



# Observações

— Boletim Epidemiológico

editorial\_

## Vigilância laboratorial da infeção por vírus Zika

*Laboratory surveillance of Zika virus infections*

Desde a declaração de emergência na Micronésia e na Polinésia, a partir de 2007, o arbovírus Zika foi identificado em praticamente todos os países das Américas e das Caraíbas, tendo sido detetado pela primeira vez no Brasil no início de 2015.

As infeções por vírus Zika, na maior parte dos casos, são assintomáticas e a patologia é ligeira e auto-limitada. No entanto, em outubro de 2015, os clínicos, no Brasil, notaram um aumento significativo no número de casos de crianças nascidas com microcefalia em zonas com circulação de Zika. A evidência das casuísticas de microcefalias no Brasil levou a Organização Mundial da Saúde a declarar, a 1 de fevereiro de 2016, os casos de microcefalia associada a Zika, como uma emergência internacional de saúde pública. Ao Zika também foram associados numerosos casos de síndrome Guillain-Barré e, raro entre arbovírus, a transmissão por via sexual e as infeções congénitas.

A relação causal entre os casos de microcefalia e a infeção por vírus Zika não é universalmente aceite, acreditando muitos investigadores, sem dúvida que o vírus Zika está envolvido, mas que podem existir cofatores em determinadas regiões.

A perspetiva atual é que a vacina está a ser desenvolvida em vários países, mas só deverá estar disponível em dois ou três anos. O tratamento é sintomático e o controlo de vetores é problemático uma vez que as espécies associadas à emergência atual de Zika têm características invasivas.

As espécies do género *Aedes* que transmitem Zika também transmitem vírus Dengue e Chikungunya. Atualmente estes vírus partilham a distribuição geográfica, sendo a sintomatologia também semelhante. Os vírus Dengue e Zika são ambos flavivírus, o que obriga a determinações laboratoriais específicas para evitar a deteção de reações cruzadas.

Em Portugal, e no resto da Europa, têm sido identificados casos de Zika de importação, no entanto o risco de emergência de casos autóctones existe tanto para a ilha da Madeira, onde *Aedes aegypti* está presente, como para a costa mediterrânica pois em vários países como Itália, França e Espanha o *Ae. albopictus* está presente e mantém as suas características invasivas.

Sem sabermos bem o que o futuro nos reserva e as implicações em saúde pública é importante conhecer a epidemiologia, a transmissão, as características clínicas e realizar um diagnóstico laboratorial com elevada sensibilidade e especificidade dos casos de infeção por Zika.

Este número do *Observações*, para além de um artigo sobre Zika, apresenta outros de observação em saúde em que são abordados diferentes temáticas – alimentação e nutrição, saúde ambiental, doenças neurológicas e doenças infecciosas – que são exemplo e fazem parte de desafios mais amplos que o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge inclui no desempenho da sua missão.

Jorge Machado

Coordenador do Departamento de Doenças Infecciosas  
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Maria João Alves

Investigadora do Laboratório Nacional de Referência de Doenças Infecciosas Transmitidas por Vetores  
Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas  
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

nesto número

**Editorial**

- Vigilância laboratorial da infeção por vírus Zika** p 01  
*Laboratory surveillance of Zika virus infections*  
Jorge Machado, Maria João Alves

**Artigos Breves**

**Doenças Infecciosas**

- 1\_ Diagnóstico laboratorial de casos de importação de infeções por vírus Zika** p 03  
*Laboratory diagnosis of Zika infection imported cases*  
Maria João Alves, Líbia Zé-Zé
- 2\_ Em Casa Observamos Saúde (ECOS) por telefone e via eletrónica: resultados da implementação da 1ª vaga de 2016** p 08  
*'Em Casa Observamos Saúde (ECOS)' by telephone and web: results from the 2016 first wave implementation*  
Ausenda Machado, Rita Roquette, Mafalda Sousa-Uva, Ana Paula Rodrigues
- 3\_ A gripe em Portugal: análise preliminar da atividade gripal na época 2015/2016** p 12  
*2015/2016 influenza season in Portugal: preliminary data*  
Patrícia Conde, Pedro Pechirra, Paula Cristóvão, Inês Costa, Ausenda Machado, Ana Paula Rodrigues, Baltazar Nunes, Raquel Guiomar
- 4\_ Efetividade da vacina antigripal sazonal na época 2015/2016: resultados do projeto EuroEVA** p 16  
*2015/2016 influenza season vaccine effectiveness: results from the EuroEVA project*  
Verónica Gómez, Raquel Guiomar, Ana Paula Rodrigues, Pedro Pechirra, Patrícia Conde, Paula Cristóvão, Inês Costa, Baltazar Nunes, Ausenda Machado
- 5\_ Histoplasmose em Portugal: infeção rara?** p 30  
*Histoplasmosis in Portugal: rare infection?*  
Cristina Veríssimo, Helena Simões, Raquel Sabino

