a pharmacogenomics test, 10% have already analyzed a pharmacogenomics report and 25.6% know reliable sources of information on this topic. We identified the existence of highly favorable opinions and expectations regarding the use of pharmacogenomics tests, and some regulatory concerns. As in other countries, Portuguese pharmacists are interested in learning more about pharmacogenomics, they think that it can bring benefits to patients, but they do not feel prepared yet for its immediate application in their workplace. There are educational needs in pharmacogenomics that have to be met so that it becomes a common routine practice of the pharmaceutical practice.



_Introdução

A Farmacogenómica (abreviada frequentemente PGx, do termo inglês *Pharmacogenomics*) é uma área do conhecimento que resulta da associação da farmacologia e da genómica. A farmacogenómica envolve a identificação de variações genéticas, herdadas ou adquiridas, responsáveis por diferenças interindividuais na resposta aos medicamentos (1,2). Diferenças no genoma do indivíduo podem determinar se o tratamento a aplicar será eficaz, ineficaz ou levar à ocorrência de reações adversas.

Numa perspetiva de eficiência para o sistema de saúde, aumentar a probabilidade de sucesso terapêutico levará a uma diminuição significativa de custos para o Serviço Nacional de Saúde (SNS), já que reduz o número de tratamentos intermediários pouco eficazes, assim como a ocorrência de efeitos adversos, e, por conseguinte, os internamentos para sua resolução. Isto permitirá que esses recursos possam ser direcionados para outras áreas da saúde (3).

Apesar da investigação suportar a farmacogenómica e o seu impacto na saúde humana, as terapias personalizadas ainda estão pouco difundidas nas instituições de saúde portuguesas. Paradoxalmente, a sua utilização tem vindo a aumentar nalguns países como os Estados Unidos da América, o Canadá, a Espanha e a Holanda à medida que se acumula evidência sobre a sua utilidade clínica.

Dado que os farmacêuticos são os profissionais do medicamento, possuindo um conhecimento extenso em áreas como a farmacologia e farmacoterapia e desempenham um papel fundamental na otimização do uso dos medicamentos, devem, de acordo com vários autores, ser motores da Reforma *Farmacogenómica* (4,5). Desconhece-se, contudo, qual a opinião dos farmacêuticos portugueses em relação à Farmacogenómica, o seu nível de conhecimento sobre o tema e a disponibilidade para integrar este novo desafio na sua prática profissional. Para colmatar essa lacuna, foi feito um inquérito apoiado num questionário *online* sobre este tema dirigido a todos os farmacêuticos portugueses.

_Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo aferir atitudes, opiniões, expectativas, práticas e preocupações dos farmacêuticos portugueses, enquanto técnicos do medicamento, relativamente à farmacogenómica e identificar necessidades formativas e de desenvolvimento de competências nesta área.

_Material e métodos

Estudo observacional transversal desenvolvido pelo Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), no âmbito das suas atividades em Medicina Personalizada. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para da Saúde do INSA. A recolha de dados primários foi feita através da aplicação de um questionário de autopreenchimento, em formato eletrónico, na plataforma RedCap® entre janeiro e julho de 2020.

O questionário foi construído mediante revisão da literatura, seleção e adaptação das perguntas à realidade nacional e avaliação por um grupo focal.

Foram garantidos todos os requisitos éticos necessários: participação voluntária, consentimento informado, confidencialidade e anonimato, cumprindo com o Regulamento Geral de Proteção de Dados.

Foi utilizado o sistema de amostragem probabilística por conveniência. A população-alvo inclui adultos de ambos os sexos, residentes em Portugal com habilitações mínimas de licenciatura em Ciências Farmacêuticas (ou equivalente) obtida numa instituição de ensino superior portuguesa.

O questionário foi divulgado por canais preferenciais (*newsletters* da Ordem dos Farmacêuticos e da Associação Nacional das Farmácias) e partilhado por *Facebook*, *LinkedIn* e outras listas de contactos.

As respostas foram exportadas da plataforma RedCap® para o Excel Microsoft 365 MSO para tratamento dos dados recolhidos.



_Resultados e discussão

Informação sociodemográfica

Da recolha de dados resultaram 303 questionários preenchidos: 192 (64%) completos e 111 (36%) incompletos; destes últimos, 11 foram eliminados por não terem respondido à questão de consentimento informado. Os inquiridos são farmacêuticos maioritariamente do sexo feminino (77%), com idades compreendidas entre 23 e 77 anos (idade média: 47±12 anos). Noventa e nove por cento estão empregados, a maioria em farmácia comunitária (51,7%) e apenas uma minoria (2,4%) trabalha em indústria e farmácia hospitalar (4,5%). Cerca de 3/4 começou a trabalhar há mais de duas décadas.

Habilitações académicas e formação técnico-científica

Dos respondedores 9,5% são doutorados. Os restantes dividem-se entre licenciados pré-Bolonha (46,1%) e mestres, 38% dos quais com Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF).

Mais de 70% dos farmacêuticos referiram que frequentaram uma unidade orgânica/curricular com conteúdos de genética humana. Contudo, entre os mais novos, há quem tenha terminado o MICF sem ter tido formação em genética humana, expondo diferenças nos planos curriculares das várias Faculdades do Farmácia do país.

Um quarto dos inquiridos referiu que os testes de seleção terapêutica com base no perfil genético do doente foram abordados na sua formação académica; este grupo é composto maioritariamente por mestres formados nos últimos 10 anos, provenientes quer das universidades públicas quer das privadas. De acordo com os participantes, o tema testes de seleção terapêutica com base no perfil genético do doente foi lecionado nas unidades de i) Farmacologia, ii) Genética e iii) Farmacogenética/Farmacogenómica. Alguns farmacêuticos referem ter contactado com este tema durante o estágio curricular, na elaboração da dissertação de mestrado ou ainda, no curso de especialização em análises clínicas.

Opinião relativamente à farmacogenómica enquanto parte integrante das ciências farmacêuticas

As perguntas que compunham esta secção do questionário foram divididas em dois grupos: o primeiro relacionado com a importância da farmacogenómica para a atividade farmacêutica e o segundo sobre a sua aplicabilidade futura. As respostas foram dadas numa escala de *likert* de cinco níveis, contudo, atendendo a que a opção *concordo totalmente* foi largamente maioritária sobre *concordo parcialmente* e que as respostas *discordo parcialmente* e *discordo totalmente* foram raras, optou-se por as agrupar as respostas em três níveis: *concordo*, *discordo* e *sem opinião*.

O grau de concordância com as afirmações sobre a relevância da farmacogenómica ([gráfico 1](#)) foi muito elevado: 98% dos inquiridos considera que a farmacogenómica é uma área importante das ciências farmacêuticas, 97% que devia ser incluída na formação contínua e 96% no currículo do MICF. Todos os respondentes que exercem atividade no meio académico ou na investigação (n=19), estiveram de acordo com as quatro afirmações apresentadas. Verificou-se igualmente um elevado grau de concordância com as afirmações apresentadas sobre a utilização futura da farmacogenómica pelos farmacêuticos em termos de aconselhamento e interpretação dos referidos testes, apresentadas na segunda parte desta secção ([gráfico 1](#)).

Só dois dos inquiridos, um a exercer na área da farmacovigilância e outro na genética humana, pensam que a implementação da farmacogenómica não acarretará uma melhor gestão dos recursos financeiros.

Um pequeno grupo (<10% dos inquiridos) manifestou não ter opinião sobre as várias questões; são maioritariamente farmacêuticos da área da farmácia comunitária e dos assuntos regulamentares e inclui alguns farmacêuticos jovens com MICF finalizado há menos de uma década.

Atitudes e prática

Foi incluído no questionário um grupo de questões de autoavaliação adaptadas de um estudo efetuado pelo Departamento de Farmácia e Anestesia da Clínica Mayo ⁽⁶⁾.



Com estas perguntas pretende-se avaliar a confiança dos profissionais nos seus conhecimentos em farmacogenómica para aplicação prática imediata.

Nesta secção contrariamente à anterior, predominam as respostas negativas ([gráfico 2](#)), por exemplo, só 9% dos respondentes se consideram capazes de identificar os medicamentos que requerem um teste de farmacogenómica e apenas 11% se sentem de momento habilitados para recomendar a realização do teste.

O número de respostas afirmativas é superior nas questões relacionadas com os relatórios de farmacogenómica e com o conhecimento de fontes de informação fidedignas nesta área (25,6%) ([gráfico 2](#)).

Expectativas e preocupações

As expectativas quanto à utilidade dos testes genéticos de seleção terapêutica na seleção do fármaco mais apropriado e, ajuste personalizado de dose (de forma que o tratamento seja tão eficaz e seguro quanto possível) são elevadas e foram reforçadas nalguns dos comentários finais deixados na pergunta aberta com que encerrava o questionário.

Na sua grande maioria (99%), os farmacêuticos inquiridos esperam que a farmacogenómica venha a ser usada preventivamente evitando-se a administração de fármacos inadequados ou ineficazes a doentes que devido ao seu perfil farmacogenómico não possuam vantagem terapêutica com a sua utilização. Noventa e oito por cento esperam ainda que as reações adversas a medicamentos causadores de morbidade, mortalidade e custos desnecessários para os sistemas de saúde possam ser diminuídas.

Mais de metade dos respondentes dizem-se preocupados pelo facto de o teste poder mostrar que não existe um tratamento eficaz para um doente (embora hoje já se identifiquem situações dessas sem a realização de testes de farmacogenómica). Há também fortes preocupações relativamente ao acesso indevido à informação dos testes de farmacogenómica por pessoas não autorizadas para o efeito e com os testes genéticos diretos ao consumidor (TGDC) os quais são vendidos através da *internet*

pelos riscos que o mesmo acarreta uma vez que escapam à regulamentação em vigor e ao acompanhamento técnico necessários ([gráfico 3](#)).

Formação contínua em Farmacogenómica

Quando questionados sobre o contexto de formação/aprendizagem em farmacogenómica cerca de metade dos inquiridos respondeu que nunca teve, o que revela um défice na formação contínua nesta área. Outro dado a salientar é que só em situações pontuais o tema é abordado nas reuniões de serviço demonstrando a falta de integração do assunto com a prática profissional.

Um aspeto positivo evidenciado por deste inquérito foi que a maioria dos farmacêuticos está disponível para aumentar a sua formação em nesta área, tema que 98% dos inquiridos considera ser parte importante das ciências farmacêuticas e na qual os farmacêuticos devem ter conhecimentos.

Limitação do estudo

A principal limitação deste estudo prende-se com o número de respostas ser pequeno quando consideramos o universo dos farmacêuticos portugueses (2%) e a distribuição das respostas não ser representativa do número de profissionais de cada área profissional. Esta assimetria tem como consequência a impossibilidade de ter uma informação específica relativa a determinados subgrupos nomeadamente dos farmacêuticos hospitalares uma vez na maioria dos países a implementação da farmacogenómica passa pela intervenção ativa da farmácia hospitalar.



Gráfico 1: Opiniões dos farmacêuticos portugueses relativamente à Farmacogenómica enquanto parte integrante das Ciências Farmacêuticas.

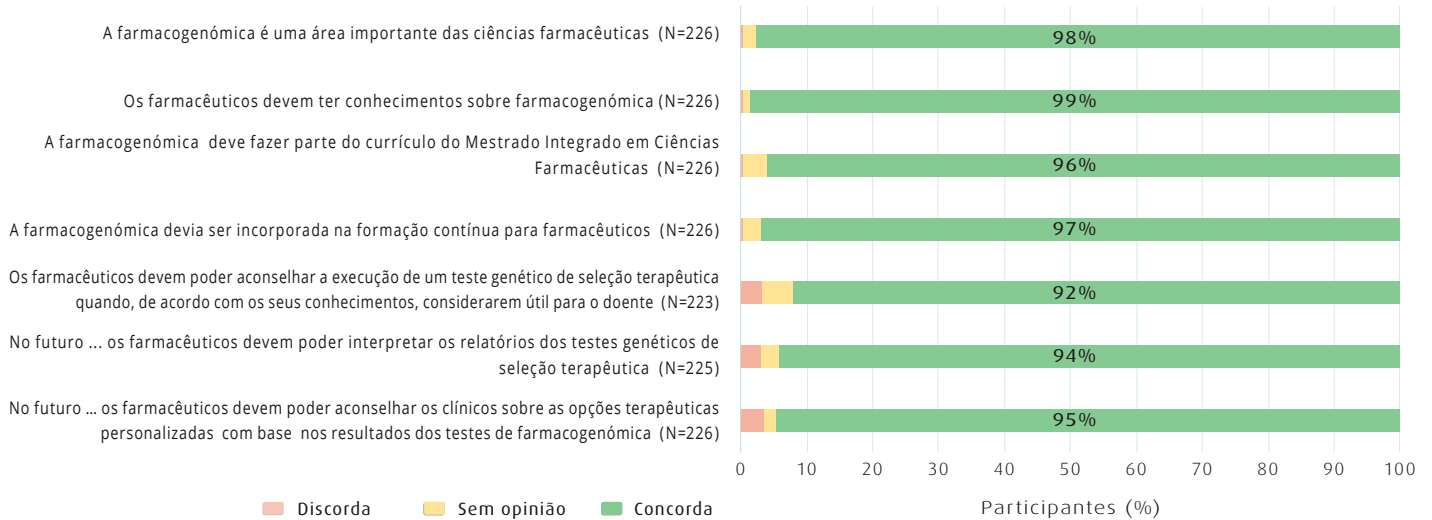


Gráfico 2: Atitudes e prática dos farmacêuticos portugueses em Farmacogenómica.

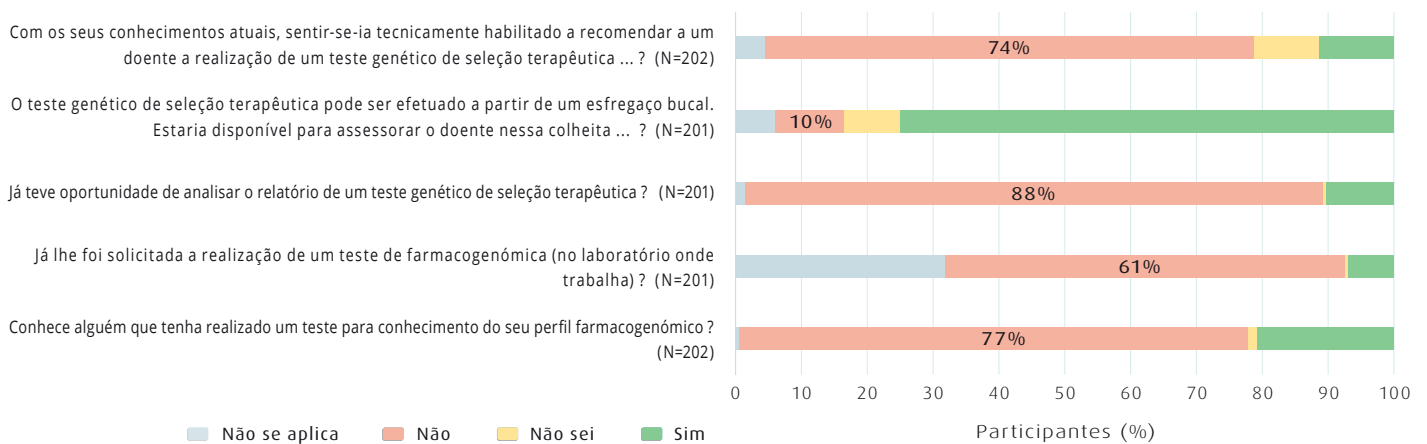
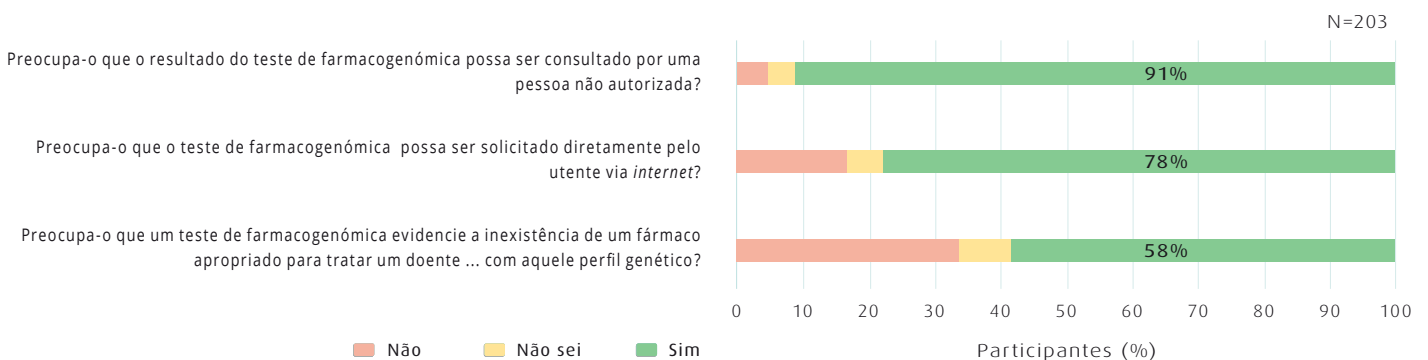


Gráfico 3: Preocupações dos farmacêuticos portugueses relativamente à Farmacogenómica.





_Conclusões

A implementação da farmacogenómica na prática clínica está dependente da sua aceitação pelos profissionais de saúde, uma vez que são eles os motores da mudança. No caso dos farmacêuticos portugueses este inquérito permitiu evidenciar qual o seu posicionamento e expectativas face à farmacogenómica e identificar necessidades formativas. Segundo os inquiridos a farmacogenómica é uma área importante das ciências farmacêuticas e deve estar incluída no currículo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas e a implementação da farmacogenómica permitirá uma melhor gestão dos recursos financeiros em saúde.

À semelhança de outros países, os farmacêuticos portugueses estão interessados em aprender mais sobre este tema, acham que pode trazer benefícios aos doentes, mas sentem que ainda não estão suficientemente preparados para aplicar a farmacogenómica de uma forma generalizada no seu local de trabalho

Há necessidades educativas que têm de ser colmatadas para que a farmacogenómica venha a tornar-se uma prática comum de rotina do ato farmacêutico. A formação tem de satisfazer as necessidades e expectativas dos profissionais e contribuir para a implementação da medicina personalizada/de precisão em Portugal.

Referências bibliográficas:

- (1) Cavallari LH, Lam Y. Pharmacogenetics. In: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, (eds.). *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, 10th. McGraw-Hill, 2017.
- (2) Miteva-Marcheva NN, Ivanov HY, Dimitrov DK, et al. Application of pharmacogenetics in oncology. *Biomark Res*. 2020 Aug 17;8:32. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00213-4>
- (3) Strianese O, Rizzo F, Ciccarelli M, et al. Precision and Personalized Medicine: How Genomic Approach Improves the Management of Cardiovascular and Neurodegenerative Disease. *Genes (Basel)*. 2020 Jul 6;11(7):747. <https://doi.org/10.3390/genes11070747>
- (4) Haga SB, Moaddeb J. Pharmacogenomics courses in pharmacy school curricula. *Pharmacogenomics*. 2019 Jun;20(9):625-630. <https://doi.org/10.2217/pgs-2019-0024>
- (5) Haidar CE, Petry N, Oxencis C, et al. ASHP Statement on the Pharmacist's Role in Clinical Pharmacogenomics. *Am J Health Syst Pharm*. 2022 Apr 1;79(8):704-07. <https://doi.org/10.1093/ajhp/zxab339>
- (6) McCullough KB, Formea CM, Berg KD, et al. Assessment of the pharmacogenomics educational needs of pharmacists. *Am J Pharm Educ*. 2011 Apr 11;75(3):51. <https://doi.org/10.5688/ajpe75351>

Prevalência ao nascimento da drepanocitose nos distritos de Lisboa e Setúbal: resultados preliminares do estudo-piloto de rastreio a 24.130 recém-nascidos

Birth prevalence of sickle cell disease in Lisbon and Setúbal districts: preliminary results of the screening study of 24,130 newborns in Portugal

Diogo Rodrigues, Ana Marcão, Lurdes Lopes, Laura Vilarinho

laura.vilarinho@insa.min-saude.pt

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

Resumo

As hemoglobinopatias são as doenças hereditárias mais frequentes a nível mundial e que resultam de mutações que afetam os genes responsáveis pela síntese das cadeias de globina da hemoglobina. Trata-se de uma patologia cada vez mais disseminada à escala global, e consequentemente, é cada vez maior a importância do rastreio neonatal da drepanocitose para a diminuição da morbilidade e mortalidade através de adoção de medidas preventivas o mais precocemente possível. Em maio de 2021 iniciou-se, em Portugal, o estudo-piloto do rastreio neonatal da drepanocitose nos distritos de Lisboa e Setúbal. Num total de 24.130 recém-nascidos rastreados nestes distritos, identificaram-se 27 casos positivos e 626 portadores de variantes anormais de hemoglobina, dos quais 537 eram portadores de hemoglobina S. A partir de fevereiro de 2022, este estudo-piloto foi alargado a nível nacional, passando a abranger todos os recém-nascidos em Portugal.

Abstract

The haemoglobinopathies are the most common genetic disorders worldwide and result from mutations in the genes responsible for the synthesis of the globin chains of hemoglobin. It is an increasingly widespread pathology on a global scale, and consequently, the neonatal screening for sickle cell disease is very important to reduce morbidity and mortality through the implementation of preventive measures as early as possible. In May 2021, the pilot study of neonatal screening for sickle cell disease start in Lisbon and Setúbal districts. In a total of 24130 newborns screened in these districts, we found 27 positive cases and 626 carriers of abnormal hemoglobin variants, of which 537 are hemoglobin S carriers. In February 2022, this pilot study was extended to all newborns in Portugal.

Introdução

Os eritrócitos são células complexas, anucleadas, com ciclo médio de vida de 120 dias. Um dos componentes básicos que garante a sua integridade é a hemoglobina (Hb), que é também responsável pelo transporte de oxigénio até aos tecidos. As hemoglobinas são moléculas tetraméricas constituídas por um par de cadeias polipeptídicas do tipo alfa- α com 141 aminoácidos e um par do tipo não alfa (beta- β , gamma- γ ou delta- δ), com 146 aminoácidos (1).

