

Observações

— Boletim Epidemiológico

sumário

Editorial

O valor dos Institutos públicos de Saúde Pública: base para o conhecimento e capacidade disponível **p 03**

The value of public Institutes of Public Health: knowledge-base and available capacity

Carlos Matias Dias

Artigos breves

Ambiente e saúde

1_ Será que os planos de contingência para ondas de calor reduzem a mortalidade associada ao calor? Um estudo da diferença-das-diferenças em Portugal **p 04**

Do heat contingency plans reduce heat related deaths? A difference-in-difference study in Portugal

Catarina Leitão, Susana Pereira da Silva, Rita Roquette, Mafalda Sousa Uva, Baltazar Nunes

2_ Excesso de mortalidade em Portugal associado ao período de calor extremo em agosto de 2018: um instrumento ao serviço da intervenção em saúde pública **p 09**

Excess mortality in Portugal associated with an extreme heat period in August 2018: a public health instrument

Ana Rita Torres, Susana Silva, Baltazar Nunes, Ana Paula Rodrigues

Doenças infecciosas

3_ Surto de parotidite epidémica numa escola secundária do concelho de Vila Real de Santo António, Portugal, janeiro-fevereiro de 2019 **p 14**

Outbreak of epidemic parotitis in a secondary school in the municipality of Vila Real de Santo António, Portugal, January-February 2019

Raquel Neves, Teresa Lourenço, Carlos Ribeiro, Paula Palminha

4_ Avaliação do impacto da vacina materna contra a tosse convulsa durante a gravidez na Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, um ano após a sua introdução no Programa Nacional de Vacinação **p 18**

Impact evaluation of the maternal pertussis vaccine during pregnancy in the region of Lisbon and Tagus Valley one year after its introduction in the National Immunization Programme

Sara Gomes Raposo, Baltazar Nunes

5_ Variantes na região não codificante do gene *TLR2* associadas à infeção bacteriana grave na anemia falciforme pediátrica **p 22**
Variants in non-coding regions of the TLR2 gene associated with severe bacterial infection in pediatric sickle cell anemia

Susana David, Pedro Aguiar, Líliliana Antunes, Alexandra Dias, Anabela Morais, Anavaj Sakuntabhai, João Lavinha

Alimentação e nutrição

6_ Perceção e hábitos de consumo relativamente a alimentos funcionais **p 27**
Perception and consumption habits regarding functional foods

Mafalda Alexandra Silva, Tânia Gonçalves Albuquerque, M Beatriz PP Oliveira, Rita C Alves, Helena Soares Costa

7_ Consumo de alimentos à base de cereais pelas crianças portuguesas: uma avaliação de risco-benefício **p 33**
Consumption of cereal-based foods by Portuguese children: a risk-benefit assessment

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

8_ Avaliação da exposição a contaminantes com base num estudo de dieta total conduzido em Portugal **p 38**
Exposure assessment to contaminants based on a Total Diet Study conducted in Portugal

Elsa Vasco, Maria Graça Dias, Luísa Oliveira

9_ Substitutos vegetarianos da carne em receitas tradicionais como fontes de vitaminas do grupo B **p 43**
Vegetarian meat substitutes in traditional recipes as sources of group B vitamins

Cristina Flores, Tânia Gonçalves Albuquerque, Mariana Santos, Isabel Castanheira

10_ Publicidade dirigida a crianças: restrições impostas à realidade alimentar portuguesa **p 48**
Advertising aimed at children: restrictions imposed on the Portuguese food reality

Roberto Brazão, Andreia Lopes, Paulo Fernandes, Maria da Graça Dias

11_ A rotulagem nutricional simplificada na avaliação de cereais de pequeno-almoço **p 54**
Simplified nutrition labeling in the assessment of breakfast cereals

Filipa Matias, Mariana Santos, Ricardo Assunção, Isabel Castanheira



_Bases genéticas das doenças

12_ Biomarcadores nas doenças lisossomais de sobrecarga: o que são e o que nos dizem? p 59

Biomarkers in lysosomal storage disorders: what do they tell us?

Paulo Gaspar, Hugo Rocha, Raquel Neiva, Olga Azevedo, Tabita Maia, Patrício Aguiar, Teresa Cardoso, Paulo Chaves, Sandra Alves, Laura Vilarinho

13_ Moduladores genéticos de vasculopatia cerebral em crianças com drepanocitose p 63

Genetic modulators of cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia

Marisa Silva, Sofia Vargas, Raquel Maia, Alexandra Dias, Teresa Ferreira, Anabela Morais, Isabel Mota Soares, João Lavinha, Rita Silva, Paula Kjöllérström, Paula Faustino

O valor dos Institutos públicos de Saúde Pública: base para o conhecimento e capacidade disponível

The value of public Institutes of Public Health: knowledge-base and available capacity

Embora preparado durante a fase pré-pandemia, este vigésimo sexto número da segunda edição do *Boletim Epidemiológico Observações* (BEO) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) ilustra mais uma vez as várias funções essenciais que o INSA concretiza em resposta à sua tripla missão de acordo com a atual Lei Orgânica, todas relevantes nesta fase pandémica.

Os artigos sobre **vigilância epidemiológica** e avaliação do impacto do calor na mortalidade, sobre **investigação epidemiológica de um surto** de uma doença evitável pela vacinação, numa escola secundária do concelho de Vila Real de Santo António, ou a **avaliação do impacto da vacina** materna contra a tosse convulsa durante a gravidez na Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, ilustram as bases do treino e capacidade que estes temas e métodos trazem para a preparação que o Instituto demonstra desde há décadas quando chamado à defesa da saúde da população portuguesa, como é o caso da atual pandemia por COVID-19.

Temas relacionados com a alimentação e a nutrição, ou com doenças genéticas, tratados noutros dos artigos, ilustram áreas de investigação e desenvolvimento ligadas a problemas e a determinantes de saúde fundamentais para a prevenção e promoção da saúde dos portugueses no campo das doenças relacionadas com comportamentos e estilos de vida, cujo conhecimento importa para o combate a epidemias mais silenciosas e lentas como as da obesidade e doenças não transmissíveis.

Os dois artigos que abordam as bases genéticas das doenças ilustram a capacidade de trabalhar abordagens sofisticadas durante processos de investigação e de os ligar a necessidades de diagnóstico e intervenção em caso de emergência como a que atualmente vivemos.

Não será, assim, por acaso que todos os países mantem e reforçam Institutos públicos de Saúde Pública de âmbito Nacional, com capacidades e trabalho em vigilância epidemiológica, observação em saúde e investigação científica, três das seis funções essenciais que o INSA pratica, além das funções de Laboratório de Referência no setor da Saúde, disseminação da cultura científica e prestação de serviços diferenciados. Assentes numa forte base de capacidade instalada e em constante atualização e modernização na vertente laboratorial e epidemiológica e elevado grau de prontidão, 24h por dia, 7 dias por semana, 52 semanas por ano, estas funções contribuem para a segurança e o bem-estar dos portugueses.

Carlos Matias Dias

*Médico especialista em Saúde Pública,
Coordenador do Departamento de Epidemiologia
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP*

_Será que os planos de contingência para ondas de calor reduzem a mortalidade associada ao calor? Um estudo da diferença-das-diferenças em Portugal

Do heat contingency plans reduce heat related deaths? A difference-in-difference study in Portugal

Catarina Leitão^{1,2}, Susana Pereira da Silva³, Rita Roquette³, Mafalda Sousa Uva³, Baltazar Nunes³

catleitao64@gmail.com

(1) Unidade de Saúde Pública. Unidade Local de Saúde Litoral Alentejano, Santiago do Cacém, Portugal

(2) Exército Português, Portugal

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

_Resumo

Com a implementação em Portugal Continental, a partir de 2004, dos planos de contingência para ondas de calor (PCOC) espera-se que tenha havido uma redução do impacto do calor na mortalidade. Através da comparação da mortalidade diária por todas as causas em períodos de calor adverso (períodos em que a temperatura tem impacto na mortalidade) antes (2000-2003) e após (2005-2008) a implementação dos PCOC, pretendemos estimar o seu impacto na mortalidade ocorrida nesses períodos. Aplicou-se o método da diferença-das-diferenças (DID) às séries temporais dos óbitos diários por todas as causas, total e por estratos (sexo, grupo etário, região de saúde e tercils da distribuição da versão portuguesa do *European Deprivation Index*) cedidos pelo Instituto Nacional de Estatística (INE). Os períodos de calor adverso foram classificados em excesso de calor e calor extremo com base nas temperaturas diárias, máximas e mínimas, cedidas pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA). Para estimar o impacto dos PCOC na mortalidade, foi ajustado um modelo de regressão ao número de óbitos diários. Os resultados preliminares para Portugal Continental e para a maioria das regiões de saúde evidenciaram uma redução na mortalidade diária por todas as causas nos dias de calor extremo, após a implementação dos PCOC.

_Abstract

With the implementation in Portugal, since 2004, of specific heat contingency plans (HCP) or contingency plans for heat (CPH), a reduction of heat-related mortality is expected. Through the comparison of mortality in periods of adverse heat before (2000-2003) and after (2005-2008) the implementation of HCP, in Portugal (mainland), we aimed to estimate its impact in heat related mortality. A difference-in-differences (DID) approach was undertaken using time series analysis of daily deaths from all causes, total and population subgroups (sex, age group, health region and the tertile of the European Deprivation Index distribution) obtained from Statistics Portugal (INE). The adverse heat periods were classified as heat excess or extreme heat, accordingly the daily maximum and minimum temperatures obtained from Portuguese Meteorological Institute (IPMA). To estimate the impact of the HCP, we fitted a regression model to the daily number of deaths. We found evidence that the HCP contributed to reducing mortality on extreme hot days in Portugal (mainland) and most of the portuguese health regions.

_Introdução

O efeito do calor extremo na mortalidade encontra-se bem documentado (1-4). Em Portugal, desde 1980, têm sido descritos vários períodos de calor extremo com impacto significativo na mortalidade diária (5-11), quando são ultrapassados determinados limiares de temperatura (12-18). Pela sua localização geográfica, Portugal é considerado um dos países europeus mais vulneráveis ao aumento das temperaturas e à alteração do padrão climático (1,2). Nas últimas décadas, há evidência que aponta para a diminuição do risco de mortalidade associada ao calor, o que poderá indiciar uma mudança/redução do impacto do calor na saúde das populações (1-3,18-20). Pode pressupor-se que, para níveis semelhantes de exposição, essa diminuição seja parcialmente atribuída à implementação de programas de intervenção em saúde pública (1).

A implementação de planos de contingência específicos para períodos de calor extremo, associados a sistemas de vigilância e alerta, demonstrara estar relacionado a uma diminuição no número de mortes associadas ao calor (1-3,15,16,21,22). Em Portugal, apesar de continuar a ser observado um excesso de mortalidade associada ao calor (8-11,13), espera-se que tenha havido uma redução do seu impacto após a implementação dos planos de contingência para ondas de calor (PCOC), em 2004, integrando o Índice-ÍCARO (17,23-25).

_Objetivo

Através da comparação da mortalidade diária por todas as causas em períodos de calor adverso (períodos em que a temperatura tem impacto na mortalidade), antes (2000-2003) e após (2005-2008) a implementação dos PCOC, em Portugal Continental, pretendemos estimar o impacto dos PCOC na mortalidade ocorrida nesses períodos.



_Material e métodos

Aplicou-se o método da diferença-das-diferenças (DID) (27,28) às séries temporais dos óbitos diários por todas as causas registados nos meses estivais (maio a setembro) entre 2000 e 2008, em Portugal Continental, total e por estratos (sexo, grupo etário, região de saúde e tercís da distribuição da versão portuguesa do *European Deprivation Index*) cedidos pelo Instituto Nacional de Estatística (INE). Os períodos de calor adverso foram classificados em excesso de calor e calor extremo com base nas temperaturas diárias, máximas e mínimas, cedidas pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA).

Foi calculada a redução bruta do número médio de óbitos diários nos períodos de excesso de calor e calor extremo através do cálculo da DID, para a população geral de Portugal Continental e para cada estrato das variáveis a estudar. A DIDbruta foi calculada pela diferença entre duas diferenças: a) a diferença entre o número médio de óbitos diários em períodos de excesso de calor ou calor extremo antes e após a implementação dos PCOC e b) a diferença entre o número médio de óbitos diários em períodos sem calor antes e após a implementação dos PCOC.

Para estimar o impacto da implementação dos PCOC na redução da mortalidade diária nos períodos de calor adverso, na população geral de Portugal Continental e para cada estrato das variáveis a estudar, foi usado um modelo de regressão de Poisson com função de ligação *identity*, separadamente para os períodos de excesso de calor e de calor extremo. Os modelos foram ajustados para as variáveis mês (sazonalidade), dia da semana (variação intrassemanal), para a proporção (%) de agregados privados com acesso a ar condicionado e estimativa anual da população residente como variável *offset*. O grupo referência/contrafactual foi definido pela extrapolação da tendência de longo curso subjacente à mortalidade diária observada nos períodos sem calor, antes e após a implementação dos PCOC.

A DID foi obtida através do parâmetro de interação calor*PCOC. Serão apresentados os resultados preliminares para o total de Portugal Continental e regiões de saúde.

_Resultados

A implementação dos PCOC teve um impacto estatisticamente significativo na redução da mortalidade diária média por todas as causas, em períodos de calor extremo, na população geral de Portugal Continental (tabela 1). Estimamos que tenham sido prevenidos, no total, uma média de 1059 (IC95%=458 a 1661) óbitos por todas as causas, em períodos de calor extremo, entre 2005 e 2008, período de vigência do PCOC. Ou seja, foram prevenidos, em média, cerca de 35% (IC95%=9 a 54) dos óbitos por todas as causas que se verificariam em períodos de calor extremo, caso os PCOC não tivessem sido implementados (tabela 2). Nos períodos de excesso de calor verifica-se também uma redução na média da mortalidade total de cerca de 3 óbitos diários em média (IC95%=-3 a 9). Contudo com os dados analisados não se obteve uma associação estatisticamente significativa com a implementação dos PCOC.

A nível das regiões de saúde, verifica-se uma redução na média da mortalidade diária por todas as causas após a implementação dos PCOC, em períodos de excesso de calor, estatisticamente significativa para as regiões do Norte, Alentejo e Algarve (tabela 1). Nos períodos de calor extremo a região Centro é a única onde não se observa uma redução estatisticamente significativa. Apesar do número total de óbitos diários prevenidos, em média, nestas regiões ser indicativo de um impacto efetivo dos PCOC na mortalidade diária em períodos de calor adverso (gráfico 1 e gráfico 2), o facto de estarmos a lidar com números pequenos faz com que estes resultados devam ser interpretados com cautela. Isto aplica-se principalmente na região do Algarve, em que os períodos de calor adverso são definidos tendo em conta a temperatura medida numa estação meteorológica única para toda a região.



Tabela 1: Impacto da implementação dos planos de contingência para ondas de calor (PCOC) na redução da mortalidade diária por todas as causas, em períodos de excesso de calor e calor extremo ao nível de Portugal Continental e Região de Saúde (organização do Serviço Nacional de Saúde anterior a 2007).

	Excesso de calor			Calor extremo		
	DIDbruta (M0)	DIDajustada (IC95%)	Valor <i>p</i>	DIDbruta (M0)	DIDajustada (IC95%)	Valor <i>p</i>
Portugal Continental	5	3 (-3 a 9)	0,305	16	13 (5 a 20)	<0,001
Região Norte	3	3 (0 a 5)	0,023	5	4 (1 a 8)	0.007
Região Centro	1	1 (-1 a 4)	0,244	1	1 (-2 a 4)	0,424
Região Lisboa e Vale do Tejo	1	1 (-2 a 4)	0,483	4	4 (1 a 7)	0.007
Região Alentejo	2	2 (1 a 3)	0,002	2	2 (1 a 3)	<0,001
Região Algarve	2	2 (0 a 3)	0,026	6	6 (3 a 9)	<0,001

DIDbruta: estimada pelo modelo M0 – Modelo Quasi-Poisson não ajustado para fatores de confundimento; inclui a variável dependente número de óbitos diários por todas as causas e as variáveis independentes implementação dos PCOC (0, 1), os períodos de excesso de calor (0, 1) e calor extremo (0, 2) e a interação entre os dois [excesso de calor e plano (M0_1); calor extremo e plano (M0_2)].

DIDajustada: ao nível de Portugal Continental, foi estimada pelo modelo M2 - Modelo Quasi-Poisson M0 ajustado para a sazonalidade e proporção (%) de agregados privados com acesso a ar condicionado, e com a população como *offset*; IC95% e valores de *p* obtidos para o parâmetro de interação; ao nível da Região de Saúde, foi estimado pelo modelo M1 - Modelo Quasi-Poisson M0 ajustado para a sazonalidade com a população como *offset*.

IC95% e valores de *p* obtidos para o parâmetro de interação.

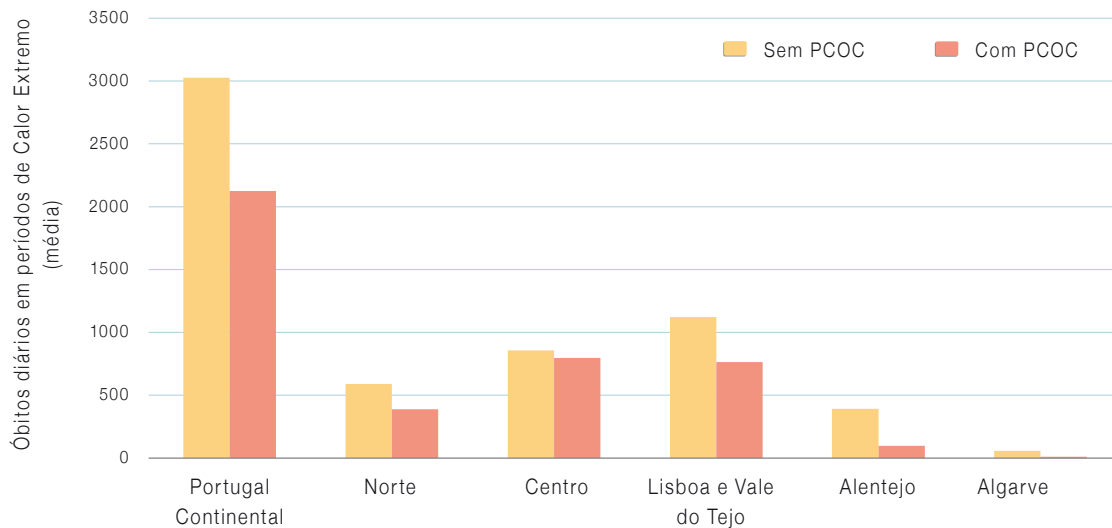
Tabela 2: Impacto da implementação dos planos de contingência para ondas de calor (PCOC) na mortalidade diária por todas as causas, em períodos de excesso de calor e calor extremo ao nível de Portugal Continental e de Região de Saúde (organização do Serviço Nacional de Saúde anterior a 2007).

	Excesso de calor		Calor extremo	
	Número total de óbitos prevenidos (média) (IC95%)	Fração total do número de óbitos prevenidos em % (média) (IC95%)	Número total de óbitos prevenidos (média) (IC95%)	Fração total do número de óbitos prevenidos em % (média) (IC95%)
Portugal Continental	558 (-510 a 1625)	14 (-14 a 36)	1059 (458 a 1661)	35 (9 a 54)
Região Norte	390 (53 a 728)	39 (0 a 64)	230 (62 a 398)	39 (-4 a 68)
Região Centro	291 (-199 a 782)	24 (-19 a 55)	120 (-174 a 414)	14 (-33 a 45)
Região Lisboa e Vale do Tejo	170 (-305 a 646)	17 (-50 a 52)	415 (113 a 716)	37 (2 a 59)
Região Alentejo	429 (156 a 701)	66 (32 a 95)	302 (139 a 464)	77 (44 a 108)
Região Algarve	71 (9 a 134)	44 (5 a 74)	47 (25 a 70)	82 (53 a 109)

Utilizando o valor da DIDajustada (M2 ao nível de Portugal Continental e M1 ao nível das Regiões de Saúde) foram determinados: a) O número médio diário de óbitos associados ao calor prevenidos pelos PCOC (beta3); b) o número total de óbitos associados ao calor prevenidos durante os períodos de calor adverso após a implementação do PCOC (beta3* número de dias de calor adverso no período após PCOC); e c) a fração do número médio diário de óbitos associados ao calor prevenidos pelos PCOC beta3 (redução mortes calor com PCOC)/ beta1 (mortalidade associada ao calor sem PCOC), com respetivo IC(95%) obtido pelo método de *bootstrapping* (1000 amostras).



Gráfico 1: Impacto da implementação dos planos de contingência para ondas de calor (PCOC) na mortalidade diária por todas as causas, em períodos de calor extremo, ao nível de Portugal Continental e de Região de Saúde (organização do Serviço Nacional de Saúde anterior a 2007).



Discussão e conclusões

Os resultados preliminares do nosso estudo sugerem que a implementação dos PCOC, como um todo, podem ter contribuído para a redução da mortalidade diária por todas as causas, principalmente em períodos de calor extremo, sendo essa redução aproximadamente 35% dos óbitos associados ao calor caso não estivessem implementados os PCOC, em Portugal Continental. Sugere, também, que há uma percentagem importante de mortes associadas ao calor, cerca de 65%, que poderão ainda ser evitadas.

São, pois, necessários estudos complementares de avaliação do grau da implementação dos PCOC ao longo de todo o sistema de saúde, assim como estudos de efetividade das medidas neles contempladas, comparando com boas práticas internacionais com comprovada efetividade na proteção da saúde da população em períodos de calor extremo.

Recomendamos vivamente o uso de métodos quase-experimentais, como o DID, para avaliar o impacto dos planos de contingência e ajustar a sua implementação, visando o desenvolvimento de melhores medidas e políticas de saúde pública que sejam efetivas na redução do impacto do calor na saúde das populações.

Referências bibliográficas:

- (1) McGregor G, Bessemoulin P, Ebi K, et al. (eds). Heatwaves and health: guidance on warning-system development. Geneva: World Meteorological Organization, World Health Organization, 2015. https://www.who.int/globalchange/publications/WMO_WHO_Heat_Health_Guidance_2015.pdf?ua=1
- (2) World Health Organization Regional Office for Europe. Protecting health in Europe from climate change: 2017 update. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2017. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/355792/ProtectingHealthEuropeFromClimateChange.pdf?ua=1
- (3) Matthies F, Bickler G, Marin N, et al. (eds). Heat-health action plans : guidance. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2008. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/107888>
- (4) Bustinza R, Lebel G, Gosselin P, et al. Health impacts of the July 2010 heat wave in Québec, Canada. BMC Public Health. 2013;13:56. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-56>
- (5) Rodrigues AP, Batista I, Silva S. Médicos-Sentinela: o que se fez em 2017. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde, 2019. <http://hdl.handle.net/10400.18/6422>
- (6) Paixão EJ, Nogueira PJ. Efeitos de uma onda de calor na mortalidade. Rev Port Saude Pública. 2003;21(1):41-54.
- (7) Calado R, Nogueira PJ, Catarino J, et al. A onda de calor de Agosto de 2003 e os seus efeitos sobre a mortalidade da população portuguesa. Rev Port Saude Pública. 2004;22(2):7-20.
- (8) Paixão EJ, Nogueira PJ, Nunes AR, et al. Onda de calor de Julho de 2006: efeitos na mortalidade: estimativas preliminares para Portugal Continental. Lisboa: Observatório Nacional de Saúde. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2006.
- (9) Silva S, Roquette R, Nunes B, et al. A onda de calor de junho e julho de 2013: análise dos seus impactes na mortalidade por distrito de Portugal Continental. Boletim Epidemiológico Observações. 2016 janeiro-abril;5(15):27-9. <http://hdl.handle.net/10400.18/3700>
- (10) Pereira da Silva S, Batista I, Antunes L, et al. Estimativas do excesso de mortalidade associado a períodos de calor extremo ocorridos em Portugal em 2014: relatório: Projecto Ícaro. Lisboa: Departamento de Epidemiologia. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2014.



- (11) Pereira da Silva S, Batista I, Nunes B, et al. Estimativas de excesso de mortalidade associado a calor extremo entre maio e setembro de 2015, em Portugal Continental: relatório: Projecto Ícaro. Lisboa: Departamento de Epidemiologia. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2015.
- (12) Nogueira P, Paixão E. Models for mortality associated with heatwaves: update of the Portuguese heat health warning system. *Int J Climatol*. 2008;28:545-62. <https://doi.org/10.1002/joc.1546>
- (13) Nogueira PJ, Paixão EJ, Morais L. Temperaturas do ar de Lisboa e Portugal (por distritos). Distribuições semanais e geográficas: modelos para previsão e monitorização dos impactos das ondas de calor na mortalidade humana. *Portugal Saúde em Números*. 2013;1:8-18. <http://hdl.handle.net/10400.26/10508>
- (14) Paixão EJ, Nogueira PJ. Efeitos de uma onda de calor na mortalidade. *Port Saude Pública*. 2003;21(1):41-54.
- (15) Almeida SP, Casimiro E, Calheiros J. Effects of apparent temperature on daily mortality in Lisbon and Oporto, Portugal. *Environ Heal*. 2010;9:12. <https://doi.org/10.1186/1476-069x-9-12>
- (16) García-Herrera R, Díaz J, Trigo RM, et al. Extreme summer temperatures in Iberia: Health impacts and associated synoptic conditions. *Ann Geophys*. 2005;23:239-51. <https://doi.org/10.5194/angeo-23-239-2005>
- (17) Nogueira PJ, Paixão EJ, Nunes B, et al. Excesso de calor em Agosto de 2005: efeitos na mortalidade: estimativas para Portugal Continental. Lisboa: Observatório Nacional de Saúde. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2005.
- (18) Pereira da Silva S, Batista I, Antunes L, et al. Estimativas do excesso de mortalidade associado a períodos de calor extremo ocorridos em Portugal em 2014: relatório: Projecto Ícaro. Lisboa: Departamento de Epidemiologia. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2014. <http://hdl.handle.net/10400.18/2455>
- (19) Vicedo-Cabrera AM, Sera F, Guo Y, et al. A multi-country analysis on potential adaptive mechanisms to cold and heat in a changing climate. *Environ Int*. 2018;111:239-46. Epub 2017 Dec 20. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.11.006>
- (20) Gasparri A, Guo Y, Hashizume M, et al. Temporal variation in heat-mortality associations: a multicountry study. *Environ Health Perspect*. 2015;123(11):1200-7. <https://doi.org/10.1289/ehp.1409070>
- (21) Boeckmann M, Rohn I. Is planned adaptation to heat reducing heat-related mortality and illness?: a systematic review. *BMC Public Health*. 2014;14:1112. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-1112>
- (22) Toloo G, Fitzgerald G, Aitken P, et al. Are heat warning systems effective?. *Environ Health*. 2013;12:27. <https://doi.org/10.1186/1476-069x-12-27>
- (23) Nunes B, Paixão E, Dias CM, Nogueira P, Falcão JM. Air conditioning and intrahospital mortality during the 2003 heatwave in Portugal: evidence of a protective effect. *Occup Environ Med*. 2011;68:218-23.
- (24) Portugal.Ministério da Saúde.Direção-Geral da Saúde. Plano de contingência para ondas de calor 2005: avaliação do plano de contingência para as ondas de calor: relatório. Lisboa: Direção-Geral da Saúde; 2005.
- (25) Nogueira PJ, Machado A, Rodrigues E, Nunes B, Sousa L, Jacinto M, et al. The new automated daily mortality surveillance system in Portugal. *Surveill Outbreak Reports*. 2010.
- (26) Nogueira PJ. Examples of heat health warning systems: Lisbon's ÍCARO's Surveillance System: Summer of 2003. In: Kirch W, Bertolini R, Menne B, editors. *Extreme weather events and public health responses*. Berlin: Springer; 2005. p. 141-59.
- (27) Benmarhnia T, Bailey Z, Kaiser D, Auger N, King N, Kaufman J. A difference-in-differences approach to assess the effect of a heat action plan on heat-related mortality, and differences in effectiveness according to sex, age, and socioeconomic status: Montreal, Quebec. *Environ Health Perspect*. 2016;124(11):1694-9.
- (28) Saeed S, Moodie EEM, Strumpf EC, Klein MB. Evaluating the impact of health policies: using a difference-in-differences approach. *Int J Public Health [Internet]*. 2019; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00038-018-1195-2>

Excesso de mortalidade em Portugal associado ao período de calor extremo em agosto de 2018: um instrumento ao serviço da intervenção em saúde pública

Excess mortality in Portugal associated with an extreme heat period in August 2018: a Public Health instrument

Ana Rita Torres, Susana Silva, Baltazar Nunes, Ana Paula Rodrigues

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

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

_Resumo

Durante o mês de agosto de 2018, entre os dias 01 e 06, ocorreu um período de calor extremo em Portugal, tendo o sistema de vigilância ÍCARO previsto consequências graves a nível da mortalidade. Associado às temperaturas elevadas, estimou-se um excesso de mortalidade por todas as causas em Portugal de 6,9 óbitos por 100.000 habitantes. A região de Lisboa e Vale do Tejo (LVT), o grupo etário com 85 ou mais anos, e o género feminino foram os grupos para os quais foram estimados os valores mais elevados (taxas de excesso de mortalidade: 11,7/100.000, 126,7/100.000 e 8,4/100.000, respetivamente). O dia 05 de agosto foi aquele em que se observou um maior excesso de mortalidade em Portugal, destacando-se LVT com um excesso relativo de 175,0% e o grupo etário com 85 ou mais anos de idade com um excesso relativo de 129,5%.

_Abstract

Between the 1st and 6th of August 2018, Portugal was under a period of extreme heat, and the ICARO surveillance system anticipated serious consequences in terms of mortality. An estimated excess of 6.9 deaths per 100,000 inhabitants was attributed to the period of extreme heat, in Portugal. Lisbon and Tagus Valley (LVT) region, individuals with more than 85 years old, and females were the groups with the highest estimated excess mortality rates (11.7 deaths per 100,000 population, 126.7 deaths per 100,000 population and 8.4 deaths per 100,000 population, respectively). In the day with highest excess mortality rate in Portugal (5th of August), relative excess mortality was 175.0% for Lisbon and Tagus Valley region, and relative excess mortality was 129.5% for individuals with more than 85 years old.

_Introdução

O efeito negativo das temperaturas extremas na saúde humana tem sido amplamente estudado e descrito na literatura (1-4). Em particular, no que se refere às temperaturas elevadas, é vasta a evidência proveniente de estudos epidemiológicos sobre o impacto destes fenómenos atmosféricos na saúde, comprovado através do aumento do número de óbitos durante períodos de calor extremo (5-11). Em Portugal, há registos de aumento da mortalidade por todas as causas durante as ondas de calor de 1981, 1991, 2003 e 2013 (12-14).

O risco de um indivíduo ser afetado devido ao calor varia em função de vários fatores, em particular, idade, comorbilidades, medicação crónica, suporte social e familiar e condições de vida (15). No entanto, este risco pode ser minimizado através da intervenção a vários níveis, nomeadamente, o social e comportamental. Consequentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o desenvolvimento e implementação de sistemas de monitorização dos efeitos do calor na saúde humana, com vista a minorar o seu impacto (16).

Tendo em conta estas recomendações, em Portugal Continental vigora anualmente entre os meses de maio e setembro, o sistema de vigilância ÍCARO. Este sistema criado em 1999, e coordenado pelo Departamento de Epidemiologia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), em parceria com o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), assenta na análise de dados meteorológicos para a emissão de níveis de alerta diários, que não são mais do que a tradução do impacto do calor na mortalidade, previsto a três dias (14,16-18).

Os resultados diários são enviados a um grupo restrito de profissionais e serviços, com vista à tomada de decisões em



saúde pública, já que o Índice ÍCARO (e respetivos níveis de alerta) é um dos indicadores utilizados na implementação do Plano de Contingência de Temperaturas Extremas Adversas (PCTEA) (19) pelas Autoridades de Saúde.