**Alimentação e Nutrição**

- 6\_ Caracterização *in vitro* dos efeitos tóxicos da patulina na integridade do epitélio intestinal e potenciais efeitos protetores da cisteína** p 26  
*In vitro characterization of patulin toxic effects on intestinal epithelial integrity and potential cysteine protective effects*  
Ricardo Assunção, Carla Martins, Mariana Ferreira, Paula Alvito
- 7\_ Quantificação de iodo em alimentos consumidos em Portugal: resultados preliminares** p 30  
*Iodine quantification in food consumed in Portugal: preliminary results*  
Inês Delgado, Inês Coelho, Pedro Andrade, Carolina Antunes, Isabel Castanheira, Maria Antónia Calhau
- 8\_ Doenças do metabolismo do colesterol: cromatografia de esteróis no diagnóstico de 25 casos em Portugal** p 33  
*Cholesterol synthesis defects: sterol analysis in the diagnosis of 25 Portuguese patients*  
Carla Valongo, Aureliano Jorge Dias, Mónica Sofia Leite, Laura Vilarinho

**Saúde Ambiental**

- 9\_ A importância do uso de métodos complementares para a avaliação da toxicidade de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos** p 38  
*Toxicity assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: the importance of the use of complementary methods*  
Patrícia I. Morgado, Luísa Jordão
- 10\_ Remoção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em águas utilizando subprodutos da indústria da cortiça** p 44  
*Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, using byproducts of cork industry*  
Sílvia S. José, Ana S. Mestre, Susana P. Silva, Ana S. Cardoso, Helena Rebelo, Ana P. Carvalho

**Doenças Neurológicas**

- 11\_ Perspetivas da comunidade do autismo em relação à investigação em autismo** p 49  
*Autism community perspectives on autism research*  
Inês C. Conceição, Célia Rasga, Natércia Miranda, Astrid M. Vicente
- 12\_ Diminuição da expressão dos genes APP e CP em doentes de Alzheimer sugere alteração da exportação de ferro celular nesta demência** p 53  
*Decrease in APP and CP mRNA expression in Alzheimer's disease patients suggests impairment of cellular iron export in this dementia*  
Cláudia Guerreiro, Bruno Silva, Ângela C. Crespo, Liliana Marques, Sónia Costa, Ângela Timóteo, Erica Marcelino, Carolina Maruta, Arminda Vilares, Mafalda Matos, Frederico Simões Couto, Paula Faustino, Ana Verdelho, Manuela Guerreiro, Ana Herrero, Cristina Costa, Alexandre de Mendonça, Madalena Martins, Luciana Costa

## Diagnóstico laboratorial de casos de importação de infeções por vírus Zika

### Laboratory diagnosis of Zika infection imported cases

Maria João Alves, Líbia Zé-Zé

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

Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Águas de Moura, Portugal.

#### \_Resumo

O vírus Zika (*Flavivirus*) é um arbovírus transmitido sobretudo por mosquitos, mas também, por transmissão materno-fetal e sexual. Existem evidências que as infeções por vírus Zika podem estar associadas à síndrome de Guillain-Barré e a casos congénitos de microcefalia e outras malformações do sistema nervoso central. As infeções por vírus Zika, Dengue e Chikungunya partilham, atualmente, os mosquitos vetores, a sintomatologia e a distribuição geográfica. O Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge no seu Laboratório Nacional de Referência de Vírus Transmitidos por Vetores tem desenvolvido o diagnóstico e estudos epidemiológicos de vírus transmitidos por artrópodes desde o princípio dos anos 90. O diagnóstico de Zika foi desenvolvido e padronizado em 2007. O laboratório desenvolveu testes de diagnóstico molecular e serológico tendo identificado vários casos de importação para o território português e feito o diagnóstico diferencial com Dengue e Chikungunya e o despiste de infeção em grávidas e em casos de transmissão sexual.

#### \_Abstract

Zika virus (*Flavivirus*) is a mosquito borne arbovirus, but maternofetal and sexual transmission were also described. There is evidence that Zika virus infections may be associated with Guillain-Barré syndrome and congenital cases of microcephaly and other malformations of the central nervous system. Zika, Dengue and Chikungunya virus infections share currently the same mosquito vectors, the signs and symptoms of the illness and the same and geographical distribution. The Center for Vectors and Infectious Diseases Research from the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge in their National Reference Laboratory for Vector Borne Virus has developed diagnostic methods and epidemiological studies of arboviruses since the beginning of the 90s. The Zika diagnosis was developed and standardized in 2007. The Laboratory developed molecular and serological diagnostic tests and have identified several imported cases of Zika infections into Portuguese territory and performed the differential diagnosis with Dengue and Chikungunya and screening for infection in pregnant women and in suspected cases of sexual transmission.

#### \_Introdução

O vírus Zika é um arbovírus (*arthropod borne virus*) do género flavivírus transmitido por mosquitos e isolado pela primeira vez em 1947 na floresta de Zika no Uganda (1).

De 1947 a 2006 foram identificadas várias espécies de mosquitos do género *Aedes* como vetores e estudos epidemiológicos demonstravam prevalências até 50% em populações africanas e do sudeste asiático. Nesse período foram descritos unicamente 14 casos clínicos e duas infeções no laboratório (2,3). A doença provocada por Zika era descrita como ligeira, auto-limitada, com febre, cefaleias, mal-estar e exantema maculopapular (4,5).