Num adulto, normalmente temos hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$ – cerca de 97%), hemoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$ – inferior a 3,5%) e podemos ainda encontrar de forma residual hemoglobina fetal (F) ($\alpha_2\gamma_2$ – inferior a 1%). No entanto, no caso dos recém-nascidos estas proporções são diferentes e normalmente apresentam cerca de 90% de hemoglobina F e o restante percentual de hemoglobina A. Após o nascimento verifica-se um acentuar de produção de hemoglobina A e um decréscimo exponencial de hemoglobina F, sendo que entre os 6 a 9 meses de idade podemos ter valores a rondar os 5% de hemoglobina F (1,2).

As hemoglobinopatias são as doenças hereditárias mais frequentes a nível mundial, têm uma transmissão autosómica recessiva e resultam de mutações que afetam os genes responsáveis pela síntese das cadeias de globina da hemoglobina (3,4). Podem ser classificadas em quantitativas (talassémias), se resultam da diminuição ou ausência de síntese de uma ou mais cadeias de globina, ou em qualitativas, se apresentam variantes estruturais como é o caso da Hemoglobina S, característica da drepanocitose ou Anemia de Células Falciformes (2,3).



Rastreo neonatal da drepanocitose

A drepanocitose é uma doença monogénica, mas clinicamente heterogénea. As manifestações clínicas são dependentes de fatores genéticos, ambientais e comportamentais. Historicamente, foi em 1910 que J. Herrick realiza a primeira descrição clínica da doença (4). Em 1949, L. Pauling revela que se trata de uma doença genética e em 1954 A. C. Allison refere que os portadores de drepanocitose apresentam resistência à malária.

Atualmente, temos conhecimento que a variante estrutural de hemoglobina que desencadeia a drepanocitose, resulta de uma mutação no gene *HBB* (c.20 A>T), que origina a substituição de um ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da β -globina (Glu6Val, β S) e origina eritrócitos em forma de “foice”. A hemoglobina S acaba por precipitar em ambiente de hipoxia e liga-se à membrana dos eritrócitos conferindo-lhes uma condição de maior rigidez e com menor resistência à hemólise. A forma mais comum e mais grave de drepanocitose está associada à forma homocigótica (HbSS), mas existem outras formas associadas à heterocigotia para a hemoglobina S e para outras hemoglobinas, nomeadamente HbSC, HbSD e HbS/ β talassémia (1,4).

Apesar de ser uma doença característica de zonas de risco como África, América Latina, subcontinente indiano e bacia do Mediterrâneo, com os atuais fluxos migratórios passou a ser um problema de saúde pública na Europa (2,4-6).

Em Portugal, a forma mais frequente é a HbSS, que apresenta um quadro clínico de anemia e hemólises crónicas, com agudizações como por exemplo, crises vasoclusivas e/ou anemia aguda bem como um aumento da suscetibilidade a infeções sistémicas. O quadro inaugural da doença pode ser fatal, como consequência de acidente vascular cerebral, sequestro esplénico ou sépsis (7,8).

Apesar da elevada morbidade e mortalidade antes dos cinco anos, associadas a esta condição, a qualidade e esperança média de vida tem revelado melhorias significativas devido, à administração profilática de penicilina oral, à vacinação antipneumocócica e à educação dos pais relativamente às complicações associadas à patologia (4,9).

A prevenção de alterações neurológicas e a terapia atempada com hidroxiureia (hidroxicarbamida) também tem contribuído para melhorar o prognóstico que lhe está associado (4). Assim sendo, o rastreo neonatal da drepanocitose desempenha um papel importante para a diminuição da morbidade e mortalidade através de adoção de medidas preventivas (4,7,8) o mais precocemente possível.

Estudo-piloto do rastreo da drepanocitose no Programa Nacional de Rastreo Neonatal

Em março de 2021, e após o parecer favorável da Comissão de Ética do Hospital Fernando da Fonseca (Amadora-Sintra), deu-se início ao rastreo da drepanocitose nos recém-nascidos deste Hospital. Esta colaboração foi baseada no historial do Hospital Fernando da Fonseca tendo em conta o elevado número de pessoas com raízes do continente africano a residir na área de influência deste Hospital.

O estudo-piloto para o rastreo neonatal da drepanocitose teve o parecer favorável da Comissão de Ética para a Saúde do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e em maio de 2021, a Unidade de Rastreo Neonatal, Metabolismo e Genética do Departamento de Genética Humana do INSA iniciou o referido estudo, numa primeira fase nos distritos de Lisboa e Setúbal, para posteriormente ser alargado a nível nacional. Pretende-se estudar 100 000 recém-nascidos no espaço temporal de 1 a 2 anos e os principais objetivos deste estudo são: 1) determinar a prevalência ao nascimento da drepanocitose em Portugal; 2) avaliar a estratégia para integrar o rastreo da drepanocitose no painel das doenças sistematicamente rastreadas do Programa Nacional de Rastreo Neonatal, com a metodologia adequada, testada e adaptada à realidade portuguesa.

O rastreo neonatal de uma patologia exige a existência no Serviço Nacional de Saúde de Centros de Tratamento com consulta especializada, neste caso de Hematologia-Pediátrica. Assim, foram selecionados quatro Centros de Tratamento que cumpriam essa exigência: o Hospital Fernando Fonseca, o Hospital Santa Maria (Centro



Hospitalar Lisboa-Norte), o Hospital Dona Estefânia (Centro Hospitalar Lisboa-Central) e o Hospital Garcia da Orta.

Outro aspeto tido em consideração foi a criação de um folheto informativo para os pais (figura 1) que é fornecido nas consultas de vigilância da gravidez ou na altura

do nascimento do bebé, onde consta a apresentação do estudo-piloto do rastreio da drepanocitose, informação sobre a doença e também os contactos, tanto da unidade laboratorial que executa o estudo-piloto, como da própria Associação Portuguesa de Pais e Doentes com Hemoglobinopatias, que apoia a realização deste estudo.

Figura 1: Folheto informativo sobre o rastreio neonatal da drepanocitose para os pais, realizado pela Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo do INSA, em colaboração com a Associação Portuguesa de Pais e Doentes com Hemoglobinopatias.

RASTREIO NEONATAL DA DOENÇA FALCIFORME (DREPANOCITOSE)

Sobre a Doença Falciforme (Drepanocitose)

A Drepanocitose é uma doença genética que causa anemia severa, oclusão de pequenos vasos sanguíneos e lesões em vários órgãos. Os doentes têm episódios frequentes de dores violentas e um risco elevado de infeções, sequestro esplénico e AVC. O diagnóstico é muitas vezes tardio, com grave prejuízo para a criança. Um acompanhamento clínico precoce e rigoroso permite reduzir, consideravelmente, a frequência dos episódios dolorosos e outras complicações, proporcionando ao doente uma melhor qualidade de vida. Este teste permite rastrear com grande sensibilidade os recém-nascidos em risco de desenvolver a doença, mas testes posteriores de confirmação, que poderão incluir estudos moleculares, são sempre necessários. Estas são as razões pelas quais o Programa Nacional de Rastreio Neonatal vos propõe a inclusão do vosso filho no Rastreio da Doença Falciforme (Drepanocitose).

Queridos pais,

O Programa Nacional de Rastreio Neonatal realiza, desde 1979, testes de rastreio de algumas doenças graves em todos os recém-nascidos, o chamado "teste do pezinho". Estes testes permitem identificar as crianças que sofrem destas doenças e que devem ser tratadas o mais precocemente possível. O Programa Nacional de Rastreio Neonatal iniciou o estudo piloto do rastreio da Drepanocitose.

O objetivo é que as crianças identificadas com a Drepanocitose possam ser acompanhadas nos Serviços de Saúde desde o seu nascimento, de modo a evitar, tanto quanto possível, as complicações desta doença.

PROGRAMA NACIONAL DE RASTREIO NEONATAL

Perguntas Frequentes

Ainda tenho dúvidas. Onde posso encontrar mais informação sobre a doença?

A Associação Portuguesa de Pais e Doentes com Hemoglobinopatias (APPDH), fornece apoio e excelente informação dirigida a todos os interessados.

Não quero participar no rastreio da Doença Falciforme (Drepanocitose). Posso realizar os restantes testes de rastreio?

Sim. O rastreio neonatal, assim como qualquer dos testes que dele fazem parte, é inteiramente voluntário. Se deseja ficar de fora do rastreio da Doença Falciforme (Drepanocitose) informe o profissional de saúde responsável pela colheita, que tem obrigação de anotar o seu pedido na respectiva ficha. A recusa em participar no rastreio não prejudica os seus direitos, nem o acompanhamento do seu filho pelos serviços de saúde.

Mais Questões?

Esta brochura não substitui as informações que podem e devem ser prestadas pelo vosso médico e outros profissionais de saúde. Podem também contactar, para esse efeito:

- O Programa Nacional de Rastreio Neonatal, utilizando o formulário de contacto do site www.insa.pt ou www.diagnosticoprecoce.pt
- O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, (INSA), na morada: Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética, Rua Alexandre Herculano, nº 321 4000-055 Porto, Tel. 223401157 / 68
- A Associação Portuguesa de Pais e Doentes com Hemoglobinopatias (APPDH), na morada: Av. de Professor Ruy Luís Gomes nº11 R/Ch-Dto 2810-274 Almada, Tel. 967690577 | 964455227, Email. sede.appdh@gmail.com www.appdh.org.pt



_Objetivo

Com este trabalho pretende-se apresentar os resultados preliminares do estudo-piloto para o rastreio da drepanocitose nos distritos de Lisboa e Setúbal, e a prevalência ao nascimento desta doença nesta área geográfica.

_Material e métodos

A partir das amostras de sangue seco em cartão de *Guthrie*, cuja finalidade era a realização do rastreio neonatal das doenças incluídas no painel de doenças rastreadas, foram estudados 24.130 recém-nascidos nos distritos de Lisboa e Setúbal, no espaço temporal de 9 meses (maio 2021 a janeiro 2022), onde se estimava que houvesse uma maior incidência da patologia.

Optou-se pela eletroforese capilar – *Sebia Capillarys® neonat fast automated system* – por se tratar de uma metodologia validada internacionalmente para a realização deste rastreio. Trata-se de um método que permite identificar hemoglobina S, bem como outras formas de hemoglobinas associadas a síndromes drepanocíticas graves e que, de acordo com as recomendações internacionais, deverão também ser identificadas no rastreio neonatal. São exemplos concretos as hemoglobinas C e D, prevalentes em populações do norte de África e da região mediterrânica, com estreitas relações com a população portuguesa.

Esta técnica já era utilizada na Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo do INSA desde 2014, com bons resultados, no âmbito da prestação de serviços que o INSA está a disponibilizar a vários países africanos. Atualmente, com o lançamento do *Capillarys 3 DBS* que tal como o seu antecessor é um instrumento que efetua a eletroforese de forma totalmente automatizada, a partir de sangue seco colhido em cartão de *Guthrie*, mas que agora permite a análise de amostras em microplacas e utiliza 12 capilares para realizar múltiplas separações eletroforéticas em simultâneo, com elevado rendimento (>70 amostras/hora) e com capacidade para processamento autónomo até 768 amostras.

_Resultados

Durante os 9 meses deste estudo-piloto, foram rastreados 24.130 recém-nascidos nos distritos de Lisboa e Setúbal. Foram diagnosticados e reportados 27 casos positivos (1/894) com alterações de hemoglobina, dos quais: 24 casos homozigóticos HbSS, 2 casos heterozigóticos HbSC e 1 caso homozigótico HbEE ([gráfico1](#)).

Todos os casos positivos do rastreio foram devidamente reportados a um dos quatro Centros de Tratamento definidos para avaliação clínica, confirmação do resultado do rastreio e acompanhamento do doente em causa ([tabela 1](#)).

Sob ponto de vista epidemiológico, foram detetados 626 portadores de hemoglobinas alteradas, com presença de hemoglobina A, dos quais: 537 casos apresentaram perfis de HbAS, 43 de HbAC, 23 de HbAE e 23 de HbAD/G/K, mas não reportados.

Nos casos em que se obteve um perfil de hemoglobinas alterado como consequência de transfusão de sangue realizada antes da colheita para o rastreio neonatal, os pais foram notificados para efetuar nova colheita 4 meses após a data da última transfusão de sangue.

Gráfico 1: Distribuição dos 27 casos positivos do estudo-piloto do rastreio da drepanocitose reportados para Centro de Tratamento (maio 2021 a janeiro 2022).

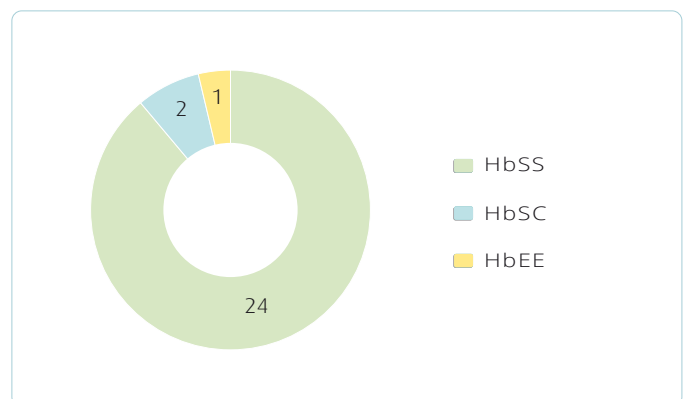




Tabela 1: Síntese informativa dos casos positivos do estudo-piloto do rastreio da drepanocitose, com alteração do perfil de hemoglobinas.

N.º Casos	Data de nascimento	Idade Gestacional (semanas)	Peso (g)	Género	Fenótipo	Centro de tratamento
27	17/01/2022	39	3055	F	FS	Hospital Garcia de Orta
26	04/01/2022	38	2900	F	FS	Hospital Dona Estefânia
25	01/01/2022	41	3390	F	FS	Hospital Santa Maria
24	26/12/2021	41	3300	M	FS	Hospital Santa Maria
23	30/12/2021	40	3280	M	FS	Hospital Garcia de Orta
22	16/12/2021	39	2990	M	FS	Hospital Dona Estefânia
21	15/12/2021	39	2896	M	FS	Hospital Garcia de Orta
20	14/12/2021	39	2900	F	FS	Hospital Garcia de Orta
19	24/11/2021	39	4585	F	FE	Hospital Santa Maria
18	15/11/2021	38	?	M	FS	Hospital Santa Maria
17	16/11/2021	39	2570	M	FS	Hospital Fernando da Fonseca
16	09/11/2021	39	3705	M	FS	Hospital Santa Maria
15	28/10/2021	40	2950	M	FS	Hospital Santa Maria
14	26/09/2021	39	3320	M	FS	Hospital Santa Maria
13	25/09/2021	40	2910	M	FS	Hospital Fernando da Fonseca
12	19/09/2021	41	?	F	FSC	Hospital Santa Maria
11	16/09/2021	39	3985	M	FS	Hospital Dona Estefânia
10	11/09/2021	39	3525	M	FS	Hospital Garcia de Orta
9	24/08/2021	37	3210	M	FS	Hospital Fernando da Fonseca
8	18/08/2021	38	2920	F	FS	Hospital Fernando da Fonseca
7	23/07/2021	41	3260	M	FS	Hospital Fernando da Fonseca
6	02/06/2021	32	1445	M	FS	Hospital Santa Maria
5	02/06/2021	39	?	M	FS	Hospital Garcia de Orta
4	12/05/2021	39	3275	F	FSC	Hospital Santa Maria
3	28/04/2021	40	4670	M	FS	Hospital Santa Maria
2	27/04/2021	39	3560	F	FS	Hospital Fernando da Fonseca
1	21/04/2021	37	3645	M	FS	Hospital Fernando da Fonseca



_Discussão

A incidência da drepanocitose na Europa tem sofrido alterações devido aos movimentos populacionais provenientes de regiões onde a doença é muito frequente. Esta doença tornou-se um problema de saúde pública e um desafio para os sistemas de saúde europeus. Inglaterra foi o primeiro país europeu a introduzir o rastreio neonatal da drepanocitose à escala nacional e posteriormente, foi alargado ao Reino Unido. Malta, Espanha e Países Baixos também já incluíram o rastreio neonatal da drepanocitose no seu painel de doenças rastreadas a nível nacional (5,6).

Por outro lado, e tendo em consideração a concentração de imigrantes, têm-se verificado a inclusão da drepanocitose como rastreio regional em mais alguns países europeus. Na Bélgica, o rastreio é realizado apenas nas regiões de Bruxelas e Liège, na Alemanha é realizado nas regiões de Berlim, Hamburgo e sudoeste da Alemanha. Em Itália, é realizado o rastreio universal na região de Padova-Monza, enquanto que em Novara, Ferrara e Modena o rastreio é realizado, mas de forma direcionada. Isto também se verifica na Irlanda e em França, onde o rastreio neonatal da drepanocitose é realizado a nível nacional de forma direcionada, e voluntariamente no caso irlandês (5,6).

Também em Portugal, o fluxo migratório fez com que o peso da doença tenha vindo a aumentar, e além dos imigrantes provenientes de África e América Latina, também o sudoeste asiático tem contribuído para o aumento de imigrantes em Portugal e consequentemente para a disseminação de hemoglobinopatias como é o caso da drepanocitose.

Como consequência da implementação do estudo-piloto nos distritos de Lisboa e Setúbal, 27 recém-nascidos foram identificados e precocemente diagnosticados, e estão a ser devidamente acompanhados por médicos especialistas de Hematologia nos respetivos Centros de Tratamento. Desses 27 doentes, 7 foram encaminhados para o Hospital Fernando da Fonseca, 11 para o Hospital Santa Maria, 3 para o Hospital Dona Estefânia e 6 para Hospital Garcia da Orta (tabela 1). Foi possível identificar 626 casos, não reportados, de hemoglobinas alteradas, dos quais 537 casos eram portadores de hemoglobina S.

De acordo com os resultados obtidos, verificamos que a prevalência da drepanocitose nos distritos de Lisboa e Setúbal é bastante elevada. Foram diagnosticados 26 casos de drepanocitose (24 casos – HbSS e 2 casos – HbSC) num universo de 24.130 recém-nascidos, ou seja, uma prevalência de 1 doente por cada 928 nascimentos.

Estes números são facilmente justificados pelo facto de estarmos perante uma população que ao longo dos anos tem estado sujeita a um aumento de imigrantes e consequentemente tem originado grandes comunidades nos distritos de Lisboa e Setúbal em que os cruzamentos são muito comuns dentro dessas comunidades e como tal a probabilidade de surgirem casos positivos de drepanocitose também seja superior nessas mesmas comunidades.

_Conclusão

A Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética iniciou em 2021 o estudo-piloto do rastreio neonatal da drepanocitose nos distritos de Lisboa e Setúbal e os dados preliminares deste estudo demonstram uma grande prevalência ao nascimento desta doença (1/928 RN), após o estudo de 24.130 recém-nascidos (RN)

Em fevereiro de 2022, o estudo-piloto foi expandido a todos os RN com nascença em território nacional, para assim se determinar qual a prevalência da doença em Portugal.

O principal objetivo do rastreio neonatal da drepanocitose é reduzir a morbilidade e mortalidade associada à doença, proporcionando às crianças com a patologia uma melhor qualidade e esperança média de vida.

Agradecimentos:

À Dra. Anabela Serrão do Hospital Santa Maria (CH Lisboa-Norte), à Dra. Paula Kjollerström do Hospital Dona Estefânia (CH Lisboa-Central), à Dra. Cristina Trindade e à Dra. Teresa Faria, do Hospital Fernando da Fonseca e ainda à Dra. Sofia Fraga e ao Dr. João Franco do Hospital Garcia da Orta, pela colaboração desde o início do estudo-piloto.

Um agradecimento muito especial à Dra. Cristina Trindade do Hospital Fernando da Fonseca e à Doutora Celeste Bento (Associação Portuguesa de Pais e Doentes com Hemoglobinopatias), pelas suas colaborações e contributos ao longo de todo o processo de implementação do estudo-piloto do rastreio neonatal da drepanocitose em Portugal.