Em paralelo com o sistema ÍCARO, funciona o sistema de Vigilância Diária da Mortalidade (VDM), que colige dados provenientes do Sistema de Informação dos Certificados de Óbito (SICO), disponibilizados pelo Instituto de Registos e Notariado (IRN). Esta ferramenta nasceu da necessidade de estimar o impacto do calor na população portuguesa de forma rápida e eficiente (20), evoluindo de uma utilização complementar, para um dos principais instrumentos de observação e vigilância que funciona ao longo de todo o ano.

Em 2018, foi observado em Portugal um período de temperaturas extremas, entre 01 e 06 de agosto. A previsão do impacto na mortalidade foi detetada precocemente (30/07/2018) pelo sistema ÍCARO, tendo sido emitido um 'Alerta de Período de Calor Extremo', o mais grave na escala deste sistema.

_Objetivo

Este trabalho tem como objetivo estimar e descrever o excesso de mortalidade associado a esta onda de calor meteorológica observada entre 01 e 06 de agosto de 2018.

_Material e métodos

De acordo com a literatura, o impacto das temperaturas elevadas na saúde humana é sentido até três dias após a sua ocorrência (21-23). Consequentemente, devido ao conhecimento de possíveis desfasamentos do efeito do calor na mortalidade, o período de análise considerado para este trabalho englobou o período de calor extremo (01 a 06 de agosto) acrescido de 3 dias, pelo que o período de análise considerado neste trabalho foi compreendido entre 01 e 09 de agosto.

O número de óbitos por todas as causas, estratificado por género, grupo etário (0-14; 15-24; 25-44; 45-64; 65-74; 75-84; ≥85 anos) e região de saúde foi obtido através do sistema VDM, com dados extraídos no dia 12/09/2019. O número de óbitos esperado foi calculado ajustando às séries

temporais de mortalidade por todas as causas em Portugal, um modelo de regressão linear formado por uma componente polinomial (com vista a explicar tendências temporais), e uma componente sinusoidal (de modo a captar a sazonalidade observada), utilizando um histórico desde a semana 40 de 2007 até à semana 20 de 2018, ao qual se retiraram os períodos associados a excessos de mortalidade (epidemias de gripe, períodos de frio e períodos de calor extremo) (24).

O número de óbitos em excesso foi estimado a partir da diferença entre o número de óbitos observado e o número de óbitos esperado sem efeito do calor extremo, para os dias identificados como apresentando excesso de mortalidade segundo as regras de Westgard (25) entre 01 e 09 de agosto. Este valor foi também expresso na forma de taxa, utilizando o número de óbitos em excesso e a estimativa da população residente em Portugal, em 2016 (26).

Adicionalmente, para os dias identificados com excesso de mortalidade absoluto, estimou-se o excesso de mortalidade relativo:
$$\left(\frac{N^{\circ} \text{ de } \acute{o}b\text{itos observado}}{N^{\circ} \text{ de } \acute{o}b\text{itos esperado sem efeito do calor}} \right) - 1 \times 100\%$$

Os excessos de mortalidade (absolutos e relativos) foram estimados para Portugal, por região de saúde, grupo etário e género. Para os estratos onde se observaram excessos de mortalidade, foi feita uma análise por dia, de forma a identificar os dias em que houve maior impacto na mortalidade.

_Resultados

A **tabela 1** apresenta o excesso de mortalidade associado ao período de calor extremo identificado em Portugal, desagregado por região de saúde, grupo etário e género. No período em análise (01 a 09 de agosto de 2018), estimou-se um excesso de 707 óbitos (IC95%=601-813) em Portugal, correspondente a uma taxa de excesso de 6,9 óbitos por 100.000 habitantes. Adicionalmente, à exceção do Algarve, todas as regiões registaram um excesso de mortalidade, sendo Lisboa e Vale do Tejo (LVT) a que terá tido o excesso de mortalidade mais elevado (11,7 óbitos por 100.000 habitantes).

Por outro lado, a distribuição da mortalidade por grupo etário revela que o grupo etário mais afetado foi o de indivíduos com idade ≥85 anos (taxa de excesso de mortalidade: 126,7 óbitos



Tabela 1: ↴ Estimativas de excessos de mortalidade associadas ao período de calor extremo em Portugal, por região de saúde, grupo etário e género.

	Óbitos em excesso (n)	IC95%	Excesso relativo (%)	Taxa de excesso (por 10 ⁵ habitantes)
Região				
Portugal	707	(601;813)	30,01	6,9
Norte	119	(76;162)	16,89	3,3
Centro	101	(69;133)	22,91	6,1
Lisboa e Vale do Tejo	426	(370;482)	53,34	11,7
Alentejo	37	(22;52)	26,07	7,7
Algarve	0	(0;0)	0,00	0,0
Açores	0	(0;0)	0,00	0,0
Madeira	7	(1;13)	12,40	2,7
Grupo etário				
0-14	0	(0;0)	0,00	0,0
15-24	0	(0;0)	0,00	0,0
25-44	0	(0;0)	0,00	0,0
45-64	37	(19;55)	11,45	1,3
65-74	46	(27;65)	12,57	4,1
75-84	218	(169;267)	32,97	28,2
≥85	362	(304;420)	38,45	126,7
Género				
Feminino	454	(389;519)	39,52	8,4
Masculino	206	(156;256)	17,07	4,2

A soma dos óbitos em excesso de cada estrato não totaliza o valor de Portugal, pois estes resultam de modelos diferentes.

por 100.000 habitantes), embora também se tenha observado excesso de mortalidade nos grupos etários acima dos 45 anos [45-64 anos (1,3 óbitos por 100.000 habitantes), 65-74 anos (4,1 óbitos por 100.000 habitantes), e 75-84 anos (28,2 óbitos por 100.000 habitantes)].

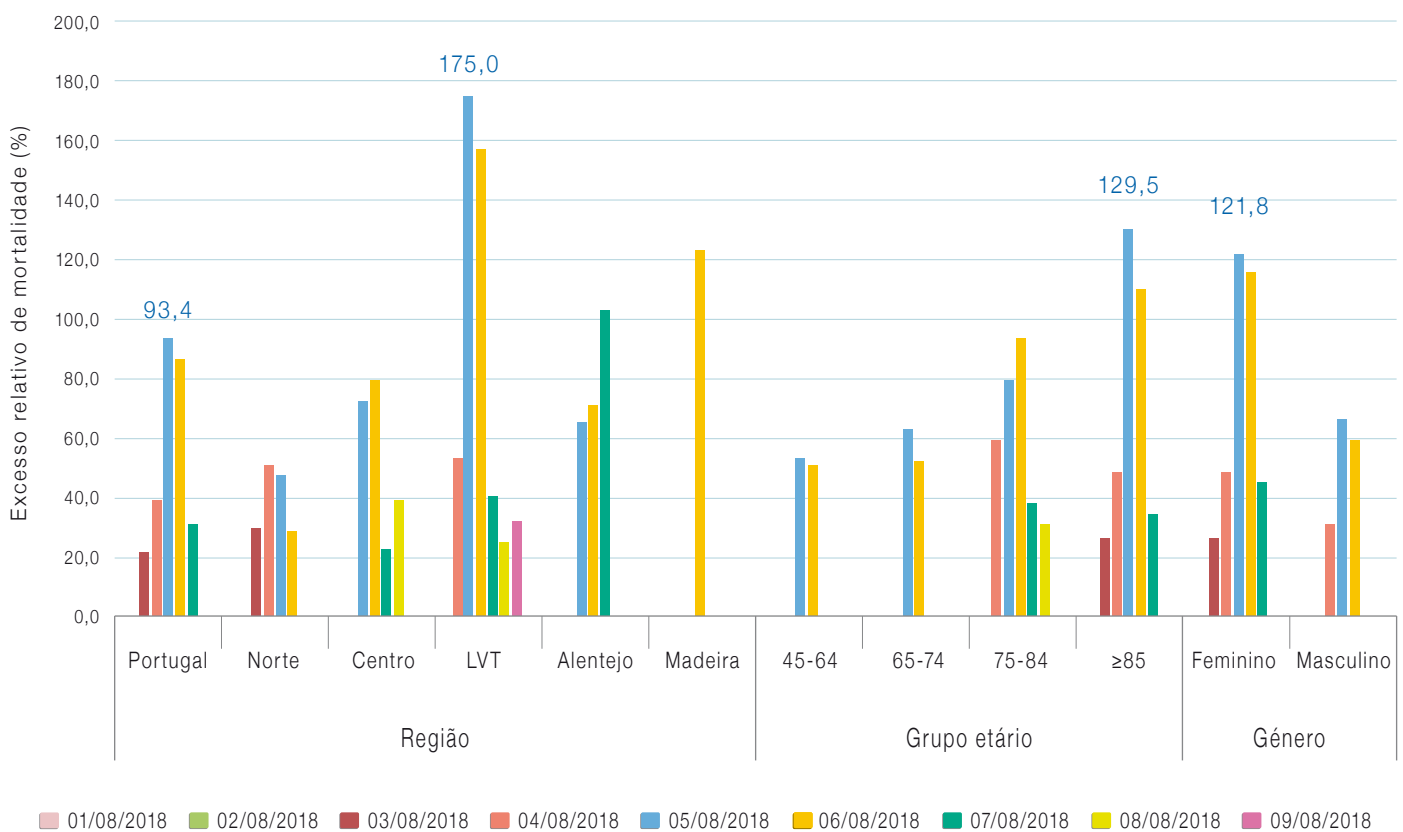
A taxa de excesso no género feminino (8,4 óbitos por 100.000 habitantes) foi o dobro da observada no género masculino (4,2 óbitos por 100.000 habitantes).

Portugal apresentou excesso de mortalidade de 03/08/2018 a 07/08/2018, salientando-se o dia 05 de agosto, com um excesso relativo de 93,4%. LVT foi a região que esteve mais

tempo em excesso de mortalidade (entre 04/08/2018 a 09/08/2018) e que apresentou simultaneamente maior excesso relativo diário (175,0%, para o dia 05 de agosto). Analogamente, o maior excesso relativo de mortalidade diário a nível dos grupos etários ocorreu no dia 05 de agosto, para o grupo de indivíduos ≥85 anos (129,5%). Por fim, o maior excesso relativo de mortalidade diário a nível do género ocorreu no dia 05 de agosto, para o género feminino (121,8%) (gráfico 1).



Gráfico 1: ↘ Evolução diária do excesso de mortalidade relativo, por região de saúde, grupo etário e género.



Discussão e conclusões

Durante o mês de agosto de 2018, entre os dias 01 e 06, ocorreu um período de calor extremo em Portugal, tendo o sistema ÍCARO previsto consequências graves a nível da mortalidade. No período em análise, estimou-se em Portugal um excesso de 707 óbitos, correspondendo a uma taxa de excesso de 6,9 óbitos por 100.000 habitantes. A região de Lisboa e Vale do Tejo (LVT), o grupo etário com 85 ou mais anos, e o género feminino foram os grupos que apresentaram as taxas de excesso mais elevadas (11,7/100.000, 126,7/100.000 e 8,4/100.000, respetivamente). Saliente-se que a taxa de excesso de mortalidade de LVT foi superior à estimada para Portugal, o que pode traduzir um diferente nível de exposição, ou de vulnerabilidade, das populações. O dia 05 de agosto foi aquele em que se observou um maior excesso de mortalidade em Portugal, destacando-se LVT

com um excesso relativo de 175,0%, o grupo etário com 85 ou mais anos de idade com um excesso relativo de 129,5%, e o género feminino com um excesso relativo de 121,8%. Tendo em conta o envelhecimento da população portuguesa e o elevado peso das doenças crónicas na população com idade superior a 65 anos (27), tais resultados podem indicar uma elevada vulnerabilidade das populações atingidas, colocando também a tónica na necessidade de avaliar as medidas de prevenção e controlo mais efetivas nas populações afetadas. Estes resultados confirmam o alerta previsto pelo sistema ÍCARO, suportando o seu uso pelas Autoridades de Saúde como sistema de alerta e resposta atempada durante o período de verão no âmbito do Plano de Contingência de Temperaturas Extremas Adversas (19). No entanto, tendo em conta as diferenças regionais observadas, parece-nos necessário investigar fatores que possam ter contribuído para os maiores impactos observados, como as condições at-



mosféricas (temperatura, qualidade do ar), o efeito das cidades (qualidade do ar e efeito “ilha de calor”), a suscetibilidade das populações e as medidas de saúde pública implementadas. A nível do género, parece-nos também necessário averiguar fatores que possam explicar as diferenças encontradas entre homens e mulheres, tais como o nível de exposição, ou a suscetibilidade (fatores metabólicos, fármacos, idade).

Referências bibliográficas:

- (1) Gasparri A, Guo Y, Hashizume M, et al. Mortality risk attributable to high and low ambient temperature: a multicountry observational study. *Lancet*. 2015;386(9991):369-75. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)62114-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)62114-0)
- (2) Armstrong B, Bell ML, de Sousa Zanotti Stagliorio Coelho M, et al. Longer-term impact of high and low temperature on mortality: an international study to clarify length of mortality displacement. *environ health perspect*. 2017;125(10):107009. <https://doi.org/10.1289/ehp1756>
- (3) Braga AL, Zanobetti A, Schwartz J. The effect of weather on respiratory and cardiovascular deaths in 12 U.S. cities. *Environ Health Perspect*. 2002;110(9):859-63. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110859>
- (4) Huynen MM, Martens P, Schram D, et al. The impact of heat waves and cold spells on mortality rates in the Dutch population. *Environ Health Perspect*. 2001;109(5):463-70. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109463>
- (5) Rooney C, McMichael AJ, Kovats RS, et al. Excess mortality in England and Wales, and in Greater London, during the 1995 heatwave. *J Epidemiol Community Health*. 1998;52(8):482-86. <https://doi.org/10.1136/jech.52.8.482>
- (6) Fouillet A, Rey G, Laurent F, et al. Excess mortality related to the August 2003 heat wave in France. *Int Arch Occup Environ Health*. 2006;80(1):16-24. <https://doi.org/10.1007/s00420-006-0089-4>
- (7) Kaiser R, Le Tertre A, Schwartz J, et al. The effect of the 1995 heat wave in Chicago on all-cause and cause-specific mortality. *Am J Public Health*. 2007;97(Suppl 1):S158-S162. <https://doi.org/10.2105/ajph.2006.100081>
- (8) Perčič S, Kukec A, Cegnar T, Hojs A. Number of Heat Wave Deaths by Diagnosis, Sex, Age Groups, and Area, in Slovenia, 2015 vs. 2003. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(1):173. <https://doi.org/10.3390/ijerph15010173>
- (9) Baccini M, Kosatsky T, Biggeri A. Impact of summer heat on urban population mortality in Europe during the 1990s: an evaluation of years of life lost adjusted for harvesting. *PLoS One*. 2013;8(7):e69638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069638>
- (10) Hales S, Kovats S, Lloyd S, et al (eds). Quantitative risk assessment of the effects of climate change on selected causes of death, 2030s and 2050s. Geneva: World Health Organization, 2014. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/134014>
- (11) Joe L, Hoshiko S, Dobraca D, et al. Mortality during a Large-Scale Heat Wave by Place, Demographic Group, Internal and External Causes of Death, and Building Climate Zone. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(3):299. <https://doi.org/10.3390/ijerph13030299>
- (12) Direção-Geral da Saúde, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Onda de calor de Agosto de 2003: os seus efeitos sobre a mortalidade da população portuguesa. Lisboa, 2004. <https://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/onda-de-calor-de-agosto-de-2003-os-seus-efeitos-sobre-a-mortalidade-da-populacao-portuguesa-pdf.aspx>
- (13) Marto N. Ondas de calor: impacto sobre a saúde. *Acta Med Port*. 2005;18:467-74. <https://www.actamedicportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/download/1063/731>
- (14) Nogueira P, Paixão E. Models for mortality associated with heatwaves: update of the Portuguese heat health warning system. *Int. J. Climatol*. 2008;28(4):545-62. <https://doi.org/10.1002/joc.1546>
- (15) McGregor G, Bessemoulin P, Ebi K, et al. (eds). Heatwaves and health: guidance on warning-system development. Geneva: World Meteorological Organization, World Health Organization, 2015. https://www.who.int/globalchange/publications/WMO_WHO_Heat_Health_Guidance_2015.pdf?ua=1
- (16) Koppe C, Kovats S, Jendritzky G, et al. Heat-waves: risks and responses. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2004. (Health and Global Environmental Change Series, 2). http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0008/96965/E82629.pdf?ua=1
- (17) Nogueira PJ. Examples of heat health warning systems: Lisbon's ÍCARO's Surveillance System: Summer of 2003. In: Kirch W, Bertollini R, Menne B (eds). Extreme weather events and public health responses. Berlin: Springer, 2005. p. 141-59. https://doi.org/10.1007/3-540-28862-7_14
- (18) Nogueira P. Ondas de calor: modelos de medição previsão e monitorização dos impactos na saúde. (Tese de Doutoramento, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 2011). <http://hdl.handle.net/10362/64936>
- (19) Direção-Geral da Saúde, Plano de contingência para temperaturas extremas adversas - módulo calor. Lisboa: DGS, 2018. <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/plano-de-contingencia-saude-sazonal-modulo-verao-2018-referenciais1.aspx>
- (20) Nogueira PJ, Machado A, Rodrigues E, et al. The new automated daily mortality surveillance system in Portugal. *Euro Surveill*. 2010;15(13):19529. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19529>
- (21) Green RS, Basu R, Malig B, et al. The effect of temperature on hospital admissions in nine California counties. *Int J Public Health*. 2010;55(2):113-121. <https://doi.org/10.1007/s00038-009-0076-0>
- (22) Hajat S, Armstrong B, Baccini M, et al. Impact of high temperatures on mortality: is there an added heat wave effect?. *Epidemiology*. 2006;17(6):632-38. <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000239688.70829.63>
- (23) Lin S, Luo M, Walker RJ, et al. Extreme high temperatures and hospital admissions for respiratory and cardiovascular diseases. *Epidemiology*. 2009;20(5):738-46. <https://doi.org/10.1097/ede.0b013e3181ad5522>
- (24) Nunes B, Natário I, Carvalho, ML. Obtaining a mortality baseline free of influenza epidemic effects using models with no covariates. Lisboa: Centro de Estatística e Aplicações. Universidade de Lisboa, 2009. <http://ceaul.org/wp-content/uploads/2018/10/Nunes-Natario-e-Carvalho08.pdf>
- (25) Chaves T. Automated Daily Mortality Surveillance Systems: Integration of data collection, analysis and reporting system components. (Dissertação de mestrado, Instituto Superior Técnico de Lisboa, 2015). <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/cursos/mebiom/dissertacao/846778572210707>
- (26) Instituto Nacional de Estatística. Estimativas anuais da população residente. [Em linha]. [consult. 15/3/2019]. Disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&contecto=pi&ndOcorrCod=0008273&selTab=tab0&xlang=pt

_Surto de parotidite epidémica numa escola secundária do concelho de Vila Real de Santo António, Portugal, janeiro-fevereiro de 2019

Outbreak of epidemic parotitis in a secondary school in the municipality of Vila Real de Santo António, Portugal, January-February 2019

Raquel Neves, Teresa Lourenço, Carlos Ribeiro, Paula Palminha

paula.palminha@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de Doenças Evitáveis pela Vacinação. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa

_Resumo

A parotidite epidémica ("papeira") é uma doença contagiosa causada por um vírus de RNA, pertencente à família *Paramixovirus*, género *Rubulavirus*. O vírus da parotidite epidémica tem apenas um serotipo, mas 12 genótipos diferentes (A, B, C, D, F, G, H, I, J, K, L, N). Em Portugal, a vacina contra a papeira foi introduzida no Plano Nacional de Vacinação (PNV) em 1987 combinada com a vacina do sarampo e rubéola (VASPR). Desde a sua introdução, as taxas de cobertura vacinal referentes a esta vacina têm sido altas, contudo, o número de casos de papeira notificados, sem a ocorrência de surtos, foi sempre elevado comparativamente ao número de casos de sarampo e rubéola. Este trabalho teve como objetivo a confirmação laboratorial de um surto de parotidite epidémica ocorrido numa escola secundária do concelho de Vila Real de Santo António, Portugal, entre janeiro e fevereiro de 2019. A confirmação laboratorial dos casos foi efetuada através da deteção do RNA viral e da determinação de IgG e IgM utilizando reagentes comerciais. A determinação do genótipo foi efetuada por sequenciação cíclica. Entre janeiro e fevereiro de 2019, foram identificados 19 casos suspeitos de parotidite epidémica numa escola secundária do concelho de Vila Real de Santo António. A mediana de idades dos casos foi de 17,5 anos e apenas um indivíduo era não vacinado. O Laboratório Nacional de Referência de Doenças Evitáveis pela Vacinação recebeu produtos biológicos de 10 destes casos para confirmação laboratorial. Dos 10 casos em estudos, 5 foram confirmados laboratorialmente através da deteção do ácido nucleico viral, dos quais 4 eram indivíduos vacinados. Apenas um destes casos apresentava anticorpos IgM correspondendo ao indivíduo não vacinado. Os estudos de genotipagem mostraram que o vírus responsável por este surto pertence ao genótipo G. Do presente surto salienta-se que não foram detetados anticorpos IgM nos indivíduos vacinados, sendo a confirmação laboratorial destes casos só possível através da deteção do RNA viral. Os 5 casos não confirmados laboratorialmente eram todos indivíduos vacinados e 2 não apresentavam sintomas compatíveis com a definição de caso de parotidite epidémica. No entanto, é de referir que o intervalo de tempo entre o aparecimento dos sintomas e a colheita dos produtos biológicos foi superior a 7 dias, o que pode ter condicionado os resultados laboratoriais. Por último, salienta-se que a ocorrência, em diversos países, de surtos de parotidite epidémica em adolescentes vacinados associados ao genótipo G, vem reforçar a importância da rápida confirmação laboratorial dos casos suspeitos, a qual deverá ser efetuada pela deteção do RNA viral, uma vez que só este parâmetro pode confirmar um caso de parotidite epidémica neste grupo populacional.

_Abstract

Mumps is a contagious disease caused by a RNA virus, belonging to the family Paramixovirus, genus Rubulavirus. Mumps virus has only one serotype but 12 different genotypes (A, B, C, D, F, G, H, I, J, K, L, N). In Portugal, MMR (measles, mumps and rubella) vaccine was introduced into the National Vaccination Plan (PNV) in 1987. Since its introduction, MMR coverage rates have been high. However, the number of reported mumps cases without outbreaks has always been high, compared to the number of measles and rubella cases. This work aimed at the laboratory confirmation of a mumps outbreak in a secondary school in the municipality of Vila Real de Santo António, Portugal, between January and February 2019. Laboratory confirmation of the cases was carried out by mumps RNA detection and IgG and IgM specific antibodies determination using commercial reagents. Mumps genotyping was performed by cyclic sequencing. Between January and February 2019, 19 suspected mumps cases were identified in a secondary school in the municipality of Vila Real de Santo António. The median age of the cases was 17.5 years and only one individual was unvaccinated. Biological products of ten suspected cases were sent to the National Reference Laboratory for Vaccine Preventable Diseases for laboratory confirmation. Of these, 5 cases were laboratory confirmed by RNA detection, of which 4 cases were vaccinated individuals. Only one of these cases had IgM antibodies corresponding to the unvaccinated individual. Viral molecular characterization has shown that the mumps virus responsible for this outbreak belongs to genotype G. In this outbreak investigation, no IgM antibodies were detected in vaccinated individuals and laboratory confirmation of these cases was only possible by detection of viral RNA. The five not confirmed cases were all vaccinated individuals and two had no symptoms consistent with mumps case definition. However, it should be noted that the time between the onset of the symptoms and sample collection was longer than 7 days which may conditioned the laboratory results. Finally, we would like to pointed out that the occurrence of mumps outbreaks in vaccinated adolescents associated with genotype G has been described in several countries, reinforcing the importance of a rapid laboratory confirmation of suspected cases. This confirmation can be done only by mumps RNA detection since only this parameter can confirm a mumps case in a vaccinated population.



_Introdução

A parotidite epidémica (“papeira”) é uma doença contagiosa causada por um vírus de RNA, pertencente à família *Paramixovírus*, género *Rubulavirus*. A transmissão do vírus ocorre por via aérea, através do contacto com secreções respiratórias de indivíduos infetados (1).

Apesar do vírus da parotidite epidémica ter um único serotipo, possui variação genotípica tendo sido identificados 12 genótipos diferentes (A, B, C, D, F, G, H, I, J, K, L, N) na estirpe selvagem, com base na variação genómica do gene SH (2,3,4).

A vacina contra o sarampo, parotidite e rubéola (VASPR) foi introduzida em Portugal em 1987. No entanto, apesar da sua elevada cobertura vacinal (>95% desde 1992), o número de casos de parotidite, não relacionados a surtos, foi sempre mais elevado comparativamente ao número de casos de sarampo e rubéola notificados (5,6). Contudo, a ocorrência de surtos é uma realidade, que tem sido descrita em vários países (8,9,10,11).

_Objetivo

Confirmação laboratorial de um surto de parotidite epidémica ocorrido numa escola secundária do concelho de Vila Real de Santo António, Portugal, entre janeiro e fevereiro de 2019.

_Material e métodos

A confirmação laboratorial dos casos foi efetuada através da deteção do ácido nucleico viral (RNA) por RT-PCR e da determinação de imunoglobulinas do tipo G (IgG) e tipo M (IgM) através de métodos imunoenzimáticos. Em ambas as determinações foram utilizados *kits* comerciais, segundo as instruções do fabricante. A genotipagem foi efetuada por sequenciação cíclica utilizando os primers SH3 e SH4R (3).

_Resultados

Entre janeiro e fevereiro de 2019, foram identificados 19 casos suspeitos de parotidite epidémica numa escola secundária do concelho de Vila Real de Santo António. Nove casos ocorreram em indivíduos do sexo masculino e 10 do sexo feminino. Dos 19 indivíduos pertencentes ao surto, apenas um era não vacinado. A idade média foi de 20,2 anos, com um mínimo de 13 e um máximo de 55 anos e uma mediana de 17,5 anos. Os anos de escolaridade mais afetados foram o 11º e 12º ano letivos.

Dos 19 casos suspeitos de parotidite epidémica, foram enviadas amostras biológicas de 10 doentes ao Laboratório Nacional de Referência de Doenças Evitáveis pela Vacinação do Instituto Nacional de Saúde para confirmação laboratorial.

Foram confirmados laboratorialmente 5 casos através da deteção do ácido nucleico viral, dos quais 4 eram indivíduos vacinados. O indivíduo não vacinado foi o único caso que apresentava também anticorpos IgM contra o vírus da parotidite epidémica (quadro 1).

A caracterização molecular do vírus responsável por este surto mostrou tratar-se de um vírus pertencente ao genótipo G.



Quadro 1: Distribuição dos 10 casos suspeitos de parotidite epidémica de acordo com idade, estado vacinal, data de início dos sintomas, data da colheita dos produtos biológicos e resultados laboratoriais.

Caso	Idade	Vacinação			Diagnóstico clínico	Data de colheita dos produtos biológicos	Resultados laboratoriais		
		VASPR	Data da última dose	Data de início dos sintomas			IgG	IgM	PCR
1	16	Sim	17/07/2008	31/01/2019	Parotidite	08/02/2019	P	N	P
2	17	Sim	18/01/2007	31/01/2019	Parotidite	08/02/2019	P	N	P
3	18	Sim	03/08/2005	31/01/2019	Dor de garganta	08/02/2019	P	N	N
4	17	Sim	15/09/2006	31/01/2019	Dor de garganta	08/02/2019	P	N	N
5	55	Não	NA	31/01/2019	NR	08/02/2019	P	P	P
6	19	Sim	22/11/2007	01/02/2019	Parotidite	08/02/2019	P	N	P
7	17	Sim	06/02/2006	31/01/2019	Parotidite	08/02/2019	P	N	P
8	18	Sim	04/05/2006	09/02/2019	NR	21/02/2019	P	N	N
9	35	Sim	1992 (só uma dose)	30/01/2019	Parotidite	21/02/2019	N	N	N
10	16	Sim	16/07/2007	15/02/2019	Parotidite	21/02/2019	P	N	N

NR: Não refere; NA: Não aplicável; P: Positivo; N: Negativo

Discussão e conclusão

Do presente surto salienta-se que não foram detetados anticorpos IgM nos indivíduos vacinados sendo a confirmação laboratorial destes casos só possível através da deteção do RNA viral.

Os 5 casos não confirmados laboratorialmente eram indivíduos vacinados, 2 dos quais não apresentavam sintomas compatíveis com a definição de caso de parotidite epidémica estabelecida para efeitos de investigação de surto, referindo “dores de garganta” como único sintoma clínico. Um caso, vacinado apenas com uma dose de VASPR, apresentou resultados laboratoriais serológicos e moleculares negativos.

No entanto, é de referir que, globalmente, o intervalo de tempo entre o aparecimento dos sintomas e a colheita dos produtos biológicos foi superior a 7 dias, com uma mediana de 9 dias, com um mínimo de 8 dias e um máximo de 21 dias, o que pode ter condicionado os resultados laboratoriais, uma vez que nos indivíduos vacinados a carga viral é menor do que a que ocorre em indivíduos não vacinados (7).

O caso do jovem vacinado com uma única dose de VASPR em 1992 (caso 9, quadro 1) e cujos resultados laboratoriais foram negativos, pode ser explicado por falência vacinal primária ou por uma diminuição das IgG séricas ao longo do tempo atingido níveis não detetáveis.

Por ultimo, salienta-se que a ocorrência, em diversos países, de surtos de parotidite epidémica em adolescentes vacinados (8,9,10,11), todos eles associados ao genótipo G, vem reforçar a importância da rápida confirmação laboratorial dos casos com suspeita clínica compatível. Esta confirmação laboratorial passa pela colheita dos produtos biológicos adequados (fluidos da orofaringe, urina e soro) logo após o início dos sintomas, uma vez que só a deteção do RNA viral pode confirmar um caso de parotidite epidémica neste grupo populacional cuja carga viral é normalmente baixa.

Agradecimentos:

À Doutora Cristina Furtado pela revisão deste artigo.
A todos os técnicos da ARS Algarve envolvidos na investigação deste surto.