Em 2007 a distribuição e expansão geográfica do vírus Zika emergiu, primeiro na ilha de Yap, Micronésia, depois noutras regiões como na Polinésia Francesa, Nova Caledónia, Ilhas Cook em 2013/2014 e em outras regiões do Oceano Pacífico, incluindo Ilha de Páscoa (Chile) (6). Em 2015 as infeções por vírus Zika foram identificadas pela primeira vez no Brasil. Atualmente é conhecida a sua presença em 65 países, 62 dos quais reportaram pela primeira vez a evidência de transmissão vetorial após 2015, nomeadamente nas Américas e Cabo Verde (7).

A maioria (80%) das infeções por vírus Zika é assintomática. Quando há desenvolvimento de quadro clínico este caracteriza-se usualmente por, após um período de incubação de três a 12 dias, ocorrência de febre ligeira, exantema (predominantemente maculopapular), cefaleias, artralgias, mialgias, astenia e sufusão conjuntival.

As infeções por vírus Zika foram associadas a complicações neurológicas como a síndrome de Guillain-Barré na Polinésia Francesa em 2014, assim como a casos de microcefalia e outras malformações do sistema nervoso central

em infeções congénitas no Brasil em 2015 o que levou a Organização Mundial da Saúde a considerar, em fevereiro de 2016, os casos de microcefalia e de outros distúrbios neurológicos, provavelmente associados a Zika, como uma emergência internacional de saúde pública (8).

A transmissão de vírus Zika ocorre, sobretudo, através da picada de mosquitos do género *Aedes*. Em 2011 e em 2014 foi descrito, pela primeira vez, o facto, inédito entre arbovírus, da possibilidade de transmissão de Zika por via sexual e transmissão perinatal e congénita (9,10,11). Prováveis transmissões de origem sexual foram posteriormente reportadas em 11 países e a transmissão perinatal e congénita foi reportada em 13 países ou territórios (7).

Outros vírus emergiram no passado com a mesma expressão que o vírus Zika, nomeadamente o vírus Dengue (também um flavívirus), com origem asiática e distribuído atualmente por todo o hemisfério sul, e o vírus Chikungunya (alfavírus) com origem africana, já conhecido na Ásia e introduzido na América Central e do Sul, a partir das Caraíbas em dezembro de 2012, sendo actualmente identificados milhares de casos por ano nessas regiões (12,13).

As infeções por vírus Zika, Dengue e Chikungunya partilham o vetor (mosquitos do género *Aedes*) e os sinais e sintomas de doença, partilham agora também uma extensa distribuição geográfica, o que torna muito difícil diferenciar clinicamente os diferentes agentes etiológicos sem a disponibilização do diagnóstico laboratorial.

O facto de o vírus Zika estar associado à ocorrência de malformações congénitas, como a microcefalia, e a sintomas neurológicos, como Guillain-Barré, reforça a necessidade de diagnosticar laboratorialmente as infeções por este vírus.

O Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (CEVDI/INSA) no seu Laboratório Nacional de Referência de Vírus Transmitidos por Vetores tem desenvolvido o diagnóstico e estudos epidemiológicos de vírus transmitidos por artrópodes desde o princípio dos anos 90. O diagnóstico de Zika foi desenvolvido e padronizado em 2007. O laboratório desenvolveu testes de diag-

nóstico molecular e serológico tendo identificado vários casos de importação para o território português e feito o diagnóstico diferencial em grávidas e em casos de transmissão sexual (14).

## \_Objetivos

Os objetivos deste artigo são alertar para importância do diagnóstico e métodos utilizados no diagnóstico laboratorial de infeções por vírus Zika e apresentar a casuística de infeção por Zika identificados no CEVDI/INSA de junho de 2015 a junho de 2016.

## \_Material e métodos

O vírus Zika foi considerado, desde a sua descoberta até 2007, um vírus em que a maioria das infeções eram assintomáticas ou com capacidade para desenvolver doença ligeira e auto-limitada, não tendo sido, por isso, desenvolvidos métodos de diagnóstico comerciais. No entanto alguns laboratórios, como o CEVDI/INSA logo em 2007, desenvolveram métodos de diagnóstico *in house*.

### Diagnóstico molecular

A deteção do RNA de vírus Zika pode ser realizada, até cinco dias após o início dos sintomas, por métodos de biologia molecular no sangue, plasma e soro e, do segundo até ao décimo dia após início dos sintomas, na urina.

No CEVDI/INSA o RNA do vírus Zika é detetado, após extração dos ácidos nucleicos da amostra clínica, por RT-PCR em tempo real (15). Nas amostras positivas é posteriormente aplicado um procedimento de RT-PCR convencional para que os produtos de amplificação sejam purificados e sequenciados (16). A análise das sequências obtidas permite confirmar de forma inequívoca o diagnóstico e identificar a linhagem da estirpe.

As amostras colhidas para análise por biologia molecular devem ser guardadas e transportadas em frio, por períodos de até dois dias, ou congeladas, por períodos de mais de dois dias, uma vez que o RNA viral se degrada facilmente.