Referências bibliográficas:

- (1) Martínez E, Conde J. Drepanocitosis. IN: Sanjurjo P, Baldellou A (eds). Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditárias. 2.ª ed. Madrid: Ergón, 2006, pp. 845-59.
- (2) Teixeira AT, Garcia C, Ferreira T, et al. Rastreio Neonatal de Hemoglobinopatias: a experiência de um Hospital de Nível II na Área Metropolitana de Lisboa. *Acta Pediatr Port.* 2018;49(3):228-34. <https://ojs.pjp.spp.pt/article/view/11781/11055>
- (3) Miranda A, Costa S, Seuanes F, et al. Estudo Bioquímico de portadores de hemoglobinopatias. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2013;2(6):16-18. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/1745>
- (4) Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet.* 2010 Dec 11;376(9757):2018-31. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)61029-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)61029-x)
- (5) Lobitz S, Telfer P, Cela E, et al.; with the endorsement of EuroBloodNet, the European Reference Network in Rare Haematological Diseases. Newborn screening for sickle cell disease in Europe: recommendations from a Pan-European Consensus Conference. *Br J Haematol.* 2018 Nov;183(4):648-660. <https://doi.org/10.1111/bjh.15600>
- (6) Daniel Y, Elion J, Allaf B, et al. Newborn Screening for Sickle Cell Disease in Europe. *Int J Neonatal Screen.* 2019 Feb 12;5(1):15. <https://doi.org/10.3390/ijns5010015>
- (7) Costa SN, Madeira S, Sobral MA, et al. Hemoglobinopatias em Portugal e a intervenção do médico de família. *Rev Port Med Geral Fam.* 2016;32(6):416-24. <https://doi.org/10.32385/rpmgf.v32i6.11963>
- (8) Sánchez JM, Magdaleno MS, Prieto AG, et al. Cribado neonatal de drepanocitosis en Castilla y León: Estudio descriptivo. *Bol Pediatr.* 2021;61:160-65. https://sccalp.org/uploads/bulletin_article/pdf_version/1637/BolPediatr2021_61_160-165.pdf
- (9) Peres MJ, Carreiro MH, Machado MC, et al. Rastreio neonatal de hemoglobinopatias numa população residente em Portugal. *Acta Med Port.* 1996;9:135-39. <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/viewFile/2569/1982>

Alfa-talassémia deletional e fenótipo hematológico: parâmetros associados às diferentes deleções na casuística de 2015 a 2019

Deletional alpha-thalassemia and hematological phenotype: indicative parameters of the different deletions in the series from 2015 to 2019

Gisela Gaspar¹, Rita de Mira Ramalho², Filomena Seuanes¹, Carla Feliciano¹, Guida Duarte¹, Sandra Copeto¹, Alcina Costa¹, João Xavier Santos^{1,3}, Armandina Miranda¹

armandina.miranda@insa.min-saude.pt

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

(2) Serviço de Patologia Clínica, Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, Lisboa, Portugal

(3) 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

Resumo

As talassémias são caracterizadas por um desequilíbrio quantitativo nas cadeias globínicas devido à redução ou supressão da síntese de uma das cadeias. Foram avaliados retrospectivamente os resultados de 496 casos suspeitos de α -talassémia deletional e correlacionados com os dados hematológicos. A pesquisa de deleções causadoras de α -talassémia foi efetuada por Gap e Multiplex Gap-PCR. A maioria dos casos (n=190) apresentou um genótipo normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), seguido de heterozigotia ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) (n=148) e homozigotia ($-\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$) (n=141) para a deleção de 3,7kb. Detetaram-se ainda 5 casos de heterozigotia para a deleção de 4,2Kb ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$), 4 de dupla heterozigotia ($\alpha^{3.7}/\alpha^{4.2}$), 7 de heterozigotia α^0 ($--^{SEA}/\alpha\alpha$), e 1 de Hb H ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$). Os resultados evidenciaram que o VGM e o HGM são excelentes índices hematológicos de rastreio e seleção dos testes moleculares, sendo o seu valor tanto mais baixo quanto maior o número de genes deletionados. Os resultados obtidos são ainda concordantes com o descrito na literatura e reforçam que o valor de *cut-off* de 25 pg (HGM), tem sensibilidade adequada para inferir da presença de uma deleção α^0 -talassémia. A deteção da deleção α^0 assume particular importância na prevenção da ocorrência de Hb Bart's na descendência de um casal de portadores. O diagnóstico de α -talassémia é efetuado por métodos moleculares, no entanto os índices hematológicos são importantes marcadores preditivos do número de genes alfa deletionados e da relação fenótipo/genótipo.

Abstract

Thalassemias are characterized by a quantitative imbalance of the globin chains due to the reduction or suppression of the synthesis of one of the globin chains. In the present study, we evaluated retrospectively 496 cases suspected of deletional α -thalassemia and we correlated them with the hematological data available. We searched for α -thalassemia deletions by performing Gap and Multiplex Gap-PCR. Most patients (n=190) had a normal genotype ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), followed by heterozygosity ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) (n=148) and homozygosity ($-\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$) (n=141) for the 3.7kb deletion. We also detected 5 cases of heterozygosity for the 4.2Kb deletion ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$), 4 of double heterozygosity ($\alpha^{3.7}/\alpha^{4.2}$), 7 heterozygosity α^0 ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) and 1 of Hb H ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$). The results showed that the MCV and the MCH are excellent hematological indices for screening and selection of patients for molecular testing (their value being the lower the greater the number of deleted genes). Our results are in line with those described in the literature and reinforce that the cut-off value of 25 pg (HGM) is sensitive enough to infer the presence of an α^0 -thalassemia deletion. The detection of the α^0 deletion is very important in preventing the occurrence of Hb Bart's in the offspring of a carrier couple. Genetic testing makes the diagnosis of α -thalassemia, however hematological indices are relevant predictive markers of the number of deleted alpha genes and the phenotype/genotype correlation.

7 heterozygosity α^0 ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) and 1 of Hb H ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$). The results showed that the MCV and the MCH are excellent hematological indices for screening and selection of patients for molecular testing (their value being the lower the greater the number of deleted genes). Our results are in line with those described in the literature and reinforce that the cut-off value of 25 pg (HGM) is sensitive enough to infer the presence of an α^0 -thalassemia deletion. The detection of the α^0 deletion is very important in preventing the occurrence of Hb Bart's in the offspring of a carrier couple. Genetic testing makes the diagnosis of α -thalassemia, however hematological indices are relevant predictive markers of the number of deleted alpha genes and the phenotype/genotype correlation.

Introdução

A hemoglobina (Hb) presente nos eritrócitos é constituída por quatro cadeias de globina, duas cadeias do tipo α e duas do tipo não- α . A Hb A, predominante nos adultos, é composta por duas cadeias α e duas cadeias β , que são sintetizadas de forma equilibrada e sob o controlo de genes localizados nos cromossomas 16 e 11, respetivamente. As talassémias são caracterizadas por um desequilíbrio quantitativo devido à redução ou supressão da síntese de uma das cadeias globínicas.

A maioria das α -talassémias são causadas por deleções, (α -talassémias deletionais) embora também possam ocorrer mutações pontuais (α -talassémias não-deletionais), sendo a sua base molecular muito heterogénea.

A α -talassémia é uma das doenças genéticas mais comuns a nível mundial. A sua distribuição geográfica é variável,



com maior prevalência em algumas regiões da China e do Sudeste asiático, mas também no continente africano, Mediterrâneo e no Médio Oriente.

O défice de cadeias α conduz à destruição de eritrócitos em circulação e conseqüentemente à diminuição da quantidade de hemoglobina por célula, originando microcitose e hipocromia (1). Os testes hematológicos de rastreio de α -talassémia são o hemograma com VGM (Volume Globular Médio) <80 fL e/ou HGM (Hemoglobina Globular Média) <27 pg e Hb A2 normal ($<3,5\%$) (2,3).

Existem quatro graus de gravidade consoante o número de genes α -globina afetados (figura 1).

A deleção de um gene α -globina, heterozigotia para α^+ -talassémia ($-\alpha/\alpha\alpha$), resulta num portador silencioso. A deleção de dois genes α -globina no mesmo cromossoma, heterozigotia para α^0 -talassémia ($--/\alpha$), ou nos cromossomas homólogos, homozigotia para α^+ ($-\alpha/-\alpha$), pode resultar numa anemia microcítica hipocrômica, ligeira a moderada. Por outro lado, a deleção de três genes α ($--/-\alpha$) resulta numa talassémia intermédia, doença de Hb H. A deleção dos quatro genes α resulta em hipoxia grave e anemia durante o desenvolvimento uterino (Hb Bart's e *Hydrops fetalis*; $--/--$), levando à morte fetal ou neonatal (4).

A deleção α^+ mais comum é a de 3.7Kb ($-\alpha^{3,7}$) que representa mais de 80% das deleções alfa talassémicas, sendo frequentemente encontrada no continente africano (10-30%) (4).

As deleções α^0 são mais comuns no Sudeste Asiático ($--SEA$, $--FIL$ e $--THAI$) e no Mediterrâneo (as duas mais comuns são $--MED$ e $-\alpha^{20,5}$) (5).

_Objetivo

Este estudo teve como objetivo correlacionar as diferentes alterações genéticas de α -talassémia delecional com o correspondente fenótipo hematológico, com base na casuística de 2015 a 2019.

_Materiais e métodos

Foram avaliados retrospectivamente os resultados de 496 casos de estudo de α -talassémia delecional, no Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis (DPS), do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Todos os casos foram anonimizados previamente à sua análise.

A pesquisa das deleções α -talassémia, 3,7 kb ($-\alpha^{3,7}$), 4,2 kb ($-\alpha^{4,2}$), $--SEA$, $--MED$, $-\alpha^{20,5}$, $--FIL$ e $--THAI$, foi efetuada por Gap-PCR e Multiplex Gap-PCR.

Figura 1: Relação fenótipo-genótipo na α -talassémia delecional.

Fenótipo	$\alpha 2$	$\alpha 1$	Genótipo
Normal			$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Alfa-talassémia silenciosa, α^+			$-\alpha/\alpha\alpha$
Alfa-talassémia	homozigótico para α^+		$-\alpha/-\alpha$
	heterozigótico para α^0		$--/\alpha\alpha$
Hemoglobina H			$--/-\alpha$
Hb Bart's, <i>hydrops fetalis</i>			$--/--$



Seguindo o procedimento instituído, previamente ao estudo molecular, foi efetuada a avaliação hematológica (eritrograma, focagem isoelétrica da Hb e a quantificação da Hb A₂ e Hb F por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iónica).

Não foram incluídos neste estudo os portadores de α -talassémia deletional com outra hemoglobinopatia adicional.

A análise estatística dos resultados foi efetuada através do cálculo da média, desvio padrão, mediana e teste T de *Student*, com um nível de significância de 0,05.

Resultados e discussão

Do total de 496 casos avaliados, de 2015 a 2019, 92 correspondiam a crianças com idade ≤ 2 anos, 58 com idade >2 anos ≤ 6 anos e 60 entre os 6 anos e 12 anos. No grupo etário >12 anos, 117 eram do género masculino e 169 do género feminino, num total de 286 casos.

As amostras foram analisadas para a pesquisa das deleções α^+ mais comuns na população portuguesa ($-\alpha^{3,7}$ e $-\alpha^{4,2}$) e deleções α^0 ($--SEA$, $--MED$, $-\alpha^{20,5}$, $--FIL$ e $--THAI$) (1,2,5) (tabela 1).

Os genótipos mais frequentes foram o normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), a heterozigotia para 3,7kb ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$) e a homozigotia para 3,7kb ($-\alpha^{3,7}/\alpha^{3,7}$). Foram detetados 5 casos de heterozigotia para 4,2Kb ($-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$), 4 de dupla heterozigotia

($\alpha^{3,7}/\alpha^{4,2}$), 7 de heterozigotia α^0 ($--SEA/\alpha\alpha$), e 1 caso de Hb H (genótipo $--SEA/-\alpha^{3,7}$).

A média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos para cada grupo etário e genótipo encontram-se descritas na tabela 2.

Para os valores de Hb e VGM não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ e $-\alpha^+/\alpha\alpha$ ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$; $-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$). Relativamente ao HGM verificou-se significância estatística apenas no grupo etário dos $>2-6$ anos.

Na Hb verificou-se uma tendência decrescente com diferença estatisticamente significativa entre os genótipos $-\alpha^+/\alpha\alpha$ e $-\alpha^+/-\alpha^+$ ($-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$; $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{4,2}$) e entre os genótipos $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ e $-\alpha^+/-\alpha^+$, nos grupos etários $>2-6$ anos, $>6-12$ anos e >12 anos F.

No VGM, observou-se um decréscimo proporcional ao número de genes deletados, em todos os grupos etários, verificando-se diferença estatisticamente significativa entre os genótipos $-\alpha^+/\alpha\alpha$ e $-\alpha^+/-\alpha^+$ nos maiores de 6 anos, e entre $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ e $-\alpha^+/-\alpha^+$ em todos os grupos etários.

O HGM também apresentou uma tendência decrescente proporcional ao número de genes deletados (figura 2), observando-se significância estatística em todas as faixas etárias entre os genótipos $-\alpha^+/\alpha\alpha$ e $-\alpha^+/-\alpha^+$ e $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ e $-\alpha^+/-\alpha^+$ (tabela 2).

Tabela 1: Distribuição dos genótipos α -talassémia deletional e sua frequência por idade e género, na casuística de 2015 a 2019 (n=496).

	Genótipos														
	Total	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$		$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$		$-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$		$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$		$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{4,2}$		$--SEA/\alpha\alpha$		$--SEA/-\alpha^{3,7}$	
	n	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
≤ 2 anos	92	42	46	25	27	0		25	27	0		0		0	
$>2-6$ anos	58	20	34	25	43	0		13	22	0		0		0	
$>6-12$ anos	60	19	32	23	38	0		16	27	0		2		0	
>12 anos (máx.=80 anos)	286	109	38	75	26	5	2	87	30	4	1	5	2	1	0,3
Feminino	169	69	41	41	24	2	1	53	31	0		4	2	0	
Masculino	117	40	34	34	29	3	3	34	29	4	3	1	0,9	1	1



Tabela 2: Médias (\bar{x}) dos valores de Hb (hemoglobina), VGM (volume globular médio) e HGM (hemoglobina globular média), nos diferentes grupos etários, de acordo com os genótipos α -talassémia deletional e avaliação da significância estatística.

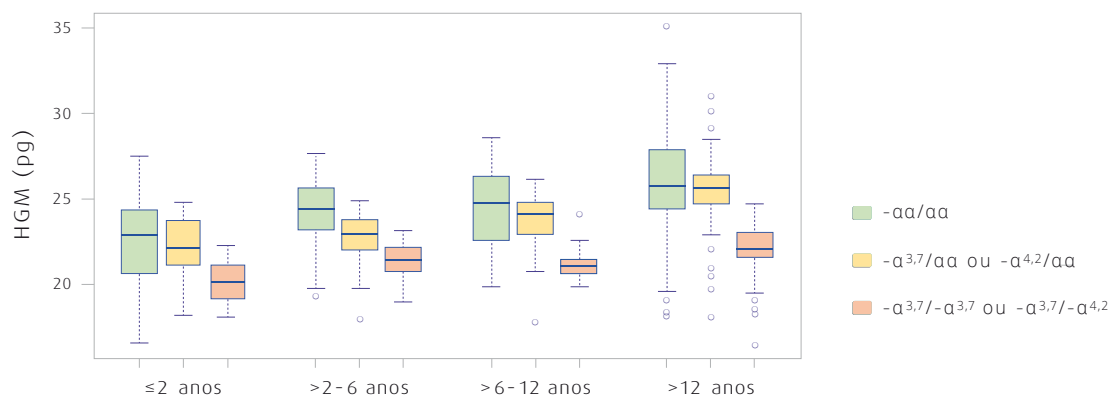
Genótipo	aa/aa			$-\alpha^{3,7}/\alpha$ e $-\alpha^{4,2}/\alpha$			$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$ e $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{4,2}$			$-\text{SEA}/\alpha$			$-\text{SEA}/-\alpha^{3,7}$		Significância estatística			
	n	\bar{x}	2S	n	\bar{x}	2S	n	\bar{x}	2S	n	\bar{x}	2S	n	\bar{x}	p_a	p_b	p_c	p_d
Hemoglobina (g/dL)																		
≤2 anos (n=92)	42	10,8	2,5	25	11,1	2,4	25	10,8	1,4						0,39	0,22	0,79	
>2-6 anos (n=58)	20	12,1	2,5	25	11,9	3,0	13	10,6	1,3						0,62	<0,01	<0,001	
>6-12 anos (n=60)	19	12,1	3,0	23	12,4	2,3	16	11,1	1,3	2	12,2	2,3			0,46	<0,001	<0,05	0,06
>12 anos F (n=169)	69	11,8	2,6	43	11,9	2,3	53	11,0	2,4	5	11,3	1,4			0,47	<0,01	<0,001	0,56
>12 anos M (n=117)	40	12,9	3,8	37	13,5	3,7	38	12,9	3,2				1	11,0	0,23	0,14	0,84	
VGM (fL)																		
≤2 anos (n=92)	42	71,0	12,1	25	69,5	8,8	25	64,3	6,8						0,29	0,91	<0,001	
>2-6 anos (n=58)	20	73,8	11,7	25	71,0	8,7	13	69,2	7,1						0,07	0,19	<0,05	
>6-12 anos (n=60)	19	75,7	14,1	23	73,3	9,7	16	68,0	7,9	2	65,8	8,1			0,28	<0,001	<0,001	0,45
>12 anos F (n=169)	69	79,6	13,8	43	79,3	11,6	53	71,0	8,6	5	69,0	2,9			0,83	<0,01	<0,001	0,40
>12 anos M (n=117)	40	81,8	15,6	37	79,6	9,9	38	71,8	7,3				1	67,4	0,14	<0,001	<0,001	
HGM (pg)																		
≤ 2 anos (n=92)	42	22,4	5,0	25	22,1	3,6	25	20,2	2,3						0,70	<0,001	<0,001	
>2-6 anos (n=58)	20	24,1	4,4	25	22,8	3,4	13	21,4	2,3						<0,05	<0,05	<0,001	
>6-12 anos (n=60)	19	24,4	5,1	23	23,7	4,1	16	21,1	2,1	2	20,8	2,7			0,32	<0,001	<0,001	0,54
>12 anos F (n=169)	69	25,7	5,6	43	25,3	4,6	53	22,0	2,8	5	22,0	0,5			0,50	<0,01	<0,001	0,93
>12 anos M (n=117)	40	26,7	6,7	37	25,7	3,7	38	22,3	2,3				1	18,3	0,10	<0,001	<0,001	

Para o grupo etário >12 anos, os géneros foram considerados separadamente.

p_a representa valor de p entre aa/aa e $-\alpha^{3,7}/\alpha$; p_b representa valor de p entre $-\alpha^{3,7}/\alpha$ e $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$;

p_c representa valor de p entre aa/aa e $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$; p_d representa valor de p entre $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$ e $-\text{SEA}/\alpha$.

Figura 2: Valores de HGM (hemoglobina globular média) dos diferentes genótipos de α -talassémia deletional, nos quatro grupos etários.





Estes resultados evidenciam que o VGM e o HGM são excelentes índices para a seleção dos testes moleculares a utilizar na identificação do genótipo. Quanto maior o número de genes alfa deletados, menores os valores de VGM e HGM. Tal como descrito previamente, o parâmetro mais fortemente correlacionado com o número de genes alfa deletados é o HGM. Encontra-se descrito que um valor de HGM < 21,9 pg é preditivo da presença de deleção α^0 (6). Os resultados (tabela 2) estão concordantes com o descrito e reforçam que o valor de *cut-off* do HGM de 25 pg, utilizado no laboratório da Unidade de Diagnóstico Laboratorial e Referência, tem sensibilidade adequada para discriminar a presença de uma deleção α^0 -talassémia.

A doença de Hb H apresentava uma anemia microcítica/hipocrômica (Hb=11g/dL; VGM=67,4fL; HGM=18,3pg) e um valor de Hb A₂ particularmente baixo (HbA₂ =1,3%). O alelo α^0 corresponde a uma deleção --^{SEA} originária do Sudeste asiático. A doença por Hb H encontra-se normalmente associada a uma redução significativa de cadeias α globina, e conseqüentemente a um excesso de cadeias β globina que levam a formação do tetrâmero β^4 (Hb H). A instabilidade da Hb H leva à presença de anemia hemolítica crónica, com microcitose e hipocromia, redução da Hb A₂ e níveis de Hb F ligeiramente aumentados (1-3%) (4).

Os casais com os genótipos $-\alpha^+/aa$ e $-\alpha^+/-\alpha^+$ podem transmitir à sua descendência um ou mais genes α^+ , no entanto não existe o risco de *Hydrops fetalis* (Hb Bart's) ou Hb H.

Por outro lado, a presença de uma deleção α^0 assume particular importância na prevenção da ocorrência de Hb Bart's na descendência de um casal em que ambos são portadores, e no seu aconselhamento genético.

Conclusão

O diagnóstico de α -talassémia deletional só pode ser efetuado por métodos moleculares, no entanto os parâmetros hematológicos são marcadores preditivos importantes do número de genes alfa deletados e na avaliação da relação genótipo/fenótipo.

Referências bibliográficas:

- (1) Beutler E, Lichtman MA, Colker BS, et al. (eds.). Williams Hematology. 5th ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division, cop. 1995.
- (2) Direção-Geral da Saúde. Circular Normativa N.º 18/DSMIA, 7/9/2004. Prevenção das formas graves de Hemoglobinopatia. <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/circular-normativa-n-18dsmia-de-07092004-pdf.aspx>
- (3) Ryan K, Bain BJ, Worthington D, et al.; British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. Br J Haematol. 2010 Apr;149(1):35-49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.08054.x>
- (4) Bain BJ (ed.). Haemoglobinopathy diagnosis. 3rd. Wiley-Blackwell, 2020.
- (5) NHS Sickle Cell and Thalassaemia Screening Programme: Handbook for antenatal laboratories. 4th ed., September 2017
- (6) Velasco-Rodríguez D, Blas C, Alonso-Domínguez JM, et al. Cut-Off Values of Hematologic Parameters to Predict the Number of Alpha Genes Deleted in Subjects with Deletional Alpha Thalassemia. Int J Mol Sci. 2017 Dec 13;18(12):2707. <https://doi.org/10.3390/ijms18122707>

_Avaliação dos teores de sal e açúcar em refeições servidas em refeitórios da Administração Pública: um estudo conjunto entre o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge e os Serviços Sociais da Administração Pública

Assessment of salt and sugar content in meals served in public administration cafeterias: a joint study between National Institute of Health Dr Ricardo Jorge of Portugal and Social Services of Public Administration in Portugal

Mariana Simão, Ana Cláudia Nascimento, Susana Santiago, Ana Cristina Bento, Susana Santos, Mariana Santos, Isabel Castanheira

marianasimao330@gmail.com

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

_Resumo

A alimentação servida nos refeitórios é uma questão de saúde pública que ganhou importância na nutrição coletiva devido ao número elevado de utentes. Em Portugal, tem sido feito um esforço para reduzir o teor de sal e de açúcar presentes nos alimentos. Porém, entre a população portuguesa ainda persiste o hábito associado ao seu elevado consumo, o que tem dificultado a redução destes dois compostos, pelas entidades reguladoras e pela indústria, nas refeições prontas a comer. Desta forma, o conhecimento dos teores de sal e açúcares totais nas refeições servidas, e a sua comparação com os valores recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), é essencial para planear medidas de prevenção a tomar pelos diversos intervenientes. Neste trabalho foi estudado o teor de sal e de açúcares totais em menus servidos em refeitórios dos Serviços Sociais da Administração Pública (SSAP). Foram efetuadas recolhas de 62 amostras de sopas e de pratos principais, posteriormente analisadas de acordo com os métodos normalizados, para a determinação do teor de açúcares totais e de sal. Verificou-se que o valor médio de sal por menu, corresponde a cerca de 50% da dose diária recomendada (DDR) pela OMS, e, que o valor de açúcares totais em algumas refeições vegetarianas foi superior a 9 g/100 g. Confirma-se, assim, ser necessário haver a monitorização dos teores de sal e açúcar nas refeições dos SSAP.