Referências bibliográficas:

- (1) Carbone KM, Rubin S. Mumps virus. IN: Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields virology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp. 1527-50.
- (2) Jin L, Beard S, Brown DW. Genetic heterogeneity of mumps virus in the United Kingdom: identification of two new genotypes. *J Infect Dis.* 1999;180(3):829-33. <https://doi.org/10.1086/314957>
- (3) Jin L, Brown DW, Litton PA, et al. Genetic diversity of mumps virus in oral fluid specimens: application to mumps epidemiological study. *J Infect Dis.* 2004;189(6):1001-8. <https://doi.org/10.1086/382134>
- (4) Jin L, Rima B, Brown D, et al. Proposal for genetic characterisation of wild-type mumps strains: preliminary standardisation of the nomenclature. *Arch Virol.* 2005;150(9):1903-9. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0563-4>
- (5) Direção-Geral dos Cuidados de Saúde Primários. *Normas de Vacinação do Programa Nacional de Vacinação*. Lisboa: Direção-Geral dos Cuidados de Saúde Primários, 1991.
- (6) Direção-Geral da Saúde. *Doenças de Declaração Obrigatória 2012-2015, Vol. I*. Lisboa: Direção-Geral da Saúde, 2016.
- (7) Plotkin SA, Rubin SA. Mumps vaccine. IN: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA (eds). *Vaccines*. 6th ed, Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2013, p. 435-65.
- (8) Schmid D, Pichler AM, Wallenko H, et al. Mumps outbreak affecting adolescents and young adults in Austria, 2006. *Euro Surveill.* 2006;11(24):pii=2972. <https://doi.org/10.2807/esw.11.24.02972-en>
- (9) Whelan J, van Binnendijk R, Greenland K, et al. Ongoing mumps outbreak in a student population with high vaccination coverage, Netherlands, 2010. *Euro Surveill.* 2010;15(17):pii=19554. <https://doi.org/10.2807/ese.15.17.19554-en>
- (10) Rota JS, Turner JC, Yost-Daljev MK, et al. Investigation of a mumps outbreak among university students with two measles-mumps-rubella (MMR) vaccinations, Virginia, September-December 2006. *J Med Virol.* 2009;81(10):1819-25. <https://doi.org/10.1002/jmv.21557>
- (11) Centers for Disease Control and Prevention. Update: multistate outbreak of mumps--United States, January 1-May 2, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2006;55(20):559-63. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5520a4.htm>

Avaliação do Impacto da vacina materna contra a tosse convulsa durante a gravidez na Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, um ano após a sua introdução no Programa Nacional de Vacinação

Impact evaluation of the maternal pertussis vaccine during pregnancy in the region of Lisbon and Tagus Valley one year after its introduction in the National Immunization Programme

Sara Gomes Raposo¹, Baltazar Nunes²

baltazar.nunes@insa.min-saude.pt

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

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

_Resumo

Identificou-se um padrão de reemergência de tosse convulsa em Portugal desde 2000. A maioria dos casos notificados ocorreram em crianças com idade inferior a 6 meses sem primovacinação completa. Após o último surto que superou o número de notificações anteriores, a vacinação materna durante a gravidez foi integrada no Programa Nacional de Vacinação a partir de 01.01.2017. Com o objetivo de avaliar a introdução da vacina na Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo (ARSLVT), no primeiro ano após a sua introdução foi delineado um estudo ecológico que incluiu casos ocorridos em crianças com menos de 6 meses de idade sem primovacinação completa e teve como população de referência todas as crianças da mesma idade nascidas antes (2016) e depois (2017) da introdução da vacinação materna. Calcularam-se as taxas de incidência anuais e a sua razão e respetivos intervalos de confiança a 95%. Estimaram-se também as taxas de incidência mensais para os grupos etários dos 0-2 meses e 2-6 meses. Verificou-se que a taxa de incidência de tosse convulsa diminuiu 82% e 40% entre 2016 e 2017, respetivamente para as faixas etárias dos 0-2 meses e dos 2-6 meses. Os resultados indicam uma elevada efetividade, embora ainda não seja possível excluir totalmente um possível efeito sazonal.

_Abstract

Whooping cough resurgence has been registered in Portugal since early 2000's with a majority of cases reported among children aged less than 6 months of age, without priming vaccination completed or even initiated. After the last outbreak in 2016 maternal vaccine during pregnancy was included in the National Immunization Programme on January 1st 2017. An ecological study was designed to study the impact of the pertussis maternal vaccination in the Region of Lisbon and Tagus Valley in the first year after its implementation. It included cases occurred in children aged less than 6 months and the reference population were all the children with the same age born in the year before (2016) and the year after (2017) the introduction of maternal vaccination. The annual pertussis incidence rates, its ratio and 95% confidence intervals were estimated. To study the disease trends, monthly incidence rates were also calculated in both years. Pertussis incidence rate declined 82% and 40% from 2016 to 2017, respectively in the population aged 0-2 months and 2-6 months. The reduction was most accentuated in the second half of the year. The results suggest that the vaccine was highly effective, even though a seasonal effect cannot be totally excluded.

_Introdução

A tosse convulsa é a doença prevenível por vacinação mais frequente no mundo (1). Causada principalmente pelo cocobacilo gram-negativo *Bordetella pertussis*, é uma doença do tracto respiratório potencialmente grave com impacto na morbidade e mortalidade infantis, pelo que a vacina está incluída no Programa Nacional de Vacinação (PNV) desde a sua instituição em 1965 (2). Presentemente é administrada em 5 doses aos 2, 4, 6 e 18 meses, terminando aos 5 anos (3). A primovacinação inclui os três primeiros momentos vacinais, uma vez que só após se considera existir imunidade contra a doença (2).

A vacinação ou a infeção prévia não conferem imunidade vitalícia (4). Adolescentes e adultos são, por isso, suscetíveis e potenciais focos de contágio (5,6,7,8).

Em Portugal, identificou-se um padrão de reemergência da doença, devido ao aumento de casos desde 2000, com vários picos cíclicos registados (9). O último surto, ocorrido em 2016, incidiu maioritariamente em crianças com idade inferior a 1 ano (10). Tendência idêntica foi verificada entre 2012 e 2015, quando 74% dos casos reportados corresponderam a bebés com menos de 6 meses, dos quais 42% tinham menos de 2 meses de idade (11).

A evidência atual indica que a vacinação contra a tosse convulsa durante a gravidez estimula a imunidade materna, com consequente passagem de anticorpos para o feto que conferem imunidade passiva (3,12). Desta forma, a vacina direcionada às gestantes foi incluída no PNV, a 1 de janeiro de 2017, como medida preventiva da doença.



_Objetivo

Avaliação do impacto da vacinação materna contra a tosse convulsa durante a gravidez na incidência da doença, na Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo (ARSLVT), um ano após a introdução no Programa Nacional de Vacinação (PNV).

_Metodologia

Delineou-se um estudo observacional, analítico do tipo ecológico. Teve como objetivo comparar a incidência de casos de tosse convulsa em crianças com idade inferior a 6 meses antes (2016) e após (2017) a introdução da vacinação materna contra a tosse convulsa, durante a gravidez, no PNV.

A população de referência correspondeu às crianças nascidas em 2016 e 2017, utentes do Serviço Nacional de Saúde (SNS) na ARSLVT, tendo sido contadas para efeito de tempo de exposição durante o período decorrido até aos 6 meses de idade. Os casos foram crianças com as mesmas características e com notificação de tosse convulsa no SINAVE validada e confirmada laboratorialmente, entre 01.01.2016 e 31.12.2017.

Para efeitos do estudo, as crianças foram divididas em dois grupos etários. O primeiro incluiu crianças com 0-2 meses (sem primovacinação iniciada) e o segundo englobou as crianças entre os 2-6 meses (sem primovacinação completa).

Construiu-se uma base de dados em *Microsoft Excel®* com a distribuição mensal de casos e nascimentos ocorridos na ARSLVT, tendo-se calculado as taxas de incidência de tosse

convulsa anuais, a razão das taxas de incidência e respetivos intervalos de confiança (IC) a 95% (estes últimos em *Open Epi*) para apreciação do impacto da vacina. Estimaram-se também as taxas de incidência mensais.

_Resultados

Identificaram-se um total de 138 casos, dos quais 108 ocorreram em 2016 e 30 em 2017.

Em 2016, 65,7% dos casos eram relativos a crianças com idade inferior a dois meses, por oposição a 2017, ano em que a maioria dos casos ocorreu em crianças entre os 2-6 meses de idade (60,0%).

Em 2017, observou-se uma redução acentuada do número de casos de tosse convulsa em ambos os grupos etários. Na faixa com menos de dois meses observou-se uma redução de cerca de 82% (IC95%=67,75% a 90,66%) na taxa de incidência de tosse convulsa. No grupo dos 2-6 meses determinou-se uma queda de aproximadamente 40,3% (IC95%=17,03% a 73,45%) (tabela 1).

Na análise da taxa de incidência mensal observou-se que, durante o primeiro semestre de 2017, existiu uma redução gradual do número de novos casos na população em risco, que se acentuou na segunda parte do ano, culminando numa taxa de incidência residual no último trimestre (gráfico 1).

O estudo mensal, por grupo etário, revela que, no início de 2016, todos os casos notificados aconteceram em crianças com menos de 2 meses de idade, sendo que (neste grupo etário) a taxa da incidência foi quase nula, nos últimos meses de 2017. Na faixa dos 2 aos 6 meses, a descida da

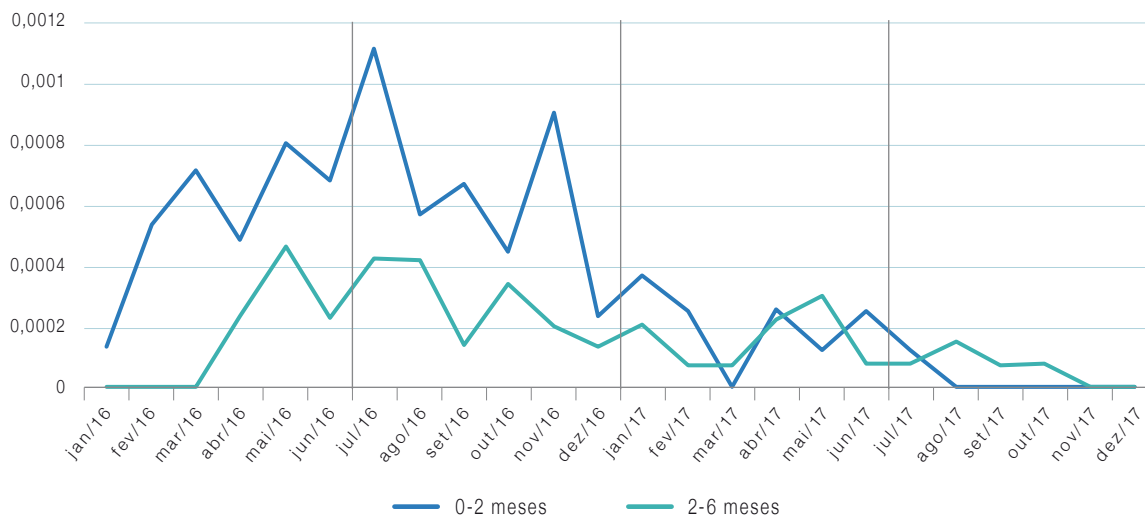
Tabela 1: ↴ Evolução da incidência de tosse convulsa, por 100.000 crianças, em 2016 e 2017, entre os 0 e os 6 meses de idade, na ARSLVT.

Grupos etários	2016			2017			Razão de taxa de incidência (2017/2016)	IC95%	Redução na taxa de incidência (%)	IC95%
	Casos	População em risco	Taxa de incidência (por 100.000)	Casos	População em risco	Taxa de incidência (por 100.000)				
<2 meses	71	39491	179,8	12	37171	32,3	0,180	(0,093; 0,323)	82,0%	(67,7%; 90,7%)
2-6 meses	37	45780	80,8	20	44789	44,7	0,597	(0,265; 0,830)	40,3%	(17,0%; 73,5%)

População em risco: crianças existentes na população com as idades indicadas durante o período de seguimento.



Gráfico 1: Taxa de incidência de tosse convulsa, por 10.000 nados-vivos, por mês, em crianças dos 0-2 meses e dos 2-6 meses, em 2016 e 2017, na ARSLVT.



taxa de incidência em 2017 foi notória sobretudo no segundo semestre, não se verificando casos nos últimos dois meses (gráfico 1).

Discussão

A realização de um estudo de impacto permitiu obter uma “fotografia” entre o antes (2016) e depois da introdução da vacinação materna no PNV (2017), obtendo informação que suporta o seu impacto.

De qualquer forma, a análise das taxas de incidência revela um decréscimo bastante significativo da taxa de incidência de tosse convulsa entre 2016 e 2017 nos grupos etários analisados, o que sugere uma efetividade vacinal (efeito direto) elevada. A redução da taxa de incidência de doença tornou-se inequívoca sobretudo no segundo semestre de 2017, provavelmente em consequência da plena implementação da vacina materna. A menor redução verificada na faixa etária dos 2-6 meses pode estar relacionada com o facto de serem crianças mais velhas, algumas nascidas em 2016 (quando a vacina não fazia parte do PNV) ou no início do ano de 2017 (quando se iniciou a vacinação materna). Dado que as crianças com idades compreendidas entre os 2-6 meses no segundo semestre de 2017 nasceram todas durante esse mesmo ano, a vacinação materna já terá sido generalizada.

É de notar, também, que as crianças com idades entre os 2-6 meses têm pelo menos uma dose de vacina DTPa (difteria, tétano e tosse convulsa). Ainda que não confira proteção eficaz contra a doença, esse factor, conjuntamente com um sistema imunitário com maior maturidade, pode ter efeito na incidência da doença, como se pode verificar pela menor taxa de incidência de tosse convulsa neste grupo em comparação com as crianças com menos de dois meses em 2016.

Conclusão

Dado o curto espaço temporal ocorrido desde o último surto, ainda não é possível descartar, por completo, um efeito sazonal, como explicação para parte da redução da taxa de incidência de tosse convulsa nas crianças com menos de 6 meses entre 2016 e 2017. Porém, estes resultados indicam que a diminuição ocorrida será muito provavelmente devida à implementação da vacinação materna.

Referências bibliográficas:

- (1) Hegerle N, Guiso N. Epidemiology of whooping cough & typing of Bordetella pertussis. *Future Microbiol.* 2013;8(11):1391-1403. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.111>
- (2) Correia P, Tavares M. Linhas de Orientação para Diagnóstico e Terapêutica da Tosse Convulsa. Sociedade Portuguesa de Pneumologia [Internet]. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Pneumologia; 2010. Consultado a 05.11.2017. Disponível em <https://goo.gl/nFmpBM>.



- (3) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Vacinação 2017. Lisboa: DGS, 2016.
<https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/programa-nacional-de-vacinacao-2017-pdf.aspx>
- (4) Lapidot R, Gill CJ. The Pertussis resurgence: putting together the pieces of the puzzle. *Trop Dis Travel Med Vaccines*. 2016;2:26.
<https://doi.org/10.1186/s40794-016-0043-8>
- (5) Zepp F, Heining U, Mertsola J, et al. Rationale for pertussis booster vaccination throughout life in Europe. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(7):557-70.
[https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(11\)70007-x](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(11)70007-x)
- (6) Wright SW, Edwards KM, Decker MD, et al. Pertussis infection in adults with persistent cough. *JAMA*. 1995;273(13):1044-46.
<https://doi.org/10.1001/jama.1995.03520370086042>
- (7) Guiso N. Bordetella pertussis and pertussis vaccines. *Clin Infect Dis*. 2009;49(10):1565-69. <https://doi.org/10.1086/644733>
- (8) Cherry JD, Grimprel E, Guiso N, et al. Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(Suppl 5):S25-S34. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000160926.89577.3b>
- (9) WHO SAGE pertussis working group Background paper SAGE April 2014. Geneva: World Health Organization, 2014. <https://goo.gl/r1QkCS>
- (10) Ministério da Saúde, Serviço Nacional de Saúde, Portal da Transparência. Doenças de Notificação Obrigatória [online]. Lisboa: Ministério da Saúde, 2017. Consultado a 30.10.2017. Disponível em <https://goo.gl/jxDp2U>
- (11) Direção-Geral da Saúde. Orientação nº 002/2016 de 15/07/2016. Vacinação da grávida contra a tosse convulsa. (atualizada a 08/08/2016)
- (12) Esposito S, Bosis S, Morlacchi L, et al.. Can infants be protected by means of maternal vaccination?. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(Suppl 5):85-92.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03936.x>

Variantes na região não codificante do gene *TLR2* associadas à infeção bacteriana grave na anemia falciforme pediátrica

Variants in non-coding regions of the TLR2 gene associated with severe bacterial infection in pediatric sickle cell anemia

Susana David^{1,2}, Pedro Aguiar³, Liliana Antunes⁴, Alexandra Dias⁵, Anabela Morais⁶, Anavaj Sakuntabhai^{7,8}, João Lavinha^{1,9}

suzana.david@insa.min-saude.pt

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

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

(3) Centro de Investigação em Saúde Pública. Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

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

(5) Departamento de Pediatria, Hospital Prof Doutor Fernando Fonseca, Amadora, Portugal

(6) Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal

(7) Unité de la Génétique Fonctionnelle des Maladies Infectieuses, Institut Pasteur, Paris, France

(8) Centre National de la Recherche Scientifique, URA3012 Paris, France

(9) Biosystems and Integrative Sciences Institute. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

A anemia falciforme é caracterizada por hemólise crónica, crises vaso-occlusivas (CVO) e infeções recorrentes frequentemente graves. Uma coorte de 95 doentes pediátricos com anemia falciforme foi estudada quanto à associação genótipo-fenótipo para o subfenótipo “infeção bacteriana grave pelo menos uma vez durante o período de acompanhamento do doente” e três regiões polimórficas não codificantes do gene *TLR2*, a saber, a indel -196 a -174, o SNP rs4696480 e uma repetição em tandem (GT)_n. A ausência do haplótipo [Del]-T-[n≥17] (Hap7) em homozigotia parece proteger contra a infeção bacteriana grave, numa associação estatisticamente significativa, resistindo à correção para testes múltiplos. Além disso, uma redução na taxa de incidência da infeção bacteriana grave foi associada a um aumento do componente hemolítico, aos níveis de hemoglobina fetal (antes do tratamento pela hidroxiureia) e à prevalência da alfa-talassemia de 3,7 kb. Estes resultados poderão vir a ter implicações práticas nas estratégias de cuidados de saúde para reduzir a morbilidade e mortalidade dos doentes com anemia falciforme.

_Abstract

Sickle cell anemia (SCA) is characterized by chronic hemolysis, severe vasoocclusive crises (VOC) and recurrent often-severe infections. A cohort of 95 SCA pediatric patients was the background for genotype-to-phenotype association of the patient's infectious disease phenotype “severe bacterial infection at least once during the patient's follow-up” and three noncoding polymorphic regions of the *TLR2* gene, the -196 to -174 indel, SNP rs4696480 and a (GT)_n short tandem repeat. The absence of the haplotype [Del]-T-[n≥17] (Hap7) in homozygosity protected against severe bacterial infection, in a statistically significant association, resisting correction for multiple testing. Moreover, a reduction in the incidence rate of severe bacterial infection was associated to a rise in the hemolytic score, fetal hemoglobin levels (prior to hydroxyurea treatment) and 3.7-kb alpha-thalassemia. These results could have practical implications in health care strategies to lower the morbidity and mortality of SCA patients.

_Introdução

Como primeira linha de defesa do hospedeiro, o sistema imune inato discrimina entre um grande número de patógenos através dos recetores de reconhecimento de padrões (*pattern-recognition receptors*, PRRs). Os recetores do tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLRs) são uma família pluripotente de PRRs que reconhecem um amplo espectro de agentes infecciosos. Entre estes, o TLR2 tem sido associado à resposta imune inata contra bactérias, fungos, parasitas e vírus.

A anemia falciforme (AF) é uma anemia crónica monogénica autossómica recessiva, potencialmente fatal, clinicamente heterogénea (1). A doença é caracterizada por episódios recorrentes de vaso-oclusão, hemólise crónica e infeções recorrentes frequentemente graves. O desenvolvimento e a validação de preditores precoces da gravidade da doença é uma estratégia orientada para reduzir a morbilidade e mortalidade nos doentes afetados.

_Objetivo

Neste contexto, o nosso objetivo foi investigar a associação genética da predisposição à infeção bacteriana grave e três *loci* nas regiões não-codificantes do gene *TLR2*, ou seja, a indel -196-174 de 22 pb no primeiro exão não traduzido, o SNP rs4696480, c-16934A> T (g.153685974T> A), no promotor, e o polimorfismo (GT)_n STR no segundo íntron numa coorte de 95 doentes pediátricos com AF.



_Métodos

População de estudo

Noventa e cinco doentes com AF, sem relação familiar conhecida, foram recrutados com base no critério de terem mais de três e menos de 20 anos de idade, inscritos num estudo longitudinal anterior (2). Os procedimentos do estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para a Saúde do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Genotipagem

O detalhe das metodologias de genotipagem encontram-se no artigo original. Muito sumariamente, a genotipagem do marcador: *TLR2* indel -196 a -174 foi realizada por PCR e os produtos visualizados em gel de agarose: uma única banda distinta entre os casos da Insertion/Insertion (Ins/Ins) e deleção/deleção (del/del) e duas bandas (Ins/del) nos heterozigotos; SNP rs4696480 foi realizada por análise de restrição (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP); STR, foi realizada por PCR utilizando o *primer* direto marcado com um fluorocromo e o número de repetições (GT)_n identificado pelo dimensionamento dos produtos de PCR com o sequenciador ABI 310 e o *software* Genescan Analysis 2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O equilíbrio de *Hardy Weinberg* foi verificado utilizando o teste qui-quadrado genotípico (1 grau de liberdade). A reconstrução dos haplótipos a partir dos dados de genotipagem foi realizada com o programa PHASE, versão 2.1 (3).

Derivação de um componente hemolítico

Um componente hemolítico foi derivado por análise de componentes principais (ACP) com 3 graus de liberdade: contagem de reticulócitos (%), concentrações séricas de lactato desidrogenase (U/L) e bilirrubina total (mg/dL). Para a ACP apenas foram utilizados valores de estado estacionário (e não de crise vaso-oclusiva).

Estudos de associação genótipo-fenótipo

Um modelo de regressão quasi-Poisson (4) multivariado foi aplicado nos estudos de associação entre os diferentes *loci* polimórficos do *TLR2* e o subfenótipo “infecção bacteriana grave pelo menos uma vez durante o período de acom-

panhamento do doente”: fenótipo ~ genótipo + nível de hemoglobina no estado estacionário + contagem de leucócitos no estado estacionário + hemoglobina fetal (antes do tratamento com hidroxiureia) + componente hemolítico + alfa-talassemia. As estimativas de risco foram obtidas utilizando o rácio da taxa de incidência (*incidence rate ratio*). As associações genótipo-fenótipo foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$. A correção de Bonferroni foi realizada para comparações múltiplas.

_Resultados

População de estudo

Estudos de associação genética foram realizados para 95 doentes com AF (na sua maioria de origem subsaariana) e episódios infecciosos. O período total de observação para a coorte (estudo longitudinal) foi de 433,4 pessoas * ano. A média de idades foi de $7,7 \pm 3,7$ anos.


Componente hemolítico

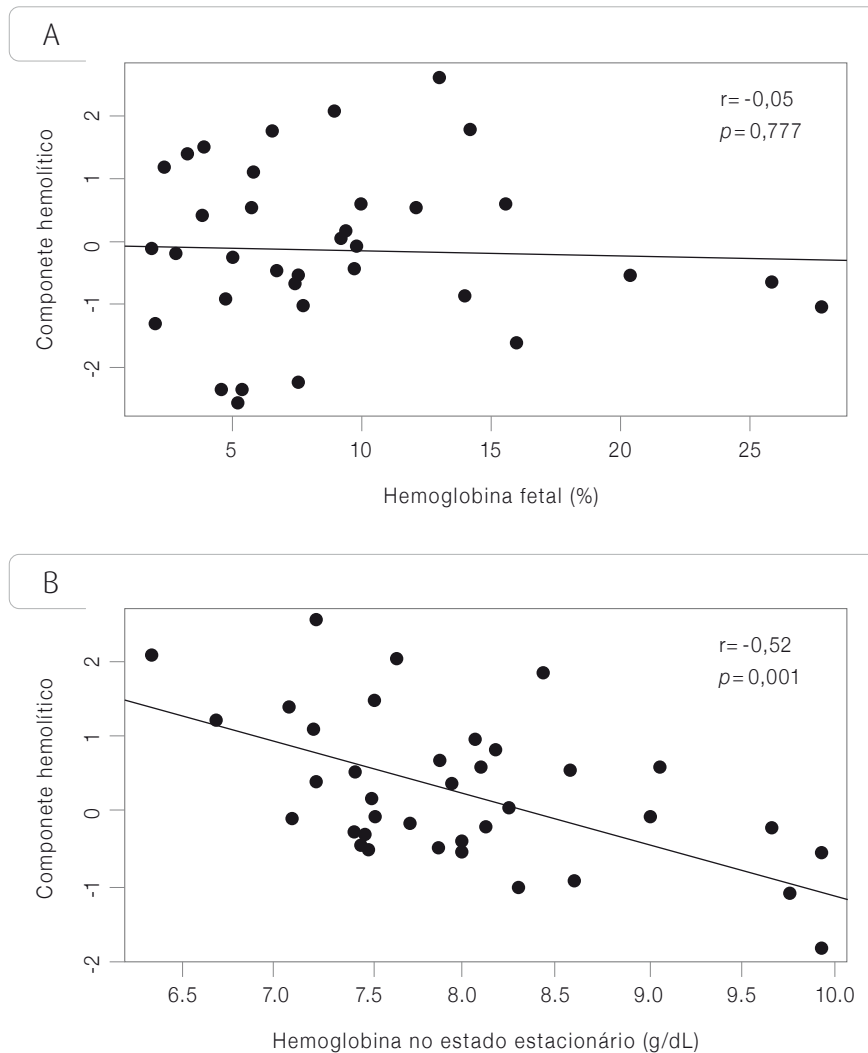
O componente hemolítico teve uma média de 0 (DP=1,23), predizendo 51% da variação entre as três variáveis (valor próprio=1,51) e um valor médio significativamente menor com o genótipo da alfa-talassemia ($p=0,023$), resultados que são comparáveis com de outros autores (5). Não observámos uma correlação positiva com a percentagem de hemoglobina fetal, antes do tratamento com hidroxiureia (gráfico 1a). No entanto, uma correlação negativa estatisticamente significativa com o aumento da percentagem de hemoglobina no estado estacionário foi observada ($p=0,001$) (gráfico 1b).

Estudos de associação genótipo-fenótipo

As estimativas de risco obtidas na análise de haplótipos foram estatisticamente significativas para o subfenótipo “infecção bacteriana grave pelo menos uma vez durante o período de acompanhamento do doente”, e resistiram à correção de Bonferroni para comparações múltiplas (tabela 1). Os resultados mostraram que, em relação ao grupo de referência [Outro que não Hap7], a presença de Hap7 no modelo alélico causou um aumento na taxa de incidência do fenótipo infeccioso ($p=0,00145$). Pelo contrário, em relação



Gráfico 1(A-B):  Correlação entre o componente hemolítico e a (A) hemoglobina fetal, (B) hemoglobina no estado estacionário.



a Hap7/[Outro que não Hap7], a ausência de Hap7 no genótipo homocigótico [Outro que não Hap7]/[Outro que não Hap7] causou uma redução na razão da taxa de incidência ($p=0,00145$). Uma associação estatisticamente significativa independente do genótipo também foi obtida em relação ao componente hemolítico (tabela 2). Um aumento de uma unidade do componente hemolítico causou uma diminuição de 82% na taxa de incidência do subfenótipo ($p=0,000366$). Esse resultado foi influenciado positivamente pelas covariáveis hemoglobina fetal (antes do tratamento com hidroxiureia) e alfa-talassemia de 3,7 kb.



Tabela 1: Modelo de regressão quasi-Poisson¹ para o fenótipo “infecção bacteriana grave pelo menos uma vez durante o período de acompanhamento do doente” em doentes pediátricos com anemia falciforme (n=95) em relação ao haplótipo 7 do TLR2.

	Estimativa	EP	Z	p^2	Razão da taxa de incidência	IC Limite inferior	IC Limite superior	Razão da taxa de incidência redução/aumento (%)
Modelo alélico								
Hap7	2,52	0,75	3,37	0,00145 **	12.36699701	2.866318564	53.3585544	1137
Modelo genotípico								
[Outro que não Hap7]/[Outro que não Hap7]	-2,52	0,75	-3,37	0,00145 **	0.08086037	0.01874114	0.3488796	-92

¹ Modelo estatístico: modelo linear generalizado, *fenótipo ~ genótipo + nível de hemoglobina no estado estacionário + contagem de leucócitos no estado estacionário + hemoglobina fetal (antes de tratamento por hidroxiureia) + componente hemolítico + alfa-talassemia*. O Fenótipo=“infecção bacteriana grave pelo menos uma vez durante o período de acompanhamento do doente”. O grupo de referência para o modelo alélico foi a ausência do Hap7 ([Outro que não Hap7]). O grupo de referência para o modelo genotípico foi Hap7/Hap7.

² O alfa ajustado de Bonferroni $\alpha=0,001471$, onde o número de testes realizados por modelo de hereditariedade por *locus* n=34. As interações entre fatores foram testadas, mas por não serem estatisticamente significativas, não foram incluídas no modelo final. A análise estatística foi realizada em R (Team, R.C., 2013). Códigos de significância: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * 0.1 ' ' EP: Erro Padrão; IC: intervalo de confiança

Tabela 2: Modelo de regressão quasi-Poisson¹ para o fenótipo infeccioso “infecção bacteriana grave pelo menos uma vez durante o período de acompanhamento do doente” em doentes pediátricos com anemia falciforme (n=95) em relação ao componente hemolítico.

	Estimativa	EP	Z	p^2	Razão da taxa de incidência	IC Limite inferior	IC Limite superior	Razão da taxa de incidência redução/aumento (%)
Componente hemolítico ²	-1,7206	0,4285	-4,015	0,000366 ***	0.17896141	0.077266233	4.145043e-01	-82
Hemoglobina fetal ³	-0,7612	0,2457	-3,098	0,004205 **	0.46708616	0.288567509	7.560431e-01	-53
Alelos alfa-talassemia 3,7 kb	-2,6593	1,1501	-2,312	0,027811 *	0.07000001	0.007347522	6.668916e-01	-93

¹ Modelo estatístico: Regressão quasi-Poisson num modelo linear generalizado, *fenótipo ~ genótipo + nível de hemoglobina no estado estacionário + contagem de leucócitos no estado estacionário + hemoglobina fetal (antes de tratamento por hidroxiureia) + componente hemolítico + alfa-talassemia*. O fenótipo=“infecção bacteriana grave pelo menos uma vez durante o período de acompanhamento do doente”. Para o componente hemolítico, não houve grupo de referência. Para a hemoglobina fetal não houve grupo de referência. O grupo de referência para a alfa-talassemia de 3,7 kb foi a ausência de alfa-talassemia de 3,7 kb.

² Componente hemolítico por unidade de pontuação.

³ Hemoglobina fetal (%).

As interações entre fatores foram testadas, mas por não serem estatisticamente significativas, não foram incluídas no modelo final.

A análise estatística foi realizada em R (Team, R.C., 2013). Códigos de significância: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * 0.1 ' ' EP: Erro Padrão; IC: intervalo de confiança



Conclusão

O curso clínico da AF é uma alternância de períodos entre crises quase assintomáticas (estado estacionário) (IC) com crises vaso-oclusivas (CVOs) dolorosas. As CVOs resultam da solubilidade reduzida da HbS desoxigenada, a sua subsequente polimerização e a formação de glóbulos vermelhos deformados (falciformes), que conduzem a alterações fisiopatológicas potencialmente fatais (6). Estas modificações contribuem para uma predisposição às infeções, que constituem a principal causa de morbilidade e mortalidade nesses doentes. Os doentes pediátricos na nossa coorte estavam sob supervisão médica rigorosa e sujeitos a medidas preventivas ou curativas abrangentes. No entanto, foram relatados episódios infecciosos graves e recorrentes.

Este estudo de associação genótipo-fenótipo revelou aspetos importantes em relação à fisiopatologia da infeção na AF pediátrica. O efeito deletério do haplótipo Hap7 ([Del] -T- [M ou L]) na taxa de incidência de infeções bacterianas graves em doentes com AF pediátrica, foi evidenciado. Este haplótipo apresenta a deleção -196 a -174 de 22 bp, localizada no primeiro exão não traduzido e o alelo T do SNP rs4696480, no promotor do *TLR2*, que foram previamente associados à suscetibilidade a infeções de diversas etiologias. Outro aspeto interessante foi a análise de um componente hemolítico. A hemólise é uma das principais características fisiopatológicas da AF. Os nossos resultados mostram a sua relevância em relação à predisposição às infeções bacterianas.

A exploração destes resultados deverá continuar, com estudos de replicação noutras coortes de modo a obter conclusões mais consistentes; estudos prospetivos para comprovar a utilidade clínica da informação sobre o *TLR2* e análises detalhadas de *loci* do *TLR2* para identificar os marcadores mais propícios a serem utilizados na prática clínica futura.

À medida que aprofundamos e compreendemos melhor a base genética e os mecanismos fisiopatológicos envolvidos, intervenções direcionadas e personalizadas podem vir a reduzir a morbilidade e mortalidade atribuíveis à infeção em doentes com AF, particularmente vulneráveis.

Financiamento:

Este estudo foi realizado com o apoio da FCT/MEC através de fundos nacionais e cofinanciado pelo FEDER, no âmbito do Acordo de parceria PT2020 (UIDMULTI/00211/2013). Foi ainda parcialmente financiado por subvenções da FCT (PIC/IC/83084/2007) e do Centro de Investigação em Genética Molecular Humana.