Um resultado positivo por biologia molecular confirma a suspeita clínica.

Um resultado negativo, com suspeita clínica, deve ser avaliado, sobretudo para as condições de transporte da amostra e para

artigos breves\_ n. 1

o número de dias após o início dos sintomas em que a colheita foi feita. Em ambos os casos o diagnóstico serológico, numa amostra colhida posteriormente (mais de três dias após início dos sintomas), pode contribuir para o esclarecimento do caso.

**Diagnóstico serológico**

Os anticorpos anti-Zika são detetáveis normalmente a partir do terceiro (IgM) e quarto (IgG) dia após início dos sintomas no soro. Os anticorpos IgM persistem pelo menos durante três meses e os IgG provavelmente para sempre. As reações serológicas cruzadas entre Zika e outros flavivírus, como, por exemplo, Dengue e Febre-amarela, são conhecidas.

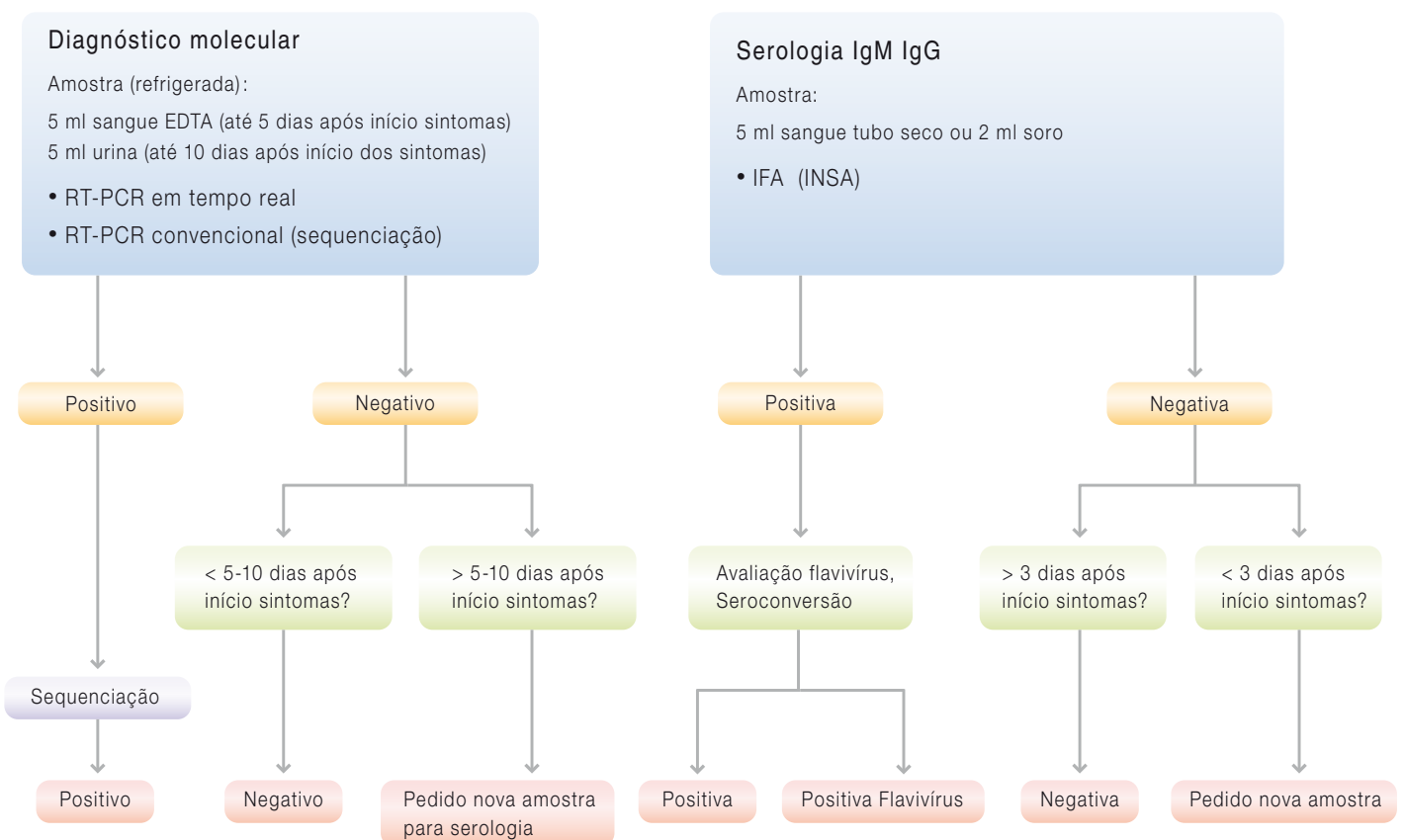
No CEVDI/INSA as amostras de soro são testadas por IFA *in-house* (IgM e IgG).

Um resultado negativo por serologia exclui o contacto com Zika ou outro flavivírus.

Um resultado positivo tem que ser avaliado para outros flavivírus, com titulação da amostra, e/ou analisada uma segunda amostra, colhida pelo menos com dez dias de intervalo da primeira, para identificação de seroconversão. É também essencial que seja conhecido o histórico de vacinas do doente, sobretudo de vacinas de flavivírus, como Febre-amarela, Encefalite Japonesa e Encefalite Transmitida por Carraças (TBE), que podem interferir com a interpretação do resultado serológico.