_Abstract

The food served in cafeterias is a public health issue that has gained importance in collective nutrition due to the high number of users. In Portugal, a great effort has been made to reduce the salt and sugar content in food. However, among the Portuguese, there is still a family habit associated with their high consumption, which has made it difficult to reduce these two compounds, by regulatory authorities and the industry, in ready-to-eat meals. In this way, knowledge of the salt and total sugar levels in the meals served and their comparison with the values recommended by the World Health Organization (WHO) is essential to plan preventive measures to be taken by the various stakeholders. In this work, the salt and total sugar content in menus served in cafeterias of the Social Services of Public Administration (SSAP) in Portugal were studied. 62 samples of soups and main dishes were collected and later analyzed by normalized methods, for the total sugar and salt con-

tent. It was found that the average value of salt per menu corresponds to about 50% of the recommended daily allowance (RDA) by the WHO and that the value of total sugar in some vegetarian meals the content of total sugar was higher than 9 g/100 g. These results confirm that it is necessary to monitor the salt and sugar contained in SSAP meals.

_Introdução

Dados recentes da literatura revelam que a alimentação fornecida em refeitórios de locais de trabalho, pode constituir uma oportunidade para reajustar hábitos e corrigir erros alimentares, sendo estes últimos uma das principais causas de morte neste século (1,2). Os teores de sal e de açúcar influenciam as características organolépticas dos alimentos, e são os componentes que mais contribuem para o elevado número de mortes relacionadas com erros alimentares. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda um consumo de até 2 g de sódio por dia, o equivalente a 5 g de sal por dia, para a população adulta (3). No entanto, nos dados do último Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física – IAN-AF (2015-2016), a população portuguesa apresenta um consumo médio diário de sal de 7,3 g (4). Com a criação da Estratégia Integrada para a Alimentação Saudável (EIPAS) têm sido dados passos importantes para alterar a palatabilidade de grandes grupos populacionais (5).

Reduzir o consumo de açúcares totais tornou-se ainda mais premente, pois está associado ao excesso de peso/obesidade, sendo por isso um fator de risco para as doenças crónicas (6). De acordo com os dados do IAN-AF



(2015-2016), 24,4% da população portuguesa apresenta um consumo de açúcar (açúcares livres) superior a 10% do valor energético total, ou seja, apresenta um consumo de açúcar superior ao valor máximo recomendado pela OMS (7). Estima-se que alimentos destinados a uma alimentação vegetariana tenham um teor de açúcares totais elevado. Com a introdução da Lei n.º 11/2017, que apresenta a obrigatoriedade de existir uma opção vegetariana nas ementas das cantinas e refeitórios públicos (8), surge a necessidade de monitorizarmos o teor de açúcares totais nas refeições vegetarianas.

_Objetivos

Este estudo teve como objetivo quantificar o teor de sal em sopas e pratos de carne, peixe, dieta e vegetarianos, e quantificar o teor de açúcares totais em amostras de refeições vegetarianas. As amostras foram recolhidas em refeitórios dos Serviços Sociais da Administração Pública (SSAP), incluindo o do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), no âmbito da colaboração entre o INSA e o SSAP.

_Materiais e métodos

Plano de amostragem e preparação das amostras

Neste estudo foram recolhidas, nos diversos refeitórios dos SSAP distribuídos pelo país, 30 amostras de sopa e no refeitório do INSA, 32 amostras de pratos principais (carne, peixe, dieta e vegetariano). As amostras foram pesadas no dia da receção no laboratório, de seguida foram trituradas e homogeneizadas individualmente, num moinho de facas de laboratório (GRINDOMIX GM 200). As amostras foram conservadas a -20° C até serem analisadas.

Todas as amostras foram analisadas em condições de garantia da qualidade, em concordância com a norma ISO 17025:2017 (9).

Determinação do teor de sal

O teor de sal foi determinado pelo método de Charpentier-Volhard, através da quantificação do teor total de iões de cloro expresso em percentagem de cloreto de sódio (10).

Para garantir a qualidade dos resultados, por cada análise de 6 amostras, foi feito um duplicado para cada matriz, um ensaio de recuperação (amostra com adição de padrão) e um ensaio em branco.

Os resultados foram expressos em gramas de NaCl (cloreto de sódio), por dose da amostra.

Determinação do teor de açúcar total

O teor de açúcar total foi determinado pelo método de Munson e Walker (11).

Para garantir a fiabilidade dos resultados, todas as análises foram feitas em duplicado e os resultados foram expressos em gramas de açúcar total por dose de amostra, utilizando a média das réplicas (ou a mediana, quando aplicável).

_Resultados e discussão

Neste estudo decidiu-se incluir a análise de sopas, por o seu consumo estar enraizado na cultura alimentar portuguesa, mas também porque poderá existir uma grande variabilidade na sua forma de preparação.

Nos gráficos 1a e 1b são apresentados os resultados do teor de sal de sopas e pratos principais estruturados em 4 grupos: Grupo 1: 0,0 g a < 1,0 g; Grupo 2: ≥ 1,0 g a 2,0 g; Grupo 3: ≥ 2,0 g a 3,0 g e Grupo 4: ≥ 3,0 g.

Neste trabalho foram recolhidas e analisadas 18 tipos de amostras de sopas, designadamente sopa de abóbora (3), sopa de espinafre (1), sopa de grão com espinafres (1), sopas de feijão-verde (3), sopas de alho francês (4), cremes de couve-flor (3), cremes de legumes (3), sopa das vindimas (1), macedónia de legumes (1), sopa de nabiças (1), sopa à camponesa (1), sopa de feijão e lombardo (1), sopa de repolho (1), sopa juliana (1), canja (1), sopa da pedra (1), sopa de agrião (1) e caldo verde com chouriço (1) e sem chouriço (1).

Conforme era expectável, as sopas de legumes foram as que apresentaram valores de sal mais baixos.

As sopas que apresentaram menor valor de sal, cerca de 0,4 g, foram: a sopa de espinafres, a sopa de alho francês e a sopa macedónia de legumes, compostas apenas por vegetais.



As sopas que apresentaram maior teor de sal foram: a sopa da pedra, com cerca de 3,2 g e a canja, com cerca de 2,3 g, ambas contendo carne.

Alguns dos valores de sal encontrados nas sopas foram discrepantes, o que pode estar relacionado com a forma como o operador a tempera, o tempo de cozedura, a quantidade de água e a sua evaporação ou a presença de carne, ou peixe (12).

Relativamente aos pratos principais, cujos resultados estão apresentados no gráfico 1b, foram recolhidos e analisados 32 pratos principais: 8 refeições de carne, 8 refeições de peixe, 8 refeições de dieta e 8 refeições vegetarianas.

As refeições onde se observou menor teor de sal foram: 1 refeição vegetariana com 0,2 g, 1 refeição de carne com 0,7 g e 2 refeições de peixe com 0,9 g, enquanto as refeições que apresentaram maior teor de sal foram: 1 refeição vegetariana com 3,6 g e 2 refeições de carne, tendo estas 3,2 g e 3,0 g.

A discrepância encontrada para alguns valores de sal encontrados nas refeições pode ser justificada pelos mesmos motivos apresentados relativamente às sopas, porém devem ser considerados outros fatores tais como, o teor de sal existente nos ingredientes antes de serem confeccionados (13).

Constatou-se, também, que algumas refeições com mais de 2 g de sal eram refeições de dieta, possivelmente devido ao teor de sal existente nos ingredientes adicionados.

O valor médio de sal presente nas sopas foi de 1,3 g e nas refeições de 1,8 g. O valor médio de sal presente num menu composto por sopa e prato principal foi cerca de 3,1 g, o que ultrapassa, em apenas uma refeição, 50% do valor de sal diário recomendado pela OMS.

No gráfico 2 estão representados os resultados do teor de açúcares totais em 8 pratos vegetarianos agrupados em 4 grupos: Grupo 1: 0,0 g a ≤ 3,0 g; Grupo 2: > 3,0 g a ≤ 6,0 g; Grupo 3: > 6,0 g a ≤ 9,0 g e Grupo 4: > 9,0 g.

A refeição *Nuggets de seitan com arroz de beterraba e salsa picada com molho de iogurte e limão* é a que tem menos quantidade de açúcares totais, com apenas 1,0 g.

Gráfico 1 (a-b): Teores de sal de sopas e pratos principais, em gramas por dose de amostra.

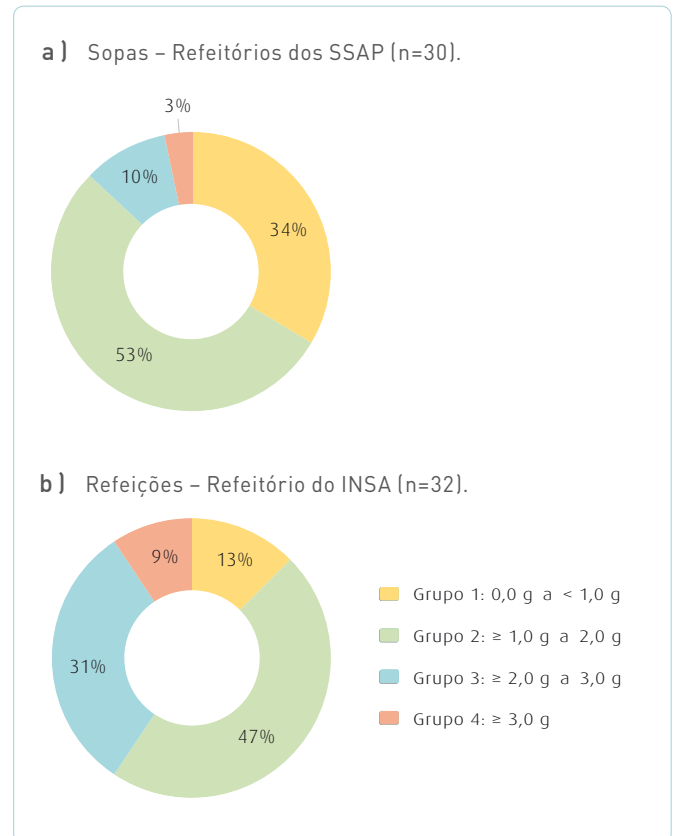
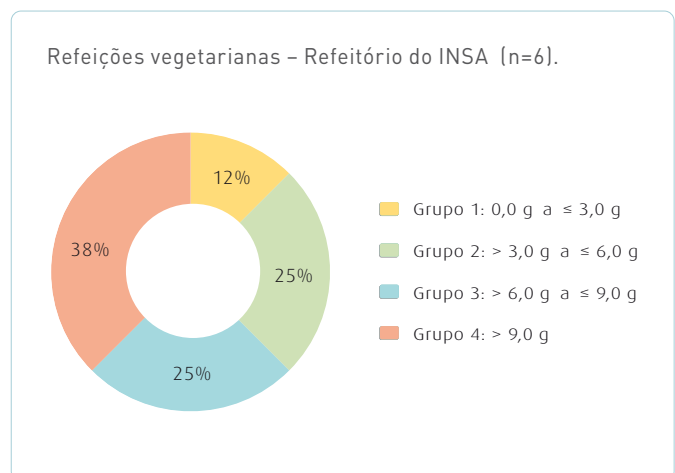


Gráfico 2: Teores de açúcares totais de refeições vegetarianas, em gramas por dose de amostra.





No entanto, verificou-se que havia refeições com valores bastante elevados, a refeição *Rancho Vegetariano* com 9,0 g de açúcares totais, a *Macarronada de soja e legumes* com 13 g de açúcares totais e o *Seitan tropical com arroz* com 15 g de açúcares totais.

O teor de açúcares totais do *Seitan tropical* é facilmente justificado pela presença de dois tipos de fruta na receita, banana e ananás. Os valores das outras duas refeições podem estar aumentados, pela quantidade de massa presente nas suas receitas, no entanto existe uma necessidade de se fazer um estudo mais aprofundado para se entender melhor quais os ingredientes que têm maior teor de açúcar e que tipo de açúcares estão presentes (ex: açúcares simples ou açúcares livres) (13,14).

Conclusão

Alguns autores advogam que o local de trabalho é adequado para a promoção da saúde e do bem-estar, e que, a implementação de medidas ao nível da modificação da oferta alimentar, aumentando a disponibilidade e variedade de opções alimentares saudáveis, são necessárias para alcançar mudanças ao nível dos hábitos alimentares dos trabalhadores.

Este estudo confirma a necessidade de implementar uma monitorização laboratorial dos teores de sal e de açúcar nas refeições servidas nos Serviços Sociais da Administração Pública (SSAP), sendo que este continua a ser um tópico que deve merecer a maior atenção por parte das entidades de saúde.

O estudo revela a importância maior que se deve dar ao teor de açúcar dos pratos vegetarianos.

Sendo o primeiro trabalho a ser desenvolvido para avaliar em conjunto o teor de sal em menus e açúcar nas refeições vegetarianas de refeitórios dos SSAP, tem bastante relevância para que, no futuro, seja possível aos Serviços Sociais alcançar as metas propostas, de redução dos teores de sal e açúcar nas refeições servidas nas cantinas.

Este trabalho foi realizado em condições de controlo de qualidade alinhadas com a ISO 17025. Assim, os resulta-

dos obtidos são fiáveis e rigorosos e podem ser utilizados pelos decisores políticos para apoio à reformulação das refeições preparadas na restauração coletiva. Trata-se de uma cooperação entre o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge e os SSAP, cujos primeiros resultados são agora apresentados.

Deve ser referido, ainda, que fatores organolépticos influenciam a adesão dos consumidores às refeições reformuladas e, por sua vez, têm influência nos indicadores de saúde, estando previstos na campanha de sensibilização e de intervenção deste projeto.

Agradecimento:

Os autores do trabalho agradecem aos Serviços Sociais de Administração Pública toda a disponibilidade para a realização do trabalho e a cedência de amostras.

Referências bibliográficas:

- (1) Organisation for Economic Co-operation and Development, European Observatory on Health Systems and Policies. Portugal: perfil de saúde do país 2021. Paris: OECD Publishing, 2021. <https://doi.org/10.1787/766c3111-pt>
- (2) Jaworowska A, Rotaru G, Christides T. Nutritional Quality of Lunches Served in South East England Hospital Staff Canteens. *Nutrients*. 2018 Dec 1;10(12):1843. <https://doi.org/10.3390/nu10121843>
- (3) World Health Organization. Guideline: sodium intake for adults and children. Geneva: WHO, 2012. <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/110243/retrieve>
- (4) 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/sites/default/files/IAN-AF%20Brochura%20de%20resultados_0.pdf
- (5) Despacho n.º 11418/2017. DR 2ª série de 2017-12-29, n.º 249:29595-8. Aprova a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS). <https://dre.pt/pesquisa/-/search/114424591/details/normal?l=1>
- (6) World Health Organization. Guideline: Sugars intake for adults and children. Geneva: WHO, 2015. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549028>
- (7) Mardones L, Villagrán M, Petermann-Rocha F, et al. Consumo de azúcares totales y su asociación con obesidad en población chilena – Resultados del estudio GENADIO. *Rev Med Chil*. 2020 Jul;148(7):906-914. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872020000700906>
- (8) Lei n.º 11/2017, de 17 de abril. Estabelece a obrigatoriedade de existência de opção vegetariana nas ementas das cantinas e refeitórios públicos. DR Série I n.º 75, 2017-04-17:1974. <https://dre.pt/dre/detalhe/lei/11-2017-106886578>
- (9) ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- (10) NP 1845:1982. Carnes, derivados e produtos cárneos – Determinação do teor de cloretos. Método corrente.
- (11) NP 1419:1987. Frutos, produtos hortícolas e seus derivados. Determinação dos açúcares redutores e dos açúcares não redutores (sacarose). Técnica de Munson e Walker.



artigos breves_ n. 6

- (12) de Castro Rda S, Giatti L, Barreto SM. Fatores associados à adição de sal à refeição pronta. *Cien Saude Colet*. 2014 May;19(5):1503-12. <https://doi.org/10.1590/1413-81232014195.13212013>
- (13) Petit G, Jury V, de Lamballerie M, et al. Salt Intake from Processed Meat Products: Benefits, Risks and Evolving Practices. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2019 Sep;18(5):1453-1473. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12478>
- (14) Mela DJ, Woolner EM. Perspective: Total, Added, or Free? What Kind of Sugars Should We Be Talking About? *Adv Nutr*. 2018 Mar 1;9(2):63-69. <https://doi.org/10.1093/advances/nmx020>

_Avaliação das características nutricionais de hambúrgueres e iogurtes de base vegetal disponíveis no mercado português em 2022

Assessment of the nutritional characteristics of plant-based hamburgers and yogurts available in the Portuguese market in 2022

Roberto Brazão, Paulo Fernandes, Andreia Lopes, M. Graça Dias

roberto.brazao@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

A procura por alternativas aos alimentos de origem animal tem contribuído para a crescente popularidade e disponibilidade de produtos processados de base vegetal em Portugal, à semelhança do resto do mundo. Apesar dos benefícios de uma dieta à base de plantas, as características nutricionais dos alimentos processados de base vegetal poderão não corresponder à aura saudável que lhes está associada, eventualmente existindo alguns destes novos produtos com teores elevados de ácidos gordos saturados, açúcares e sal. Neste âmbito, procurou-se avaliar as características nutricionais de hambúrgueres e de iogurtes à base de plantas disponíveis no mercado português, através da comparação da respetiva informação nutricional com os valores de referência da Estratégia Integrada para Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS) e do descodificador de rótulos da Direção-Geral da Saúde. Foram monitorizados 234 produtos processados de base vegetal, tendo-se verificado que 88,5% não estavam de acordo com as metas de referência da EIPAS, quando avaliados conjuntamente os teores de açúcares e de sal. De acordo com o descodificador de rótulos, a maioria dos hambúrgueres de base vegetal apresentava baixos teores de ácidos gordos saturados (67,9%) e de açúcares (97,8%), no entanto, a percentagem destes produtos com teores médios ou altos de sal era consideravelmente elevada (99,3%). Relativamente às alternativas vegetais aos iogurtes, nenhum apresentava teores altos de açúcares e a maioria apresentava baixos teores de lípidos (62,0%), ácidos gordos saturados (64,0%) e de sal (97,8%), tendo-se verificado, ainda, que 19,0% apresentavam teores altos de ácidos gordos saturados. Neste contexto, para manutenção de um padrão alimentar saudável, as decisões de compra de alimentos processados de base vegetal devem ser muito bem ponderadas. Simultaneamente, a amplitude de valores encontrada para os vários parâmetros nutricionais analisados, na mesma categoria de produtos, revela a possibilidade de uma reformulação destes alimentos pelos seus produtores.

_Abstract

The search for alternatives to food products of animal origin has contributed to the growing popularity and availability of plant-based processed products in Portugal, as in worldwide. Despite the benefits of a plant-based diet, the nutritional characteristics of plant-based processed foods may not correspond to the healthy aura associated to them, and there may be some of these new products with high levels of saturates, sugars and salt. In this context, we sought to evaluate

the nutritional characteristics of plant-based hamburgers and yogurts available in the Portuguese market, by comparing the respective nutritional information with the reference values of the Integrated Strategy for Healthy Eating Promotion (EIPAS) and of the Label Decoder of the Directorate-General of Health of Portugal. A total of 234 plant-based processed products were monitored, and it was found that 88.5% did not comply with the EIPAS reference values, when jointly evaluated the sugars and salt contents. According to the Label Decoder, the majority of the hamburgers had low levels of saturates (67.9%) and sugars (97.8%), however, the percentage of these products with medium or high levels of salt was considerably high (99.3%). Regarding yogurts, none had high levels of sugars and the majority had low levels of fat (62.0%), saturates (64.0%) and salt (97.8%) and it was also verified that 19.0% had high levels of saturates. In this context, in order to maintain a healthy eating pattern, decisions to purchase plant-based processed foods must be carefully weighted. Simultaneously, the range of values found for the various nutritional parameters analyzed, in the same category of products, reveal the possibility of a reformulation of these foods by their producers.

_Introdução

A procura por produtos processados de base vegetal tem crescido significativamente nos últimos anos, na maioria dos países desenvolvidos, por razões ideológicas e/ou relacionadas com a saúde e o ambiente. Estes novos alimentos, que têm na base da sua composição vegetais, leguminosas, frutos secos, sementes, especiarias e/ou temperos e que se caracterizam pela ausência de ingredientes de origem animal, procuram exatamente ser uma alternativa aos produtos de origem animal, podendo contribuir para um consumo alimentar mais saudável e sustentável.

Uma dieta diária rica em vegetais e com baixo teor de sal, gorduras saturadas e açúcares adicionados é recomendada como parte de um estilo de vida saudável ⁽¹⁾. No entanto,



apesar dos benefícios associados ao consumo de alimentos à base de plantas, alguns destes produtos disponíveis no mercado nas formas processados e ultraprocessados poderão apresentar características nutricionais inadequadas a um padrão alimentar saudável. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), faltam dados sobre as qualidades nutricionais e os impactos na saúde decorrentes do consumo de alimentos à base de plantas (2).

Neste contexto, procurou-se avaliar as características nutricionais de duas categorias de alimentos processados de base vegetal disponíveis no mercado português, por comparação com os correspondentes valores de referência definidos na Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS) (3) e no descodificador de rótulos da Direção-Geral da Saúde (DGS) (4).

_Objetivo

Avaliar as características nutricionais de hambúrgueres e de iogurtes de base vegetal disponíveis no mercado português, através da comparação de alguns dados da respetiva informação nutricional com os valores de referência definidos na Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável e no descodificador de rótulos da Direção-Geral da Saúde, procurando caracterizar a realidade atual.

_Métodos

Recolheu-se a informação nutricional – energia (kcal), lípidos (g), ácidos gordos saturados (g), hidratos de carbono (g), açúcares (g), fibra (g), proteínas (g) e sal (g) – por 100 g /100 ml, de duas categorias alimentares de produtos processados de base vegetal: Hambúrgueres (abreviada na designação HambVeg) e Alternativas vegetais aos iogurtes (abreviada na designação Vegurt). Os respetivos produtos foram selecionados de forma aleatória, entre janeiro e fevereiro de 2022, em *websites* nacionais de empresas de comércio e de distribuição alimentar. Posteriormente, avaliaram-se as características nutricionais destes alimentos, por comparação da informação recolhida com os valores de referência da EIPAS (tabela 1) e do descodificador de rótulos da DGS (figura 1).