Agradecimentos:

Aos doentes e suas famílias, pela participação no estudo; a Dominique Labie, por ter sugerido este tema de pesquisa; à Unidade de Tecnologia e Inovação e Andreia Coelho e Emanuel Ferreira, pelo apoio técnico; a Eric David Bosne, pelos esclarecimentos sobre ACP; a Audrey V. Grant, Baltazar Nunes, Paula Faustino e Vera C.M. David, pelas suas sugestões úteis na elaboração do estudo.

Este artigo constitui, no essencial, uma tradução abreviada da publicação: David S, Aguiar P, Antunes L, Dias A, Morais A, Sakuntabhai A, Lavinha J. *Variants in the non-coding region of the TLR2 gene associated with infectious subphenotypes in pediatric sickle cell anemia. Immunogenetics.* 2018 Jan;70(1):37-51. Epub 2017 Jun 30. <https://doi.org/10.1007/s00251-017-1013-7>

Referências bibliográficas:

- (1) Driss A, Asare KO, Hibbert JM, et al. Sickle cell disease in the post genomic era: a monogenic disease with a polygenic phenotype. *Genomics Insights.* 2009;2009(2):23-48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2855197/>
- (2) Coelho A, Dias A, Morais A, et al. Genetic variation in CD36, HBA, NOS3 and VCAM1 is associated with chronic haemolysis level in sickle cell anaemia: a longitudinal study. *Eur J Haematol.* 2014;92(3):237-43. <https://doi.org/10.1111/ejh.12226>
- (3) Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 2001;68(4):978-89. <https://doi.org/10.1086/319501>
- (4) Ver Hoef JM, Boveng PL. Quasi-Poisson vs. negative binomial regression: how should we model overdispersed count data?. *Ecology.* 2007;88(11):2766-72. <https://doi.org/10.1890/07-0043.1>
- (5) Nouraie M, Lee JS, Zhang Y, et al. The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. *Haematologica.* 2013;98(3):464-72. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.068965>
- (6) Kaul DK, Fabry ME, Nagel RL. The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes. *Blood Rev.* 1996;10(1):29-44. [https://doi.org/10.1016/s0268-960x\(96\)90018-1](https://doi.org/10.1016/s0268-960x(96)90018-1)

Perceção e hábitos de consumo relativamente a alimentos funcionais

Perception and consumption habits regarding functional foods

Mafalda Alexandra Silva^{1,2}, Tânia Gonçalves Albuquerque^{1,2,3}, M Beatriz PP Oliveira², Rita C Alves², Helena Soares Costa^{1,2}

helen.a.costa@insa.min-saude.pt

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

(2) REQUIMTE-LAQV/Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal

(3) Instituto Universitário Egas Moniz, Lisboa, Portugal

Resumo

Nos dias de hoje, os consumidores questionam cada vez mais a relação entre saúde, alimentação e bem-estar. A procura de alimentos com efeitos benéficos para a saúde é um dos grandes impulsos para o desenvolvimento de alimentos funcionais, que contêm ingredientes com esse efeito. Este trabalho apresenta os resultados de um inquérito que avaliou a perceção do consumidor e os seus hábitos de consumo relativamente a alimentos funcionais. Foram inquiridos 233 indivíduos, com idades compreendidas entre os 18 e os 77 anos. Dos inquiridos, 87% afirmam saber que existem alimentos com efeitos mais significativos na saúde e bem-estar, apesar de só 58% dizerem saber o que são alimentos funcionais. A maioria da população inquirida (97%) considera necessário melhorar o nível de informação relativa a este tipo de alimentos, apontando as campanhas de informação, criação de símbolos para a rápida identificação do produto/benefício, educação nas escolas e melhoria da informação dos rótulos das embalagens, como algumas das medidas necessárias.

Abstract

Currently, consumers are increasingly interested in the relationship between health, food and well-being. The demand for food with beneficial effects on health is one of the great impulses for the development of functional foods that contain ingredients with this effect. This work presents the results of a survey that aimed to assess the consumer's perception and consumption habits regarding functional foods. A total of 233 individuals, aged between 18 and 77 years, were surveyed. Of the respondents, 87% know that there are foods with more significant effects on health and well-being, although only 58% know what functional foods are. The majority of the surveyed population (97%) agrees that it is necessary to improve the level of information on this type of food, pointing out information campaigns, creation of symbols for fast identification of the product/benefit, education in schools and improvement of information on packaging labels, as some of the necessary measures.

Introdução

A atualidade é pautada por um considerável crescimento do interesse em questões relacionadas com a saúde e bem-estar e a sua relação com a alimentação. Hoje em dia, os consumidores já não estão só interessados em alimentos com excelentes propriedades sensoriais, tornando-se os efeitos benéficos para a saúde um aspeto de extrema importância. Estes factos promovem a necessidade do desenvolvimento de alimentos funcionais, com ingredientes que possam de alguma forma melhorar a saúde de quem os consome (1).

A definição de alimento funcional ainda não é universal. No entanto, a mais consensual é a proposta pela *European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe* (FUFOSE) que estabelece que se trata de “um alimento que afeta, de forma benéfica, uma ou mais funções específicas no organismo, para além dos efeitos nutricionais adequados, de maneira a ser relevante para a melhoria do estado de saúde e bem-estar e/ou redução do risco de doença. É consumido como parte de um padrão alimentar adequado e não é um comprimido, cápsula ou qualquer forma de suplemento alimentar.” (2).

Estes alimentos contêm ingredientes funcionais que podem contribuir para melhorar a saúde e bem-estar dos indivíduos, e reduzir o risco ou retardar a progressão de certo tipo de doenças, como por exemplo, doenças cardiovasculares, cancro, osteoporose e obesidade. Esses ingredientes apresentam atividades biológicas e podem ser probióticos, prebióticos, vitaminas, minerais, ácidos gordos, fitoquímicos, fibra, entre outros (3).



_Objetivo

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a perceção do consumidor e os seus hábitos de consumo relativamente aos alimentos funcionais.

_Material e métodos

Foi desenvolvido e aplicado um questionário *online*, ao longo de 2019, e disponibilizado através de *email* e redes sociais. Foram critérios de exclusão ter menos de 18 anos, não residir em Portugal e não entender a Língua Portuguesa. O questionário era composto por 2 partes: i) dados gerais e sociodemográficos e ii) alimentos funcionais. Depois de submetida a resposta ao questionário, os inquiridos tiveram acesso a uma breve explicação sobre o tema. O questionário foi respondido por 233 indivíduos com idades compreendidas entre os 18 e os 77 anos.

_Resultados e discussão

Dos 233 inquiridos, 73% pertenciam ao género feminino e 27% ao género masculino (**gráfico 1a**). Sessenta e oito por cento (68%) dos inquiridos tinham formação superior, e desses, 21% tinham formação na área da saúde.

Oitenta e sete por cento (87%) da população inquirida referiu saber que existem alimentos com atributos adicionais e efeitos positivos na saúde e bem-estar (**gráfico 1b**), no entanto, só 58% diz saber o que são alimentos funcionais (**gráfico 1c**). Dos 87%, 80% refere já ter consumido este tipo de alimentos (**gráfico 1d**), e 31% refere uma frequência de consumo de 1-3 vezes por semana (**gráfico 1e**).

A maioria dos inquiridos (85%) consome estes alimentos devido aos seus benefícios para a saúde (**gráfico 2a**) e 67% confessam que preferem estes alimentos em detrimento dos outros (**gráfico 1f**). No que diz respeito à eficácia destes alimentos, 46% acreditam que são razoavelmente eficazes, 44% acham que são eficazes e apenas 1% acredita não serem nada eficazes (**gráfico 1g**).

Relativamente aos fatores que influenciam a escolha dos inquiridos aquando da sua compra, 87% dizem ser o benefício para a saúde, 27% o preço, 10% por sugestão de amigos/familiars, 7% a marca, 3% a embalagem e 2% a publicidade (**gráfico 2b**).

Em relação às categorias de alimentos onde podem ser incluídos os alimentos funcionais, foram os iogurtes (69%), os cereais (62%) e os leites (38%) as mais reconhecidas pelos inquiridos (**gráfico 2d**).

Dos inquiridos que não consomem este tipo de alimentos (n=40), 35% dizem ser por não ter interesse, 28% por não os encontrarem à venda, 23% devido ao seu preço e apenas 8% por não acreditarem na sua eficácia (**gráfico 2c**).

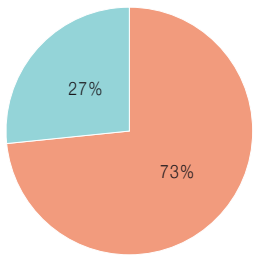
Cinquenta e cinco por cento (55%) do total de inquiridos afirma saber o que são ingredientes funcionais (**gráfico 1h**). No entanto, 8% e 2% consideram, respetivamente, a gordura e o açúcar ingredientes funcionais (**gráfico 2e**).

A maioria dos inquiridos (97%) considera essencial melhorar o nível de informação relativamente a este tipo de alimentos (**gráfico 1i**), identificando campanhas de informação (71%), criação de símbolos para a rápida identificação do produto/benefício (70%), educação nas escolas (68%), melhoria da informação dos rótulos das embalagens (63%) e maior publicidade (34%) como possíveis métodos de atuação (**gráfico 2f**).



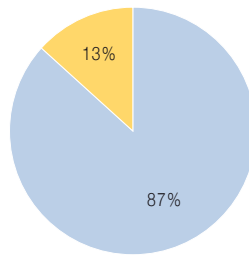
Gráfico 1 (A-I): ↓ Percentagem de respostas dos inquiridos a algumas das questões abrangidas no questionário.

A Classificação dos inquiridos quanto ao género (n=233)



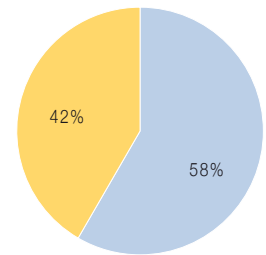
Feminino Masculino

B Tem conhecimento que existem alimentos que apresentam atributos adicionais com efeitos positivos na saúde e bem-estar? (n=233)



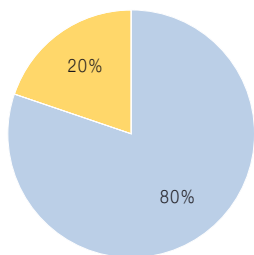
Sim Não

C Sabe o que são alimentos funcionais? (n=233)



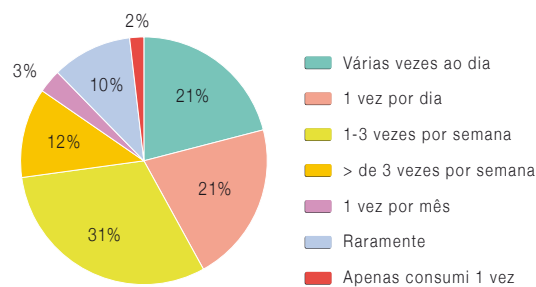
Sim Não

D Já alguma vez consumiu este tipo de alimentos? (n=202)



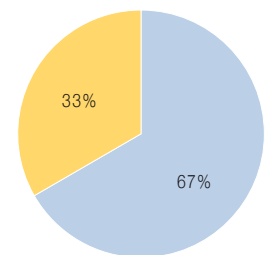
Sim Não

E Qual a frequência com que consome? (n=162)



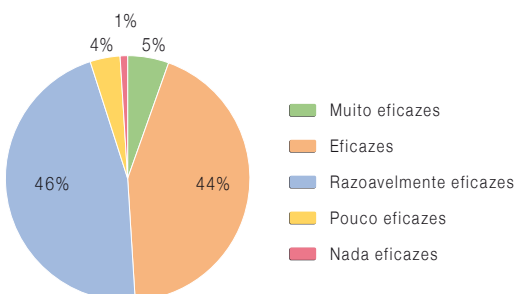
Várias vezes ao dia
1 vez por dia
1-3 vezes por semana
> de 3 vezes por semana
1 vez por mês
Raramente
Apenas consumi 1 vez

F Quando adquire os seus produtos alimentares, prefere este tipo de alimentos em detrimento dos outros? (n=162)



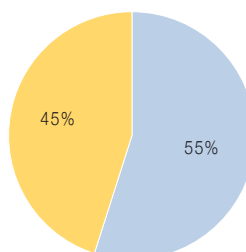
Sim Não

G Na sua opinião, qual o seu nível de eficácia? (n=202)



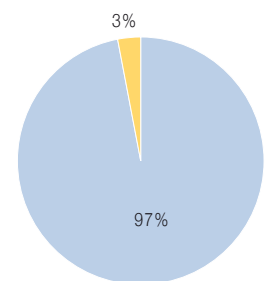
Muito eficazes
Eficazes
Razoavelmente eficazes
Pouco eficazes
Nada eficazes

H Sabe o que são ingredientes funcionais? (n=233)



Sim Não

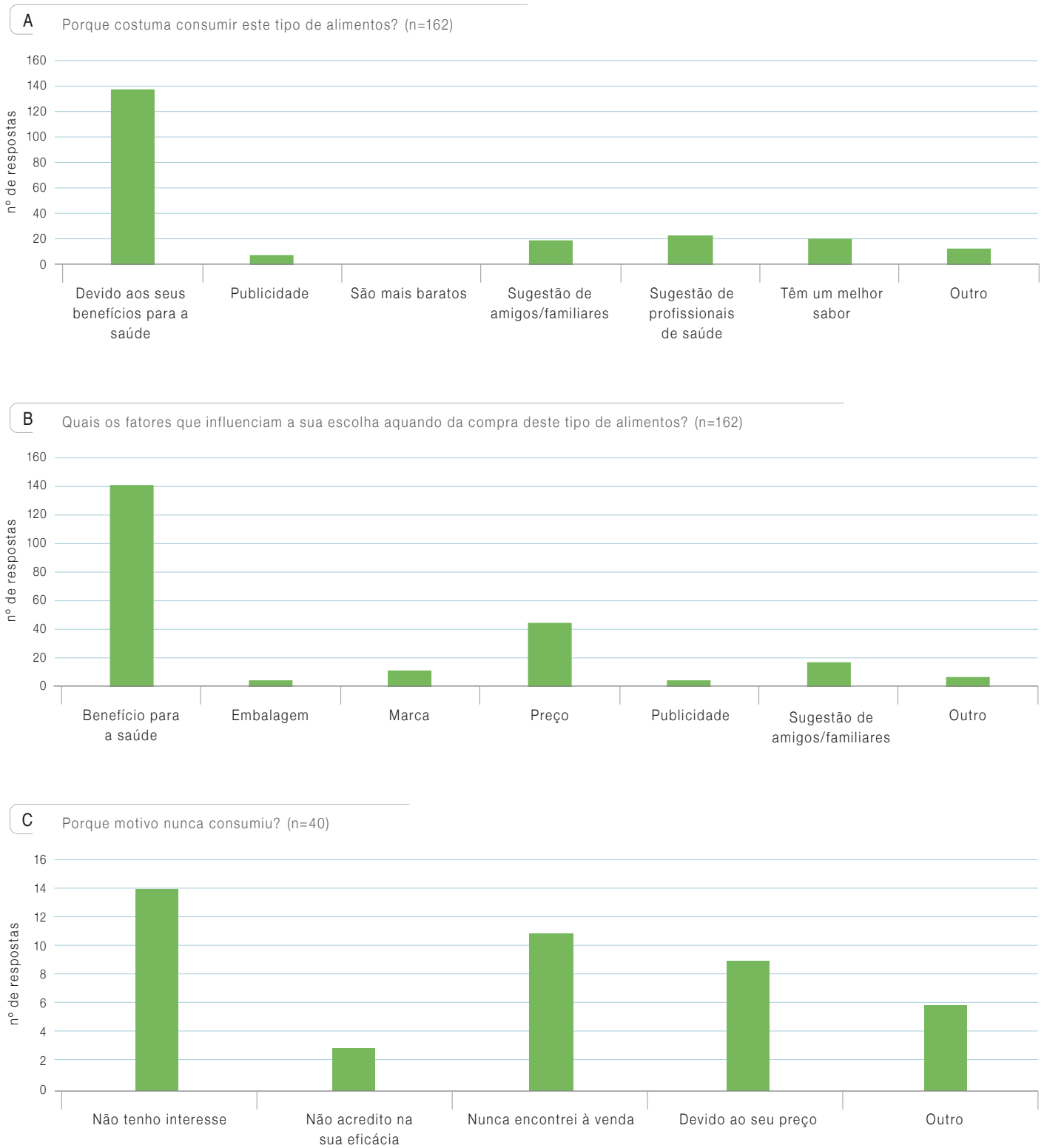
I Considera necessário melhorar o nível de informação relativamente a este tipo de alimentos? (n=233)



Sim Não

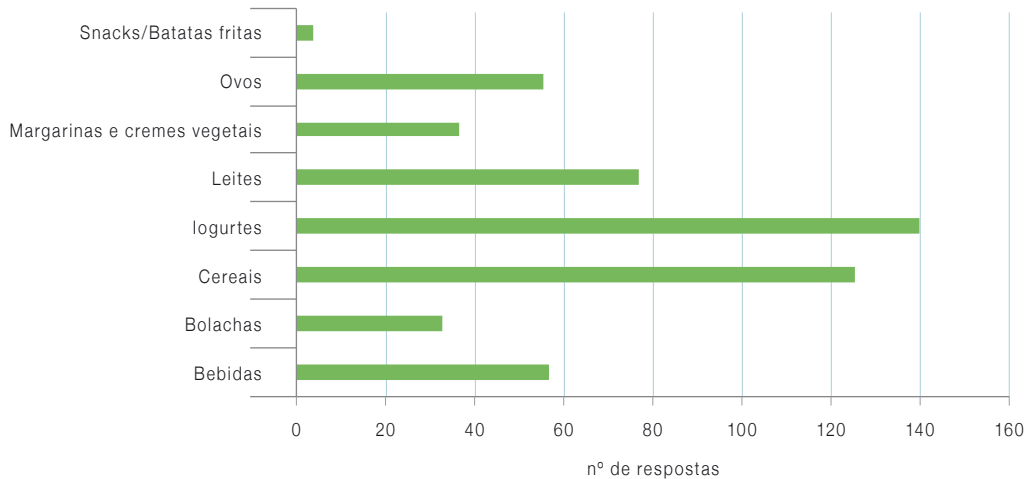


Gráfico 2 (A-F): Número de respostas dos inquiridos a algumas das questões abrangidas no questionário.

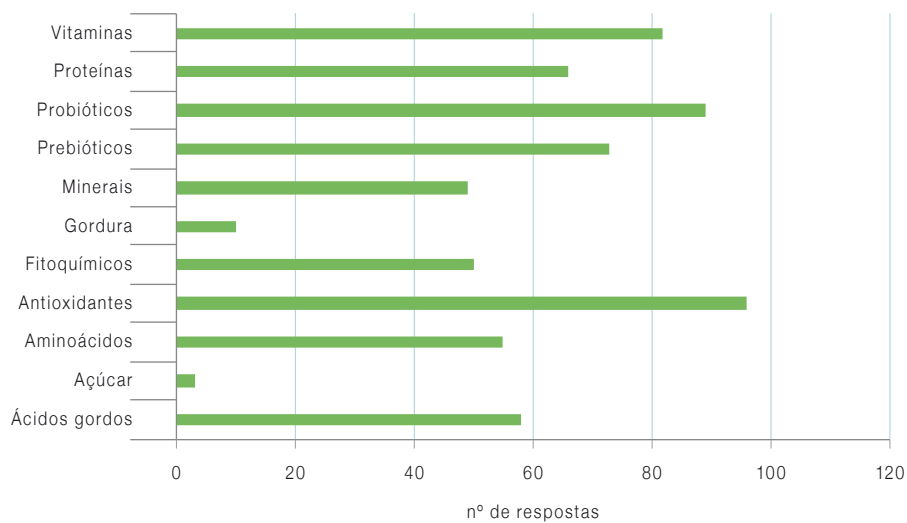




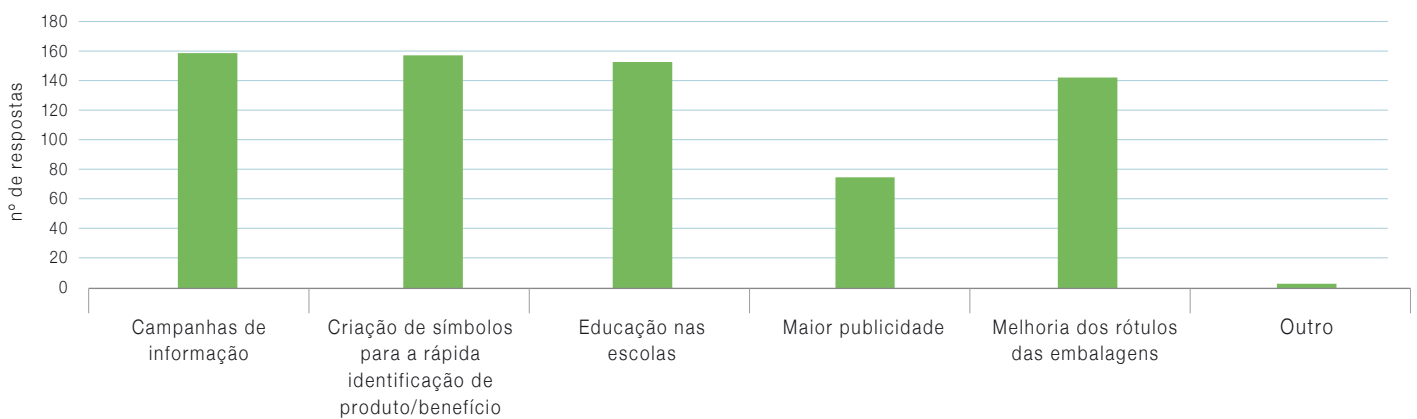
D De entre as seguintes categorias de alimentos, em quais é que identifica este tipo de alimentos? (n=202)



E Na sua opinião, ingredientes funcionais podem ser: (n=128)



F De que modo acha adequado melhorar o nível de informação? (n=226)





_Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem verificar que a maioria da população inquirida tem conhecimento da existência de alimentos com atributos adicionais positivos para a saúde, mas apenas uma parte está familiarizada com o conceito “alimento funcional”. Torna-se, então, importante desenvolver medidas que permitam melhorar o nível de informação da população no que diz respeito aos alimentos funcionais e sobre os seus potenciais benefícios para a saúde.

Agradecimentos:

Este trabalho foi financiado pelo INSA, I.P., no âmbito do projeto MELON4FOOD (2018DAN1492) e pela FCT/MCTES através de fundos nacionais (UID/QUI/50006/2019).

Referências bibliográficas:

- (1) Crowe KM, Francis C; Academy of Nutrition and Dietetics. Position of the academy of nutrition and dietetics: functional foods. *J Acad Nutr Diet.* 2013;113(8):1096-103. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2013.06.002>
- (2) European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *Br J Nutr.* 1999;81(Suppl 1):S1-27. Review. <https://doi.org/10.1017/S000711459900047>
- (3) Arvanitoyannis IS, Van Houwelingen-Koukaliaroglou M. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45(5):385-404. <https://doi.org/10.1080/10408390590967667>

Consumo de alimentos à base de cereais pelas crianças portuguesas uma avaliação de risco-benefício

Consumption of cereal-based foods by Portuguese children: a risk-benefit assessment

Ricardo Assunção^{1,2}, Géraldine Boué³, Paula Alvito^{1,2}, Roberto Brazão¹, Paulo Carmona⁴, Catarina Carvalho^{5,6}, Daniela Correia^{5,7}, Paulo Fernandes¹, Carla Lopes^{5,7}, Carla Martins^{1,2,8}, Jeanne-Marie Membré³, Sarogini Monteiro⁴, Pedro Nabais⁴, Sofie T. Thomsen⁹, Duarte Torres^{5,6}, Sara M. Pires⁹, Lea S. Jakobsen⁹

ricardo.assuncao@insa.min-saude.pt

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

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

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

(4) Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, Lisboa, Portugal

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

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

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

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

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

_Resumo

De uma forma geral, o consumo de alimentos pode apresentar potenciais riscos e benefícios para os consumidores. Os alimentos à base de cereais, incluindo os cereais de pequeno-almoço e os cereais infantis, representam componentes importantes da dieta humana e estão entre os primeiros alimentos sólidos que são introduzidos na dieta. Estes alimentos constituem uma fonte importante de vários nutrientes, incluindo o sódio, fibras e açúcares livres, que podem estar associados a efeitos benéficos e adversos para a saúde. Simultaneamente, os alimentos à base de cereais podem também ser veículo de contaminantes químicos (por exemplo, micotoxinas) e microbiológicos (por exemplo, *Bacillus cereus*). As aflatoxinas, um grupo de micotoxinas que apresenta maior potencial tóxico, são frequentemente detetadas em cereais. No âmbito do projeto RiskBenefit4EU, o presente estudo teve como objetivo avaliar os riscos e os benefícios associados ao consumo de alimentos à base de cereais pelas crianças portuguesas. Os riscos (teores de aflatoxinas e *B. cereus*, sódio e açúcares livres) e os benefícios (teor de fibra) associados ao consumo de cereais de pequeno-almoço (CPA) foram comparados com aqueles associados ao consumo de cereais infantis (CI). Os resultados obtidos revelaram que a mudança do consumo atual para os cenários alternativos considerados (em especial para o consumo de cereais de pequeno-almoço com características semelhantes ao "Melhor CPA") poderia resultar num ganho de anos de vida saudável.

_Abstract

Foodstuffs, as cereal-based products, may present both potential risks and benefits to consumers. Cereal-based foods including breakfast and infant cereals represent important components of human diets and are among the first solid foods that young children usually eat. Cereal-based products constitute a source of several nutrients, including sodium, fibre and free sugars, which could be associated to beneficial and hazardous effects. Simultaneously, cereal-based foods could also present chemical

(e.g. mycotoxins) and microbiological (e.g. *Bacillus cereus*) contaminants. Aflatoxins, a frequent mycotoxin found in cereals, are undoubtedly the most toxic. Developed under RiskBenefit4EU project, the present study aimed to assess risks and benefits associated with the consumption of cereal-based products by the Portuguese young children. The risks posed by the consumption of breakfast cereals (BC) versus infant cereals (IC), due to aflatoxins, *B. cereus*, sodium and free sugars, were evaluated against the benefits of the intake of fibre. Obtained results showed that moving from the current consumption to the considered alternative scenarios (especially if considered the consumption of breakfast cereals similar to "Best BC") could result in a gain of healthy-life years.

_Introdução

A alimentação pode apresentar simultaneamente riscos e benefícios para os consumidores, sendo o balanço entre estes dois componentes de grande interesse para a promoção e desenvolvimento de políticas relacionadas com a alimentação (1).

Os alimentos à base de cereais, incluindo os cereais de pequeno-almoço (CPA) e os cereais infantis (CI, que correspondem a farinhas lácteas ou cereais destinados a lactentes), constituem um dos primeiros tipos de alimentos sólidos introduzidos na dieta infantil (2), integrando um grupo de alimentos bastante importante da sua dieta (3,4). Os alimentos à base de cereais são uma fonte de macro e micronutrientes onde se incluem a fibra, o sódio e os açúcares livres, apre-



sentando potencialmente efeitos benéficos (fibra) ou adversos (sódio e açúcares livres) para a saúde (5-7). Além dos componentes nutricionais, os cereais e os seus produtos podem também apresentar riscos de natureza química e.g. micotoxinas e microbiológica e.g. *Bacillus cereus*.

Em Portugal, estudos anteriores reportaram a ocorrência de micotoxinas, incluindo aflatoxinas, em alimentos consumidos pela população portuguesa, nomeadamente em produtos usualmente consumidos pelas crianças, como CPA e CI (8-11). No âmbito do projeto MYCOMIX, foi avaliado o risco associado à exposição de crianças a micotoxinas através do consumo de alimentos à base de cereais. Os resultados obtidos sugerem um potencial risco de efeitos adversos para níveis de ingestão iguais ou superiores ao percentil 50 (correspondentes a 0,097 ng/kg peso/dia) (11,12).

B. cereus é o perigo microbiológico mais investigado em alimentos à base de cereais tendo sido identificado como a causa de 44/72 surtos em diferentes regiões dos Estados Unidos da América, Austrália, Nova Zelândia e Europa. Relativamente à prevalência de *B. cereus*, a Food and Agriculture Organization/World Health Organization reportou numa meta-análise uma mediana de 41,7% em produtos desidratados e em produtos à base de cereais.


_Objetivo

O presente estudo teve como objetivo responder à seguinte questão: qual o impacto na saúde resultante da substituição do consumo de cereais de pequeno-almoço por cereais infantis habitualmente consumidos pelas crianças portuguesas com idades compreendidas entre os 6 e os 35 meses, no que respeita aos potenciais efeitos decorrentes da ingestão de aflatoxinas, *Bacillus cereus*, fibra, sódio e açúcares livres?

_Material e métodos

Por forma a responder à questão identificada, foram estabelecidos cinco cenários relativos ao consumo de cereais de pequeno-almoço (CPA) e de cereais infantis (CI), conforme descrito na tabela 1.

Com o objetivo de identificar os componentes alimentares mais relevantes para a avaliação de risco-benefício, os efeitos para a saúde associados e a sua priorização, foi realizada uma revisão da bibliografia em duas etapas: 1) pesquisa relacionada com o “componente alimentar”, para identificar os componentes de interesse nos alimentos considerados; 2) pesquisa relacionada com os “efeitos para a saúde”, para identificar os efeitos na saúde associados a um componente alimentar específico. A tabela 2 resume os componentes alimentares e os efeitos para a saúde considerados na presente avaliação de risco-benefício.

Tabela 1:  Cenários considerados na avaliação de risco-benefício associados ao consumo de alimentos à base de cereais (cereais de pequeno-almoço, CPA e cereais infantis, CI) consumidos pelas crianças portuguesas.

# Cenário	Descrição ¹
Referência	Consumo atual de CPA e CI
1	100% consumo CPA (substituição de CI por CPA) ²
2	100% consumo de CI (substituição de CPA por CI) ²
3	Melhor CPA: consumo de CPA e CI substituído por um cereal de pequeno-almoço específico, considerando a classificação obtida ³
4	Pior CI: consumo de CPA e CI substituído por uma farinha láctea específica, considerando a classificação obtida ³

¹ Quantidade consumida: a substituição preservou o número de calorias (isocalórica); ² Selecionados de forma aleatória em conformidade com a distribuição de consumo destes produtos na população; ³ Produtos definidos através da sua classificação relativa a três componentes nutricionais [fibra (+), sódio (-) e açúcares livres (-)]. Melhor CPA → classificação mais elevada; Pior CI → classificação mais baixa.



Tabela 2: Componentes alimentares e respetivos efeitos para a saúde considerados na avaliação de risco-benefício.

	Componentes alimentares	Tipo de análise efetuada	Tipo de efeito para a saúde	Efeitos para a saúde
Nutrição	Fibra	Quantitativa	+	Diabetes mellitus tipo 2 Doença cardiovascular
	Sódio	Semi-quantitativa	-	a)
	Açúcares livres		-	
Toxicologia	Aflatoxinas (AFB ₁)	Quantitativa	-	Carcinoma hepatocelular
Microbiologia	<i>Bacillus cereus</i>	Quantitativa	-	Doença de origem alimentar com sintomatologia gastrointestinal

+ : Efeito benéfico para a saúde; - : Efeito adverso para a saúde; a) Para o sódio e açúcares livres por não se dispor de dados epidemiológicos robustos procedeu-se a uma avaliação semi-quantitativa, não se identificando, portanto, quais os efeitos para a saúde.

Os dados utilizados no presente estudo foram obtidos de diferentes formas:

- os dados de ocorrência de micotoxinas em CPA e CI foram obtidos no âmbito do projeto MYCOMIX (11);
- os dados relativos à quantificação de *Bacillus cereus* resultaram do Plano Nacional de Colheita de Amostras executado pela Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE);
- os dados de consumo foram retirados do Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (IAN-AF) (13);
- os conteúdos de fibra, sódio e açúcares livres foram extraídos do Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (IAN-AF) (13), que utilizou uma versão alargada da Tabela de Composição de Alimentos (14).