As amostras com pedido de diagnóstico molecular e serológico devem chegar ao laboratório acompanhadas de inquérito que permite ao laboratório fazer a avaliação dos casos e interpretação do algoritmo do CEVDI/INSA (figura 1).

Figura 1: Algoritmo utilizado no diagnóstico de Zika no Laboratório Nacional de Referência de Vírus Transmitidos por Vetores (CEVDI/INSA).



## \_Resultados

O diagnóstico laboratorial de Zika pode ser solicitado ao CEVDI/INSA como Zika -diagnóstico molecular- e como -diagnóstico serológico- Zika, ou incluído em painel Flavivírus (em que são também testados os anticorpos anti-Dengue, Febre-amarela, *West Nile* e TBE), ou incluído em painel Arbovírus (em que, para além dos Flavivírus, são analisados anticorpos anti-Chikungunya, Toscana, Dhori e Thogoto).

De junho de 2015 a junho 2016 foram enviadas ao laboratório 388 amostras com pedido específico de diagnóstico de Zika. A maior parte dos pedidos de diagnóstico coincidem temporalmente com a confirmação da ocorrência de infeções congénitas assim como da transmissão por via sexual realizada pela Organização Mundial da Saúde (fevereiro) não se tratando provavelmente de casos de suspeita de doença mas de diagnóstico diferencial ou exclusão de infeção nas grávidas (gráfico 1).

De junho de 2015 a junho 2016 foram confirmados 17 casos positivos de infeção por Zika.

Oito casos positivos (47%) foram confirmados por biologia molecular, sobretudo na urina. Em três casos (18%) foi identificada virúria e anticorpos IgM específicos e, também em três casos

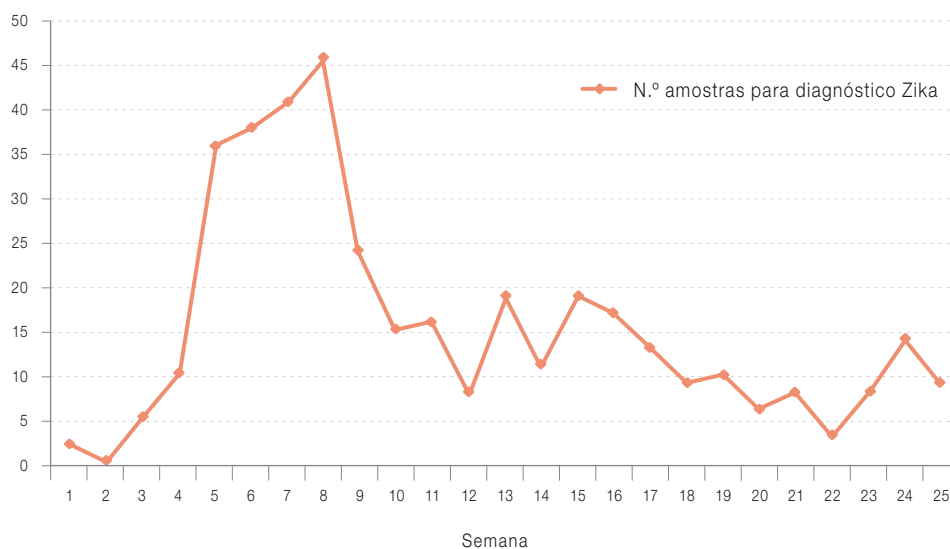
Quadro 1: Descrição do número de casos confirmados por método e amostra.

Método	Amostra Sangue (virémia), Urina (virúria), Soro (Ac IgM)	N.º casos confirmados
Biologia molecular	Virémia	0
	Virémia e Virúria	2
	Virúria	6
Biologia molecular e Serologia	Virémia e Ac IgM	0
	Virúria e Ac IgM	3
	Virémia e Ac IgM/IgG Flavivírus	0
	Virúria e Ac IgM/IgG Flavivírus	3
Serologia	Ac IgM com seroconversão	3
Total		17

(18%), foi confirmada virúria e anticorpos anti-flavivírus evidenciando infeção anterior, ou coinfeção, por outro flavivírus (quadro 1).

Em todas as amostras em que o resultado de biologia molecular foi positivo foi confirmada a linhagem asiática do vírus Zika como a causa de infeção.

Gráfico 1: Evolução do número de pedidos de diagnóstico específico de Zika em 2016.



Na folha de inquérito, que deve acompanhar a amostra, foi referido pelos clínicos, nos sinais e sintomas, a febre em 12 casos (71%) e o exantema em 14 (82%). As mialgias e artralguas foram referidas em nove casos (53%) e a conjuntivite em dois casos (12%).

A origem geográfica dos casos de importação foi, sobretudo, Brasil com 13 casos (76%) identificados. Foram também diagnosticados três casos com origem na Colômbia, Martinica e Venezuela e um caso autóctone com provável infeção por via sexual.