É de salientar que a categoria Vegurt inclui produtos sólidos e líquidos, no entanto, para efeitos deste estudo consideraram-se todos como sendo sólidos e, também, que o volume de 100 ml é equivalente a 100 g. Deste modo, o valor de referência da EIPAS tido em consideração para os açúcares foi apenas o de 5 g/100 g. Acrescenta-se, ainda, que não foi possível a recolha de dados de fibra para um grande número de produtos estudados, uma vez que a sua indicação na declaração nutricional presente nos rótulos não é obrigatória.

Tabela 1: Valores de referência da Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável para produtos alimentares em geral e para sopas e pratos de refeição em particular.

Categoria de alimentos	Objetivos da EIPAS	Valores de referência da EIPAS (g/100 g ou 100 ml)	
		Açúcares	Sal
Produtos alimentares em geral	Atingir os valores definidos pelo Regulamento (CE) n.º 1924/2006, relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos, para alimentos com baixo teor de açúcar e de sal	≤ 5 (sólidos)	≤ 0,3
Sopas & Refeições	Atingir o valor de referência definido por um grupo de trabalho interministerial	≤ 2,5 (líquidos)	< 0,2

Adaptado de: Despacho n.º 11418/2017, de 29 de dezembro (3).



Figura 1: ▾ Decodificador de rótulos da Direção-Geral da Saúde – alimentos por 100 g (4).

ALIMENTOS por 100g				
	GORDURA (Lípidos)	GORDURA SATURADA	AÇÚCARES	SAL
ALTO	mais de 17,5g	mais de 5g	mais de 22,5g	mais de 1,5g
MÉDIO	entre 3 e 17,5g	entre 1,5 e 5g	entre 5 e 22,5g	entre 0,3 e 1,5g
BAIXO	3g ou menos	1,5g ou menos	5g ou menos	0,3g ou menos

_Resultados

Foram avaliados 234 produtos processados de base vegetal: 134 HambVeg; e 100 Vegurt; tendo-se verificado que 67,9% (n=159) estavam de acordo com o valor de referência da EIPAS para os açúcares, mas apenas 40,6% (n=95) satisfaziam o definido para o sal. Deste modo, quando avaliados os dois parâmetros conjuntamente, verificou-se que somente uma pequena percentagem de produtos (11,5%; n=27) satisfazia esses valores de referência em simultâneo (gráfico 1). Por categoria, as percentagens de produtos que satisfaziam os referidos valores de referência foram de 0,7% (n=1) para os HambVeg e de 26,0% (n=26) para os Vegurt (gráfico 2).

Gráfico 1: ▾ Concordância dos produtos processados de base vegetal estudados com os valores de referência da Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável.

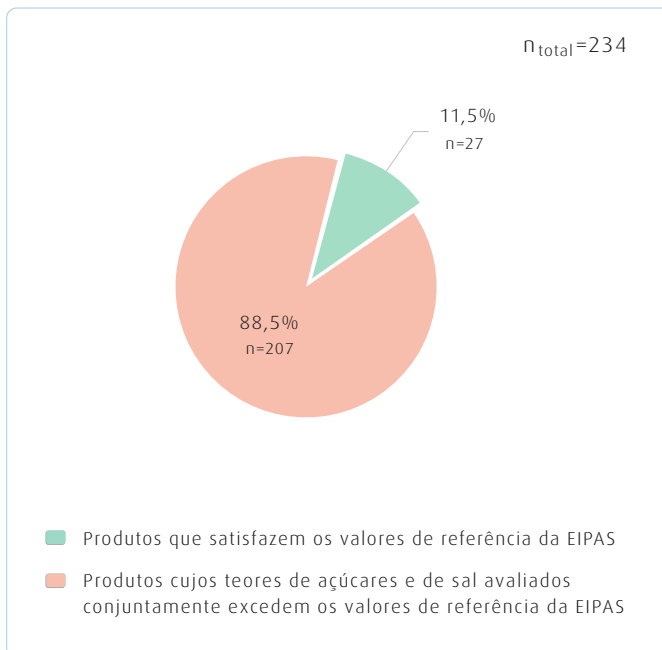
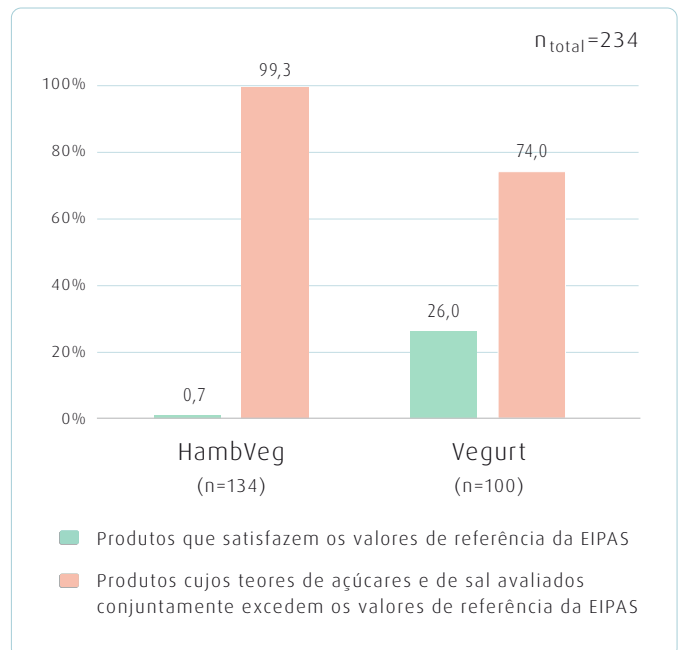


Gráfico 2: ▾ Concordância dos produtos processados de base vegetal com os valores de referência da Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável, por categorias estudadas.





artigos breves_ n. 7

Considerando os valores de referência do descodificador de rótulos da DGS (figura 1), verificou-se que as percentagens de HambVeg que apresentavam teores baixos de lípidos, ácidos gordos saturados, açúcares e sal, e que é sinónimo de uma melhor qualidade nutricional, foram respetivamente: 0,0% (n=0), 67,9% (n=91), 97,8% (n=131) e 0,7% (n=1). Por outro lado, 100% (n=134), 32,1% (n=43), 2,2% (n=3) e 99,3% (n=133) dos HambVeg apresentavam teores médios ou altos dos referidos nutrientes (tabela 2). Relativamente aos Vegurt, verificou-se que a maioria apresentava baixos teores de lípidos, ácidos gordos saturados

e sal, respetivamente 62,0% (n=62), 64,0% (n=64), e 94,0% (n=94), e que, por outro lado, 38,0% (n=38), 36,0% (n=36), 72,0% (n=72) e 6,0% (n=6) apresentavam teores médios ou altos desses mesmos nutrientes (tabela 2).

Procurando avaliar de forma mais completa os produtos processados de base vegetal em estudo, determinou-se o mínimo, a média e o máximo, para os parâmetros nutricionais: energia (kcal), lípidos (g), ácidos gordos saturados (g), hidratos de carbono (g), açúcares (g), fibra (g), proteínas (g) e sal (g), por 100 g, para ambas as categorias (tabela 3).

Tabela 2: Percentagens de HambVeg e de Vegurt com teores “Alto”, “Médio” e “Baixo” correspondentes aos diferentes parâmetros nutricionais avaliados, tendo em consideração os valores de referência do descodificador de rótulos da Direção-Geral da Saúde.

	HambVeg (n=134)				Vegurt (n=100)			
	Lípidos	Ácidos gordos saturados	Açúcares	Sal	Lípidos	Ácidos gordos saturados	Açúcares	Sal
Alto	3,0%	3,7%	0,0%	16,4%	0,0%	19,0%	0,0%	0,0%
Médio	97,0%	28,4%	2,2%	82,8%	38,0%	17,0%	72,0%	6,0%
Baixo	0,0%	67,9%	97,8%	0,7%	62,0%	64,0%	28,0%	94,0%

Tabela 3: Estatísticas dos parâmetros nutricionais para as categorias de produtos processados de base vegetal em estudo.

		Energia	Lípidos	Ácidos gordos saturados	Hidratos de carbono	Açúcares	Fibra*	Proteínas	Sal
		kcal	(g/100g)						
HambVeg (n=134)	Mínimo	124	3,4	0,4	1,9	0,0	0,0	0,9	0,03
	Média	202	9,5	1,6	14,5	2,2	4,8	12,5	1,19
	Máximo	324	9,1	6,5	34,2	5,5	14,0	27,0	2,10
Vegurt (n=100)	Mínimo	35	1,3	0,2	0,0	0,0	0,1	0,2	0,01
	Média	83	3,7	2,2	9,4	6,9	1,1	2,4	0,13
	Máximo	134	11,9	10,5	19,0	14,0	4,5	6,4	0,60

* As estatísticas apresentadas para este parâmetro nutricional são referentes a um número de produtos inferior (n=179) à amostra total de produtos processados de base vegetal avaliados (n=234).



Considerando conjuntamente os teores médios referentes aos açúcares e ao sal, verificou-se que nenhuma das categorias alimentares em estudo estava de acordo com os valores de referência da EIPAS. À categoria HambVeg correspondia uma média dos teores de açúcares de 2,2 g/100 g, no entanto, apresentava uma média dos teores de sal (1,19 g/100 g) muito superior ao valor de referência da EIPAS (0,3 g/100 g); e à categoria Vegurt correspondia uma média dos teores de açúcares de 6,9 g/100 g, portanto superior ao valor de referência da EIPAS (5 g/100 g), apesar da média dos teores de sal (0,13 g/100 g) ser inferior ao respetivo valor de referência (tabela 3).

No que se refere ao valor energético, os HambVeg apresentavam um valor médio de 202 kcal/100 g e os Vegurt de 83 kcal/100 g (Vegurt) (tabela 3), o que significa que, de acordo com a definição de “Baixo valor energético” (≤ 40 kcal/100 g) constante do Regulamento (CE) n.º 1924/2006 (5), nenhuma destas categorias pode ter essa classificação. Apesar da elevada densidade energética dos HambVeg, verificou-se que as médias dos seus teores de lípidos (9,5 g/100 g), ácidos gordos saturados (1,6 g/100 g), açúcares (2,2 g/100 g), e sal (1,19 g/100 g) eram, de acordo com o descodificador de rótulos, médias ou baixas.

Estes resultados demonstram a grande discrepância de valores existente na mesma categoria alimentar, para os vários parâmetros nutricionais avaliados.

_Conclusão

A grande maioria dos produtos processados de base vegetal estudados (88,5%) não estava de acordo com os valores de referência da Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS) para os açúcares e sal, quando avaliados conjuntamente.

Em ambas as categorias, foi possível encontrar alguns alimentos concordantes com os referidos valores de referência avaliados simultaneamente, no entanto, em percentagens reduzidas (HambVeg=0,7% e Vegurt=24%). Apesar disso, quando considerados conjuntamente os teores médios determinados para os açúcares e sal, verificou-se

que nenhuma categoria satisfazia as metas de referência da EIPAS.

À categoria HambVeg correspondiam percentagens consideravelmente elevadas de produtos com teores médios ou altos de lípidos e de sal (100% e 99,3%, respetivamente). À categoria Vegurt correspondia uma percentagem elevada de produtos com teores médios de açúcares (72,0%).

Os vários resultados obtidos demonstram a grande discrepância de valores existente para os vários parâmetros nutricionais avaliados, dentro da mesma categoria alimentar, o que reflete a possibilidade de uma reformulação destes alimentos pelos seus produtores, para se obterem perfis nutricionais mais saudáveis.

Neste contexto, a compra de alimentos processados de base vegetal deve ser muito bem ponderada, sendo a literacia alimentar e a leitura completa do rótulo indispensáveis à realização de escolhas alimentares mais adequadas.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Regional Office for Europe. Plant-based diets and their impact on health, sustainability and the environment: a review of the evidence: WHO European Office for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2021. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/349086>.
- (2) World Health Organization. Regional Office for Europe. Healthy and Sustainable Diets: Key workstreams in the WHO European Region: Factsheet. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2021. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340295>
- (3) Despacho n.º 11418/2017. DR 2ª série de 2017-12-29, nº 249:29595-8. Aprova a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS). <https://dre.pt/dre/detalhe/despacho/11418-2017-114424591>
- (4) Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável. Direção-Geral da Saúde. Descodificador de rótulos. [online]. Disponível em: <https://alimentacaosaudavel.dgs.pt/descodificador-de-rotulos/>
- (5) União Europeia. Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de dezembro de 2006, relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos. JO 30.12.2006: L 404/9-25. <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1924/oj>

Caracterização do perfil de iodo em alimentos consumidos por vegetarianos

Characterization of the iodine profile in foods consumed by vegetarians

Inês Delgado^{1,2}, Cátia Patrício³, Dina Ribeiro³, Marta Ventura^{1,4}, Sandra Gueifão^{1,2}, Andreia Rego^{1,2}, Mariana Ribeiro^{1,2}, Isabel Castanheira^{1,4}, Inês Coelho¹

ines.delgado@insa.min-saude.pt

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

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

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

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

_Resumo

A dieta vegetariana é um padrão alimentar que tem ganho popularidade na última década em todo o mundo, por motivos éticos, de saúde, religiosos e também ambientais. No entanto, a preocupação com a escolha desta dieta e a supressão de todas as necessidades nutricionais tem vindo a ganhar relevância. Assim, as carências nutricionais, nomeadamente de iodo, na população vegetariana, têm sido alvo de estudos no sentido de entender se a alimentação, por si só, consegue fornecer os valores diários recomendados para este elemento. Neste estudo, determinou-se o teor de iodo, por espectrometria de massa com plasma indutivo acoplado (ICP-MS), em 37 alimentos mais consumidos pela população vegetariana. A seleção dos alimentos foi feita tendo por base o Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física. Entre os alimentos analisados as algas *Nori* apresentam os valores mais elevados de iodo com cerca de $6511 \pm 321 \mu\text{g}/100 \text{ g}$, podendo ser um alimento que se consumido na quantidade de cerca de 2,3 g/dia (equivalente a 1 folha) poderá suprir as necessidades nutricionais deste elemento. Também os lacticínios, nomeadamente os queijos (entre $53,4 \pm 0,4$ e $28,0 \pm 0,9 \mu\text{g}/100 \text{ g}$) e os iogurtes (entre $17,2 \pm 0,2$ e $14,4 \pm 0,1 \mu\text{g}/100 \text{ g}$), são alimentos com teores de iodo relevantes. Apenas com a alimentação, a população vegetariana e *vegan* poderá ter dificuldade em alcançar as necessidades diárias de iodo ($150 \mu\text{g}/\text{dia}$), sendo assim necessário criar alternativas para aumentar os teores de iodo na alimentação. A fortificação das plantas e também dos alimentos, a utilização de sal iodado na confeção ou, se necessário, a suplementação desta população mais suscetível, são estratégias alternativas possíveis. É essencial perceber mais sobre o padrão de alimentação desta população a fim de perceber a melhor forma de mitigar este tipo de carência.

_Abstract

The vegetarian diet is a dietary pattern that has gained popularity in the last decade around the world, due to ethical, health, religious and environmental reasons. However, the concern with the choice of this diet and the suppression of all nutritional needs has gained relevance. Nutritional deficiencies, namely iodine in this population, have been the subject of studies to understand whether diet by itself can provide the recommended daily values for this element. Thus,

the iodine content was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in thirty-seven foods most consumed by the vegetarian population. The selection of foods was based on the National Food and Physical Activity Survey of Portugal. Among the analysed foods, *Nori* seaweeds have the highest levels of iodine with about $6511 \pm 321 \mu\text{g}/100 \text{ g}$, which may be a way to meet the nutritional needs of this element, consuming about 2.3 g/day (equivalent to 1 leaf), followed by dairy products, namely cheeses (between 53.4 ± 0.4 and $28.0 \pm 0.9 \mu\text{g}/100 \text{ g}$) and yoghurts (between 17.2 ± 0.2 and $14.4 \pm 0.1 \mu\text{g} /100 \text{ g}$). Just with food, the vegetarian and vegan population may have difficulty to achieve the daily iodine requirement ($150 \mu\text{g}/\text{day}$). Therefore, it is necessary to create alternatives to increase the levels of iodine in the diet, such as, for example, the fortification of crops and also of foods, the use of iodized salt in the preparation of food or, if necessary, through the supplementation of this more susceptible population. It is essential to understand more about the eating pattern of this population in order to understand the best way to mitigate this type of deficiency.

_Introdução

A dieta vegetariana tem ganho popularidade na última década e de facto, tem-se verificado que um aumento do consumo de alimentos de origem vegetal apresenta inúmeros benefícios para a saúde (1). Uma dieta vegetariana pode ser saudável, variada, equilibrada e balanceada desde que apresente as porções adequadas a cada indivíduo. Segundo a Associação Vegetariana Portuguesa, o número de vegetarianos quadruplicou nos últimos dez anos, representando atualmente cerca de 9% da população residente em Portugal (2,3).

Porém, este tipo de dieta requer atenção quanto à ingestão de nutrientes e micronutrientes, entre os quais o iodo,



e à possível carência associada à população que pratica este tipo de padrão alimentar. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu 150 µg de iodo como o aporte diário recomendado para a população geral adulta, de forma a colmatar as necessidades nutricionais (1). O aporte inadequado deste oligoelemento tem efeitos nocivos para a saúde nomeadamente associados à função tiroideia e à produção de hormonas T3 e T4. Para que a produção destas hormonas seja eficiente é necessária uma acumulação de iodo na tiroide, que só assim desempenha o seu papel adequadamente. Caso o aporte de iodo fique comprometido, as consequências podem apresentar-se sob a forma de hipotireoidismo, bócio ou a formação de nódulos. Estas consequências podem apresentar repercussões irreversíveis em bebés ou fetos quando os défices nutricionais ocorrem em lactantes ou grávidas, respetivamente. Nestas populações os valores diários recomendados encontram-se entre os 175 e os 200 µg por dia, tendo os défices nutricionais, neste ciclo de vida, um impacto no neurodesenvolvimento do feto ou bebé, comprometendo o seu desenvolvimento e cognição (1,4,5).

Através da alimentação tradicional é possível suprir as necessidades de iodo diárias. Os alimentos com maiores teores deste elemento são os laticínios, ovos, peixe, crustáceos e algas, no entanto, nem todos se enquadram na dieta vegetariana (6). Com a restrição de alguns alimentos ricos em iodo, a obtenção dos valores diários recomendados pode estar comprometida. Segundo a literatura, na população vegetariana há tendência para a deficiência neste oligoelemento (7). Assim, torna-se importante perceber, se considerando os alimentos mais consumidos pelos vegetarianos as necessidades diárias são supridas ou se haverá risco de carência nutricional.

_Objetivo

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a contribuição dos alimentos para o aporte de iodo em populações vegetarianas, através da quantificação do teor deste elemento em alimentos mais consumidos por esta população.

_Materiais e métodos

Foram selecionadas amostras de alimentos mais consumidos pela população vegetariana segundo o Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (IAN-AF). Foram analisadas bebidas vegetais (arroz e amêndoa), “natas” vegetais, creme vegetal (soja e óleos vegetais), cogumelos (*Marron* e *Pleurothus*), rebentos de soja, rebentos de bambu, alga *Nori*, *Vegegurte* (soja e coco), queijo fresco (cabra e vaca magro e meio-gordo), bagas de goji, sementes (chia, abóbora e girassol), proteína de soja texturizada, iogurte grego (natural e com fruta), trigo sarraceno, *bulgur* de trigo, farinha de espelta, salsicha de soja, *seitan*, castanha do brasil, sobremesa de soja, *millet*, *miso*, lentilhas, feijão (branco, catarino, encarnado, frade e manteiga). Foram analisadas no total 37 amostras, das marcas com maior aceitação pelo consumidor. O teor de iodo foi determinado por espectrometria de massa com plasma indutivo acoplado (ICP-MS) tendo por base a norma EN 15111:2007 (*Foodstuffs – Determination of trace elements – Determination of iodine by ICP-MS*). Os resultados foram obtidos em triplicado em condições de garantia da qualidade e suportados pelos requisitos descritos na NP EN ISO/IEC 17025:2018 (Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração). O teor de iodo foi expresso em µg de iodo por 100 g de alimento.

_Resultados e discussão

A popularidade das dietas vegetarianas e *vegan* aumentou na última década e a necessidade de perceber que alimentos consumidos pelos vegetarianos podem colmatar o défice nutricional em iodo tornou-se uma questão pertinente (2). Segundo a [tabela 1](#), foi na alga *Nori* que se obteve o teor de iodo mais elevado (6511 ± 321 µg/100 g). O valor obtido nesta alga é inferior a valores reportados na Dinamarca para outras algas, como a *Kombu* e *Agar-agar*, que apresentaram ambas 36000 µg/100 g (8). Todavia, os valores obtidos nas algas *Nori* são bastante expressivos e podem representar uma alternativa para chegar ao aporte nutricional deste oligoelemento no dia alimentar dos vegetarianos. Para suprir as necessidades diárias de iodo apenas



Tabela 1: Dez dos alimentos analisados com níveis de iodo mais elevados.

Alimento	Valores de iodo ($\mu\text{g} / 100 \text{ g}$)
Alga <i>Nori</i>	6511 \pm 321
Queijo fresco de cabra	53,4 \pm 0,4
Queijo fresco de vaca magro	52,3 \pm 2,0
Queijo fresco de vaca meio-gordo	28,0 \pm 0,9
logurte grego natural sem açúcar	17,2 \pm 0,2
logurte grego com fruta	14,4 \pm 0,1
<i>Seitan</i>	11,4 \pm 0,1
Rebentos de feijão mungo	8,88 \pm 0,32
Salsicha de soja	2,69 \pm 0,07
<i>Vegegurte</i> de coco	0,68 \pm 0,06
Restantes amostras	< 1,22 (LQ)

LQ – Limite de quantificação

com o consumo de alga *Nori* ter-se-ia de consumir cerca de 2,3 g/dia (equivalente aproximadamente a 1 folha), por forma a perfazer os 150 $\mu\text{g}/\text{dia}$.