Foram ainda utilizadas outras fontes como a ferramenta *Global Burden of Disease Results Tool* (15) e dados já publicados e obtidos por pesquisa bibliográfica.

Para cada um dos cenários definidos (tabela 1) foi utilizado o software SPADE (16) por forma a estimar a ingestão de fibra total, sódio e açúcares livres. Para a caracterização do risco e do benefício, foram calculadas diferentes variáveis (*i.e.* *risk ratio*, RR, e *potential impact fraction*, PIF), que foram posteriormente utilizadas para a integração dos riscos e dos benefícios, através da estimativa dos anos de vida saudável perdidos (DALY). Os DALYs potencialmente ganhos ou perdidos como consequência da alteração do consumo de CPA e CI foram expressos em Δ DALYs.

A prevalência de inadequação da ingestão de sódio e de açúcares livres foi avaliada em cada um dos cenários estabelecidos através de uma abordagem semi-quantitativa. Foram utilizadas para o efeito as estimativas de ingestão destes componentes obtidas pela aplicação do software SPADE (16). Estes valores de ingestão foram comparados com os valores de referência para o sódio (1500 mg/dia) (17) e de açúcares livres (ingestão recomendada de 5% a 10% da energia total ingerida) (6).

_Resultados

Em todos os cenários considerados, verificou-se que os níveis de exposição a *B. cereus* foram inferiores à dose considerada como necessária para conduzir ao desenvolvimento de doença, não apresentando assim risco significativo, considerando as habituais condições de consumo dos CPA e das CI.

Os resultados obtidos evidenciaram ainda que a alteração do consumo atual pelo consumo considerado nos cenários “100% consumo CPA” e “Melhor CPA” estariam potencialmente associados a uma redução no número de casos de diabetes mellitus tipo 2, doença cardiovascular e carcinoma hepatocelular e, conseqüentemente, prevenindo DALYs, em especial no cenário “Melhor CPA” (tabela 3). Estes cenários apresentaram valores de Δ DALY negativos, sugerindo uma redução do número anos de vida saudável perdidos (-0,486 e -4,473 de Δ DALY por 100.000 indivíduos para os cenários “100% consumo CPA” e “Melhor CPA”, respetivamente). Este



Tabela 3: Alterações nos valores de DALYs estimados pela integração de riscos e benefícios considerados na avaliação de risco-benefício.

	100% consumo CPA	100% consumo CI	Melhor CPA	Pior CI
ΔDALY	-0,486	0,143	-4,473	0,877

CPA: Cereais de pequeno-almoço; CI: Cereais infantis;
DALY: Anos de vida saudável perdidos

facto é justificado pelo aumento da ingestão de fibras e pela diminuição da exposição a aflatoxinas.

Através da análise semi-quantitativa, verificou-se que cerca de 25% das crianças portuguesas com idades compreendidas entre os 6 e os 35 meses apresentam uma ingestão inadequada de sódio. Dos cenários analisados, a menor ingestão de sódio seria alcançada no cenário “Melhor CPA”, apresentando cerca de 23% de prevalência de inadequação da ingestão de sódio. Relativamente aos açúcares livres, 29% das crianças portuguesas da faixa etária considerada apresenta inadequação de ingestão destes compostos. O cenário “Melhor CPA” revelou ser a melhor alternativa, apresentando uma prevalência de inadequação de ingestão de 16%.

Discussão e conclusão

Na presente avaliação de risco-benefício foram considerados quatro cenários alternativos de consumo de alimentos à base de cereais (CPA e CI), em comparação com o atual consumo de CPA e CI por crianças portuguesas com idades compreendidas entre os 6 e os 35 meses. Estimou-se que os cenários alternativos considerados permitiriam um ganho de anos de vida saudável, em especial o cenário “Melhor CPA”. No entanto, o elevado teor de fibras e baixo teor de sódio e açúcares livres poderá estar associado a uma reduzida palatabilidade e, consequentemente, uma baixa adesão por parte dos consumidores, principalmente para a faixa etária considerada.

Apesar de serem consumidos por esta faixa etária em Portugal, os CPA que são habitualmente comercializados para as crianças não são reconhecidos como alimentos infantis para fins legislativos (18). Se esses produtos integrassem a categoria “alimentos infantis”, seriam aplicáveis limites máximos mais rígidos e, consequentemente, teriam que ser

desenvolvidos esforços para produzir alimentos com teores de micotoxinas ainda mais baixos.

Conclui-se ainda que estudos de avaliação de risco-benefício permitem inferir, de forma holística e integrada, acerca do impacto na saúde do consumo de certos alimentos ou dietas, providenciando assim evidência científica para a tomada de decisão com vista à proteção da saúde pública.

Agradecimentos:

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto *RiskBenefit4EU – Partnering to strengthen the risk-benefit assessment within EU using a holistic approach* financiado pelas EFSA Partnering Grants (Grant Agreement Number – GA/EFSA/AFSCO/2017/01 – GA02) ¹.

¹ This work was supported by the “RiskBenefit4EU – Partnering to strengthen the risk-benefit assessment within EU using a holistic approach” funded by EFSA Partnering Grants (Grant Agreement Number – GA/EFSA/AFSCO/2017/01 – GA02).



Referências bibliográficas:

- (1) Hart A, Hoekstra J, Owen H, et al. Qalibra: a general model for food risk-benefit assessment that quantifies variability and uncertainty. *Food Chem Toxicol.* 2013; 54:4-17. Epub 2012 Dec 20. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.056>
- (2) Amezdroz E, Carpenter L, O’Callaghan E, et al. Transition from milks to the introduction of solid foods across the first 2 years of life: findings from an Australian birth cohort study. *J Hum Nutr Diet.* 2015;28(4):375-83. <https://doi.org/10.1111/jhn.12313>
- (3) Collins HM, Burton RA, Topping DL, et al. REVIEW: Variability in Fine Structures of Noncellulosic Cell Wall Polysaccharides from Cereal Grains: Potential Importance in Human Health and Nutrition. *Cereal Chem.* 2010;87(4):272-82. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-87-4-0272>
- (4) Schwartz MB, Vartanian LR, Wharton CM, et al. Examining the nutritional quality of breakfast cereals marketed to children. *J Am Diet Assoc.* 2008;108(4):702-5. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2008.01.003>
- (5) World Health Organization. Guideline: Sodium intake for adults and children. Geneva: WHO, 2012. https://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sodium_intake_printversion.pdf
- (6) World Health Organization. Guideline: Sugars intake for adults and children. Geneva: WHO, 2015. <https://www.who.int/publications-detail/9789241549028>
- (7) Anderson JW, Baird P, Davis RH Jr, et al. Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev.* 2009;67(4):188-205. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x>
- (8) Alvito PC, Sizoo EA, Almeida CMM, et al. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. *Food Anal. Methods.* 2010;3:22-30. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9064-x>
- (9) Martins C, Assunção R, Cunha SC, et al. Assessment of multiple mycotoxins in breakfast cereals available in the Portuguese market. *Food Chem Toxicol.* 2018;118:399-408. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.040>



- (10) Assunção R, Martins C, Dupont D, et al. Patulin and ochratoxin A co-occurrence and their bioaccessibility in processed cereal-based foods: A contribution for Portuguese children risk assessment. *Food Chem. Toxicol.* 2016;96:205-14 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.004> .
- (11) Assunção R, Martins C, Vasco E, et al. Portuguese children dietary exposure to multiple mycotoxins: an overview of risk assessment under MYCOMIX project. *Food Chem. Toxicol.* 2018;118:399-408. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.040>
- (12) Assunção R, Vasco E, Nunes, B, et al. Single-compound and cumulative risk assessment of mycotoxins present in breakfast cereals consumed by children from Lisbon region, Portugal. *Food Chem. Toxicol.* 2015;86:274-81. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.017>
- (13) Lopes C, Torres D, Oliveira A, et al. Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, IAN-AF 2015-2016: relatório de resultados. Porto: Universidade do Porto, 2017. https://ian-af.up.pt/sites/default/files/IAN-AF%20Relat%C3%B3rio%20Resultados_0.pdf
- (14) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Tabela de Composição de Alimentos. [Em linha]. [consult. 12/3/2019]. Disponível em: <http://portfir.insa.pt/foodcomp/search>
- (15) Institute for Health Metrics and Evaluation. GBD Results Tool [Em linha]. [consult. 12/3/2019]. Disponível em: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>
- (16) Dekkers AL, Verkaik-Kloosterman J, van Rossum CT, et al. SPADE, a New Statistical Program to Estimate Habitual Dietary Intake from Multiple Food Sources and Dietary Supplements. *J Nutr.* 2014;144(12):2083-91. <https://doi.org/10.3945/jn.114.191288>
- (17) Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*; AC, R., CL, T., AL, Y., Al., E., Eds.; Washington (DC): National Academies Press (US), 2011;
- (18) Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium; Ross AC, Taylor CL, Ann L Yaktine AL (eds). *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. Washington (DC): National Academies Press (US), 2011

Avaliação da exposição a contaminantes com base num estudo de dieta total conduzido em Portugal

Exposure assessment to contaminants based on a Total Diet Study conducted in Portugal

Elsa Vasco, Maria Graça Dias, Luísa Oliveira

elsa.vasco@insa.min-saude.pt

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

Resumo

Neste trabalho avaliou-se a exposição da população portuguesa a cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsénio (As), mercúrio (Hg) e nitrato (NO_3^-) com base na ocorrência destas substâncias nos alimentos e no consumo destes, utilizando a metodologia dos Estudos de Dieta Total. A definição da amostragem representativa do consumo alimentar da população foi realizada com base no estudo "Alimentação e estilos de vida da população portuguesa" e os alimentos foram recolhidos, tratados e cozinhados para serem analisados na forma "como consumido". Para estimar a exposição da população aos contaminantes foi utilizado o programa MCRA (Monte Carlo Risk Assessment). A percentagem da população portuguesa dos 18 aos 74 anos, de ambos os sexos, exposta a doses diárias superiores às toleráveis/admissíveis, definidas pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, na sigla em inglês), foi inferior a 5 para o cádmio e nitratos e inferior a 10 para o mercúrio. Para o arsénio e chumbo a população portuguesa não ultrapassa os valores-guia.

Abstract

The exposure of the Portuguese population to cadmium (Cd), lead (Pb), arsenic (As), mercury (Hg) and nitrates (NO_3^-) was evaluated based on the occurrence of these substances in foods and their consumption, using the methodology of Total Diet Studies. The sample definition representative of the population's food consumption was based on the study "Food and lifestyles of the Portuguese population" and the foods were collected, treated and cooked to be analysed as "consumed". To estimate population exposure to contaminants, the MCRA (Monte Carlo Risk Assessment) software was used. The percentage of the Portuguese population from 18 to 74 years of age, of both sexes, exposed to daily intakes above the tolerable / acceptable levels, defined by the European Food Safety Authority (EFSA), is less than 5 for cadmium and nitrates and less than 10 for mercury. For arsenic and lead, the Portuguese population does not exceed the guidance values.

Introdução

Os Estudos de Dieta Total (TDS) são considerados um bom complemento aos programas de monitorização ou vigilância alimentar existentes para estimar a exposição da população, através dos alimentos tal como são consumidos, a substâncias químicas prejudiciais e benéficas.

A comparação da ingestão real de substâncias químicas presentes nos alimentos, utilizando um TDS, com os valores de orientação baseados na saúde (DDA – Dose Diária Admissível, IST – Ingestão Semanal Tolerável, DDT – Dose Diária Tolerável), fornece uma estimativa realista da exposição para fins de avaliação de risco da população em geral. Estes resultados podem ser utilizados como uma ferramenta de definição de prioridades para que os gestores de risco concentrem os seus recursos, habitualmente limitados, nas substâncias e alimentos que se revelem de maior risco para a saúde pública.

O cádmio é um metal pesado naturalmente presente no ambiente. É principalmente tóxico para o rim, podendo, no entanto, também causar desmineralização óssea. Este metal tem sido associado ao aumento do risco de cancro no pulmão, endométrio, bexiga e mama. O consumo alimentar é a principal fonte de exposição ao cádmio para a população em geral, não fumadora. A *European Food Safety Authority* (EFSA) confirmou uma IST para o cádmio de 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal (1,2).

O chumbo é um contaminante ambiental natural, mas o seu uso, no passado, em canalizações de água, tintas e gasolina aumentou a sua presença nos humanos, sendo os alimentos a principal fonte de exposição. O chumbo acumula-se no corpo humano e pode afetar o sistema nervoso central especialmente em crianças em desenvolvimento. Atualmente não existe Ingestão Semanal Tolerável Provisória (ISTP) por



não haver um consenso sobre um valor considerado protetor da saúde, especialmente porque necessitam de ser consideradas outras fontes de exposição ao chumbo, para além dos alimentos. No entanto, para a avaliação da exposição é utilizado o valor de 25 µg/kg peso corporal, fixada pelo *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) em 1993 para a ingestão semanal tolerável (3, 4, 5).

O arsénio é um metal que ocorre naturalmente no ambiente e está presente no solo, nas águas subterrâneas e nas plantas e ocorre em diferentes formas (inorgânicas e orgânicas) sendo as inorgânicas as mais tóxicas. Os principais efeitos adversos associados à ingestão a longo prazo de arsénio inorgânico em humanos são as lesões cutâneas, cancro do pulmão e bexiga, neurotoxicidade, doenças cardiovasculares, metabolismo anormal da glicose e diabetes. Das formas orgânicas de arsénio, a arsenobetaina, a principal forma encontrada nos peixes e nos mariscos, não apresenta preocupação toxicológica. Atualmente também não está definido um valor para a IST, mas para a avaliação da exposição é utilizado o valor de 15 µg/kg peso corporal, fixado pelo JECFA em 1993 (6, 7).

O mercúrio é um metal que é libertado no ambiente a partir de fontes naturais e antropogénicas. Uma vez libertado, passa por uma série de transformações e ciclos complexos entre a atmosfera, o oceano e a terra. Existem três formas químicas de mercúrio sendo o metilmercúrio a forma mais comum de mercúrio orgânico na cadeia alimentar e a mais tóxica. Os principais efeitos da exposição a mercúrio são a neurotoxicidade, nefrotoxicidade, imunotoxicidade e teratogenicidade. O peixe e os produtos à base de peixe são os maiores contribuintes para a exposição a metilmercúrio. A IST para o mercúrio inorgânico é de 4 µg/kg peso corporal, expressa como mercúrio (8).

Os nitratos estão presentes no ambiente e ocorrem naturalmente em alimentos vegetais como parte do ciclo do azoto. Os seus sais de sódio ou potássio, também são utilizados como aditivos alimentares em alimentos processados com a função de conservantes. A exposição humana aos nitratos ocorre principalmente pela ingestão de frutas e legumes, no entanto, o consumo destes alimentos é amplamente reco-

mentado devido à forte evidência de efeitos benéficos para a saúde. Os efeitos adversos, incluem a meta-hemoglobinemia em crianças (dificuldade no transporte do oxigénio no sangue) e possível aumento do risco de cancro. A dose diária admissível para o nitrato é de 3,7 mg/kg peso corporal/dia (9,10).

_Objetivo

Avaliação da exposição da população portuguesa a cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsénio (As), mercúrio (Hg) e nitrato (NO₃⁻) com base num Estudo de Dieta Total.

_Material e métodos

Para estimar a exposição alimentar da população portuguesa a cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsénio (As), mercúrio (Hg) e nitrato (NO₃⁻), com base na abordagem do Estudo de Dieta Total (11), foram analisadas 164 amostras compostas preparadas “como consumidas”, a partir de 1968 sub-amostras (12). As amostras eram representativas dos hábitos de consumo da população portuguesa e basearam-se no Inquérito Nacional de Consumo Alimentar “Alimentação e estilos de vida da população portuguesa” (13).

Os três primeiros elementos (cádmio, chumbo, arsénio) foram determinados por espectrometria de massa aplicada a plasma indutivo, o mercúrio por espectrofotometria de absorção atómica, e o nitrato por HPLC-UV.

A avaliação da exposição foi efetuada através do *software Monte Carlo Risk Assessment* (MCRA) usando uma abordagem semiprobabilística, atribuindo aos valores analíticos inferiores ao limite de deteção, o valor do limite de deteção e aos resultados analíticos entre o limite de deteção e o limite de quantificação, o valor do limite de quantificação, permitindo obter a ingestão média, mediana e outros percentis, assim como, o contributo de cada alimento para a ingestão de cada contaminante. Para a avaliação foram utilizadas as doses diárias toleráveis (DDT), em µg/kg de peso corporal/dia, 0,357; 3,6; 2,1 e 0,571, respetivamente para o Cd, Pb, As e Hg; para o nitrato utilizou-se a dose diária admissível (DDA) de 3,7 mg/kg peso corporal/dia.

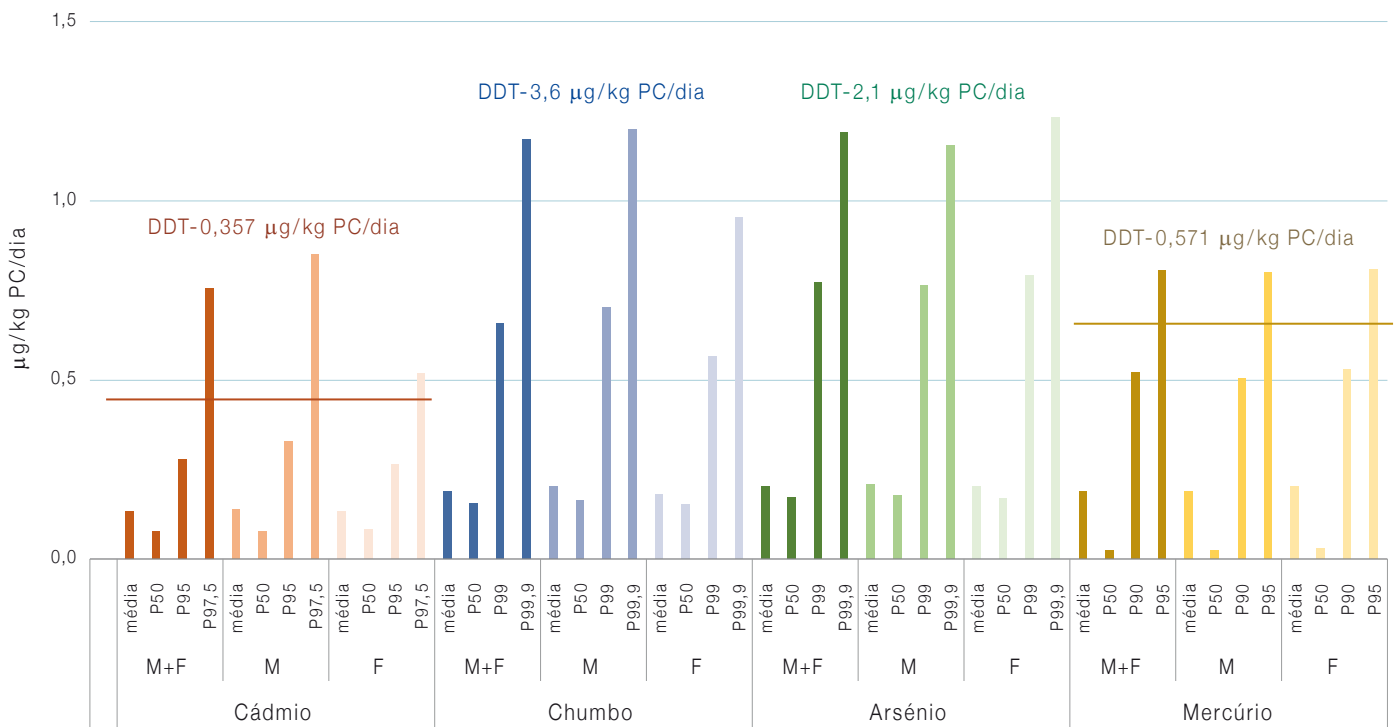


Tendo em consideração a toxicidade do arsénio e que a determinação analítica foi de arsénio total, os alimentos do grupo dos peixes e dos pratos compostos com peixe (que contêm a forma orgânica de arsénio não tóxica) não foram considerados na avaliação da exposição a este contaminante.

_Resultados e discussão

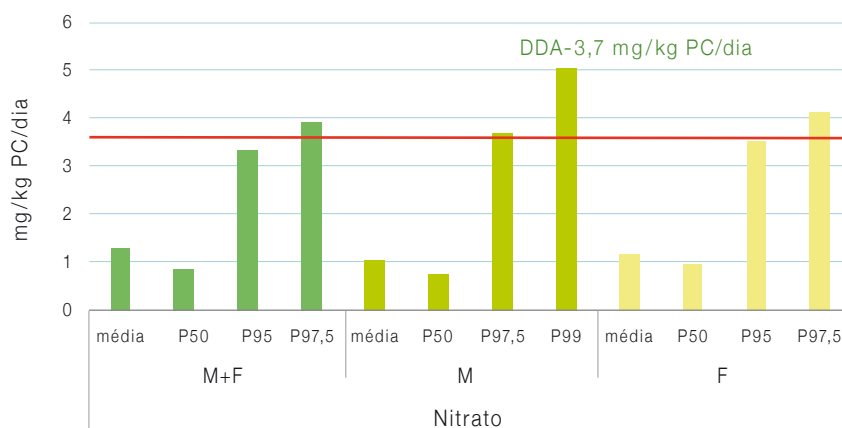
Os resultados obtidos para a exposição da população portuguesa, encontram-se no [gráfico 1](#) para o cádmio, o chumbo, o arsénio e o mercúrio e no [gráfico 2](#) para o nitrato.

Gráfico 1: Média e percentis de ingestão dos contaminantes mercúrio, cádmio, chumbo e arsénio, para o grupo etário dos 18 a 74 anos e por sexo.



DDT: Dose Diária Tolerável; PC: Peso Corporal; M: Masculino; F: Feminino

Figura 2: Média e percentis da ingestão do contaminante nitrato, para o grupo etário dos 18 a 74 anos e por sexo.



DDA: Dose Diária Admissível; PC: Peso Corporal; M: Masculino; F: Feminino



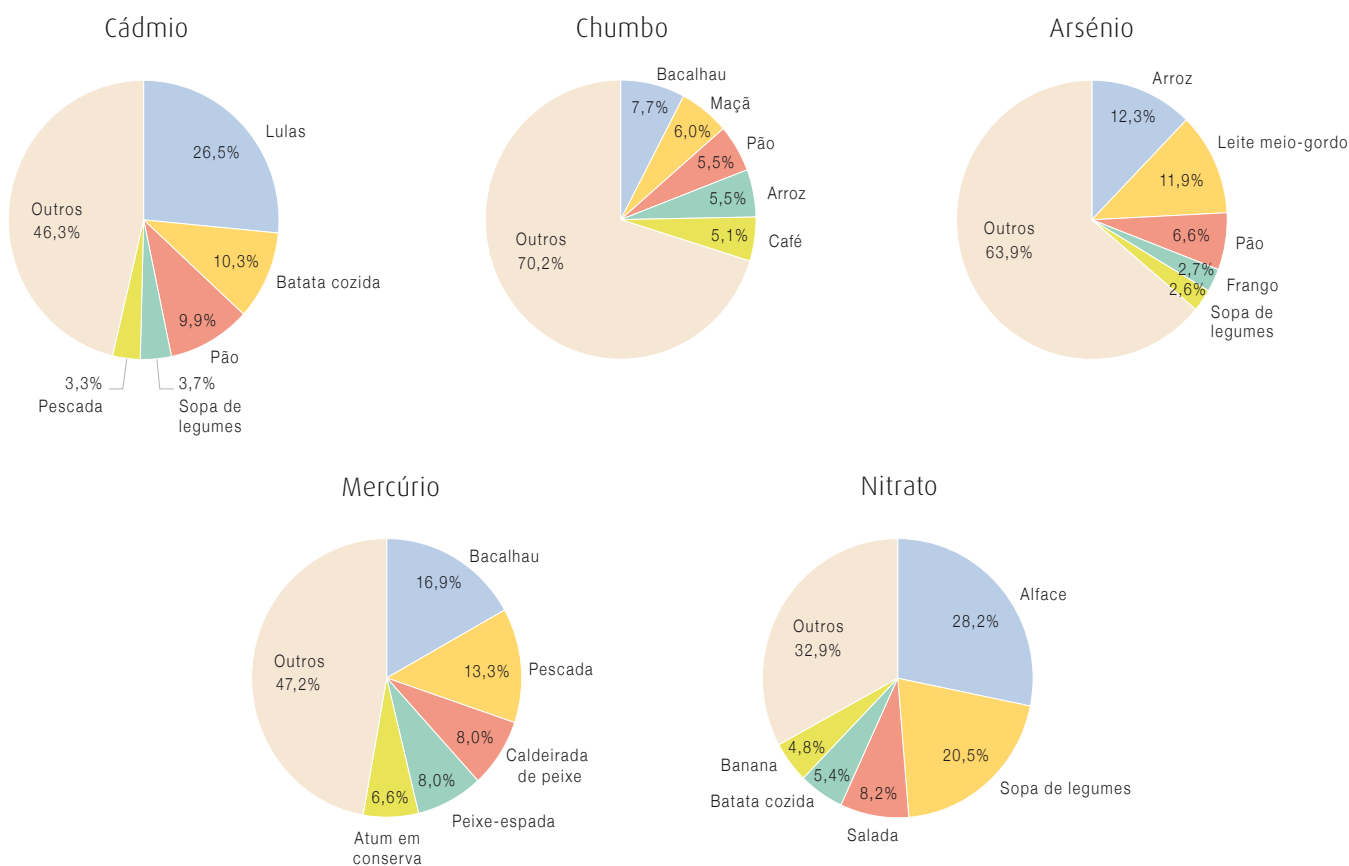
Para o cádmio e chumbo, os resultados da exposição média são menores que os valores reportados pela EFSA para a população europeia (1,4), no caso do arsénio o valor médio de exposição obtido neste estudo encontra-se dentro do intervalo reportado (7).

A contribuição dos diferentes alimentos para a exposição a cada um dos contaminantes com destaque para os cinco maiores contribuintes apresenta-se no gráfico 3. Nenhum dos restantes 159 alimentos contribuem mais que 4,9% para a exposição a estes contaminantes.

_Conclusões

Com base no Estudo de Dieta Total conduzido em Portugal, entre 2014 e 2019, utilizando uma abordagem semiprobabilística, e considerando o pior cenário, conclui-se que a percentagem da população portuguesa dos 18 aos 74 anos, de ambos os sexos, que apresenta exposição a doses diárias superiores às toleráveis/admissíveis é inferior a 5 para o cádmio e nitrato e inferior a 10 para o mercúrio. Para o arsénio e chumbo a população portuguesa não ultrapassa os valores-guia. Tendo em consideração que a elevada ingestão de peixe pela população portuguesa tem efeitos benéficos para a saúde consideráveis, os maiores consumidores deverão diversificar as espécies consumidas e incluir nas suas escolhas peixes de menores dimensões, nomeadamente da costa portuguesa, por forma a não ultrapassarem a dose diária tolerável de mercúrio.

Gráfico 3: Distribuição da contribuição dos alimentos para a exposição a cádmio, chumbo, arsénio, mercúrio e nitrato.





Financiamento:

A realização deste estudo foi parcialmente financiada pelo 7º Programa Quadro da União Europeia para investigação, desenvolvimento tecnológico e demonstração (Grant agreement nº289108).

Agradecimentos:

À Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição (SPCNA) pela cédência dos dados de consumo alimentar utilizados neste trabalho que são originários do Estudo "Alimentação e Estilos de Vida da População Portuguesa", realizado pela SPCNA ao abrigo de um protocolo de mecenato científico com a empresa Nestlé Portugal.

Aos laboratórios de Química e de Materiais de Referência do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo pelas determinações analíticas que permitiram avaliar a exposição.

- (12) Dias MG, Vasco E, Pité M, et al. Estudo de dieta total piloto para avaliação da ingestão de nutrientes e da exposição a contaminantes: amostragem. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2015;4(Supl 5):7-9. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/3008>
- (13) Póinhos R, Franchini B, Afonso C, et al. Alimentação e estilos de vida da população Portuguesa: metodologia e resultados preliminares. *Alimentação Humana*. 2009;15(3):43-60. http://www.spcna.pt/download.php?path=pdfs&filename=SPCNA_20101209222339_SPCNA_n3_2009_1.pdf

Referências bibliográficas:

- (1) European Food Safety Authority. Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal*. 2012;10(1):2551. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2551>
- (2) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Statement on tolerable weekly intake for cadmium. *EFSA Journal* 2011;9(2):1975. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1975>
- (3) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on Lead in Food. *EFSA Journal* 2010;8(4):1570. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1570>
- (4) European Food Safety Authority. Lead dietary exposure in the European population. *EFSA Journal* 2012;10(7):2831. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2831>
- (5) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants: forty-first report. Geneva: World Health Organization, 1993. (WHO technical report series; 837). <https://apps.who.int/iris/handle/10665/36981>
- (6) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA Journal* 2009; 7(10):1351. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1351>
- (7) European Food Safety Authority. Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. *EFSA Journal* 2014; 12(3):3597. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3597>
- (8) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA Journal* 2012; 10(12):2985. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2985>
- (9) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Statement on possible public health risks for infants and young children from the presence of nitrates in leafy vegetables. *EFSA Journal* 2010; 8(12):1935. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1935>
- (10) EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Mortensen A, Aguilar F, Crebelli R, et al. Re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives. *EFSA Journal* 2017; 15(6):4787. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4787>
- (11) Dofkova M, Nurmi T, Berg K, et al. Development of harmonised food and sample lists for total diet studies in five European countries. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2016;33(6):933-44. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1189770>

Substitutos vegetarianos da carne em receitas tradicionais como fontes de vitaminas do grupo B

Vegetarian meat substitutes in traditional recipes as sources of group B vitamins

Cristina Flores, Tânia Gonçalves Albuquerque, Mariana Santos, Isabel Castanheira

cristina.flores@insa.min-saude.pt

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

Resumo

Devido ao crescente número de adeptos de alimentações vegetarianas, bem como à importância da sustentabilidade ambiental, as leguminosas têm um papel relevante como fonte de proteína de origem vegetal. Assim favas, ervilhas, grão-de-bico e feijão, leguminosas tradicionalmente consumidas em Portugal, foram avaliadas, com base em dados de Tabelas de Composição dos Alimentos, como fontes de quatro vitaminas do grupo B: tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3) e piridoxina (B6). Foi também estimado o contributo de cada leguminosa, para o aporte destas vitaminas do complexo B, considerando as doses de referência para adultos, recomendadas pela *European Food Safety Authority* (EFSA). Os dados indicam que estas leguminosas poderão ter um contributo importante para a ingestão destas vitaminas, com especial relevo para a tiamina.

Abstract

Due to the growing number of vegetarian consumers, as well as the importance of environmental sustainability, legumes play a relevant role as a source of protein of plant origin. Thus broad beans, peas, chickpeas and beans, which are legumes traditionally consumed in Portugal, were evaluated as sources of four group B vitamins: thiamine (B1), riboflavin (B2), niacin (B3) and pyridoxine (B6). This evaluation was based on data collected from Food Composition Tables. Legumes contribution to the intake of these B-complex vitamins has also been estimated, taking into account the European Food Safety Authority (EFSA) recommended daily intake for adults. The reported data indicate that these legumes may be a good source of those vitamins, with particular emphasis on thiamine.

Introdução

Os diferentes tipos de alimentação vegetariana, mais ou menos estritos, têm cada vez mais adeptos nos países do ocidente (1-4), devendo a crescente adesão a estes regimes alimentares a motivações de ordem religiosa, ética, ambiental ou à procura de uma alimentação, que poderá ser, nutricionalmente mais equilibrada com consequentes benefícios para a saúde. Os vários estudos indicam que a adoção des-

tes regimes alimentares é relevante para diminuir o risco de doenças crónicas como a diabetes tipo 2, a doença cardiovascular e a obesidade (2,4,5).