## \_Conclusões

Depois de um período de 60 anos em que o vírus Zika não foi considerado importante clinicamente, não tendo sido desenvolvidas nem aplicadas técnicas de diagnóstico laboratorial pela maior parte dos laboratórios, tornou-se evidente a necessidade de diagnosticar com certezas a infeção por vírus Zika, seja pela gravidade da sintomatologia (casos neurológicos), pela infeção perinatal e congénita (casos de microcefalia), pelo diagnóstico diferencial com Dengue e Chikungunya ou para despiste de transmissão sexual e infeção na grávida.

No diagnóstico laboratorial tornou-se evidente que um diagnóstico molecular positivo confirma um caso. No entanto um resultado negativo deve ser avaliado ou sujeito a confirmação por serologia posteriormente.

Na natureza da amostra a enviar ao laboratório, a urina confirma-se como uma amostra importante, uma vez que a virúria prolonga o período de deteção do vírus até pelo menos ao décimo dia após início dos sintomas, devendo ser sempre enviado ao laboratório amostra de sangue em EDTA e urina.

O diagnóstico serológico é importante na confirmação de ausência de anticorpos anti-flavivírus (resultado negativo). No entanto um resultado positivo tem que ser avaliado com nova amostra e titulação para outros flavivírus o que, no fim, até pode não levar ao um resultado conclusivo.

A colaboração entre clínicos e o laboratório de referência é essencial para a identificação de novos casos e para o esclarecimento de diagnóstico diferencial e em despiste de infeções congénitas por Zika.

## Referências bibliográficas:

- (1) Dick GWA, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46(5):509-20.
- (2) Iosifidis S, Mallet HP, Leparc Goffart I, et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect.* 2014;44(7):302-7.
- (3) Filipe AR, Martins CM, Rocha H. Laboratory infection with Zika virus after vaccination against yellow fever. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1973;43(4):315-9.
- (4) Simpson DIH. Zika virus infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1964; 58:335-8.
- (5) Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, et al. Genetic and serological properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1232-9. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1408.080287>
- (6) Petersen LR, Denise JJ, Powers AM, et al. Zika virus. *N Engl J Med.* 2016;374(16):1552-63. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMr1602113>
- (7) World Health Organization. Zika situation report, 7 July 2016. [www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/7-july-2016/en/](http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/7-july-2016/en/)
- (8) World Health Organization. Zika situation report, 5 February 2016. [www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/5-february-2016/en/](http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/5-february-2016/en/)
- (9) Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, et al. Probable non-Vector transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):880-2. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1705.101939>
- (10) Besnard M, Lastère S, Teissier A, et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill.* 2014;19(13):pii=20751. [www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20751](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20751)
- (11) Pan American Health Organization/World Health Organization. Epidemiological Alert: Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas, 1 December 2015. [www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=270&gid=32396&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32396&lang=en)
- (12) Pan American Health Organization/World Health Organization. Number of reported cases of dengue and severe dengue (SD) in the Americas, by country, July 7 2016 (EW25). [www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=readall&cid=3273&Itemid=40734&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=3273&Itemid=40734&lang=en)
- (13) Pan American Health Organization/World Health Organization. Number of reported cases of Chikungunya Fever in the Americas - Cumulative cases, May 13, 2016 (EW 20). [www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=readall&cid=5927&Itemid=40931&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5927&Itemid=40931&lang=en)
- (14) Zé-Zé L, Prata MB, Teixeira T, et al. Zika virus infections imported from Brazil to Portugal, 2015. *IDCases* 2016; 4: 46-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idcr.2016.03.004>
- (15) Faye O, Faye O, Diallo D, et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. *Virology* 2013;22;10(1):311. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-10-311>
- (16) Balm MN, Lee CK, Lee HK, et al. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. *J Med Virol.* 2012;84(9):1501-5. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.23241>

## Em Casa Observamos Saúde (ECOS) por telefone e via eletrónica: resultados da implementação da 1ª vaga de 2016

'Em Casa Observamos Saúde (ECOS)' by telephone and web: results from the 2016 first wave implementation

Ausenda Machado, Rita Roquette, Mafalda Sousa-Uva, Ana Paula Rodrigues

ausenda.machado@insa.min-saude.pt

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

### \_Resumo

Em 2016 o inquérito ECOS foi implementado, através de entrevista telefónica assistida por computador, à semelhança de vagas anteriores, e ainda por via eletrónica. O questionário foi respondido por um elemento com 18 ou mais anos residente na unidade de alojamento, que prestou informação sobre a sua saúde e dos restantes elementos do agregado (por *proxy*). No total obtiveram-se 803 entrevistas concluídas e uma taxa de participação global de 79,9%. Considerando os contactos realizados via telefónica, a taxa de participação foi de 77,4% e de 26,5% por via *web*. Em ambas as vias, a maioria dos respondentes era do sexo feminino, encontrando-se a maior frequência de respondentes por telefone no grupo etário 60-69 e via *web* no grupo 40-49. As taxas de resposta obtidas em 2016 foram semelhantes às obtidas em outras vagas do ECOS por via telefónica (aproximadamente 80% vs 79 a 86%), e na via *web* foi superior às obtidas em estudos similares. O perfil dos respondentes em cada uma das vias foi consistente com o observado em estudos que utilizaram estas metodologias, nomeadamente, uma maior frequência de respondentes do sexo feminino e uma maior adesão à via *web* dos grupos etários mais novos.