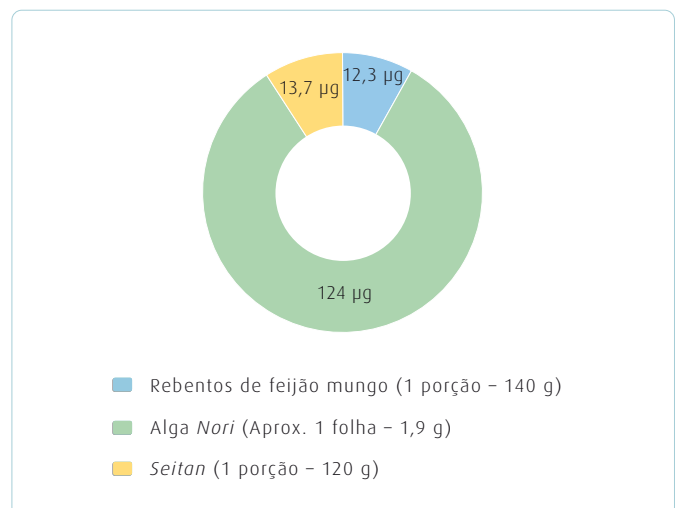
Para a população vegetariana, que consome laticínios, estes têm um papel importante no aporte diário de iodo e podem contribuir para cerca de 22 a 29 % das necessidades diárias (9). No caso dos laticínios analisados os valores variaram entre os 14,4 \pm 0,1 e os 53,4 \pm 0,4 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$. No caso do queijo fresco de cabra, o consumo de diário de uma porção equivalente a 100 g, pode colmatar 2/3 da dose de iodo necessária (10). Porém, os vegetarianos ou mesmo *vegans* que usam substitutos vegetais em detrimento dos laticínios, podem ter maior dificuldade em obter teores de iodo adequados. Nalguns países, como a Noruega, algumas bebidas vegetais são enriquecidas em iodo para permitir um maior aporte por parte desta população (4).

O *seitan*, que é utilizado como "substituto" da carne pelos vegetarianos, apresentou valores de 11,4 \pm 0,1 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$. No entanto, este é um valor com pouca relevância no dia alimentar como é possível perceber no gráfico 1, mesmo cumprindo a porção diária (120 g/dia) recomendada deste alimento pela *Food-Based Dietary Guidelines in*

Europe (11). Os restantes alimentos analisados apresentaram teores baixos de iodo na sua composição e nalguns casos valores abaixo do limite de quantificação (LQ). Desta forma, pode dizer-se que não são uma boa fonte de iodo na alimentação.

Tendo em conta que dos vários tipos de vegetarianos os *vegans* são a população com maior restrição alimentar, eliminando todo o tipo de alimentos de origem animal, como por exemplo, ovos e laticínios, estes podem ter maior dificuldade em suprir as necessidades nutricionais em iodo. Assim, para que um indivíduo com uma dieta *vegan*, chegue ao valor de 150 μg de iodo/dia recomendado pela Direção-Geral da Saúde, necessitará de inserir na sua alimentação o consumo de algas (gráfico 1) (1). Adequando os alimentos analisados com maior teor de iodo às porções diárias recomendadas, sem a inclusão de algas na alimentação, é difícil obter a dose diária recomendada (DDR) apenas com os alimentos de origem vegetal. De notar, que não estão a ser consideradas as necessidades nutricionais acrescidas das grávidas e lactantes, sendo, nestes casos, a DDR mais elevada (175 e 200 $\mu\text{g}/\text{dia}$, respetivamente) (1). Segundo uma revisão sistemática sobre a ingestão alimentar e o *status* nutricional, as algas são uma boa fonte de iodo. No entanto,

Gráfico 1: Proporção da ingestão de iodo a partir do consumo alimentar para obtenção da dose diária recomendada (DDR) (1).





a quantidade deste elemento pode variar bastante dependendo do tipo de alga e local da recolha. Sendo pequena a quantidade consumida deste alimento, e não havendo outros alimentos de origem vegetal que permitam colmatar as necessidades nutricionais em iodo, a adequação nutricional em *vegans*, pode estar comprometida (7).

Será importante incluir outros métodos de obtenção de iodo através da alimentação. Noutros países já são aplicadas estratégias como a fortificação das plantações ou até de alimentos, como por exemplo de bebidas vegetais (12). Por outro lado, também a suplementação com *microalgae*, está a ser estudada e poderá ser uma alternativa mais natural e com possibilidade de evitar a carência nutricional (4). Em Portugal, foi implementada a fortificação do sal de cozinha e executada a medida da sua utilização em cantinas escolares, sendo uma opção para aumentar o consumo deste elemento (13). Nos casos em que a necessidade de alcançar os valores de iodo é mais urgente, como é o caso das grávidas, uma alternativa será a suplementação de iodo (14).

Conclusão

O método analítico foi aplicado com sucesso para determinar o teor de iodo em alimentos consumidos pela população vegetariana.

A alga *Nori* e os lacticínios apresentaram os teores mais elevados de iodo. Neste último grupo de alimentos destacam-se os queijos com valores mais elevados de iodo. Porém, nem todos os vegetarianos consomem lacticínios e, por conseguinte, a população vegetariana e *vegan*, pode estar com algum comprometimento quanto ao aporte diário de iodo. O consumo de alga *Nori*, pode ser uma alternativa, mas poderá não ser exequível a sua inclusão na alimentação diária.

No caso de grávidas e lactantes vegetarianas ou *vegans*, a carência nutricional pode ser uma situação mais preocupante, tendo em conta que poderá provocar alterações de neurodesenvolvimento no feto e no bebé. Assim, é necessário ponderar alternativas que possam amenizar os défices nutricionais de iodo, para prevenir possíveis conse-

quências na saúde. Estas poderão incluir a utilização do sal iodado, a fortificação das plantações, a fortificação de alimentos ou a suplementação.

Como trabalho futuro, são necessários mais estudos sobre a alimentação dos vegetarianos e *vegans* para entender as reais carências nutricionais e quais os alimentos a privilegiar para mitigar esta problemática.

Referências bibliográficas:

- (1) Teixeira D, Calhau C, Pestana D, et al. Iodo – Importância para a Saúde e o Papel da Alimentação. Lisboa: Direção-Geral da Saúde, 2014. https://nutrimento.pt/activeapp/wp-content/uploads/2015/03/Iodo_Import%C3%A2ncia-para-a-sa%C3%BAde-e-o-papel-da-alimenta%C3%A7%C3%A3o.pdf
- (2) Hargreaves SM, Raposo A, Saraiva A, et al. Vegetarian Diet: An Overview through the Perspective of Quality of Life Domains. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Apr 12;18(8):4067. <https://doi.org/10.3390/ijerph18084067>
- (3) Associação Vegetariana Portuguesa. Crescimento da População Veggie em Portugal [online]. [consult. 23/8/2022]. <https://www.avp.org.pt/crescimento-populacao-veggie-portugal/>
- (4) Groufh-Jacobsen S, Hess SY, Aakre I, et al. Vegans, Vegetarians and Pescatarians Are at Risk of Iodine Deficiency in Norway. *Nutrients*. 2020 Nov 20;12(11):3555. <https://doi.org/10.3390/nu12113555>
- (5) Shelor CP, Dasgupta PK. Review of analytical methods for the quantification of iodine in complex matrices. *Anal Chim Acta*. 2011 Sep 19;702(1):16-36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.05.039>
- (6) van der Reijden OL, Zimmermann MB, Galetti V. Iodine in dairy milk: Sources, concentrations and importance to human health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2017 Aug;31(4):385-395. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.004>
- (7) Neufingerl N, Eilander A. Nutrient Intake and Status in Adults Consuming Plant-Based Diets Compared to Meat-Eaters: A Systematic Review. *Nutrients*. 2021 Dec 23;14(1):29. <https://doi.org/10.3390/nu14010029>
- (8) Food Institute, Technical University of Denmark. Frida fooddata [online]. Published 2020. <https://frida.fooddata.dk/>
- (9) Iacone R, Iaccarino Idelson P, Russo O, et al; on behalf of The Minisal-Gircsi Study Group. Iodine Intake from Food and Iodized Salt as Related to Dietary Salt Consumption in the Italian Adult General Population. *Nutrients*. 2021 Sep 30;13(10):3486. <https://doi.org/10.3390/nu13103486>
- (10) Associação Portuguesa de Nutrição. Manual de "Equivalentes" Alimentares. Porto: APN, 2019.
- (11) European Commission. Food-Based Dietary Guidelines in Europe [online]. [consult. 23/8/2022]. https://knowledge4policy.ec.europa.eu/health-promotion-knowledge-gateway/to-pic/food-based-dietary-guidelines-europe_en
- (12) Gonzali S, Kiferle C, Perata P. Iodine biofortification of crops: agronomic biofortification, metabolic engineering and iodine bioavailability. *Curr Opin Biotechnol*. 2017 Apr;44:16-26. Epub 2016 Oct 28. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.10.004>
- (13) Delgado I, Coelho I, Silva JAL da, et al. Avaliação do teor de iodo nas refeições de escolas portuguesas do 1º ciclo após a introdução do programa de iodização do sal. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2019;8(25):23-25. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/6449>
- (14) Teixeira D, Marinho R, Mota I, et al. Alimentação e Nutrição na Gravidez. Lisboa: Direção-Geral da Saúde, 2021. https://nutrimento.pt/activeapp/wp-content/uploads/2021/03/ManualGravidez_Final-3Março2021.pdf

__Toxicidade da nanocelulose em modelos *in vitro*: um contributo para a avaliação da sua segurança para a saúde humana

Nanocellulose toxicity in vitro models: contributing to its safety assessment to human health

Célia Ventura^{1,2}, Fátima Pinto^{1,2}, Catarina Marques¹, João Cadete¹, Madalena Vilar¹, Ana Filipa Lourenço³, Jorge F.S. Pedrosa⁴, Susete N. Fernandes⁵, Rafaela R. da Rosa⁵, Maria Helena Godinho⁵, Paulo J.T. Ferreira⁴, Henriqueta Louro^{1,2}, Maria João Silva^{1,2}

m.joao.silva@insa.min-saude.pt

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

(2) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana. NOVA Medical School, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

(3) Instituto de Investigação da Floresta e Papel, Aveiro, Portugal

(4) Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta. Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

(5) Centro de Investigação de Materiais. Departamento de Ciência dos Materiais, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Caparica, Portugal

__Resumo

As nanoceluloses são nanomateriais inovadores com potencial para uma vasta gama de aplicações industriais e biomédicas. No entanto, a expansão da sua produção tem vindo a suscitar preocupações quanto aos possíveis efeitos, a longo prazo, na saúde humana. Este estudo teve como objetivo avaliar a segurança de algumas nanoceluloses produzidas a partir de matéria-prima nacional, através da caracterização da sua potencial toxicidade em células de mamífero. Para tal, testaram-se duas celuloses nano/microfibrilares (CNF e CMF) e uma celulose nanocristalina (CNC). Analisou-se a citotoxicidade usando ensaios colorimétricos e o ensaio clonogénico, e a genotoxicidade pelo ensaio do micronúcleo *in vitro* em células pulmonares de mamífero (A549 e V79) e em osteoblastos humanos (MG-63). A indução de espécies reativas de oxigénio (ROS) e a internalização celular foram também estudadas nas células A549. Observou-se citotoxicidade no ensaio clonogénico, principalmente no caso da CNC, mas não nos restantes ensaios, não havendo também indução de ROS. Todas as nanoceluloses revelaram efeitos genotóxicos nalgumas concentrações, uma vez que induziram micronúcleos e/ou pontes nucleoplásmicas num dos modelos celulares. Para além disso, visualizou-se a internalização da CNF e CMF, mas não da CNC, em células A549. Esta primeira avaliação toxicológica veio contribuir para prevenir a exposição a materiais celulósicos potencialmente perigosos, procurando impulsionar o desenvolvimento de materiais inovadores e mais seguros.

__Abstract

Nanocelluloses are innovative nanomaterials with potential for a wide range of industrial and biomedical applications. However, the expansion of its production has raised concerns about their possible long-term effects on human health. This study aimed to evaluate the safety of various nanocelluloses through the characterization of their potential toxicity in mammalian cells. Two samples of nano/microfibrillar celluloses with different pre-treatments (CNF and CMF) and a nanocrystalline cellulose (CNC) were tested. The cytotoxicity of the nanocelluloses was analyzed using colorimetric assays and the clonogenic assay, and genotoxicity by

the in vitro micronucleus assay in human alveolar epithelial cells (A549), human osteoblasts (MG-63) and Chinese hamster fibroblasts (V79). Induction of reactive oxygen species (ROS) and cellular internalization were also studied in A549 cells. Cytotoxicity was observed through the clonogenic assay, mainly in the case of CNC, but not in the remaining assays, with no induction of ROS. All nanocelluloses, at some of the concentrations tested, induced micronuclei and/or nucleoplasmic bridges in one of the cellular models. Furthermore, the internalization of CNF and CMF, but not of CNC was visualized in A549 cells. These results aim to contribute to preventing exposure to potentially hazardous cellulosic materials, seeking to boost the development of innovative and safer materials.

__Introdução

Nos últimos anos, tem-se assistido a um enorme desenvolvimento de nanomateriais inovadores, particularmente, no que diz respeito a materiais renováveis, biodegradáveis e sustentáveis. A celulose, sendo o biopolímero mais abundante na natureza, apresenta todas as qualidades requeridas e tem um enorme potencial para ser utilizada numa vasta gama de aplicações industriais. É encontrada principalmente na madeira, fibras de sementes, gramíneas, animais marinhos e algas, mas também pode ser produzida por fungos e bactérias (1). A partir da desconstrução das fibras celulósicas podem ser obtidas diferentes subestruturas, sendo duas delas as nanofibras de celulose (ou celuloses nanofibriladas; CNF) e os nanocristais de celulose (ou celulose nanocristalina; CNC) (2). As CNF são geral-



mente obtidas pela fibrilação das fibras celulósicas através de um tratamento mecânico intensivo, normalmente precedido por um tratamento químico ou enzimático. A oxidação mediada pelo radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO) resulta em CNF com um diâmetro entre 3-100 nm e um comprimento da ordem dos μm (ISO/TS 20477:2017 – *Nanotechnologies – Standard terms and their definition for cellulose nanomaterial*). Por sua vez, a aplicação de um pré-tratamento enzimático origina principalmente microfibras de celulose (CMF). A CNC deriva das regiões cristalinas da celulose, isoladas dos domínios amorfos por hidrólise ácida, e assume diâmetros entre 3-50 nm e comprimentos da ordem das várias centenas de nanómetros (ISO/TS 20477:2017).

Apresentando propriedades físico-químicas muito interessantes, tais como, uma elevada área específica, alta resistência à tração e rigidez, biodegradabilidade e biocompatibilidade, os nanomateriais celulósicos têm encontrado diversas aplicações industriais, por exemplo, para aumentar a resistência mecânica de materiais compósitos. Para além disso, as CNF têm sido estudadas com vista ao seu uso em aplicações biomédicas inovadoras, em áreas como a medicina regenerativa, cicatrização de feridas ou sistemas de veiculação de fármacos (3). No entanto, apesar da celulose ser considerada biocompatível, ela pode não o ser à escala nanométrica pela diferente capacidade de atravessar membranas celulares, interagir com biomoléculas e desencadear respostas celulares. Por outro lado, a biopersistência das CMF/CNF nos pulmões após inalação (4) causa preocupação, dado ser uma característica comum a outros materiais fibrosos, como os nanotubos de carbono e o amianto, que são genotóxicos e causam doença pulmonar (5). Os estudos existentes têm revelado resultados contraditórios que poderão estar relacionados com diferentes propriedades físico-químicas das nanoceluloses, tais como a sua morfologia, grau de cristalinidade, hidrofobicidade, carga superficial e química de superfície, que podem modificar os seus efeitos toxicológicos.

O projeto ToxApp4nanoCELFi visa investigar os potenciais efeitos adversos na saúde humana de nanoceluloses com diferentes propriedades físico-químicas. Especificamente,

pretende-se caracterizar os seus potenciais efeitos citotóxicos, imunotóxicos, genotóxicos, e epigenómicos *in vitro* e a possível relação com o desenvolvimento de doenças crónico-degenerativas, com especial enfoque no desenvolvimento de cancro.

_Objetivos

Este estudo teve como objetivo avaliar a segurança de três nanoceluloses com características físico-químicas diferentes, produzidas a partir de matéria-prima nacional. Para tal, foi caracterizada a sua potencial toxicidade (citotoxicidade e genotoxicidade) em células de mamífero, a sua internalização celular e também a indução de espécies reativas de oxigénio (ROS).

_Material e métodos

As CMF, CNF e CNC foram obtidas a partir de polpa kraft industrial branqueada de *Eucalyptus globulus*, de acordo com metodologia previamente descrita (6,7). A caracterização físico-química abrangeu, entre outras propriedades, a determinação das suas dimensões por várias técnicas microscópicas, incluindo a microscopia eletrónica de transmissão (TEM). Esta mesma técnica foi aplicada aos estudos de internalização celular. Estes materiais foram preparados a várias concentrações, sendo testados em células epiteliais alveolares humanas A549 (ATCC® CCL-185™), células osteoblásticas humanas MG-63 (ATCC® (ATCC® CRL-1427™) e fibroblastos pulmonares de hamster chinês V79 (ATCC® CCL-93™). Analisaram-se os efeitos citotóxicos (ensaio do MTT, clonogénico e com iodeto de propídeo), a indução de espécies reativas de oxigénio (sonda H2DCF-DA) e os efeitos genotóxicos (ensaio do micronúcleo em células com bloqueio da citocinese).

_Resultados

A **figura 1** mostra a morfologia e dimensão das nanoceluloses em estudo. A análise de células A549 após exposição demonstrou a internalização da CMF e CNF, mas não da CNC que permaneceu à superfície celular. As alterações morfológicas observadas, tais como um aumento dos vacúolos citoplasmáticos ou endocíticos, binucleação e



Figura 1: Imagens de TEM das micro/nanofibras de celulose obtidas após pré-tratamento enzimático (CMF), oxidação mediada por TEMPO (CNF) e dos nanocristais de celulose (CNC), em diferentes ampliações (4).

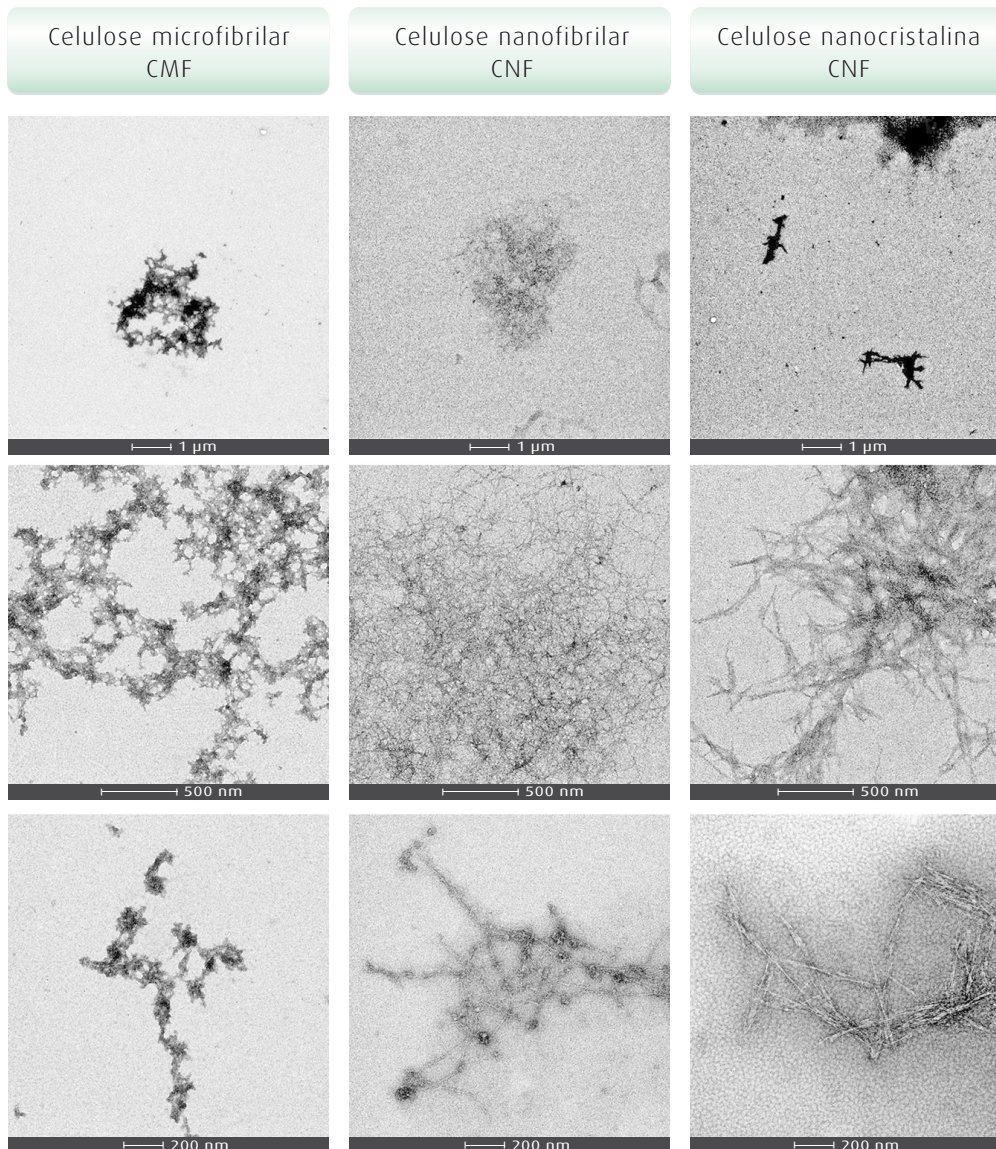


Imagem adaptada de Ventura, *et al.* (7).

protrusões superficiais, são compatíveis com a internalização por endocitose. Os resultados dos estudos toxicológicos encontram-se resumidos na [tabela 1](#). Estes indicaram que nenhuma nanocelulose causou citotoxicidade nas células A549, MG-63 e V79 em exposições até 24h e concentrações até 50 µg/cm². Contudo, a exposição mais prolongada de células pulmonares a CNC, bem como a elevadas concentrações CNF e CMF, produziram morte celular.