A adoção das dietas com base na proteína de origem vegetal também se verifica em Portugal. Um estudo realizado pelo Centro Vegetariano em 2017 concluiu que o número de vegetarianos que em 2007 era de 30.000 quadruplicou nos 10 anos seguintes (6).

Este aumento levou a uma procura crescente de ingredientes que possam substituir a carne nas receitas tradicionais que fazem parte da cultura gastronómica nacional.

Apesar de estes substitutos serem principalmente selecionados pelo seu teor proteico, a semelhança da sua textura com a da carne, depois de processados, é por vezes, um fator determinante para a sua escolha, proporcionando a quem opta por uma dieta vegetariana, a possibilidade de continuar a saborear aquelas receitas. As leguminosas são um dos ingredientes mais utilizados como substituto da carne pois, para além de estarem entre as melhores fontes proteicas de origem vegetal, permitem obter as texturas procuradas e o sabor agradável e aceite por este tipo de consumidores. Importa assim saber o seu perfil vitamínico. Todas as vitaminas do grupo B são hidrossolúveis e atuam como cofatores enzimáticos condicionando, assim, o funcionamento normal de diversas vias metabólicas.

Com exceção da niacina (B3) que pode ser sintetizada a partir do aminoácido triptofano, as vitaminas deste grupo só podem ser obtidas a partir dos alimentos e, uma vez que não são armazenadas pelo organismo em quantidades significativas, devem ser ingeridas regularmente e em quantidades que garantam o funcionamento adequado das diversas vias metabólicas onde intervêm.



Os valores de referência para a população adulta, de acordo com a *European Food Safety Authority* (EFSA) ⁽⁷⁾ são referidos na **tabela 1**.

Tabela 1: ↓ Valores de referência das vitaminas do grupo B para a população adulta (mg/dia).

	Mulheres (mg/dia)	Homens (mg/dia)
Tiamina*	0,84	1,04
Riboflavina	1,6	1,6
Niacina*	13,4	16,6
Piridoxina	1,6	1,7

* Considerando valores médios de necessidades energéticas para adultos com atividade física moderada; (MJ/dia) M=8,4 H=10,4 ⁽⁷⁾

Estas necessidades (**tabela 1**) podem, no entanto, estar aumentadas em situações que exigem a intensificação da atividade metabólica como na gravidez e aleitamento ou com a prática de atividade física intensa ⁽⁷⁻⁹⁾.

A carência de cada uma destas vitaminas pode levar ao desenvolvimento de síndromes de deficiência específicas, como por exemplo o beribéri, típico de deficiências severas em tiamina (B1). A deficiência de niacina (B3) concomitante com a ingestão proteica deficiente ou com alterações do metabolismo do triptofano poderá também originar a pelagra. O aparecimento de lesões da pele e mucosas pode surgir em situações de ingestão deficiente de niacina (B3), piridoxina (B6) ou riboflavina (B2), sendo que a carência desta última também se pode manifestar pelo desenvolvimento de fotofobia ⁽⁸⁻¹⁰⁾. Estas situações são, geralmente, reversíveis com a administração de suplementos da vitamina em déficit.

As vitaminas B1, B2, B6 e B3 podem ser obtidas a partir de todos os grupos alimentares, estando as três primeiras presentes em todos os alimentos naturais não processados ^(8,9). Apesar deste tipo de ocorrência, nem sempre os nutrientes presentes nos alimentos estão biodisponíveis, não podendo ser utilizados metabolicamente. Para além disso, as diferentes formas de uma mesma vitamina não têm, necessariamente, a mesma atividade como no caso da vitamina B6 onde a

das formas glicosiladas parece ser reduzida ⁽⁹⁾. A piridoxina (B6) existente nos alimentos de origem vegetal está, numa percentagem considerável, sob a forma glicosilada que, para além de ser menos eficiente, diminui a absorção da sua forma livre através da competição para os mesmos locais de transporte. Mais de 70% da niacina (B3) existente nos grãos dos cereais é ácido nicotínico ligado a macromoléculas, como polissacáridos ou glicopeptídeos, que não pode, por isso, ser utilizado ^(8,9).

Para além disso, algumas formas de processamento e/ou armazenamento podem causar perdas que podem representar mais de 80% dos seus teores iniciais ou, pelo contrário, aumentar a disponibilidade de vitaminas que existem incorporadas em macromoléculas. Um exemplo é a forma tradicional de preparação das *tortillas* na América central, onde a base da alimentação é o milho. Neste caso, a farinha é demolhada numa solução alcalina antes de ser utilizada, resultando na libertação do ácido nicotínico, explicando a ausência de pelagra nesta região ^(8,9).

No caso específico da riboflavina (B2), ela pode ser quase totalmente degradada no leite armazenado em recipientes transparentes e exposto à luz solar ⁽⁸⁾. Relativamente à tiamina (B1), a sua degradação pode atingir os 50% em meios alcalinos como quando se utilizam fermentos químicos em pastelaria ou bicarbonato de sódio na cozedura de vegetais verdes para manter a cor. Os sulfitos, utilizados na indústria alimentar como conservantes, podem também afetar o conteúdo dos alimentos relativamente a algumas das vitaminas em estudo, não sendo, no entanto, permitida a sua utilização na carne fresca, uma fonte importante de tiamina (B1) ⁽¹¹⁾.

De acordo com M. Prodanov *et al.* ⁽¹²⁾ as perdas em vitaminas hidrossolúveis decorrentes do processo de demolhar as leguminosas, antes de cozinhar, podem ser significativas.

De acordo com a literatura, as leguminosas podem ser fontes consideráveis de vitaminas do grupo B ^(4,5).



_Objetivo

Este trabalho procurou avaliar algumas variedades de leguminosas consumidas em Portugal, nomeadamente, favas, ervilhas, grão-de-bico e feijão, como fontes de quatro vitaminas do grupo B: tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3) e piridoxina (B6).

_Metodologia

Foram recolhidos dados relativos ao teor vitamínico daquelas leguminosas (**figura 1**) em algumas das Tabelas de Composição dos Alimentos (**13-21**) incluídas na lista de tabelas do EuroFIR - *European Food Information Resource Network* (a maior plataforma *online* de tabelas de composição de alimentos) e calculado o valor médio para cada uma das variedades avaliadas.

O valor obtido, para cada uma das vitaminas, foi comparado, em termos de percentagem, com os valores de referência para adultos.

_Resultados e discussão

Os teores médios calculados, por 100g, estão apresentados na **tabela 2** assim como o contributo percentual considerando os valores de referência para a população adulta.

Para a tiamina (B1), os valores encontrados são, em todas as variedades, superiores a 30% do valor de referência, sendo de realçar o feijão-preto onde cada 100g poderá contribuir para a ingestão de 87% do valor de referência no caso dos homens e de 107% nas mulheres.

O feijão-branco é a variedade que menos contribui para a ingestão de niacina (B3) com valores inferiores a 5%, sendo o feijão-preto o que apresenta o teor mais elevado desta vitamina, podendo contribuir com 31% do valor de referência indicado para as mulheres.

No caso da riboflavina (B2) e da piridoxina (B6), as ervilhas são a única leguminosa avaliada com valores inferiores a 10% do valor de referência por 100g. Nas outras leguminosas, os contributos médios estão entre 10% e 16%; e entre 14% e 31%, para a riboflavina (B2) e piridoxina (B6), respetivamente.

Figura 1:  Leguminosas avaliadas neste estudo.





Tabela 2: Teor de vitaminas do grupo B nas leguminosas avaliadas.

Leguminosa	N	Tiamina				Riboflavina				Niacina				Piridoxina			
		(mg/100g)		% PRI* / 100g		(mg/100g)		% PRI / 100g		(mg/100g)		% PRI* / 100g		(mg/100g)		% PRI / 100g	
		Gama	Média	M	H	Gama	Média	M	H	Gama	Média	M	H	Gama	Média	M	H
Ervilhas secas	3	0,58 - 0,82	0,67	80	64	0,070 - 0,18	0,13	8		2,2 - 3,0	2,6	19	15	0,08 - 0,16	0,12	8	7
Ervilhas frescas	12	0,21 - 0,74	0,36	43	35	0,020 - 0,30	0,11	7		1,0 - 3,0	1,9	14	11	0,08 - 0,16	0,12	7	7
Favas secas	6	0,04 - 0,56	0,43	51	41	0,040 - 0,35	0,26	16		1,2 - 2,83	2,4	18	15	0,06 - 0,56	0,36	23	21
Favas frescas	7	0,11 - 0,56	0,32	38	31	0,040 - 0,33	0,18	11		1,2 - 2,8	2,1	16	13	0,040 - 0,56	0,24	15	14
Feijão-branco	6	0,35 - 0,65	0,46	55	44	0,15 - 0,22	0,16	10		0,48 - 2,4	0,93	7	6	0,32 - 0,56	0,40	25	24
Feijão-catarino	2	0,50 - 0,75	0,62	74	60	0,12 - 0,21	0,17	11		1,4 - 1,5	1,4	10	8	0,31 - 0,31	0,31	20	18
Feijão-encarnado	6	0,51 - 0,65	0,60	71	58	0,19 - 0,22	0,20	13		2,1 - 2,3	2,1	16	13	0,40 - 0,56	0,43	27	25
Feijão-frade	4	0,54 - 1,1	0,82	98	79	0,18 - 0,23	0,21	13		2,1 - 2,2	2,1	16	13	0,36 - 0,56	0,41	26	24
Feijão-manteiga	6	0,35 - 0,77	0,56	67	54	0,14 - 0,20	0,19	12		1,4 - 2,2	2,0	15	12	0,050 - 0,52	0,32	20	19
Feijão-preto	2	0,90 - 0,90	0,90	107	87	0,19 - 0,19	0,19	12		2,0 - 6,2	4,1	31	25	0,29 - 0,29	0,29	18	17
Grão-de-bico	8	0,31 - 0,52	0,43	51	41	0,13 - 0,24	0,17	11		1,5 - 4,3	2,1	16	13	0,33 - 0,55	0,50	31	29

%PRI: Contributo(%) para a ingestão de vitaminas, considerando os valores de referência para a população adulta

N: Número de dados considerados; M: Mulheres; H: Homens

* Considerando valores médios de necessidades energéticas para adultos com atividade física moderada

X 10 ≤ % PRI / 100g ≤ 15

% PRI / 100g ≥ 15

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que as leguminosas (favas, ervilhas, grão-de-bico e feijão) podem ser consideradas uma boa fonte das vitaminas do complexo B avaliadas (tiamina(B1), riboflavina (B2), niacina (B3) e piridoxina (B6), com especial relevância para a tiamina.

Referências bibliográficas:

- Schüpbach R, Wegmüller R, Berguerand C, et al. Micronutrient status and intake in omnivores, vegetarians and vegans in Switzerland. *Eur J Nutr.* 2017;56:283-93. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1079-7>
- Richter M, Boeing H, Grünewald-Funk D, et al. Vegan Diet Position of the German Nutrition Society (DGE). *Ernahrungs Umschau.* 2016;63(04): 92-102. <https://doi.org/10.4455/eu.2016.021>
- Craig WJ. Health effects of vegan diets. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:1627S-33S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.26736N>
- Maphosa Y, Jideani VA. The role of legumes in human nutrition. IN: Chávarri Hueda M (ed). *Functional Food: Improve Health through Adequate Food.* 2nd. IntechOpen, 2017. (chapter 6). <https://doi.org/10.5772/intechopen.69127>
- Kouris-Blazos A, Belski R. Health benefits of legumes and pulses with a focus on Australian sweet lupins. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2016;25(1):1-17. <http://apjcn.nhri.org.tw/server/APJCN/25/1/1.pdf>
- Centro Vegetariano - Associação Ambiental para a Promoção do Vegetarianismo. Estudo da Nielsen [Em linha]. 2017. Disponível em: <https://www.centrovegetariano.org/Article-620-Numero-vegetarianos-quadruplica-10-anos-Portugal.html>
- European food safety Authority. Dietary Reference Values for nutrients: Summary report. Parma: EFSA, 2017. (amended 2019). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.e15121>
- Ball GFM. *Vitamins in foods: analysis, bioavailability and stability.* Boca Raton: Taylor & Francis, CRC Press, 2006. (Food science and technology ; 156). http://www.alcpo.org.ly/wp-content/uploads/2017/06/Ball_Vitamins-in-Foods-Analysis-Bioavailability-and-Stability.pdf
- Cozzolino SMF. Biodisponibilidade de nutrientes. 5e ed. Barueri: Manole, 2016.
- Gibney MJ, Lanham-New SA, Cassidy A, et al. *Introduction to human nutrition.* 2nd ed. Chichester, West Sussex, U.K. ; Ames, Iowa : Wiley-Blackwell ; [London] : Nutrition Society, 2009. <https://epdf.pub/introduction-to-human-nutrition-2nd-edition.html>
- Carrabs G, Smaldone G, Carosielli L, et al. Detection of sulfites in fresh meat preparation commercialised at retail in Lazio region. *Ital J Food Saf.* 2017;6(2):93-5. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2017.6482>
- Prodanov M, Sierra I, Vidal-Valverde C. Influence of soaking and cooking on the thiamin, riboflavin and niacin contents of legumes. *Food Chem.* 2004;84(2):271-7. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00211-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00211-5)
- ANSES-CIQUAL. *French Food Composition Table (Version 2017).* [Em linha]. Disponível em: <https://ciqual.anses.fr/>



artigos breves_ n. 9

- (14) Food Institute, Technical University of Denmark. Frida fooddata.dk (version 4, 2019). [Em linha]. Disponível em: <https://frida.fooddata.dk>
- (15) Finnish Institute for Health and Welfare. FINELI - Food Composition Database in Finland (Release 20, 2019). [Em linha]. Disponível em: <https://fineli.fi/>
- (16) European Institute of Oncology. BDA - Banca Dati di Composizione degli Alimenti per Studi Epidemiologici in Italia. (2015). [Em linha]. Disponível em: <http://www.bda-ieo.it/>
- (17) New Zealand Institute for Plant and Food Research, Ministry of Health. New Zealand FOODfiles - New Zealand Food Composition Database (2018). [Em linha]. Disponível em: <https://www.foodcomposition.co.nz/>
- (18) Swedish Food Agency. NFA - National Food Agency (2019). [Em linha]. Disponível em: <https://www.livsmedelsverket.se/>
- (19) Norwegian Food Safety Authority, Department of Nutrition at the University of Oslo. FCT - Norwegian Food Composition Table (2019). [Em linha]. Disponível em: <https://www.matvaretabellen.no/>
- (20) Federal Food Safety and Veterinary Office. FSVO - Swiss Food Composition Database (Versão 6.0, 2019). [Em linha]. Disponível em: <https://www.naehrwertdaten.ch/>
- (21) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. PortFIR - Tabela de Composição dos Alimentos portuguesa. (Versão 3.2, 2018). [Em linha]. Disponível em: <http://portfir.insa.pt/>

Publicidade dirigida a crianças: restrições impostas à realidade alimentar portuguesa

Advertising aimed at children: restrictions imposed on the Portuguese food reality

Roberto Brazão, Andreia Lopes, Paulo Fernandes, Maria da 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

É amplamente reconhecido que a publicidade alimentar dirigida a crianças pode comprometer negativamente os seus comportamentos e preferências relativamente à adoção de uma dieta mais equilibrada, variada e saudável. Deste modo, o Governo português implementou restrições nesta matéria, em consonância com recomendações internacionais, visando reduzir sobretudo a expressiva prevalência de excesso de peso (pré-obesidade e obesidade) na população infantil e juvenil. Neste âmbito, procedeu-se à avaliação do valor energético e dos teores de sal, açúcar e ácidos gordos saturados em diversas categorias de alimentos disponíveis no mercado nacional e à comparação com os valores-limite definidos pelo Despacho n.º 7450-A/2019, publicado para efeitos de aplicação da Lei n.º 30/2019 de 23 de abril destinada a introduzir restrições à publicidade dirigida a menores de 16 anos. Os produtos alimentares, das seis categorias estudadas: bolachas e biscoitos, *snacks* e batatas fritas, leites aromatizados, refrigerantes, cereais de pequeno-almoço, e iogurtes sólidos e líquidos, apresentaram em geral (86,2%) valores energéticos e/ou teores de sal, açúcar total e ácidos gordos saturados muito elevados para poderem ser publicitados a crianças menores de 16 anos. A aplicação da Lei n.º 30/2019, para além de diminuir a exposição das crianças a estes produtos, traduzir-se-á, muito provavelmente, a curto prazo, na disponibilização progressiva no mercado português de produtos mais saudáveis destas categorias, que são ampla e regularmente consumidas por crianças, mesmo sem serem publicitados.

_Abstract

It is widely recognized that food advertising aimed at children can negatively compromise their behaviour and preferences regarding the adoption of a more balanced, varied and healthy diet. In this way, the Portuguese Government has implemented restrictions in this matter, in line with international recommendations, aiming mainly to reduce the significant prevalence of overweight (pre-obesity and obesity) in the child and youth population. In this context, it was carried out the evaluation of the energy, salt, sugar and saturated fatty acids contents in several categories of foods, available in the national market, and the comparison with the limit values defined by Order n.º 7450-A/2019, published with the purpose of the Law n.º 30/2019 application, that introduces restrictions on the food advertising aimed at children under 16 years. Food products, of the six studied categories: cookies and biscuits, snacks and chips, flavoured milk, soft drinks, breakfast cereals, and solid and liquid yogurts; presented in general (86.2%) very high levels of energy and/or of salt, total sugar and saturated fat to be advertised to children under 16 years old. The application of the Law n.º 30/2019,

in addition to reducing the exposure of children to this kind of products, will probably lead to the progressive availability on the Portuguese market of healthier products of these categories, which are widely and regularly consumed by children, even without being advertised.

_Introdução

De acordo com os resultados do Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, 2015-2016 (IAN-AF), cerca de 5,9 milhões de portugueses (quase 6 em cada 10) têm excesso de peso (pré-obesidade e obesidade), sendo que nas crianças (<10 anos) e nos adolescentes (10-17 anos) já se verifica uma percentagem bastante considerável de pré-obesidade (17% e 24%, respetivamente) e de obesidade (7,7% e 8,7%, respetivamente) (1).

Uma alimentação inadequada, caracterizada por um consumo excessivo de calorias, provenientes sobretudo de açúcar e gordura, combinada com um baixo consumo de frutas e hortícolas e insuficientes níveis de atividade física (em Portugal somente cerca de 25% da população atinge as recomendações internacionais para a saúde (2)) têm contribuído para a crescente e preocupante prevalência de excesso de peso, particularmente nas faixas etárias mais jovens.

De acordo com o *World Cancer Research Fund* (WCRF), há muitas evidências sobre o efeito que a publicidade alimentar exerce nas crianças, influenciando significativamente o que estas querem, compram e comem, e afetando diretamente a sua saúde, nomeadamente contribuindo para níveis crescentes de excesso de peso. Deste modo, a implementação de restrições à publicidade alimentar dirigida a crianças reduz a sua exposição aos produtos, podendo conduzir a uma diminuição do seu consumo, ajudando a reduzir a prevalência de excesso de peso infantil (3).



Em Portugal, as restrições de publicidade alimentar estão previstas pelo Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável (PNPAS) e concretamente definidas na Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS). Com esse propósito, foram publicados a Lei n.º 30/2019, de 23 de abril que visa introduzir restrições à publicidade dirigida a menores de 16 anos de géneros alimentícios e bebidas que contenham elevado valor energético, teor de sal, açúcar, ácidos gordos saturados e ácidos gordos *trans*, procedendo a uma nova alteração ao Código da Publicidade (4), em paralelo com o Despacho n.º 7450-A/2019 que determina os valores a ter em conta na identificação de elevado valor energético, teor de sal, açúcar, ácidos gordos saturados e ácidos gordos *trans*, por forma a ser possível estabelecer os produtos alimentares a restringir (5,6).

Neste contexto, procedeu-se à comparação dos valores dos diferentes componentes nutricionais em produtos de seis categorias alimentares com os valores-limite do modelo de perfil nutricional definidos pela nova legislação em vigor, para caracterização da realidade portuguesa no momento de implementação desta medida, através da avaliação dos critérios nutricionais não atingidos e das taxas de elegibilidade/inelegibilidade dos produtos para serem publicitados.

_Objetivo

Caracterização da realidade alimentar portuguesa no momento da entrada em vigor da Lei n.º 30/2019, que visa restringir a publicidade alimentar direcionada aos menores de 16 anos, através da comparação dos valores de energia e teores de sal, açúcar e ácidos gordos saturados em produtos de seis categorias alimentares comercializadas no mercado português com os correspondentes valores-limite definidos pelo Despacho n.º 7450-A/2019, da Direção-Geral da Saúde (DGS), publicado para efeitos de aplicação da referida Lei.

_Material e métodos

Realizou-se uma recolha do valor energético e dos teores de sal, açúcar e ácidos gordos saturados de: bolachas e biscoitos (Bolachas&B); *snacks* e batatas fritas (Snacks&B); leites aromatizados (LeitesAromat); refrigerantes (Refrig); cereais de pequeno-almoço (CereaisPA) e iogurtes sólidos e líquidos (logrt.S&L). Estes valores foram comparados com os correspondentes valores-limite definidos no modelo de perfil nutricional estabelecido pela legislação, através do Despacho n.º 7450-A/2019, da DGS (quadro 1).

Os dados utilizados neste estudo foram recolhidos, em 2019, a partir dos rótulos/informação nutricional de produtos das seis categorias referidas acima, disponibilizados nos *websites* de diferentes distribuidores alimentares nacionais, não se considerando exclusivamente produtos dirigidos a menores de 16 anos. Não se consideraram os valores referentes aos ácidos gordos *trans*, dado a sua declaração não ser obrigatória e, por esse facto, não ter sido possível a recolha de informação.



Quadro 1: ↓ Excertos da tabela de perfil nutricional para identificação dos géneros alimentícios com elevado valor energético, teor de sal, açúcar, ácidos gordos saturados e ácidos gordos *trans*, correspondentes às seis categorias de alimentos em estudo (adaptado de: Despacho n.º 7450-A/2019, de 21 de agosto de 2019, da DGS ⁽⁵⁾).

O elevado valor energético, teor de sal, açúcar, ácidos gordos saturados e ácidos gordos *trans* deve ser considerado quando exceder, por 100g ¹

Categoria de alimentos	Incluídos na categoria (exemplos)	Não incluídos na categoria (exemplos)	Ácidos gordos saturados (g)	Açúcar Total (g)	Açúcar adicionado (g)	Sal (g)	Ácidos gordos <i>trans</i> (g)	Valor energético (kcal)
Bolos e outros produtos de pastelaria, biscoitos doces, preparados em pó para a produção de doces	Produtos de pastelaria; croissants; tortas e bolos; tartes de fruta; biscoitos/bolachas; biscoitos e bolachas recheados ou com cobertura; <i>wafers</i> ; pães doces; preparados para confeção de bolos	Pão e produtos à base de pão	1,5	5		0,3	2	40
Aperitivos/ <i>Snacks</i>	Pipocas doces e salgadas; biscoitos e bolachas salgados; <i>snacks</i> à base de arroz, milho ou batata e outros cereais	<i>Snacks</i> de frutos secos ou sementes	1,5	5	0	0,3	2	
Leite ²	Leite simples; leites processados (batidos de leite, leite achocolatado e aromatizado); leites em pó	Natas	2,5	5,5	0	0,3	*	
Bebidas refrigerantes	Refrigerantes com e sem gás, colas, limonadas, laranjadas; bebidas isotónicas; águas aromatizadas (incluindo gaseificadas) com adição de açúcar e/ou edulcorantes; bebidas energéticas; outras bebidas refrigerantes		*	2,5	0	*	*	20
Cereais de pequeno-almoço	Flocos de cereais; cereais infantis, farinhas lácteas e não lácteas; cornflakes; cereais com chocolate; papas de aveia; aveia, <i>muesli</i> e granola		1,5	15		1	*	
Iogurtes, leites fermentados, natas lácteas e outros produtos similares	Iogurtes; leites fermentados; <i>kefir</i> ; queijo fresco açucarado; outros substitutos do iogurte; iogurtes com ingredientes adicionais (fruta, <i>muesli</i>); natas pasteurizadas e UHT, chantili e natas de culinária aromatizadas	Leites e leites aromatizados; bebidas vegetais de amêndoa, arroz ou aveia	1,5	10		0,3	*	

* Para os nutrientes cujos valores limite não se encontram definidos na tabela devem considerar-se os seguintes valores: 1) sal - <0,3g de sal por 100g de produto; 2) açúcar - 5g de açúcar por 100g para sólidos / 2,5g de açúcar por 100ml para os líquidos; 3) ácidos gordos saturados - 1,5g de ácidos gordos saturados por 100g para os sólidos / 0,75g de ácidos gordos saturados por 100ml para os líquidos e 4) ácidos gordos *trans* - 2 g por 100g de gordura.

¹ Os géneros alimentícios devem, sempre que possível, ser avaliados como vendidos ou reconstituídos (se necessário) de acordo com as instruções do fabricante.

² Este modelo de perfil nutricional aplica-se aos géneros alimentícios para crianças acima de 36 meses. As fórmulas dos leites infantis não estão contempladas neste modelo. (...)

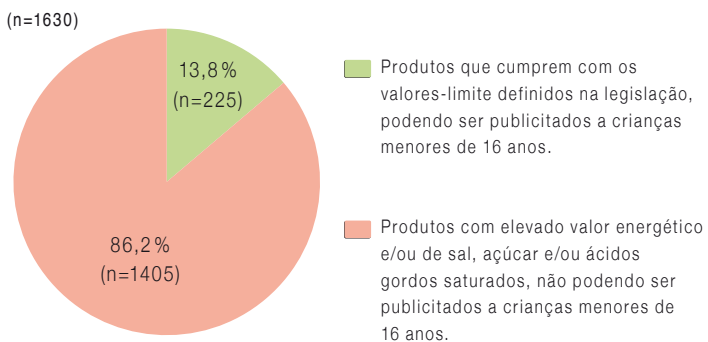


Resultados

Considerando um total de 1630 produtos, das seis categorias alimentares em análise, verificou-se que somente 13,8% (n=225) cumpriam com os valores-limite estabelecidos pela nova legislação. Este resultado demonstra que a larga maioria dos produtos avaliados (86,2%; n=1405) apresenta valores energéticos e/ou de sal, açúcar e/ou ácidos gordos saturados muito elevados, não podendo, desse modo, ser publicitados a crianças menores de 16 anos (gráfico 1).

Os resultados relativos a cada uma das seis categorias estudadas apresentam-se na gráfico 2.

Gráfico 1: Classificação dos produtos alimentares, de acordo com o Despacho n.º 7450-A/2019.



Nenhuma das Bolachas&B e dos Snacks&B avaliados apresenta perfis nutricionais compatíveis com os definidos no Despacho n.º 7450-A/2019. O mesmo se verifica para a quase totalidade de LeitesAromat, onde somente 1 (3,2%) dos produtos cumpre com os critérios nutricionais definidos. Essa percentagem de elegibilidade para serem publicitados a crianças menores de 16 anos é, também, consideravelmente baixa para os Refrig (19,9%) e CereaisPA (14,7%).

Os logrt.S&L são a categoria alimentar que apresenta a percentagem mais elevada de produtos (32,7%) com características nutricionais dentro dos valores-limite estabelecidos na legislação, para serem publicitados a crianças, ainda assim representando menos de 1/3 do total de logurtes avaliados.

Relativamente às taxas de elegibilidade/inelegibilidade dos produtos para serem publicitados às crianças, em função do(s) critério(s) nutricionais serem conjuntamente atendido(s) ou não atendido(s), verificou-se que os valores-limite mais frequentemente não atendidos por categoria foram os correspondentes: ao valor energético em Bolachas&B (100%), aos ácidos gordos saturados em Snacks&B (92,4%), e ao açúcar total em LeitesAromat (96,8%), Refrig (73,1%), CereaisPA (72,4%), e logrt.S&L (60,3%) (tabela 1).

Gráfico 2: Classificação dos produtos alimentares, por categoria, de acordo com o Despacho n.º 7450-A/2019.

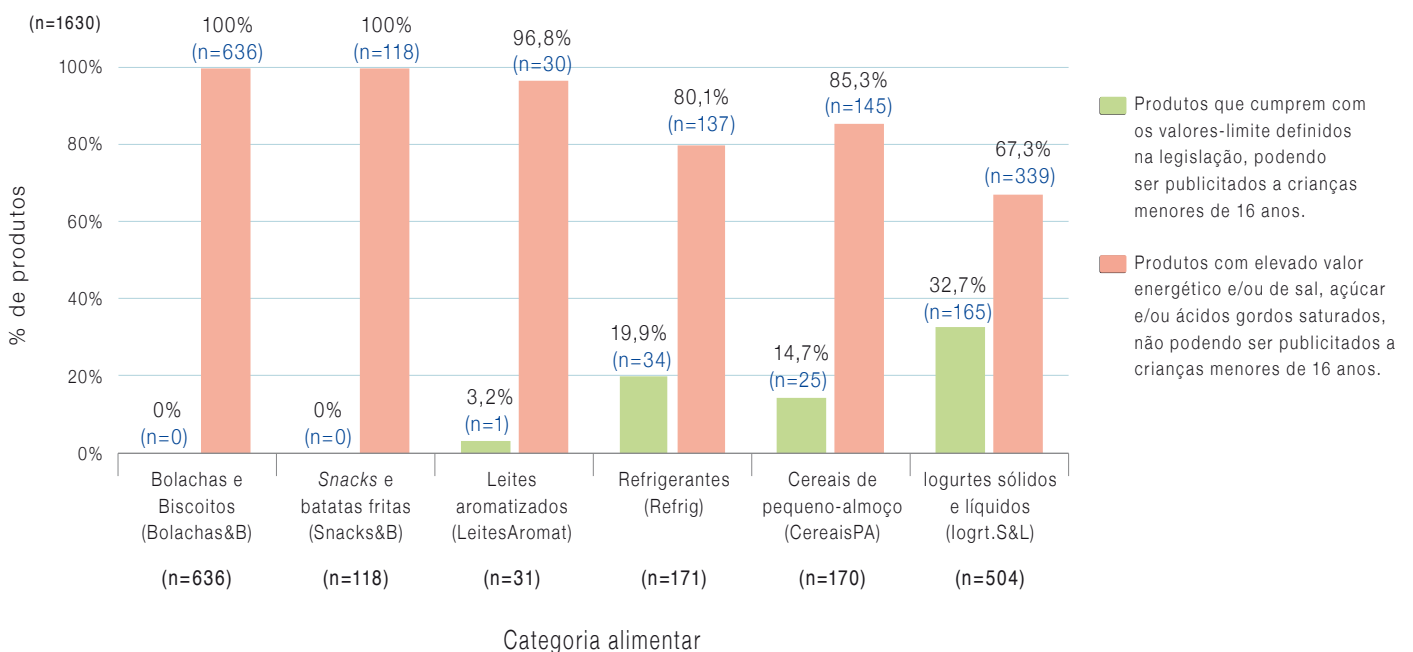




Tabela 1: Número, percentagem e estatísticas referentes aos produtos alimentares que não cumprem com os valores-limite definidos no Despacho n.º 7450-A/2019, em função do critério nutricional mais frequentemente não atingido em cada categoria.

Categoria de alimentos	Bolachas&B (n=636)	Snacks&B (n=118)	LeitesAromat (n=31)	Refrig (n=171)	CereaisPA (n=170)	logrt.S&L (n=504)
Critérios nutricionais	Valor energético (kcal)	Ácidos gordos saturados (g)	Açúcar total (g)	Açúcar total (g)	Açúcar total (g)	Açúcar total (g)
"Valores-limite definidos na legislação (por 100g/100ml)	≤ 40	≤ 1,5	≤ 5,5	≤ 2,5	≤ 15	≤ 10
Não cumprem com o valor-limite (n)	636	109	30	125	123	304
Não cumprem com o valor-limite (%)	100%	92,4%	96,8%	73,1%	72,4%	60,3%
Mínimo	350	1,0	4,1	0	0,7	0,2
Média	466	5,8	9,5	5,6	20	10,3
Máximo	848	18	13,4	23	48	21,9

Todas as Bolachas&B avaliadas apresentaram valores energéticos muito elevados, variando entre 350 kcal e 848 kcal por 100 g, ou seja mais de 8 a 21 vezes acima do valor-limite legislado (≤ 40 kcal). Dos 118 Snacks&B recolhidos, 109 não cumpriam com o limite estabelecido para os ácidos gordos saturados ($\leq 1,5$ g), sendo que apresentaram um teor médio de 5,8 g/100 g.