### \_Abstract

In 2016 the ECOS panel was implemented through both telephone and electronic contact. The information was obtained using computer assisted telephone and web. The questionnaire was answered by a household aged 18 or more years living in the house unit, giving information on himself and proxy to other household cohabitants. A total of 803 completed interviews were obtained which corresponds to a total participation rate of 79.9%. Considering the phone contacts the participation rate by contact type was 77.4% by phone and 26.5% by web. For both methods the highest percentages of respondents were female; the highest frequency of telephone respondents was obtained in the 60-69 age groups and by web in the 40-49 years individuals. Response rates obtained by telephone in 2016 are comparable to those obtained in other ECOS waves (80% vs 79-86%) and the rates via web were higher than those obtained in similar studies. The profile of respondents was consistent with that observed in studies using these methods, including increased frequency of female respondents and greater adherence to the web via the younger age groups.

### \_Introdução

O painel ECOS (Em Casa Observamos Saúde) é um instrumento de observação criado com o objetivo de obter dados e indicadores sobre saúde, com eficácia e rapidez, através de uma amostra de Unidades de Alojamentos (UA) de Portugal continental, com telefone da rede fixa (desde 1998) e da rede móvel (desde 2010) (1). A aplicação de questionários a este painel permitiu obter estimativas, para a população portuguesa residente no Continente, de indicadores de saúde como cobertura da vacina antigripal (2), prevalência de doença crónica (3, 4), cuidados preventivos (5), entre outros.

Tradicionalmente, o recrutamento e recolha de dados era efetuada por via telefone, assistida por computador (CATI). No contexto de inquéritos de saúde, existem outras opções, nomeadamente, entrevista pessoal, inquérito por via postal e inquérito por via *web*. Na primeira vaga de inquirição do painel ECOS em 2016 pretendeu-se avaliar a exequibilidade de formas alternativas de inquirição. Assim, selecionou-se além da via clássica por telefone (que permite obter as melhores taxas de resposta) também a via *web* que permite otimizar o tempo de execução e o custo (6).

### \_Objetivos

O presente artigo tem como objetivos: i) avaliar a exequibilidade da aplicação de um questionário por via *web* e telefone ao painel ECOS, através do cálculo de indicadores de execução, nomeadamente, taxas de resposta e taxas de recusa; ii) descrever e analisar o perfil demográfico dos respondentes por tipo de via de implementação do questionário.

## \_Material e métodos

Para dar resposta aos objetivos, utilizou-se o painel constituído em setembro de 2013, composto atualmente por 1005 UA e 2724 indivíduos. Seguindo o procedimento habitual de contacto com o painel ECOS (1), foi elaborada e enviada uma carta convite aos participantes, referindo que se iria realizar um novo questionário. Este contacto foi ainda efetuado por via *web* para os participantes com endereço de *e-mail* disponível.

A informação relevante foi recolhida por via telefone, por entrevista direta ou por *proxy*, com apoio de um computador (*Computer Assisted Telephone Interview*) e ainda por via *web*. O questionário foi respondido por um elemento com 18 ou mais anos residente na UA, que foi convidado a responder ao questionário, prestando informação sobre si e sobre os restantes elementos do agregado. Em ambas as vias, a introdução de dados foi realizada utilizando o *software* REDCap (*Research Electronic Data Capture*).

O questionário era composto por 25 perguntas (acrescentando mais uma pergunta no questionário via *web* para aferir o respondente). Foi disponibilizada ao entrevistador/respondente parte da informação recolhida no recrutamento inicial e/ou nas vagas ECOS anteriores, nomeadamente informação demográfica e doenças crónicas.

Pela via telefónica, o questionário foi aplicado por entrevistadores (colaboradores do Departamento de Epidemiologia do Instituto Ricardo Jorge voluntários). Os entrevistadores tiveram formação específica no questionário a aplicar com indicação de definições e esclarecimentos para cada questão.

Pela via *web*, o questionário foi enviado para o *e-mail* de cada indivíduo, tendo-se realizado um reforço de contacto 2 semanas após o primeiro envio.

A validação da base de dados foi feita para cada variável através da identificação de valores não possíveis bem como por identificação de incongruências. Estas incongruências foram validadas com o entrevistador e/ou com os entrevistados, através de novo contacto telefónico.

A taxa de resposta foi calculada dividindo-se o número de UA que responderam a pelo menos uma pergunta do questionário pelo total de UA inicial (n=1005). De igual forma, a taxa de recusa foi obtida considerando no numerador o total de recusas pelo total de UA no painel.

A comparação entre os respondentes por via telefónica e via *web* foi realizada através do teste de Qui-Quadrado com um nível de significância de 5%.

## \_Resultados

O trabalho de campo decorreu entre 15 de março e 9 de maio de 2016. As UA que não responderam por via *web*, foram ainda contactadas por telefone, após o não sucesso de um 2º reenvio/lembrete por *e-mail*.