Por sua vez, os resultados do ensaio do micronúcleo sugeriram que as nanoceluloses fibrilares têm algum potencial genotóxico, pois induziram a formação de micronúcleos e de pontes nucleoplásmicas nas células expostas, particularmente a concentrações mais baixas (1.5–3 µg/cm²). A [figura 2](#) apresenta os resultados do ensaio do micronúcleo em dois dos modelos celulares utilizados.



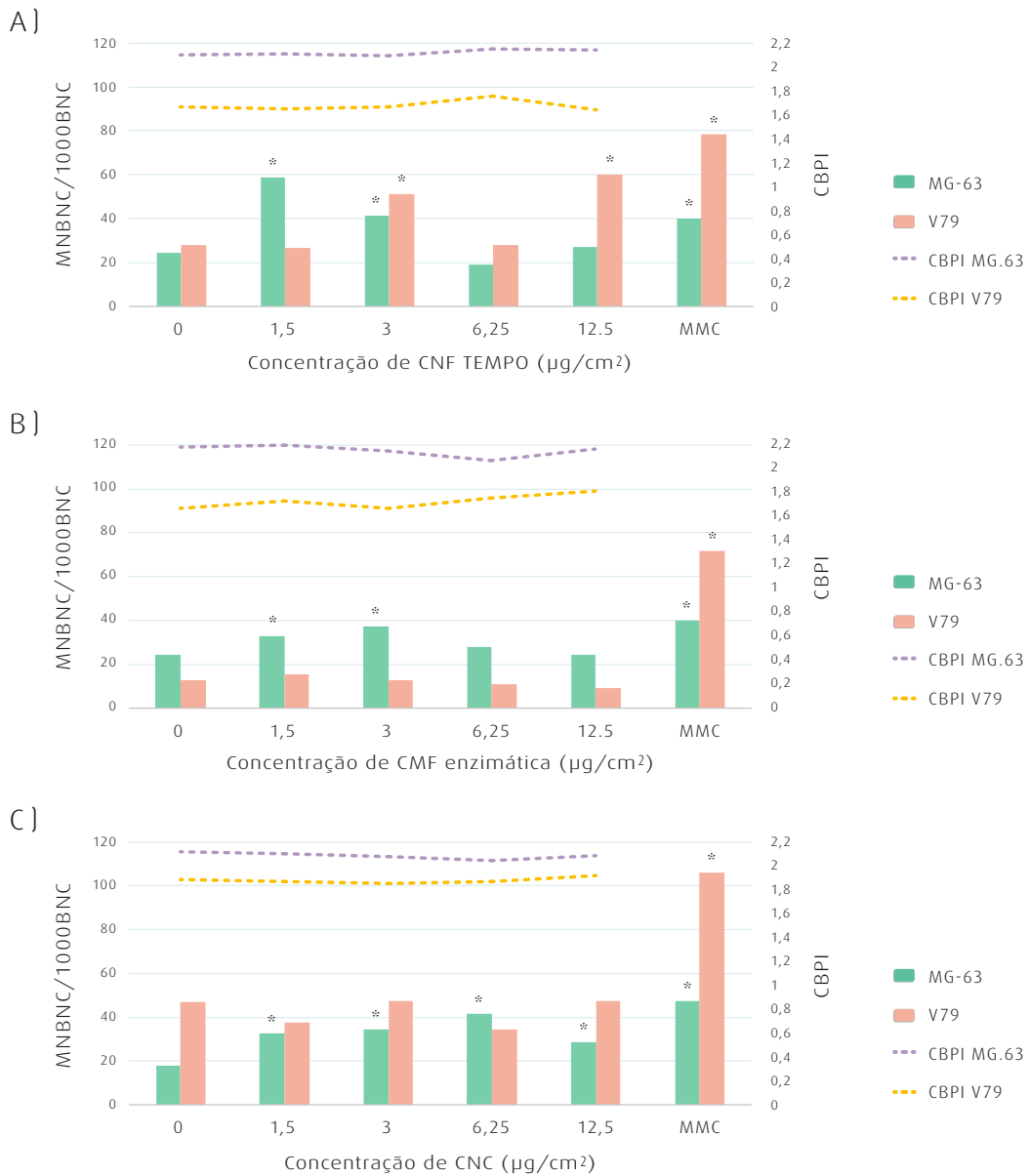
Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade com os três diferentes tipos de nanoceluloses (6,7,8).

Ensaio	CNF	CMF	CNC
<i>Células A549</i>			
MTT	-	-	-
PI	-	-	-
Clonogénico	-	-	-
ROS, 1 h	-	-	-
ROS, 24 h	-	-	-
MN	-	+	-
PN	-	-	NA
CBPI	-	-	-
<i>Células MG-63</i>			
MTT	-	-	-
MN	+	+	+
PN	+	+	(+)
CBPI	-	-	-
<i>Células V79</i>			
MTT	-	-	-
Clonogénico	(+)	+	++
MN	+	-	-
PN	-	-	-
CBPI	-	-	-

CNF – celulose nanofibrilar; CMF – celulose microfibrilar; CNC – celulose nanocristalina; MN – micro-núcleos; PN – pontes nucleoplásmicas; CBPI – cytokinesis-block proliferation index; - : negativo; (+) : positivo numa única concentração; + : positivo, sem relação dose-resposta ++ : positivo, com relação dose-resposta; NA – não analisada.



Gráfico 1: ▾ Frequência de células binucleadas micronucleadas (MNBC) por 1000 células binucleadas (CBN) e valores de CBPI observados em células MG-63 e V79 expostas a (A) CNF (B) CMF e (C) CNC.



CNF – celulose nanofibrilar; CMF – celulose microfibrilar; CNC – celulose nanocristalina
MMC – Mitomicina C; * $p < 0.05$. Figura adaptada de Ventura, *et al.* (7).

Discussão

O conhecimento sobre a toxicidade de nanomaterias celulósicas é ainda escasso e, na sua maioria, os estudos toxicológicos não têm reportado citotoxicidade ou genotoxicidade significativas em sistemas *in vitro* (9).

Neste estudo foram testadas três nanoceluloses produzidas a partir da mesma matéria-prima, mas com propriedades físico-químicas diferentes. Os resultados indicam que nenhuma delas é tóxica para as células pulmonares ou



ósseas quando ocorrem exposições de curta duração. Contudo, após uma exposição mais prolongada, a CNC, em particular, mostrou alguma toxicidade em células pulmonares. Uma possível explicação para essa toxicidade é de que os grupos sulfato que existem à superfície da CNC como resultado da hidrólise ácida interfiram no metabolismo celular.

Relativamente à genotoxicidade, todas as nanoceluloses induziram a formação de micronúcleos, que refletem eventos de quebra ou perda de cromossomas durante a divisão celular (10). Foi também detetado um aumento de pontes citoplasmáticas, causadas por outras anomalias cromossómicas, nas células expostas a concentrações baixas de CNF ou CMF. Uma hipótese explicativa para a ausência de genotoxicidade nas concentrações mais altas de nanocelulose assenta na observação de agregados nessas concentrações que não serão internalizados pelas células. No entanto, a análise por TEM revelou a internalização de fibrilas de nanocelulose numa concentração já elevada (25 µg/cm²), sugerindo que haverá outros fatores explicativos a ser estudados. Dado que nenhuma das nanoceluloses induziu a formação de espécies reativas de oxigénio, é improvável que a genotoxicidade seja mediada por danos oxidativos no DNA, sugerindo antes uma interação mais direta com o DNA ou a existência de outros mecanismos a ser investigados. Os diferentes resultados obtidos relacionam-se, possivelmente, com as diferentes características físico-químicas das nanoceluloses testadas e, também, com a sensibilidade de cada modelo celular. Assim, os nossos resultados demonstram a necessidade de continuar estes estudos utilizando concentrações mais baixas e períodos de exposição mais longos. Para além disso, importará ainda investigar outros potenciais efeitos genéticos e epigenéticos para permitir uma avaliação mais abrangente da toxicidade das nanoceluloses.

Conclusões

Os presentes resultados, obtidos para três nanomateriais celulósicos produzidos a partir de matéria-prima nacional, indicam que a celulose nanocristalina é mais citotóxica do que as duas nanoceluloses fibriladas e que todas

elas possuem algum potencial genotóxico em células pulmonares ou ósseas.

Dado o crescente interesse na aplicação destas nanoceluloses, inclusive na área biomédica, importa prosseguir estes estudos por forma a avaliar, precocemente, a sua toxicidade. Esse conhecimento contribuirá para orientar a produção responsável de novos nanomateriais mais seguros para a saúde humana e para o ambiente.

Financiamento:

Projeto ToxApp4NanoCELF – Uma abordagem de toxicologia preditiva para a caracterização dos potenciais efeitos respiratórios de fibras de nanocelulose funcionalizadas num sistema de co-cultura (PTDC/SAU-PUB/32587/2017).

Referências bibliográficas:

- (1) Kargarzadeh H, Mariano M, Gopakumar D, et al. Advances in cellulose nanomaterials. *Cellulose* 2018;25:2151-89. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1723-5>
- (2) Tayeb AH, Amini E, Ghasemi S, et al. Cellulose Nanomaterials-Binding Properties and Applications: A Review. *Molecules*. 2018 Oct 18;23(10):2684. <https://doi.org/10.3390/molecules23102684>
- (3) Halib N, Perrone F, Cemazar M, et al. Potential Applications of Nanocellulose-Containing Materials in the Biomedical Field. *Materials (Basel)*. 2017 Aug 21;10(8):977. <https://doi.org/10.3390/ma10080977>
- (4) Stefaniak AB, Seehra MS, Fix NR, et al. Lung biodegradability and free radical production of cellulose nanomaterials. *Inhal Toxicol*. 2014 Oct;26(12):733-49. <https://doi.org/10.3109/08958378.2014.948650>
- (5) Ventura C, Pereira JFS, Matos P, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of MWCNT-7 and crocidolite: assessment in alveolar epithelial cells versus their coculture with monocyte-derived macrophages. *Nanotoxicology*. 2020 May;14(4):479-503. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1695975>. Erratum in: *Nanotoxicology*. 2022 Aug 27
- (6) Pinto F, Lourenço AF, Pedrosa JFS, et al. Analysis of the In Vitro Toxicity of Nanocelluloses in Human Lung Cells as Compared to Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Nanomaterials (Basel)*. 2022 Apr 22;12(9):1432. <https://doi.org/10.3390/nano12091432>
- (7) Ventura C, Marques C, Cadete J, et al. Genotoxicity of Three Micro/Nanocelluloses with Different Physicochemical Characteristics in MG-63 and V79 Cells. *J Xenobiot*. 2022 Apr 21;12(2):91-108. <https://doi.org/10.3390/jox12020009>
- (8) Ventura C, Lourenço AF, Sousa-Uva A, et al. Evaluating the genotoxicity of cellulose nanofibrils in a co-culture of human lung epithelial cells and monocyte-derived macrophages. *Toxicol Lett*. 2018 Jul;291:173-83. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.04.013>
- (9) Ventura C, Pinto F, Lourenço AF, et al. On the toxicity of cellulose nanocrystals and nanofibrils in animal and cellular models. *Cellulose*. 2020;27:5509-44. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03176-9>
- (10) Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1084-104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>

_Acidentes domésticos e de lazer em crianças e jovens durante a pandemia da COVID-19, 2019-2021

Home and leisure accidents in children and young people during the COVID-19 pandemic, 2019-2021

Tatiana Alves¹, Susana Silva¹, Paula Braz¹, Emanuel Rodrigues², Mariana Neto¹, Ricardo Mexia¹, Carlos Matias Dias¹

tatiana.alves@insa.min-saude.pt

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

(2) Consultor externo ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge para o sistema EVITA

_Resumo

Nos últimos dois anos, entre 2020 e 2021, as crianças e os jovens terão enfrentado vários desafios decorrentes das restrições causadas pela situação pandémica da COVID-19, com interferência nas diferentes dimensões da sua vida. Considerando que as medidas de contenção da pandemia poderão ter conduzido a alterações familiares, sociais e ao nível da participação e utilização do ambiente envolvente, importa conhecer o impacto destas alterações na ocorrência de acidentes domésticos e de lazer (ADL) nesta população. O presente estudo tem como finalidade contribuir para um melhor conhecimento sobre os ADL ocorridos durante a pandemia da COVID-19 que motivaram o recurso ao serviço de urgência (SU) em crianças e jovens. Entre 2019 e 2021, a partir do sistema EVITA foram analisados 148 440 episódios de recurso ao SU devidos a ADL em crianças e jovens até aos 19 anos, ocorridos ao ar livre, em áreas desportivas, em casa, na escola, em áreas institucionais e recintos públicos. Observou-se uma diminuição de 25% no número de episódios de admissão ao SU por ADL ocorridos em 2020 e uma diminuição de 7% em 2021, ambos face a 2019.

_Abstract

During the last two years, between 2020 and 2021, children and young people have faced several challenges given the restrictions caused by the COVID-19 pandemic situation affecting different aspects in their daily lives. Considering the measures to contain the pandemic may have led to family, social and participation environmental changes it is important to know their influence on the occurrence of Home and Leisure Accidents (HLA) in this population. The aim of this study is to contribute to a better understanding of the HLA occurred during the COVID-19 pandemic involving the use of emergency department (ED) by children and young people. From the EVITA system, between 2019 and 2021, 148 440 episodes of HLA which required ED care were analysed in children and young people occurred in outdoors spaces, sports area, at home and at school, institutional areas and public places. There was a decrease by 25% in the number of ED episodes due to HLA in 2020 and a decrease by 7% in 2021, both compared to 2019.

_Introdução

Os acidentes e lesões não intencionais têm representado a principal causa de internamento hospitalar e morte em crianças no mundo (1,2), com expressão na morbilidade de toda a população infantil e juvenil (3).

Os acidentes domésticos e de lazer (ADL) em crianças e jovens constituem um evento de saúde frequente e de interesse para a área de saúde infantil e juvenil. De sublinhar a relevância do ambiente envolvente e do contexto na origem dos ADL neste grupo populacional (4).

O contexto pandémico da COVID-19, vivido nos últimos dois anos, entre 2020 e 2021, tem conduzido a alterações na dinâmica da sociedade, no seu quotidiano, nas rotinas, na participação social (5-13), inclusive na prática desportiva, particularmente dos mais vulneráveis, como as crianças e os jovens (14).

Deste modo, vários são os estudos que têm procurado demonstrar o impacto da pandemia na ocorrência de acidentes na população pediátrica (8,10-12,14-17). As restrições impostas pela pandemia, com interferência nas diferentes dimensões da vida, e o aumento do tempo de permanência das crianças e das suas famílias em casa, ou a necessidade de conciliação de diferentes tarefas realizadas no mesmo local, têm sido destacadas na análise de ocorrência de acidentes nestes grupos etários (12,14,16;17).

Com efeito, o estudo da problemática relativa aos ADL envolvendo a procura de cuidados de saúde, designadamente o serviço de urgência (SU), assume particular relevância quando se verificam alterações no quotidiano, nos estilos de vida e no comportamento das crianças, dos jovens e suas famílias, como tem sido o caso durante o contexto pandémico da COVID-19.



_Objetivo

O presente estudo tem como objetivo descrever a evolução da frequência dos episódios de acidentes domésticos e de lazer em crianças e jovens até aos 19 anos que recorreram ao serviço de urgência, entre 2019 e 2021, analisando como a pandemia afetou a distribuição deste tipo de acidente nesta população.

_Materiais e métodos

Procedeu-se a um estudo epidemiológico observacional, descritivo e transversal, com análise dos dados recolhidos através do sistema de monitorização EVITA (Epidemiologia e Vigilância dos Traumatismos e Acidentes), entre 2019 e 2021. Neste sistema participaram 28 entidades do Serviço Nacional de Saúde e uma da Região Autónoma dos Açores (18).

Foi realizada a análise secundária dos dados desagregados pelas variáveis idade, local de ocorrência, mecanismo de lesão e tipo de lesão, com apuramento das frequências absolutas e relativas (percentagens) e cálculo dos respetivos intervalos de confiança. As comparações bivariadas foram realizadas através do teste do Qui-quadrado de Pearson, considerando uma significância de 5%. A análise foi realizada utilizando o programa R *Statistical Computing Environment* (19).

_Resultados e discussão

Os episódios de ADL em crianças e jovens dos 0 aos 19 anos com recurso ao SU, entre 2019 e 2021, ocorridos ao ar livre, em área desportiva, em casa, na escola, em área institucional e recintos públicos, representaram 81% (n=148440) do total de ADL ocorridos neste grupo etário.

Foram analisados 16952 (11,4%) episódios de ADL ocorridos ao ar livre, 8809 (5,9%) episódios de ADL em área desportiva, 59311 (40,0%) episódios de ADL em casa e 63368 (42,7%) episódios de ADL na escola, área institucional e recintos públicos.

Destes episódios, 34039 (22,9%) ocorreram no grupo etário dos 0-4 anos, 34584 (23,3%) episódios nas crianças entre os 5 e os 9 anos, 49008 (33,0%) episódios no grupo

entre os 10 e os 14 anos e 30809 (20,8%) episódios nos jovens entre os 15 e os 19 anos. A maioria dos episódios de ADL analisados corresponderam a crianças e jovens do sexo masculino 86074 (58%).

Globalmente, face a 2019, observou-se uma diminuição de 25% no número de episódios de admissão ao SU por ADL ocorridos em criança e jovens em 2020 e uma diminuição de 7% em 2021, também face a 2019. Esta redução do número de episódios durante a pandemia foi observada em estudos similares desenvolvidos em diferentes países (8-13,15,20).

Em 2020, a partir do mês de março, período marcado pelo início da aplicação de medidas de contenção e de resposta à pandemia da COVID-19, o número de episódios de ADL manteve-se abaixo dos valores do período homólogo de 2019, tendência que se manteve até ao final do 1º trimestre de 2021.

De sublinhar, no ano de 2021, o aumento do número de episódios de ADL entre os meses de abril (n=5155) e outubro (n=6302), em comparação com o ano de 2020 e o período pré-pandémico (ano de 2019), tendo o mês de maio registado um aumento de 186% face a 2020 e de 11% em relação a 2019 (gráfico 1).

Ao analisar a proporção de episódios de ADL por grupo etário e ano destaca-se o grupo etário dos 10 aos 14 anos, onde se observa uma diminuição estatisticamente significativa de admissões ao SU (35,5% em 2019 versus 29,8% em 2020 e 33,0% em 2021) (gráfico 2). O predomínio deste grupo poderá ser explicado considerando as características específicas da idade, da necessidade de adaptação e aceitação de desafios, desconsiderando a sua vulnerabilidade (3,14). A diminuição da proporção de ADL neste grupo durante a pandemia foi também verificada em outros estudos (11,15).

Por outro lado, no grupo etário até aos 4 anos foi observado um aumento de 5,7 p.p. em 2020 (26,2%) e de 2,5 p.p. em 2021 (23,0%) ambos face a 2019 (20,5%) na proporção de admissões ao SU por ADL (gráfico 2). Para este aumento, também observado em outros estudos, poder-se-á apontar as características cognitivas destas crianças tendentes à exploração do ambiente, à procura ativa de objetos atra-

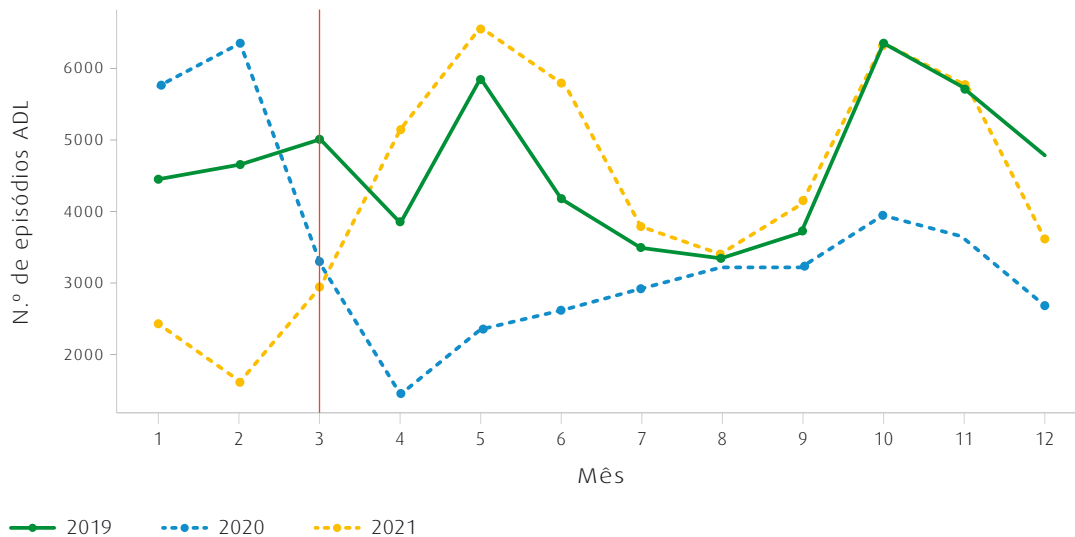


tivos, num contexto porventura, de maior pressão familiar e de alterações nas rotinas diárias dada a situação pandémica (10,11,15,17).