Em relação aos LeitesAromat, 30 dos 31 produtos avaliados apresentaram valores de açúcar total acima do valor-limite definido ($\leq 5,5$ g). No que se refere aos Refrig, os teores de açúcar total variaram entre 0 g e 23 g/100 g, sendo o valor médio observado de 5,6 g/100 g. Do total de Refrig, 125 tinham valores superiores ao limite legal definido ($\leq 2,5$ g) para poderem ser publicitados a crianças.

Relativamente aos CereaisPA, verificou-se uma enorme variabilidade de valores de açúcar total (entre 0,7 g/100 g e 48 g/100 g), sendo que 123 apresentaram valores que se situam fora do limite definido (≤ 15 g).

Finalmente, no que se refere aos logrt.S&L, foi recolhida informação nutricional de 504 produtos, que apresentaram um valor médio de açúcar total de 10,3 g/100 g, valor que justifica o facto desta categoria alimentar ser, de entre as avaliadas, aquela que apresentou proporcionalmente o

menor número de produtos (304 num total de 504 logrt.S&L) que não cumprem com o valor-limite definido para o critério nutricional em questão (≤ 10 g).

Conclusões

Em termos gerais, para as seis categorias alimentares em estudo, verificou-se que 86,2% dos 1630 produtos avaliados têm elevados valores energéticos e/ou excesso de sal, açúcar total e/ou ácidos gordos saturados, não podendo ser publicitados a crianças menores de 16 anos, de acordo com a Lei n.º 30/2019.

Os logrt.S&L são a categoria alimentar que apresenta a percentagem mais elevada de produtos (32,7%) com características nutricionais dentro dos valores-limite definidos. Por outro lado, nenhum produto das categorias Bolachas&B (0%) e Snacks&B (0%) e apenas 1 produto dos LeitesAromat (3,2%) cumprem conjuntamente com os limites dos diversos critérios nutricionais, configurando-se como categorias praticamente ineleáveis para publicidade a crianças. No conjunto das seis categorias avaliadas, o açúcar total é o critério nutricional mais frequentemente não cumprido (em LeitesAromat, Refrig, CereaisPA e logrt.S&L).



Devido à considerável presença no mercado de diversos produtos das categorias estudadas, muitos serão amplamente e, em alguns casos, regularmente consumidos por crianças, mesmo sem serem publicitados, pelo que é essencial que a indústria e distribuição continuem a colaborar para se atingirem perfis nutricionais mais adequados à alimentação das crianças.

A monitorização dos produtos alimentares e a comparação das suas características nutricionais, realizada com base no modelo de perfil nutricional definido pela nova legislação, permitem acompanhar a evolução de alguns produtos, com o objetivo de promover a melhoria da saúde e dos hábitos alimentares das crianças.

Referências bibliográficas:

- (1) [Lopes C, Torres D, Oliveira A, et al.]. Brochura de Resultados IAN-AF 2015-2016. Porto: Universidade do Porto, 2017.
https://ian-af.up.pt/sites/default/files/IAN-AF%20Brochura%20de%20resultados_0.pdf
- (2) Ministério da Saúde. Retrato da Saúde, Portugal. Lisboa, MS, 2018.
<https://www.sns.gov.pt/retrato-da-saude-2018/>
- (3) World Cancer Research Fund International. Building momentum: lessons on implementing robust restrictions of food and non-alcoholic beverage marketing to children [Em linha]. London: WCRFI, 2020. Disponível em:
<https://www.wcrf.org/sites/default/files/PPA-Building-Momentum-3-WEB-3.pdf>
- (4) Portugal. Assembleia da República. Lei n.º 30/2019, de 23 de abril. DR n.º 79, Série I: 2257-58. <https://data.dre.pt/eli/lei/30/2019/04/23/p/dre/pt/html>
- (5) Direção-Geral da Saúde. Despacho n.º 7450-A/2019. DR n.º 159, Série II (1º Supl.), 2019-08-21: 335-(2)-(5). <https://dre.pt/application/conteudo/124097542>
- (6) Direção-Geral da Saúde. Perfil Nutricional: restrições à publicidade alimentar dirigida a crianças. Lisboa: DGS, 2019.
<https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/perfil-nutricional-restricoes-a-publicidade-alimentar-dirigida-a-criancas-2019-pdf.aspx>

A rotulagem nutricional simplificada na avaliação de cereais de pequeno-almoço

Simplified nutrition labeling in the assessment of breakfast cereals

Filipa Matias¹, Mariana Santos^{1,2}, Ricardo Assunção¹, Isabel Castanheira¹

filipa.matias@insa.min-saude.pt

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

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

_Resumo

A utilização de rotulagem nutricional simplificada é considerada uma das melhores opções para a promoção de escolhas de alimentos saudáveis e consequentemente para a prevenção e controlo de doenças crónicas não transmissíveis na população. Em Portugal, a adoção de um modelo específico de rotulagem nutricional simplificada ainda não se encontra regulamentada, no entanto, têm sido utilizados diferentes sistemas por vários operadores económicos no mercado nacional. O Semáforo Nutricional consiste numa análise individualizada da concentração de quatro nutrientes (lípidos, ácidos gordos saturados, açúcares e sal), pela comparação com os critérios nutricionais estabelecidos por este sistema, com a atribuição de uma das cores do semáforo (verde, amarela e vermelha) a cada um dos nutrientes. O Nutri-Score permite avaliar de forma integrada a qualidade nutricional dos alimentos, associando-os a uma cor, permitindo aos consumidores identificarem os alimentos mais saudáveis. Este estudo teve como objetivo classificar a qualidade nutricional de cereais de pequeno-almoço disponíveis no mercado português, pela aplicação de dois sistemas de rotulagem FoP (*front-of-pack*): o Semáforo nutricional e o Nutri-Score. Dos 50 cereais analisados neste estudo, o Semáforo nutricional identifica o teor de açúcares como o componente mais crítico. Dos cereais de pequeno-almoço considerados, 56% apresentou teores de açúcar superiores a 22,5 g/100 g (cor vermelha). Aplicando o sistema Nutri-Score, 82% (n=41) dos cereais de pequeno-almoço foram classificados como menos saudáveis (amarelo e laranja-claro). Num contexto em que se privilegia a escolha informada de alimentos saudáveis, os sistemas de rotulagem nutricional simplificada permitem, de forma eficaz, uma maior facilidade de comunicação com o consumidor, emergindo como uma ferramenta importante quer de literacia em saúde quer de escolha informada.

_Abstract

The introduction of simplified nutrition labelling systems is considered one of the best ways to promote healthy food choices and, consequently, to prevent and control non-communicable chronic diseases in the population. In Portugal, Government-endorsed policy on interpretative nutrition labelling is still lacking, however different simplified labelling systems have been used by several economic operators in the national market. Multiple traffic lights label consists of an individual analysis of four nutrients (lipids, saturated fatty acids, sugars and salt) with the assignment of one of the traffic lights colours (green, yellow and red) for each nutrient. The Nutri-Score system indicates the overall nutritional quality of a given food item, associating them with a colour, allowing consumers to choose healthier foods. The objective of this study was to classify the nutritional quality of

breakfast cereals, available at the Portuguese market, using two FoP (*front-of-pack*) labelling systems: Multiple traffic lights and Nutri-Score. From the 50 analysed breakfast cereals, Multiple traffic lights identifies sugar content as the most critical nutrient. Fifty six percent (56%) of the analysed breakfast cereals contained high levels of sugar (over 22.5 g/100 g) (red colour). With Nutri-Score 82% (n=41) of breakfast cereals have been classified as less healthier (yellow and light orange). In a context in which the informed choice of healthy food is privileged, the simplified nutrition labelling systems are more effective at communicating with the consumer, emerging as an important tool in both health literacy and informed decision making.

_Introdução

A existência de um sistema de informação nutricional *front-of-pack* (FoP) foi uma das iniciativas propostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), com o intuito de melhorar as escolhas alimentares e, consequentemente, a saúde da população ⁽¹⁾. A rotulagem nutricional surge como uma importante ferramenta que dá a conhecer aos consumidores o conteúdo nutricional dos alimentos, permitindo-lhes realizar escolhas mais conscientes, informadas e saudáveis ⁽¹⁾.

Em Portugal, a adoção de um modelo específico de rotulagem nutricional simplificada ainda não se encontra regulamentada, no entanto, têm sido utilizados diferentes sistemas de rotulagem simplificada por vários operadores económicos no mercado nacional ⁽²⁾.

O sistema do Semáforo Nutricional, inicialmente desenvolvido pela *Food Standards Agency* (FSA), consiste numa análise individualizada de quatro nutrientes (lípidos, ácidos gordos saturados, açúcares e sal), pela comparação com os critérios nutricionais estabelecidos por este sistema, com a atribuição de uma das cores do semáforo (verde, amarela e vermelha) a cada um dos nutrientes ⁽³⁾. Este



sistema permite ao consumidor perceber, de uma forma simples e imediata, os níveis destes nutrientes num dado alimento, e optar por alimentos com nutrientes maioritariamente na categoria verde, moderar aqueles com um ou mais nutrientes na categoria amarela e evitar aqueles com um ou mais nutrientes na categoria vermelha (4).

O sistema de rotulagem Nutri-Score, utilizado de forma voluntária em França, Bélgica, Espanha, Alemanha e Países-Baixos, tem por base o modelo de perfil nutricional da FSA, desenvolvido para regular a publicidade televisiva dirigida a crianças no Reino Unido. Este sistema avalia a qualidade nutricional dos alimentos (à exceção de bebidas alcoólicas), recorrendo, para isso, à escala de pontuação definida pela FSA e classifica os alimentos numa das cinco categorias (dependendo da sua qualidade nutricional), cada uma delas associada a uma cor e a uma letra (5,6). Este sistema permite aos consumidores identificar e selecionar alimentos mais saudáveis, mesmo para indivíduos sem conhecimentos técnicos em nutrição (2).

O presente estudo incidiu sobre a aplicação dos dois sistemas FoP descritos: o Semáforo nutricional e o Nutri-Score.

_Objetivo

Este estudo teve como objetivo classificar a qualidade nutricional de cereais de pequeno-almoço, disponíveis no mercado português, pela aplicação de dois sistemas de rotulagem FoP: o Semáforo nutricional e o Nutri-Score.

_Material e métodos

Recolha de informação nutricional

Foram recolhidos dados nutricionais numa amostra de conveniência de cereais de pequeno-almoço (n=50), de acordo com os dados do Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, IAN-AF 2015-2016 (7). A informação nutricional constante dos rótulos das embalagens foi recolhida através de registo fotográfico, em duas superfícies comerciais da região de Lisboa e, também, por consulta da informação disponível nos *websites* das principais cadeias de distribuição. Este processo decorreu entre janeiro e maio de 2018.

Foi criada uma base de dados com as seguintes variáveis: designação do cereal, marca, local de venda, ingredientes (incluindo a percentagem de fruta, legumes e frutos secos) e informação nutricional *per* 100 g e porção (incluindo energia (kJ/kcal), açúcares (g), ácidos gordos saturados (g), sal (g), fibra (g) e proteína (g)). Os cereais de pequeno-almoço selecionados foram divididos em duas categorias: cereais infantis (n=28) e cereais não infantis (n=22). Na categoria dos cereais infantis, foram incluídos, além dos que referiam ser cereais infantis, todos os que tinham nas embalagens imagens alusivas a desenhos animados, jogos, brindes e passatempos.

Classificação pelos sistemas de rotulagem nutricional simplificada

Semáforo Nutricional

Neste sistema as cores são atribuídas consoante as quantidades em que o nutriente está presente em cada um dos produtos. As cores verde, amarela e vermelha representam uma escala quantitativa (baixo, médio e alto) adequada a cada nutriente (1). O teor de energia também está representado neste sistema, estando associado a uma cor neutra (em Portugal, a marca que tem este sistema implementado atribuiu a cor cinzenta à energia). As cores utilizadas neste sistema não representam alegações (3). Este sistema FoP contém (3):

- Teores de energia (kJ e kcal) por 100 g/mL e por porção do alimento
- Teores de lípidos, ácidos gordos saturados, açúcares totais e sal por porção do alimento
- Informação sobre a porção do alimento
- % Dose de Referência (% DR) relativa aos 4 nutrientes e à energia por porção de alimento
- Atribuição de uma cor a cada um dos nutrientes

Adicionalmente, poderá ser incluída a informação “Alto”, “Médio” ou “Baixo”, juntamente com as cores vermelha, amarela ou verde (3).

Nutri-Score

O cálculo do Nutri-Score seguiu a metodologia definida pela FSA (8), que considera a aplicação da pontuação de acordo com duas dimensões: pontos A (pontos “positivos”), atribuí-



dos aos componentes “menos saudáveis” (energia, açúcares, ácidos gordos saturados e sódio), e pontos C (pontos “negativos”), atribuídos aos componentes “saudáveis” (conteúdo em fruta, legumes e frutos secos, fibra e proteína) (5,6).

A referida metodologia considera, numa segunda etapa, que os pontos C sejam subtraídos aos pontos A, salvo quando o total de pontos A seja superior ou igual a 11 e o total de pontos C inferior a 5. Neste caso, aos pontos A apenas se subtrai o total de pontos referentes aos teores de fibra e fruta, legumes e frutos secos (5,6).

A pontuação final pode variar entre -15 (mais saudável) e +40 (menos saudável). Esta escala de pontuação está ordenada em cinco classes, e a cada uma delas é atribuída uma cor. A cada cor corresponde uma letra, de modo a permitir uma melhor legibilidade do rótulo (5,6).

Neste estudo as categorias consideradas “saudáveis” correspondem às cores Verde-escuro e Verde-claro, sendo as restantes categorias consideradas “menos saudáveis”.

_Resultados e discussão

Com a aplicação do semáforo nutricional aos 50 cereais de pequeno-almoço em estudo, observou-se que apenas um dos cereais foi classificado com quatro verdes em simultâneo (melhor classificação obtida) e que apenas dois cereais foram classificados com dois vermelhos em simultâneo (pior classificação obtida). No entanto, foi atribuída a cor vermelha ao teor de açúcares a 56% dos cereais ($> 22,5$ g/100 g) (tabela 1), bem como a 86% ($n=24$) dos cereais infantis.

Os cereais avaliados apresentaram, na sua maioria, um baixo teor de ácidos gordos saturados ($\leq 1,5$ g/100 g; 64%) e um baixo teor de lípidos ($\leq 3,0$ g/100 g; 54%), tendo-lhes sido atribuída a cor verde (tabela 1). A cor amarela foi atribuída maioritariamente ao sal em 74% dos cereais ($> 0,3$ a $\leq 1,5$ g/100 g) (tabela 1).

Relativamente à aplicação do sistema Nutri-Score, a cor amarela foi atribuída à maioria dos cereais de pequeno-almoço avaliados (60%; $n=30$), bem como a 57% dos cereais infantis ($n=16$) e a 64% dos cereais não infantis ($n=14$). A nenhum dos produtos avaliados foi atribuída a cor Laranja-escuro, categoria de menor qualidade nutricional (tabela 2). Dos 50 cereais

Tabela 1: Classificação dos componentes, de acordo com o sistema do Semáforo nutricional.

		Categorias do Semáforo nutricional		
		Verde % (n)	Amarela % (n)	Vermelha % (n)
Cereais de pequeno-almoço (n=50)	Lípidos	54 (27)	40 (20)	6 (3)
	Ácidos gordos saturados	64 (32)	30 (15)	6 (3)
	Açúcares totais	4 (2)	40 (20)	56 (28)
	Sal	20 (10)	74 (37)	6 (3)

Tabela 2: Classificação dos cereais de pequeno-almoço (n=50), de acordo com o sistema Nutri-Score.

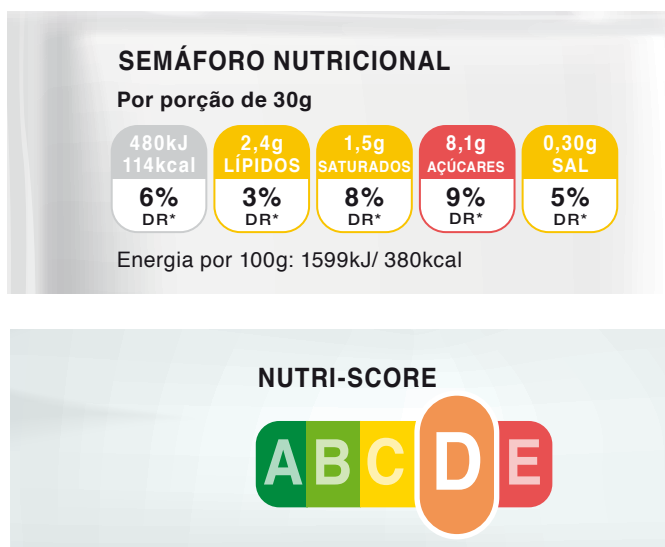
Cereais de pequeno-almoço	Categorias do Nutri-Score				
	Verde-escuro (A) % (n)	Verde-claro (B) % (n)	Amarela (C) % (n)	Laranja-claro (D) % (n)	Laranja-escuro (E) % (n)
Cereais infantis	–	18 (5)	57 (16)	25 (7)	–
Cereais não infantis	14 (3)	5 (1)	64 (14)	18 (4)	–
Total	6 (3)	12 (6)	60 (30)	22 (11)	–



de pequeno-almoço analisados neste estudo, apenas 18% (n=9) foram considerados saudáveis.

Os dois sistemas de classificação permitem avaliar a qualidade nutricional dos alimentos, de forma rápida e acessível, usando duas abordagens diferentes (figura 1). O Semáforo nutricional salienta a qualidade nutricional dos produtos, permitindo ao consumidor avaliar individualmente de forma positiva ou negativa quatro componentes importantes em termos de saúde pública e para os quais a OMS tem vindo a recomendar a sua redução. No Nutri-Score, é feita uma avaliação global da qualidade nutricional do alimento, orientando o consumidor, com informação direta e intuitiva, para escolhas alimentares informadas e saudáveis.

Figura 1: Exemplo da aplicação dos sistemas FoP em estudo a dois cereais de pequeno-almoço similares.



_Conclusões

Embora os cereais de pequeno-almoço possam ser geralmente considerados uma escolha alimentar saudável, o elevado teor de açúcares presente em alguns produtos disponíveis no mercado português pode comprometer a sua adequação a uma alimentação saudável.

Este trabalho estudou a aplicação de dois sistemas de rotulagem nutricional simplificada, em uso em Portugal, a cereais

de pequeno-almoço: o Semáforo nutricional e o Nutri-Score. Dos 50 cereais analisados, o Semáforo nutricional identificou o teor de açúcares como o componente mais crítico. O Nutri-Score classificou como saudáveis apenas 18% (n=9) dos cereais de pequeno-almoço avaliados, tendo sido o teor de açúcares o componente que mais contribuiu para que a maior percentagem dos cereais tenha sido classificada como menos saudável.

Os sistemas de rotulagem nutricional simplificada não substituem a declaração nutricional obrigatória, introduzida pelo Regulamento (EU) nº 1169/2011 de 25 de outubro do Parlamento Europeu e do Conselho, “relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios” (3). Esta declaração nutricional obrigatória deve incluir os seguintes elementos: valor energético e quantidade de lípidos, ácidos gordos saturados, hidratos de carbono, açúcares, proteínas e sal (9). Para uma informação mais abrangente e especializada, os consumidores e os utilizadores têm à disposição, para consulta, a Tabela da Composição dos Alimentos do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, onde estão publicados em detalhe os valores nutricionais de 42 nutrientes (10).

Este estudo reforça a importância dos sistemas de rotulagem nutricional simplificada como facilitadores da comunicação com o consumidor, apresentando-se como uma ferramenta importante quer de literacia em saúde quer de escolha informada, contribuindo para a redução do número crescente de doenças crónicas associadas à alimentação.

Referências bibliográficas:

- (1) Associação Portuguesa de Nutrição. Um olhar sobre os sistemas de rotulagem alimentar Front of Pack (FOP). Porto, APN, 2019. https://www.apn.org.pt/documentos/manuais/Um_olhar_sobre_os_sistemas_de_rotulagem_alimentar_Front_of_Pack_APN.pdf
- (2) Graça P, Silva AJ. Nutr-HIA - Improving Nutrition Labelling in Portugal: Health Impact: final report. Lisboa: DGS, 2019. <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/nutr-hia-improving-nutrition-labelling-in-portugal-health-impact-assessment-final-report-pdf.aspx>
- (3) Department of Health. the Food Standards Agency. Guide to creating a front of pack (FoP) nutrition label for pre-packed products sold through retail outlets. London: FSA, 2016. https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/fop-guidance_0.pdf



- (4) Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável. Direção-Geral da Saúde. Descodificador de rótulos. [Em linha]. Disponível em: nutrimento.pt/noticias/descodificador-de-rotulos/
- (5) Chantal J, Hercberg S. Nutri-Score: Evidence of the effectiveness of the French front-of-pack nutrition label. *Ernaehrungs Umschau*. 2017;64(12):181-7. <https://doi.org/10.4455/eu.2017.048>
- (6) Chantal J, Hercberg S. Development of a new front-of-pack nutrition label in France: the five-colour Nutri-Score. *J WHO Reg Off Eur - Public Heal Panor*. 2017;3(4):537-820. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325207>
- (7) Lopes C, Torres D, Oliveira A, et al. Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, IAN-AF 2015-2016: relatório metodológico. Porto: Universidade do Porto, 2017. <https://ian-af.up.pt/sites/default/files/IAN-AF%20Relatorio%20Metodol%C3%B3gico.pdf>
- (8) UK Department of Health. Nutrient Profiling Technical Guidance. London: DH, 2011. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/216094/dh_123492.pdf
- (9) União Europeia. Regulamento (UE) n. o 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011. JO 22.11.2011:L 304/18-63. Relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>
- (10) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. PortFIR - Tabela de Composição dos Alimentos portuguesa. (Versão 3.2, 2018). [Em linha]. Disponível em: <http://portfir.insa.pt/>

Biomarcadores nas doenças lisossomais de sobrecarga: o que são e o que nos dizem?

Biomarkers in lysosomal storage disorders: what do they tell us?

Paulo Gaspar¹, Hugo Rocha¹, Raquel Neiva¹, Olga Azevedo², Tabita Maia³, Patrício Aguiar⁴, Teresa Cardoso⁵, Paulo Chaves⁵, Sandra Alves⁶, Laura Vilarinho^{1,6}

laura.vilarinho@insa.min-saude.pt

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

(2) Departamento de Cardiologia. Centro de Referência em Doenças Lisossomais de Sobrecarga, Hospital Senhora da Oliveira, Guimarães, Portugal

(3) Departamento de Hematologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

(4) Centro de Referência de Doenças Hereditárias do Metabolismo, Centro Hospitalar e Universitário de Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

(5) Centro de Referência de Doenças Hereditárias do Metabolismo, Centro Hospitalar Universitário do S. João, Porto, Portugal

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

_Resumo

As Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLSs) são um conjunto de patologias raras, crónicas, multissistémicas com modo de apresentação e gravidade muito variáveis. No seu conjunto afetam aproximadamente 1:5000 nados vivos e são causadas pela acumulação de metabolitos não degradados no interior do lisossoma. As esfingolipidoses são o grupo de DLS com maior prevalência e incluem a doença de Gaucher, a doença de Fabry e a doença de Niemann-Pick. Por vezes, parte do produto primário de acumulação, através de uma reação de desacilação, é convertido na respetiva base esfingóide, que se encontra bastante elevada em casos de patologia. Em alguns doentes, estes compostos já se encontram aumentados, mesmo antes do aparecimento dos primeiros sintomas. Os tratamentos disponíveis para estas patologias (terapia de substituição enzimática, terapia de redução de substrato de chaperones farmacológicos) conduzem a um decréscimo da concentração destas bases esfingóides, tornando o doseamento destes compostos útil também para aferir a eficácia da terapêutica utilizada. Pela primeira vez em Portugal, é disponibilizado o estudo destes biomarcadores para as DLSs, através da tecnologia de espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS). Os autores apresentam os resultados obtidos do doseamento destes lisólípidos em diferentes doentes de DLSs, com a clara demonstração da especificidade destes biomarcadores, permitindo um diagnóstico atempado, um melhor conhecimento da evolução da doença e monitorização da eficácia do respetivo tratamento.

_Abstract

More than 50 inherited lysosomal storage disorders (LSDs) are presently known. They are a group of rare, multisystemic diseases with a variable presentation. Most are the result of an impairment of a catabolic enzyme, leading to the accumulation of the corresponding specific substrate(s) and subsequent pathology. LSDs are individually rare diseases, but as group they affect about 1 in 5,000 live births. The sphingolipidoses are due to deficiencies in the enzymes needed for lysosomal degradation of sphingolipid substrates and constitute the most prevalent group, where Gaucher, Fabry and Niemann-Pick diseases are included. In these disorders, the primary product of storage is deacylated into the respective sphingoid bases. In some cases, these products are already increa-

sed before the appearance of the first symptoms making them important for an early diagnosis. The available treatments for these pathologies can lead to the decrease of these sphingoid bases, raising the possibility of using them for treatment follow-up. For the first time in Portugal, it is available the study of several biomarkers for LSDs, through the technology of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). The authors present the results of the measurement of these sphingoid bases in several LSD patients, showing a clear specificity of these biomarkers, allowing an early diagnosis, a better knowledge of the natural history of the disease and a evaluation of the efficacy of the treatment.

_Introdução

As doenças hereditárias do metabolismo, são um conjunto de patologias de origem genética, em que ocorrem alterações na correta degradação ou síntese de certos metabolitos celulares. Embora individualmente raras, globalmente são um grupo bastante grande e heterogéneo, responsável por uma morbidade e mortalidade significativas (1). As doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLSs), um importante grupo das doenças hereditárias do metabolismo, são patologias crónicas, multissistémicas, com modo de apresentação e gravidade muito variáveis. No seu conjunto afetam aproximadamente 1:5000 nados-vivos e são causadas pela acumulação de produtos não degradados no interior do lisossoma, consequência de distintas deficiências enzimáticas (2). As esfingolipidoses são o grupo de DLS com maior prevalência e incluem a doença de Gaucher, a doença de Fabry e a doença de Niemann-Pick (2,3). Na doença de Gaucher, ocorre a acumulação de glucosilceramida devido à deficiência



enzimática em β -glucocerebrosidase e no caso da doença de Fabry, devido a um défice enzimático em α -galactosidase A, ocorre a acumulação em globotriosilceramida. Na doença de Nieman-Pick tipo AB, ocorre a acumulação de esfingomieliina ácida, devido a uma deficiência da enzima esfingomieliinase, enquanto na doença de Niemann-Pick tipo C, verifica-se a acumulação de colesterol dentro dos lisossomas, em resultado da deficiência das proteínas a NPC1 e/ou NPC2 codificadas por dois genes diferentes, *NPC1* e *NPC2* e envolvidas no tráfego de colesterol (4). No que diz respeito aos sintomas, a doença de Gaucher é caracterizada por hepatoesplenomegalia, anemia e trombocitopenia, a doença de Fabry por intolerância ao exercício, angioqueratomas, acroparestesias e pode apresentar ainda envolvimento cardíaco e/ou renal (5,6). A doença de Niemann-Pick, tem o tipo A, caracterizado por ser a forma mais severa com grande comprometimento neurológico, sendo fatal entre os 2-3 anos de vida. No tipo B, forma não neurológica ou visceral, apresenta envolvimento respiratório, hepático e cardíaco. O tipo C, é a forma mais frequente da doença de Niemann-Pick e apresenta um comprometimento neurológico, com atraso do desenvolvimento motor e mental (4). O tratamento destas patologias é atualmente efetuado através da utilização de terapia de substituição enzimática para as doenças de Gaucher e de Fabry, de terapia de redução de substrato para as doenças de Gaucher e de Nieman-Pick tipo C ou utilizando chaperones farmacológicos para alguns casos da doença de Fabry (7). O diagnóstico destas patologias realiza-se através da determinação da respetiva atividade enzimática ou da quantificação dos substratos acumulados, específicos para cada uma das patologias (8-10). No entanto, a falta de biomarcadores mais sensíveis e universalmente aceites, torna difícil, por um lado o diagnóstico assim como o seu *follow-up*. Exemplo disso, é o doseamento dos níveis da enzima quitotriosidase, usada na monitorização da doença de Gaucher, que se encontra igualmente elevada em outras patologias, a sua correlação com o nível de severidade é discutível e cerca de 5-10% da população é homozigótica para uma duplicação de 24bp no gene que codifica a quitotriosidase, conduzindo a uma inatividade da enzima, o que torna inviável a sua utilização como biomarcador da doença nestes indivíduos (11,12). No entanto, parte

dos produtos primários de acumulação são convertidos em novos compostos, através de uma reação de desacetilação, que se encontram cerca de 10-1000x aumentados no sangue destes doentes. São exemplo disso a glucosilesfingosina (LysoGl1) para a doença de Gaucher, a globotriosilesfingosina (LysoGb3) para a doença de Fabry, a lisoesfingomieliina (LysoSM) para a doença de Niemann Pick, tipo AB e a lisoesfingomieliina-509 (LysoSM-509), análogo carboxilado da LysoSM, para a doença de Niemann-Pick tipo C (13-16) (quadro 1).

Em alguns casos, estes compostos já se encontram aumentados, mesmo antes do aparecimento dos primeiros sintomas. Pela primeira vez em Portugal, é disponibilizado o estudo destes biomarcadores para as DLSs, através da tecnologia de espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS). Uma reduzida quantidade de amostra é suficiente para quantificação destes metabolitos e diagnóstico destas patologias. A disponibilização desta metodologia permite um diagnóstico atempado, um melhor conhecimento da evolução da doença e monitorização da eficácia do respetivo tratamento.

Quadro 1: ⬇️ Doenças Lisossomais de Sobrecarga e respetivos biomarcadores.

Doença Lisossomal de Sobrecarga	Biomarcador
Doença de Fabry	LysoGb3 (Globotriosilesfingosina)
Doença de Gaucher	LysoGl1 (Glucosilesfingosina)
Doença de Niemann-Pick, tipo AB	LysoSM (Lisoesfingomieliina)
Doença de Niemann-Pick, tipo C	LysoSM-509 (Lisoesfingomieliina - 509)

_Objetivo

Apresentar os resultados obtidos num estudo de biomarcadores para as Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLSs) em Portugal, nomeadamente do doseamento destes lípidos em diferentes doentes DLSs, demonstrando a especificidade destes biomarcadores para o diagnóstico, o conhecimento da evolução da doença e a monitorização da eficácia do respetivo tratamento.



_Doentes e métodos

Doentes

A análise foi efetuada em amostras de plasma de doentes com suspeita das DLSs acima referidas ou em doentes já identificados com o objetivo de realizar a monitorização da eficácia terapêutica. As amostras rececionadas eram provenientes de vários centros hospitalares de Portugal.


Métodos

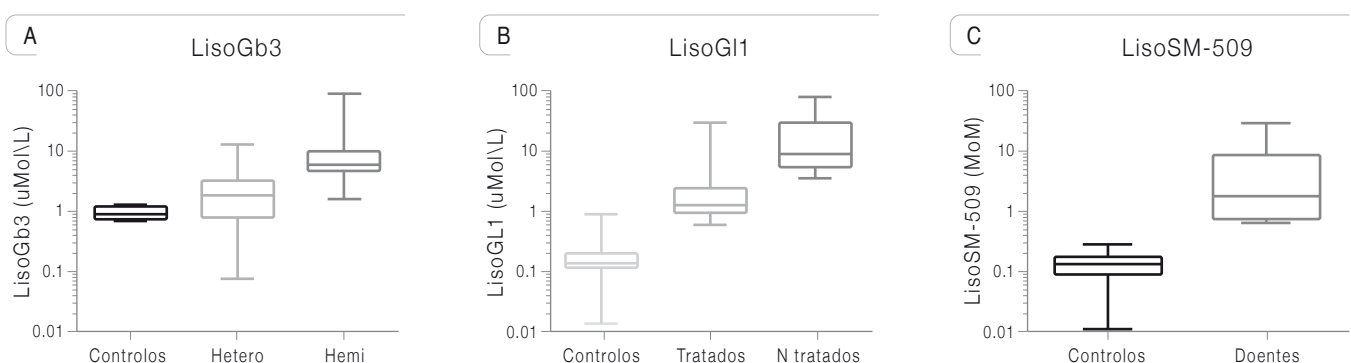
A quantificação dos biomarcadores faz-se através da tecnologia de espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS), como previamente descrito (17,18). Resumidamente, o padrão interno (IS), lisolactosilceramida é adicionado a todas as amostras para posterior quantificação dos lisolípidos. Após precipitação da proteína com clorofórmio:methanol, os lisolípidos são extraídos numa mistura de clorofórmio:metanol:água. O *pellet* previamente seco sob corrente de azoto, é reconstituído em metanol e analisado por LC-MS/MS, num 4000QTRAP (SCIEX). A quantificação dos diferentes lisolípidos é feita com recurso ao IS adicionado no início.

_Resultados

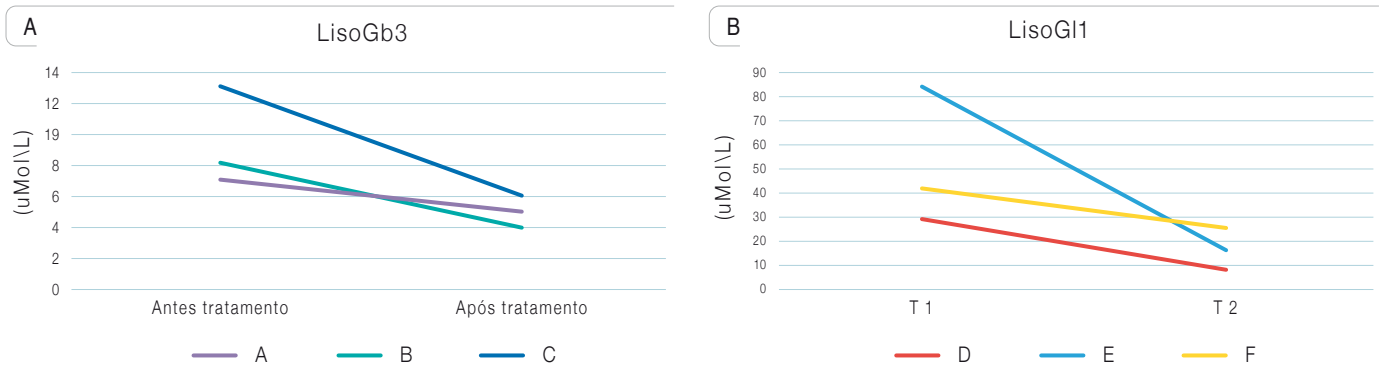
Os denominados lisolípidos são compostos fisiológicos, residuais na população em geral. O seu aparecimento ocorre quando se verifica uma interrupção na cadeia catabólica de um determinado lípido. No caso da doença de Fabry, verifica-se a acumulação de liso-globotriosilceramida

(LisoGb3), proveniente da desacetilação da globotriosilceramida (gráfico 1A). Como se trata de uma doença de transmissão ligada ao cromossoma X, as mulheres podem apresentar desde valores elevados a valores perfeitamente normais, tal como acontece com a atividade enzimática da enzima responsável pela patologia, a α -galactosidase A. No entanto, os homens afetados, apresentam valores aumentados de LisoGb3. No gráfico 1A, encontram-se representados os controlos, os doentes do género feminino e masculino em tratamento. A grande maioria dos doentes apresentados, já se encontram em terapia, tendo apenas valores ligeiramente aumentados, sendo um bom indicador da eficácia da terapia, uma vez que quando foram diagnosticados, apresentavam valores bastante elevados. No gráfico 2A, encontra-se representados formas tardias, da doença de Fabry, onde se verifica a redução do biomarcador LisoGb3 com o tratamento. No caso da doença de Gaucher, a acumulação da glucosilceramida, conduz a um aumento do LisoGl1 (gráfico 1B), patognomónico desta patologia. Verifica-se uma correlação entre o biomarcador e o fenótipo apresentado, sendo o valor mais elevado quanto mais grave for o seu fenótipo e por outro lado, quanto mais eficaz for o seu tratamento, menor será o valor de LisoGl1. No gráfico 2B verifica-se a redução do LisoGl1, entre monitorizações anuais, em três doentes de Gaucher em tratamento. No que diz respeito aos doentes de Niemann-Pick, tipo AB, e aos valores de LisoSM, verifica-se a mesma tendência como os demais biomarcadores. O LisoSM-509, usado para a dete-

Gráfico 1:  Valores dos diferentes biomarcadores LisoGb3 (A), LisoGl1 (B) e LisoSM-509 (C) em controlos e doentes de Gaucher, Fabry e Niemann-Pick tipo C, respetivamente.



Hetero: Mulheres; Hemi: Homens; N tratados: antes de iniciar o tratamento; Doentes: Doentes de NPC; MoM: Média da mediana

**Gráfico 2:** ↓ Valores de LisoGb3 (A) e LisoGl1 (B) em três doentes de Fabry (A, B e C) e Gaucher (C, D e E), respetivamente.

Hetero: Mulheres; Hemi: Homens; N tratados: antes de iniciar o tratamento; Doentes: Doentes de NPC; MoM: Média da mediana

ção e *follow-up* dos doentes de NPC, encontra-se aumentado nestes pacientes (gráfico 2C). Em todos os casos, a presença dos biomarcadores aqui referenciados na circulação sanguínea tem um papel preponderante no curso e evolução da patologia.

_Conclusão

A quantificação dos biomarcadores referidos, através da tecnologia de espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS), permite um estudo mais aprofundado das patologias em questão. A disponibilização desta metodologia permite um diagnóstico atempado, uma melhor compreensão da evolução da doença e monitorização da eficácia do respetivo tratamento. A descoberta de novos biomarcadores para outras patologias lisossomais torna-se assim igualmente importante, para o seu estudo e investigação.

Referências bibliográficas:

- (1) Garrod AE. About Alkaptonuria. *Med Chir Trans.* 1902;85:69-78. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2036375/>
- (2) Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, et al. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA.* 1999 20;281(3):249-54. <https://doi.org/10.1001/jama.281.3.249>
- (3) Pinto R, Caseiro C, Lemos M, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(2):87-92. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201044>
- (4) Vanier MT. Niemann-Pick diseases. *Handb Clin Neurol.* 2013;113:1717-21. Review. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59565-2.00041-1>
- (5) Gary SE, Ryan E, Steward AM, et al. Recent advances in the diagnosis and management of Gaucher disease. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2018;13(2):107-118. <https://doi.org/10.1080/17446651.2018.1445524>
- (6) Mahmud HM. Fabry's disease-a comprehensive review on pathogenesis, diagnosis and treatment. *J Pak Med Assoc.* 2014;64(2):189-94. Review. <https://jpma.org.pk/PdfDownload/5948>
- (7) RRastall DPW, Amalfitano A. Current and Future Treatments for Lysosomal Storage Disorders. *Curr Treat Options Neurol.* 2017;19(12):45. Review. <https://doi.org/10.1007/s11940-017-0481-2>
- (8) Kingma SD, Bodamer OA, Wijburg FA. Epidemiology and diagnosis of lysosomal storage disorders: challenges of screening. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015;29(2):145-57. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2014.08.004>
- (9) Verma J, Thomas DC, Kasper DC, et al. Inherited metabolic disorders: efficacy of enzyme assays on dried blood spots for the diagnosis of lysosomal storage disorders. *JIMD Rep.* 2017;31:15-27. Epub 2016 Mar 24. https://doi.org/10.1007/8904_2016_548
- (10) Davison J. How to use... white blood cell enzyme assays. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2017;102(3):143-147. Epub 2016 Nov 15. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2015-309964>
- (11) Giraldo P, Cenarro A, Alfonso P, et al. Chitotriosidase genotype and plasma activity in patients type 1 Gaucher's disease and their relatives (carriers and non carriers). *Haematologica.* 2001;86(9):977-84. <http://www.haematologica.org/content/86/9/977>
- (12) Barone R, Sotgiu S, Musumeci S. Plasma chitotriosidase in health and pathology. *Clin Lab.* 2007;53(5-6):321-33. Review.
- (13) Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(8):2812-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712309105>
- (14) Dekker N, van Dussen L, Hollak CE, et al. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood.* 2011;118(16):e118-27. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-352971>
- (15) Kuchar L, Sikora J, Gulino ME, et al. Quantitation of plasmatic lysosphingomyelin and lysosphingomyelin-509 for differential screening of Niemann-Pick A/B and C diseases. *Anal Biochem.* 2017;525:73-77. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.02.019>
- (16) Patterson MC, Clayton P, Gissen P, et al. Recommendations for the detection and diagnosis of Niemann-Pick disease type C: An update. *Neurol Clin Pract.* 2017;7(6):499-511. <https://doi.org/10.1212/cpj.0000000000000399>
- (17) Polo G, Burlina AP, Ranieri E, et al. Plasma and dried blood spot lysosphingolipids for the diagnosis of different sphingolipidoses: a comparative study. *Clin Chem Lab Med.* 2019;57(12):1863-74. <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-1301>
- (18) Mirzaian M, Wisse P, Ferraz MJ, et al. Simultaneous quantitation of sphingoid bases by UPLC-ESI-MS/MS with identical (13)C-encoded internal standards. *Clin Chim Acta.* 2017;466:178-84. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.01.014>

_Moduladores genéticos de vasculopatia cerebral em crianças com drepanocitose

Genetic modulators of cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia

Marisa Silva¹, Sofia Vargas¹, Raquel Maia², Alexandra Dias³, Teresa Ferreira³, Anabela Morais⁴, Isabel Mota Soares⁵, João Lavinha^{1,6}, Rita Silva⁷, Paula Kjällerström², Paula Faustino^{1,8}

paula.faustino@insa.min-saude.pt

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

(2) Unidade de Hematologia. Hospital de Dona Estefânia, Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central, Lisboa, Portugal

(3) Núcleo de Hematologia. Departamento de Pediatria, Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca, Amadora, Portugal

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

(5) Departamento de Pediatria, Hospital Garcia de Orta, Almada, Portugal

(6) Biosystems and Integrative Sciences Institute. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(7) Unidade de Neuropediatria. Hospital de Dona Estefânia, Centro Hospitalar e Universitário de Lisboa Central, Lisboa, Portugal

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

_Resumo

A drepanocitose é uma doença genética causada pela mutação c.20A>T, em homozigotia, no gene da beta-globina, que leva à síntese de uma hemoglobina anómala – hemoglobina S. Para além da anemia hemolítica crónica, as manifestações clínicas são diversas e, em crianças, a mais grave é a vasculopatia cerebral que inclui os acidentes vasculares cerebrais (AVC) e os enfartes cerebrais silenciosos. Apesar de monogénica, variantes noutros genes poderão atuar como modificadores do seu curso e gravidade clínica. Neste trabalho, estudámos 70 doentes pediátricos, de origem subsaariana, com drepanocitose e bem caracterizados em termos de vasculopatia cerebral. Procedemos à genotipagem de variantes nos genes *VCAM1* e *NOS3* envolvidos na ativação do endotélio dos vasos sanguíneos e no tónus vascular. A análise estatística revelou uma associação positiva entre a presença da variante rs1409419_T, bem como do haplotipo 7 de *VCAM1*, e a ocorrência de AVC. Por outro lado, para o gene *NOS3*, observámos uma associação negativa entre o VNTR_alelo 4b e o haplotipo V, e a ocorrência de enfarte cerebral silencioso, bem como entre o haplotipo VII e a ocorrência de vasculopatia cerebral. Os resultados obtidos sublinham a importância de *VCAM1* e *NOS3* como moduladores genéticos, bem como o seu potencial como biomarcadores para a prevenção e prognóstico da vasculopatia cerebral em crianças com drepanocitose.

_Abstract

Sickle cell anemia is a genetic disease caused by homozygosity for the mutation c.20A>T in the beta-globin gene which leads to the synthesis of an abnormal hemoglobin – hemoglobin S. In addition to chronic hemolytic anemia, the disease includes various clinical manifestations of which cerebral vasculopathy (that comprises overt stroke and silent cerebral infarction) is the most severe in children. Despite being a monogenic disease, its progression and severity may be modified due to the effect of variants in other genes. In this work, we studied 70 sickle cell anemia pediatric patients of sub-Saharan ancestry well characterized in terms of cerebral vasculopathy. We genotyped variants in the *VCAM1*

and *NOS3* genes, due to the involvement of these genes in blood vessel endothelium activation and vascular tone balance. Statistical analyses showed a positive associative between the presence of the rs1409419_T variant, as well as of the haplotype 7 of *VCAM1*, and stroke. On the other hand, for the *NOS3* gene, we observed a negative association between the presence of the VNTR_4b allele and haplotype V and silent cerebral infarcts. A similar association was observed between haplotype VII and cerebral vasculopathy as a whole. Our results underline the importance of *VCAM1* and *NOS3* genes as genetic modulators, as well as their role as potential biomarkers for cerebral vasculopathy prevention and prognosis in children with sickle cell anemia.

_Introdução

A drepanocitose, ou anemia das células falciformes, é a forma mais comum e mais grave das síndromes drepanocíticas e resulta da presença, em homozigotia, da mutação c.20A>T, no gene da β -globina (*HBB*). A hemoglobina anómala que daí resulta – hemoglobina S – polimeriza no interior dos glóbulos vermelhos, em situações de desoxigenação, levando-os a adotar uma forma de foice (os drepanócitos), o que dá o nome à doença.

A drepanocitose é considerada, pela Organização Mundial de Saúde, a mais importante hemoglobinopatia, a nível mundial, em termos de frequência e de impacto social (1), sendo que cerca de 50-90% das crianças afetadas nascidas na África subsaariana morrem antes dos 5 anos de idade (2). O facto de os portadores heterozigóticos para a mutação drepanocítica



tica possuírem proteção contra a malária, explica as elevadas frequências desse alelo na África subsaariana, Mediterrâneo, Médio Oriente e subcontinente Indiano. No entanto, os movimentos populacionais, históricos e recentes, têm levado a uma maior distribuição da mutação, tornando a drepanocitose um problema de saúde pública a nível global (1).

As manifestações clínicas da drepanocitose são complexas e envolvem vários mecanismos, tais como: hemólise crónica, inflamação sistémica, vaso-oclusão, diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e ativação endotelial. A interação dinâmica entre estes eventos resulta num fenótipo clínico heterogéneo que, em crianças, abrange, entre outros: vasculopatia cerebral, síndrome torácica aguda, hiposplenismo, doença renal e crises dolorosas. A vasculopatia cerebral – causada por uma conjugação de dano endotelial nas artérias cerebrais, vaso-oclusão e isquémia do tecido cerebral – é uma das complicações mais graves e inclui acidentes vasculares cerebrais (AVC; com sinais clínicos aparentes) e enfartes cerebrais silenciosos (apenas diagnosticáveis através de exames imagiológicos), sendo que as crianças com drepanocitose apresentam um risco de AVC muito superior ao da população pediátrica geral (3).

A ecografia com Doppler transcraniano é, atualmente, a principal ferramenta imagiológica usada no rastreio de risco de AVC, sendo a ressonância magnética aplicada ao diagnóstico de AVC e ao aumento da eficácia na deteção de enfartes cerebrais silenciosos. Em termos terapêuticos, a abordagem atualmente preconizada consiste num regime regular de transfusões sanguíneas para crianças com risco alto/moderado de AVC (determinado pela ecografia com Doppler transcraniano) e, concomitantemente, poderá ser administrado o fármaco hidroxiureia (HU). No entanto, nem as estratégias de rastreio ou de diagnóstico, atualmente disponíveis, permitem identificar todas as crianças em risco de AVC e/ou enfarte cerebral silencioso, nem as abordagens terapêuticas são eficazes em todos os doentes e nos casos em que o são, não estão isentas de efeitos secundários adversos e limitações na sua aplicação. Assim, torna-se necessário identificar e desenvolver um painel de biomarcadores, de elevada sensibilidade e especificidade, com valor prognóstico e preditivo para AVC em crianças com drepanocitose.

Apesar da drepanocitose ser uma doença monogénica, causada sempre pela mesma mutação no gene da beta-globina, a progressão e gravidade clínica da doença podem ser afetadas pela presença de variantes noutros genes. Estes modificadores genéticos podem desempenhar um papel importante na ocorrência e gravidade das diversas manifestações clínicas, nomeadamente do AVC em crianças (4).

_Objetivo

O presente trabalho pretendeu avaliar o valor prognóstico, para o risco de vasculopatia cerebral, de variantes nos genes *VCAM1* (que codifica a molécula de adesão celular vascular 1, VCAM-1, envolvida na adesão e proliferação endoteliais) e *NOS3* (que codifica a sintase endotelial do óxido nítrico, eNOS, principal produtora de NO no sistema cardiovascular) envolvidos na resposta endotelial e tónus vascular.

_Materiais e métodos

O presente trabalho consistiu num estudo de caso-controlo, realizado no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, em colaboração com quatro hospitais da Grande Lisboa – Hospital D. Estefânia, Hospital de Sta. Maria, Hospital Fernando Fonseca e Hospital Garcia de Orta. Foram selecionados 70 doentes pediátricos (≥ 3 anos de idade) com drepanocitose, caracterizados em termos de vasculopatia cerebral, cujos progenitores eram originários da África subsaariana. Os critérios de exclusão compreenderam: idade < 3 anos; origem geográfica parental fora da região da África subsaariana; anterior terapêutica com HU; participação em regime hipertransfusional nos 120 dias anteriores à inclusão no estudo. Todos os representantes legais dos participantes deram o seu consentimento informado e esclarecido para participar neste estudo. Todas as amostras foram anonimadas antes de serem enviadas ao laboratório.

Os participantes foram agrupados em 4 grupos consoante o tipo de vasculopatia cerebral apresentado: *i)* grupo “AVC” ($n=15$), ocorrência de, pelo menos, um episódio de acidente vascular cerebral isquémico, confirmado clínica e imagiológica; *ii)* grupo “enfarte cerebral silencioso” ($n=9$), ocorrência de, pelo menos, um enfarte cerebral silencioso,



confirmado imagiologicamente; *iii*) grupo “vasculopatia cerebral” (n=24), ocorrência de, pelo menos, um episódio de AVC e/ou enfarte cerebral silencioso; *iv*) grupo “controlo” (n=29) ausência de vasculopatia cerebral, confirmada clinica e imagiologicamente. Adicionalmente, os doentes foram avaliados em termos de risco de ocorrência de AVC, tendo a estratificação sido determinada pelos valores de velocidade máxima média de fluxo na artéria cerebral média (TAMMV), obtidos durante a ecografia com Doppler transcraniano, conforme segue: risco elevado/moderado – TAMMV \geq 170 cm/s (n=31); e risco reduzido – TAMMV $<$ 170 cm/s (n=29).

O DNA genómico foi isolado a partir de amostras de sangue periférico de cada participante. A homozigotia para a mutação c.20A>T no gene *HBB* foi confirmada por PCR-RFLP. A escolha dos potenciais genes modificadores foi efetuada com base em trabalhos efetuados anteriormente no nosso laboratório (5). A genotipagem das variantes em *VCAM1* e *NOS3* foi realizada por PCR, PCR-RFLP ou por sequenciação de Sanger. A partir das variantes detetadas, foi possível identificar vários haplotipos em ambos os *loci* usando o software PHASE (https://els.comotion.uw.edu/express_license_technologies/phase).

Adicionalmente, procedemos à análise *in silico* de locais de ligação de fatores de transcrição, associados à presença das variantes localizadas na região do promotor de *VCAM1*.

A análise estatística foi efetuada com recurso ao software SPSS (v.25.0, IBM Inc., Chicago, USA). As variáveis categóricas foram representadas por número, frequências e percentagens. O teste exato de Fisher foi usado para a comparação entre variáveis categóricas. O valor de $p > 0,05$ foi utilizado para definir significância estatística. O alelo *minor* de cada variante foi avaliado, usando o modelo dominante, para potencial associação com AVC, enfarte cerebral silencioso, vasculopatia cerebral geral (AVC e/ou enfarte cerebral silencioso) ou risco de AVC (de acordo com as TAMMV medidas pelo Doppler transcraniano), através de tabelas de contingência 2x2, fenótipo x genótipo. Apenas foram consideradas para análise de associação variantes cujos alelos *minor* apresentavam uma frequência $> 0,05$.

_Resultados e discussão

O principal objetivo do presente estudo, que constitui parte de uma investigação mais alargada sobre moduladores genéticos de vasculopatia cerebral pediátrica em drepanocitose, consistiu na avaliação de dados demográficos, clínicos, imagiológicos e genéticos, de forma a desenhar futuramente um painel de biomarcadores com valor preditivo e preventivo para aquela manifestação clínica.

A genotipagem de 6 locais polimórficos no promotor do gene *VCAM1* e de 3 no gene *NOS3* permitiu a caracterização de 7 haplotipos principais em *VCAM1* (identificados de 1 a 7) e também de 7 haplotipos no gene *NOS3* (identificados de I a VII), (tabela 1). A nossa abordagem permitiu identificar associações, estatisticamente significativas, entre a presença de variantes e/ou haplotipos específicos de *VCAM1* e *NOS3* e a presença/ausência de vasculopatia cerebral nos doentes estudados (figura 1).

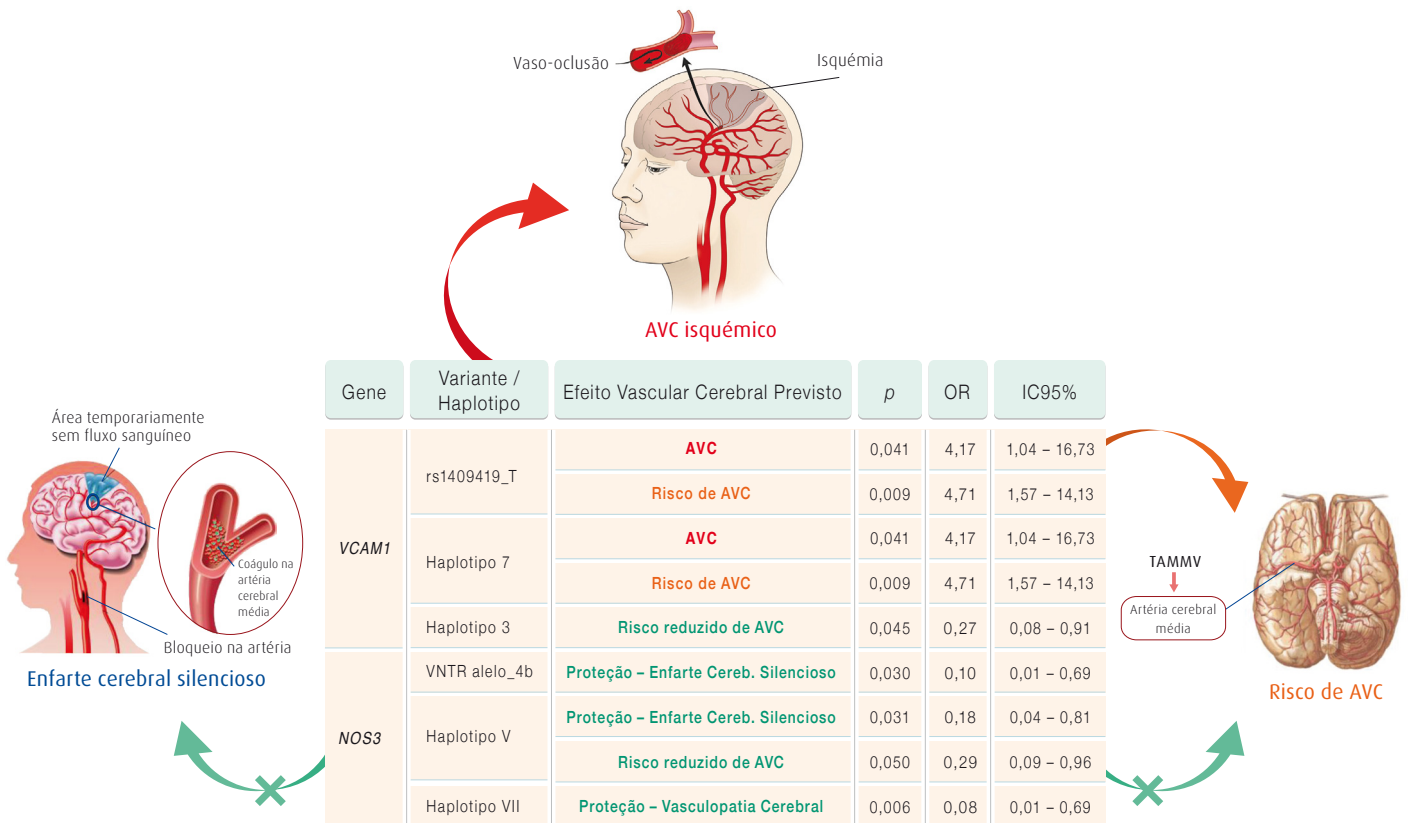
Tabela 1: Variantes estudadas nos genes *VCAM1* e *NOS3* e haplotipos identificados.

Gene / Variante	Haplótipo						
<i>VCAM1</i>	1	2	3	4	5	6	7
rs1409419 (T>C)	C	C	C	C	C	C	T
rs3917024 (C>T)	C	C	C	C	C	T	C
rs3917025 (CT>--)	CT	CT	CT	CT	--	--	CT
rs3783598 (T>G)	T	T	T	T	T	G	T
rs1041163 (T>C)	T	T	C	C	T	T	T
rs3783599 (C>T)	C	T	C	T	C	C	C
<i>NOS3</i>	I	II	III	IV	V	VI	VII
rs2070744 (C>T)	C	C	C	T	T	T	T
VNTR* no intrão 4	4a	4b	4b	4a	4b	4b	4c
rs1799983 (T>G)	G	G	T	G	G	T	G

* Alelos VNTR: 4a = 4 repetições de uma sequência de 27 pb; 4b = 5 repetições de uma sequência de 27 pb; 4c = 6 repetições de uma sequência de 27 pb



Figura 1: Associação observada entre as variantes genéticas e os haplotipos identificados, nos genes *VCAM1* e *NOS3*, e o efeito modulador putativo na vasculopatia cerebral em crianças com drepanocitose.



Fonte (imagens adaptadas): National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Wikimedia Commons, www.uihere.com

Relativamente a *VCAM1*, observámos uma associação positiva entre a presença da variante rs1409419_T, bem como do haplótipo 7, e a ocorrência de AVC ($p=0,041$; $OR=4,17$; $IC95\%=1,04-16,73$). Em contrapartida, detetámos associação negativa entre a presença do haplótipo 3 de *VCAM1* e risco de AVC ($p=0,045$; $OR=0,27$; $IC95\%=0,08-0,91$) (figura 1). O facto de as referidas variantes se encontrarem na região do promotor do gene, pressupõe que o efeito putativo da sua presença surja por alterações dos níveis de expressão de *VCAM1*, possivelmente por alteração/criação de locais de ligação de fatores de transcrição. Esta possibilidade foi confirmada por análise *in silico*. De salientar que o potencial modulador destas variantes no fenótipo em estudo deverá resultar, não do efeito individual, mas sim de um efeito cumu-

lativo no contexto dos haplotipos que as incluem. A exceção parece ser a rs1409419_T e o haplótipo 7 que a contém, já que a sobreposição de valores de ambos, em termos de associação com vasculopatia cerebral, sugere que a variante tenha um papel preponderante no efeito modulador do respetivo haplótipo.

A eNOS também envolvida na resposta endotelial, desempenha um papel crucial no equilíbrio vasodilatação/vasoconstrição, na remodelação e na proliferação vasculares. As variantes do gene *NOS3*, clinicamente mais relevantes, especialmente a nível cardiovascular, são a rs2070744 (localizada na região do promotor), a rs1799983 (localizada no exão 7) e o polimorfismo de repetição (VNTR) de uma sequência de



27 pb (localizado no intrão 4) (6). No nosso estudo, nenhuma das variantes ou haplotipos de *NOS3* identificados (tabela 1) revelou associação com a ocorrência de AVC. No entanto, o VNTR_alelo 4b, anteriormente referido, revelou uma associação negativa com a ocorrência de enfarte cerebral silencioso ($p=0,030$; OR=0,10; 0,01-0,69), tal como também verificado para o haplotipo V ($p=0,031$; OR=0,18; 0,04-0,81). Observámos ainda uma associação negativa entre a presença deste haplotipo V e o risco de AVC ($p=0,050$; OR=0,29; 0,09-0,96). Por fim, observámos, também uma associação negativa entre a presença do haplotipo VII e a ocorrência de vasculopatia cerebral (AVC e/ou enfarte silencioso) ($p=0,006$; OR=0,08; 0,01-0,69) (figura 1). Em resumo, as variantes de *NOS3*, nomeadamente os haplotipos identificados, parecem estar associados a um efeito protetor, em termos de enfarte cerebral silencioso, de vasculopatia cerebral (AVC e/ou enfarte cerebral silencioso) e de risco de AVC em crianças com drepanocitose.

_Conclusão

O conjunto dos nossos resultados sublinha a relevância da modulação genética na fisiopatologia da vasculopatia cerebral pediátrica em drepanocitose. Os moduladores genéticos aqui identificados, após confirmação por estudos funcionais, poderão assumir grande relevância na prevenção da vasculopatia cerebral em crianças com drepanocitose. A sua aplicação na qualidade de biomarcadores com papel preditivo permitirá estabelecer bases para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas personalizadas.

Financiamento:

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (projeto PIC/IC/83084/2007), pelo Instituto de Saúde Ambiental/Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (projeto 2012DGH720).

Agradecimentos:

Os autores agradecem aos doentes e seus progenitores pela participação neste estudo. Agradecemos, ainda, à Prof. Constança Coelho pelo apoio na análise estatística.

Referências bibliográficas:

- (1) Grosse SD, Odame I, Attrash HK, et al. Sickle cell disease in Africa: a neglected cause of early childhood mortality. *Am J Prev Med.* 2011;41(6 Suppl 4):S398-S405. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2011.09.013>
- (2) Piel FB, Hay SI, Gupta S, et al. Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010-2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. *PLoS Med.* 2013;10(7):e1001484. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001484>
- (3) Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood.* 1998;91(1):288-94. <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/91/1/288/1414494/288.pdf>
- (4) Hoppe C, Klitz W, Cheng S, et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood.* 2004;103(6):2391-96. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3015>
- (5) Coelho A, Dias A, Morais A, et al. Genetic variation in CD36, HBA, NOS3 and VCAM1 is associated with chronic haemolysis level in sickle cell anaemia: a longitudinal study. *Eur J Haematol.* 2014;92(3):237-43. <https://doi.org/10.1111/ejh.12226>
- (6) Armenis I, Kalotychou V, Tzanetea R, et al. Prognostic value of T786C and G894T eNOS polymorphisms in sickle cell disease. *Nitric Oxide.* 2017;62:17-23. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.11.002>

ficha técnica_

_Título: Boletim Epidemiológico Observações

_Periodicidade: Quadrimestral

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

_Numeração: 2ª série

Volume 9, número 26

janeiro - abril 2020

_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**, Biblioteca da Saúde
(segundo layout inicial de Nuno Almodovar Design, Lda.)

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2020.

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

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

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

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

Tel.: (+351) 217 519 200

Fax: (+351) 217 529 400

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

www.insa.pt