No período em análise, a proporção de episódios de ADL no sexo masculino oscilou entre 57,4% (2020) e 58,3% (2021) e no sexo feminino variou entre 41,7% (2021) e

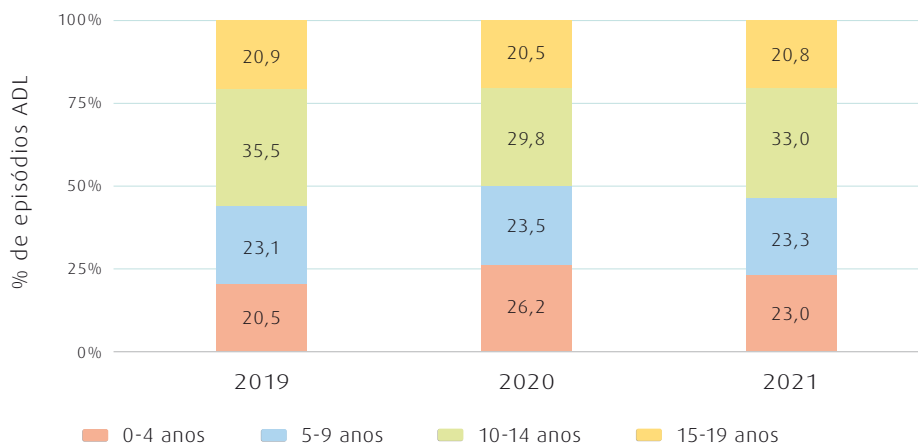
42,6% (2020), encontrando-se diferenças significativas ($p=0,025$). A maior frequência de recurso ao serviço de urgência por ADL verificada no sexo masculino, quer em período pré-pandémico, quer em período pandémico está em linha com o verificado em outros estudos (7-9,12,15,20).

Gráfico 1: ▾ Distribuição mensal do número de episódios de acidentes domésticos e de lazer (ADL) nas crianças e jovens dos 0 aos 19 anos, entre 2019-2021.



A linha vermelha indica o início da aplicação de medidas de resposta à pandemia da COVID-19.

Gráfico 2: ▾ Distribuição percentual dos episódios de acidentes domésticos e de lazer (ADL) nas crianças e jovens dos 0 aos 19 anos, por grupo etário e ano (2019-2021), $p<0,001$.





A distribuição dos episódios de ADL em cada ano pelo local de ocorrência apresenta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$). A proporção de acidentes ocorridos em casa foi mais elevada em período pandémico (46,2% em 2020 e 40,4% em 2021) do que em período pré-pandémico (34,9% em 2019) (**gráfico 3**).

Este aumento da proporção de ADL em casa foi observado em outros estudos, podendo refletir as alterações no quotidiano das famílias e das crianças, implícitas nas medidas de resposta e contenção à pandemia. Alguns autores destacam o *stress* familiar, as múltiplas tarefas domésticas e laborais, bem como, a necessidade de supervisão das crianças em espaços muitas vezes limitados. Acresce o eventual ambiente de receio de adquirir a doença COVID-19, de perdas de rendimento ou de alterações na estrutura de suporte familiar (7,10,11,14,15,20).

O aumento da proporção de ADL ocorridos em casa e nas crianças mais novas, em período pandémico, pode refletir as atividades e *hobbies* que este grupo passou a desenvolver por estar mais tempo em casa, constituindo cumulativamente este local, cenário para atividades escolares (escola

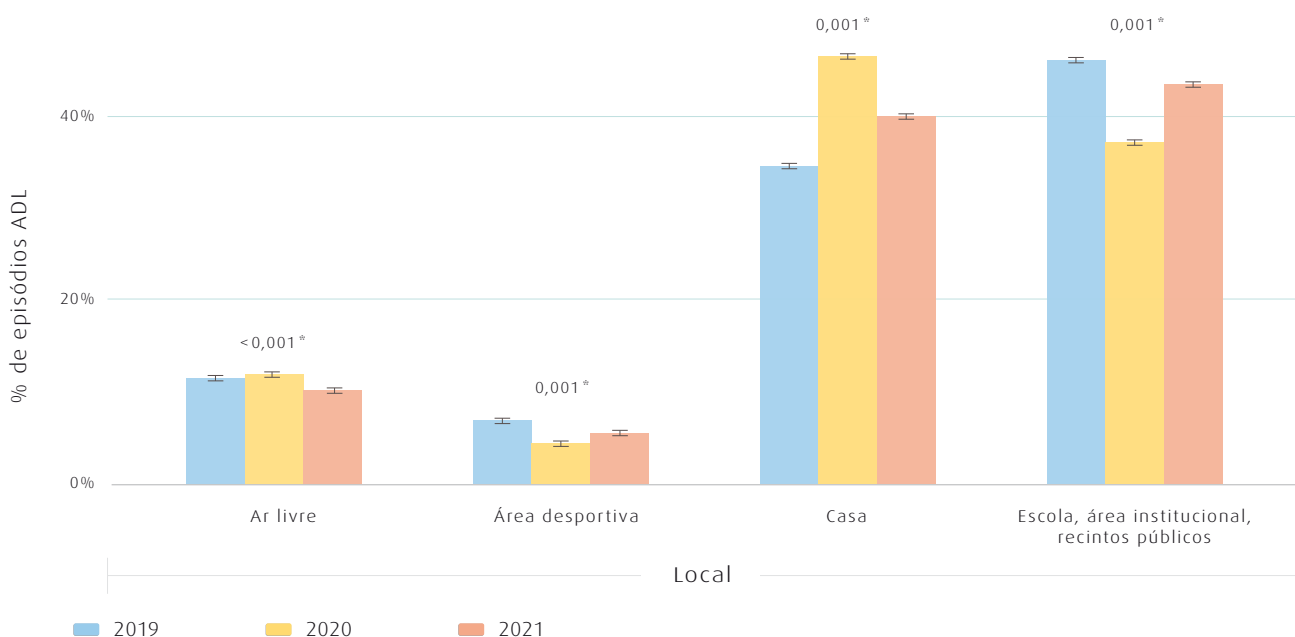
virtual, ensino à distância), atividades de lazer e atividades físicas. Acresce, a este facto, a eventual menor supervisão de adulto, por trabalho simultâneo, e ou presença de várias crianças em casa.

O ambiente doméstico, enquanto cenário de diversos perigos e risco para a saúde e para a vida das crianças e jovens, foi sublinhado em outro estudo (14). Alguns autores apontam os acidentes em casa durante a pandemia como a maior ameaça à saúde das crianças (10).

Da mesma forma, observou-se um ligeiro aumento na proporção de ADL ocorridos ao ar livre no ano de 2020 (12,0%) em relação a 2019 (11,7%). Dados similares foram encontrados num estudo (11) realizado no Canadá, embora um estudo em França revele uma diminuição de ADL ao livre (15).

Por outro lado, nos restantes locais analisados, como na escola, área institucional, recintos públicos (46,3% em 2019, 37,1% em 2020 e 43,3% em 2021) e área desportiva (7,1% em 2019, 4,6% em 2020 e 5,7% em 2021) observou-se uma diminuição da proporção de ADL em 2020 e 2021, em relação a 2019 (**gráfico 3**). Estas alterações na

Gráfico 3: Distribuição percentual dos episódios de acidentes domésticos e de lazer (ADL) nas crianças e jovens dos 0 aos 19 anos, por local de ocorrência e ano (2019-2021), $p < 0,001$.





proporção de ADL seriam esperadas dada a redução do tempo de permanência no espaço físico da escola e da diminuição de atividades em áreas desportivas, no âmbito da situação pandémica (15).

A análise dos episódios de ADL segundo os mecanismos de lesão revela as quedas como a causa mais frequente, tanto em período pré-pandémico (46,2% em 2019), como em contexto pandémico (47,7% em 2020 e 46,3% em 2021), não sendo, no entanto, estas diferenças estatisticamente significativas (gráfico 4). Este predomínio das quedas, com aumento em 2020 é observado igualmente em estudos internacionais. (8,12,17)

De sublinhar, a diminuição significativa da proporção de episódios de ADL devidos ao contacto com pessoa, objeto ou animal (categoria representada no gráfico como “Atingido por”) nos anos de 2020 (11,1%) e 2021 (13,2%) face a 2019 (14,3%). Esta diminuição também foi verificada em estudos envolvendo crianças e jovens (12,15).

No ano de 2020, comparativamente a 2019, observou-se um ligeiro aumento da proporção de episódios de ADL causados por compressão, corte e perfuração (5,7% vs 5,6%)

e por queimadura (0,9% vs 0,8%), situação também reportada por outros estudos (12).

Considerando a análise relativa aos episódios de ADL por tipo de lesão, observou-se um aumento dos episódios de concussão nos anos de 2020 (8,6%) e 2021 (9,4%) face a 2019 (8,1%), tratando-se do tipo de lesão mais frequente nas crianças mais novas, de acordo com dados do relatório EVITA (18).

Foi também observado um aumento no ano de 2020 nos episódios de ADL que resultaram em ferida aberta (16,1% em 2020 vs 13,4% em 2019), baixando a proporção em 2021 (13,2%).

Quanto aos episódios de ADL resultantes em contusão ou hematoma as proporções foram mais baixas quer em 2020 (40,2%), quer em 2021 (40,9%) comparativamente a 2019 (45,1%) (gráfico 5).

Face à diminuição global do número de ADL em 2020 e 2021 comparando a 2019, importará ainda, acrescentar que estes resultados podem ser interpretados como a consequência da redução das atividades nestes diferentes cenários, mas também podem refletir a livre decisão,

Gráfico 4: Distribuição percentual dos episódios de acidentes domésticos e de lazer (ADL) nas crianças e jovens dos 0 aos 19 anos, por mecanismo de lesão e ano (2019-2021), $p < 0,001$.

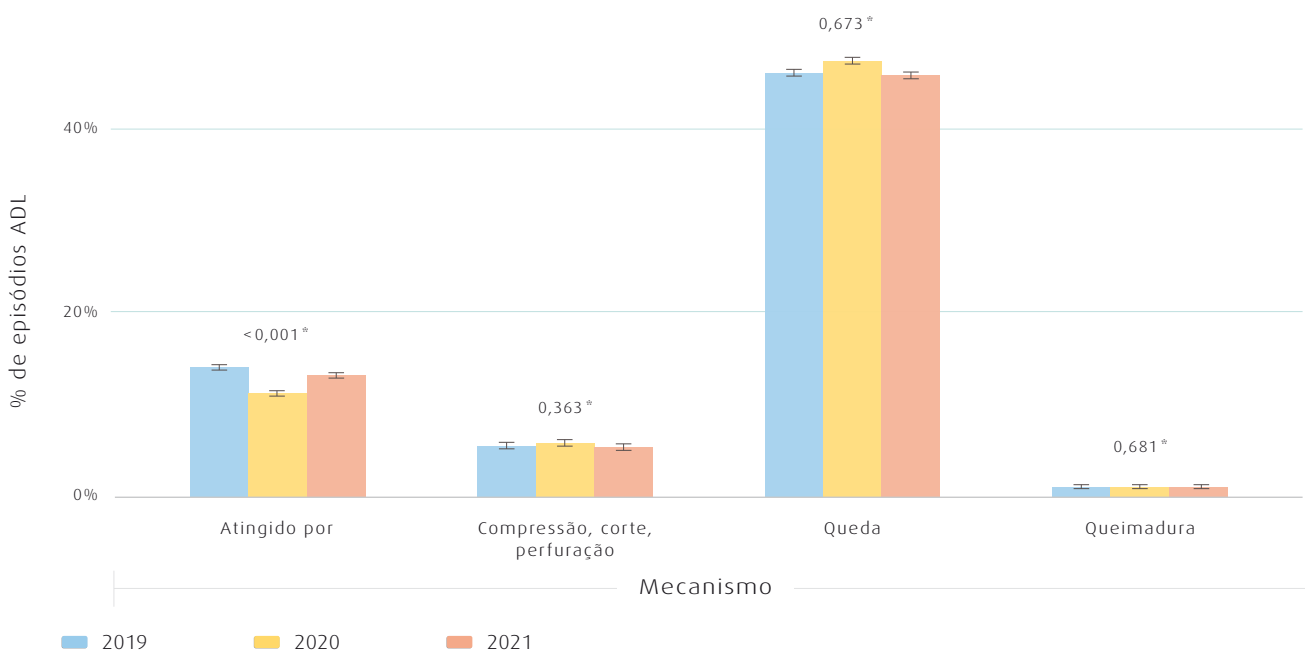
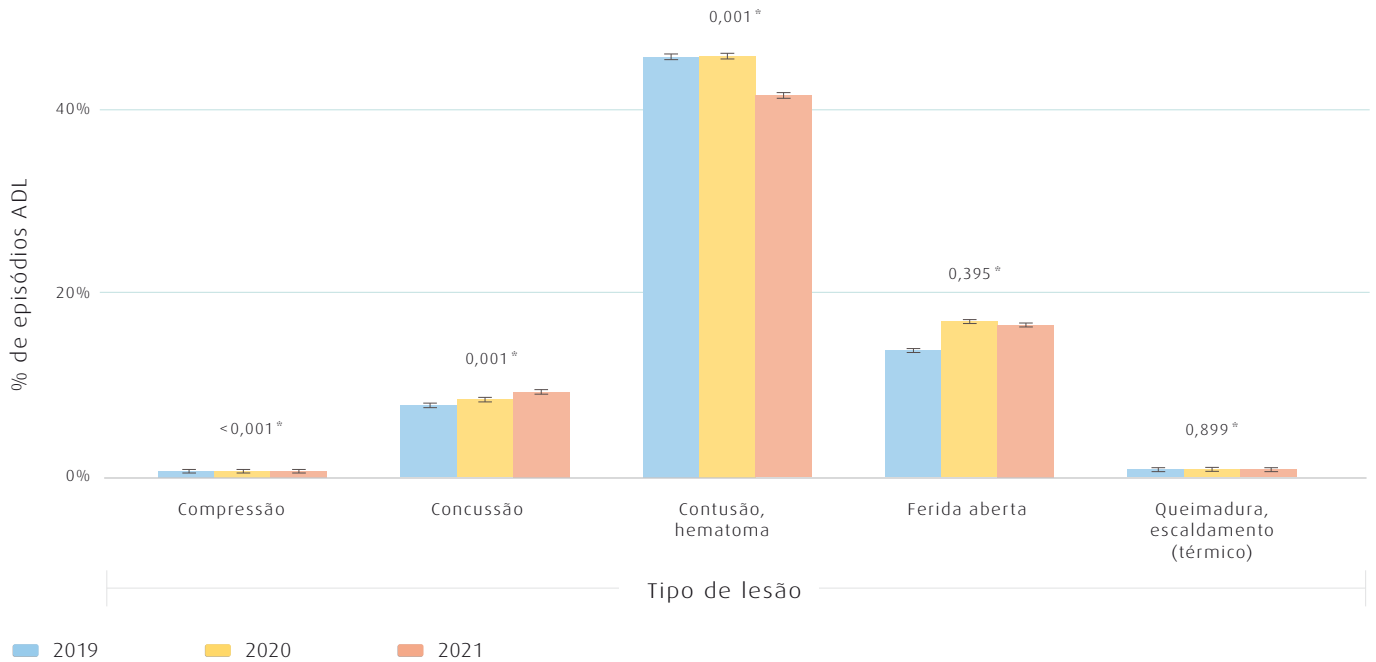




Gráfico 5: Distribuição percentual dos episódios de acidentes domésticos e de lazer (ADL) nas crianças e jovens dos 0 aos 19 anos, por tipo de lesão e ano (2019-2021), $p < 0,001$.



das famílias e/ou cuidadores, de não procurar o SU na sequência de um acidente cuja percepção da gravidade da lesão foi baixa, face a um possível risco de contágio por SARS-CoV-2 (15).

Para a compreensão destes resultados é de realçar que o tipo de acidente e as circunstâncias em que ocorrem estão relacionados com o normal desenvolvimento e crescimento da criança e do jovem (3,4). Seria portanto expectável, não só a ocorrência de ADL neste grupos, mas também alterações na frequência de ADL pela idade, local e mecanismo de lesão durante a pandemia (10-12,16,17).

Considera-se assim, que os dados obtidos através do sistema EVITA contribuíram para a compreensão dos acidentes que ocorrem nos ambientes doméstico, lazer, desportivo e escolar em crianças e jovens, bem como a sua evolução durante o contexto pandémico. Inclusivamente, alguns autores defendem que o impacto da COVID-19 reforçou a importância das medidas de prevenção de acidentes, de promoção da segurança e da proteção da saúde

nestes grupos, sublinhando que esses esforços devem ser renovados (10,14).

De referir que o sistema EVITA revelou ser um instrumento de observação em saúde cuja orgânica permite, de forma simples, a obtenção de informação útil para a comunidade científica, profissionais de saúde, sociedade no geral e crianças, jovens, cuidadores e educadores em particular. Contudo, considera-se necessária uma análise mais aprofundada das circunstâncias e história destas ocorrências para uma melhor prevenção das mesmas.



_Conclusões

Face a 2019, observou-se uma diminuição de 25% no número de episódios de admissão ao Serviço de Urgência por acidentes domésticos e de lazer (ADL) ocorridos em criança e jovens em 2020 e uma diminuição de 7% em 2021.

Embora a maioria dos episódios de ADL que recorreram a serviços de urgência tenha ocorrido no grupo dos 10 e os 14 anos (33,0%), observou-se uma diminuição da proporção de ADL durante o período pandémico face a 2019, nos grupos das crianças a partir dos 10 anos.

Em período pandémico ocorreu um aumento dos ADL ocorridos em casa (46,2% em 2020; 40,4% em 2021) face a 2019 (34,9%) e ao ar livre (12,0% em de 2020 vs 11,7% em 2019).

Referências bibliográficas:

- (1) Ishikawa T, Mâsse LC, Brussoni M. Changes in parents' perceived injury risk after a medically-attended injury to their child. *Prev Med Rep.* 2018 Dec 18;13:146-152. <https://doi.org/10.1016/j.pmedr.2018.12.008>
- (2) GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet.* 2017 Sep 16;390(10100):1151-1210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32152-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32152-9)
- (3) Zaoutis LB, Chiang VW (eds). *Comprehensive Pediatric Hospital Medicine*. 2nd ed. McGraw-Hill Education, 2017.
- (4) Cordeiro M. *Prevenção de acidentes: uma abordagem ambiental*. (Prova complementar da Tese de doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, 1996.
- (5) van Aert GJJ, van der Laan L, Boonman-de Winter LJM, et al. Effect of the COVID-19 pandemic during the first lockdown in the Netherlands on the number of trauma-related admissions, trauma severity and treatment: the results of a retrospective cohort study in a level 2 trauma centre. *BMJ Open.* 2021 Feb 19;11(2):e045015. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-045015>
- (6) Pichard R, Kopel L, Lejeune Q, et al. Impact of the CORonaVirus Disease 2019 lockdown on hand and upper limb emergencies: experience of a referred university trauma hand centre in Paris, France. *Int Orthop.* 2020 Aug;44(8):1497-1501. <https://doi.org/10.1007/s00264-020-04654-2>
- (7) Lim MA, Mulyadi R, Rida KG, Pranata R. Epidemiological pattern of orthopaedic fracture during the COVID-19 pandemic: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Orthop Trauma.* 2021 May;16:16-23. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2020.12.028>
- (8) Nabian MH, Vosoughi F, Najafi F, et al. Epidemiological pattern of pediatric trauma in COVID-19 outbreak: Data from a tertiary trauma center in Iran. *Injury.* 2020 Dec;51(12):2811-15. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.09.015>
- (9) Ohm E, Hauge LJ, Madsen C, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on the treatment of injuries during lockdown in Norway. *Scand J Public Health.* 2021 Nov;49(7):689-96. <https://doi.org/10.1177/1403494821993725>
- (10) Bressan S, Gallo E, Tirelli F, et al. Lockdown: more domestic accidents than COVID-19 in children. *Arch Dis Child.* 2021 Feb;106(2):e3. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2020-319547>
- (11) Keays G, Friedman D, Gagnon I. Injuries in the time of COVID-19. *Health Promot Chronic Dis Prev Can.* 2020 Dec 9;40(11-12):336-41. <https://doi.org/10.24095/hpcdp.40.11/12.02>
- (12) Sanford EL, Zagory J, Blackwell JM, et al. Changes in pediatric trauma during COVID-19 stay-at-home epoch at a tertiary pediatric hospital. *J Pediatr Surg.* 2021 May;56(5):918-22. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2021.01.020>
- (13) Christey G, Amey J, Campbell A, et al. Variation in volumes and characteristics of trauma patients admitted to a level one trauma centre during national level 4 lockdown for COVID-19 in New Zealand. *N Z Med J.* 2020 Apr 24;133(1513):81-88
- (14) Schwebel DC, Morgan CH, Jeffries KN. Unintentional Pediatric Injury and COVID-19 Pandemic: data trends and prevention strategies. *Academia Letters.* 2021. (article 902). <https://doi.org/10.20935/AL902>
- (15) Rigou A, Beltzer N, Abric C, et al. Monitoring home and leisure injuries during the lockdown due to the COVID-19 pandemic. *Bull Epidemiol Hebd (Paris).* 2020;20:402-409. http://beh.santepubliquefrance.fr/beh/2020/20/pdf/2020_20_1.pdf
- (16) Benmassaoud Z, Balde FB, Oudghiri Z, et al. Impact of the COVID-19 lockdown on the epidemiologic and clinic profiles of domestic accidents in children. *Afr J Paediatr Surg.* 2022 Apr-Jun;19(2):65-67. https://doi.org/10.4103/ajps.AJPS_49_21
- (17) Chaffard-Luçon MP, Beltzer N, Rigou A, et al. Child defenestration: An unexpected collateral effect of the first COVID-19 lockdown! *Arch Pediatr.* 2022 Apr;29(3):249-252. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2022.01.012>
- (18) Alves T, Braz P, Rodrigues E, et al. EVITA - Epidemiologia e Vigilância dos Traumatismo e Acidentes: relatório 2020. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge IP, 2021. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/8002>
- (19) R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing [online]. Vienna, Austria, 2022. <https://www.R-project.org/>
- (20) Fortané T, Bouyer M, Le Hanneur M, et al. Epidemiology of hand traumas during the COVID-19 confinement period. *Injury.* 2021 Apr;52(4):679-85. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2021.02.024>

ficha técnica_

_ Título: Boletim Epidemiológico Observações

_ Periodicidade: Quadrimestral

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

_ Numeração: 2.^a série
Volume 11, número 32
maio-agosto 2022

_ 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 Infecciosas
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**

(segundo layout inicial de Nuno Almodovar Design, Lda.)

Entidade proprietária:

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Sede de redação/editor:

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

NIPC: 501427511

Tel.: (+351) 217 519 200

Fax: (+351) 217 529 400

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

www.insa.min-saude.pt

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