No total obtiveram-se 690 entrevistas concluídas por telefone e 113 por *e-mail*, o que corresponde a uma taxa de participação total de 79,9% - 77,4% por telefone e 26,5% por via *web* (tabela 1). A taxa de recusa foi de 3,9%, sendo o principal motivo apontado para a não participação "não ter interesse".

Tabela 1: ↴ Distribuição das Unidades de Alojamento contactadas por resultado do contacto.

Contactos efetuados	nº UA	%
Contactos telefónicos não conseguidos	116	11,5
Contactos telefónicos conseguidos	776	77,2
Entrevistas concluídas	690	
Entrevistas não concluídas (inclui recusa, agendamento não concretizado e mudança do agregado)	86	
Contactos via <i>web</i> com sucesso (questionários concluídos)	113	11,2
Total de entrevistas concluídas (telefone e <i>web</i> )	803	79,9
Total de Unidades de Alojamento do painel ECOS	1005	100,0

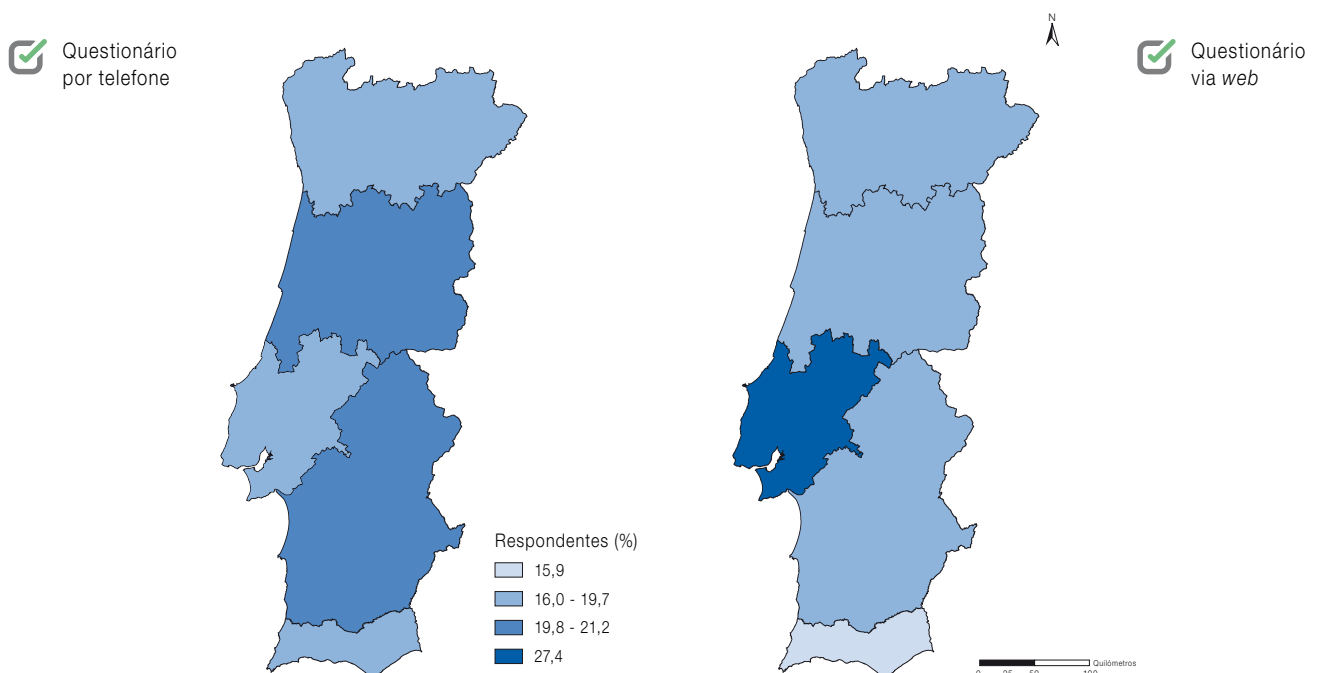
Comparando os respondentes por via telefone com via *web*, verifica-se que são maioritariamente do sexo feminino em ambos os tipos de questionário (tabela 2). O grupo etário predominante nos respondentes por telefone é o dos 60 aos 69 anos, enquanto nos respondentes da *web* é o dos 40-49 anos. Destaque-se que no grupo dos 80-90 anos não existiam endereços de *e-mail* disponíveis.

A distribuição das respostas verifica-se homogénea pelas regiões, mantendo o padrão da amostra inicial, estratificada pelas cinco regiões e com distribuição homogénea. Saliencia-se uma maior adesão à resposta via *web* na NUT de Lisboa, comparativamente às restantes NUT II (figura 1).

Tabela 2: Caracterização demográfica dos respondentes por tipo de inquérito.

	Total			Telefone		Web		p-value
	s/inf	n	%	n	%	n	%	
<b>Sexo</b>	0,6%	798		689		109		0,26
Masculino			35,6		34,8		40,4	
Feminino			64,4		65,2		59,6	
<b>Grupo etário</b>	0,6%	798		689		109		<0,001
20-29			2,4		2,0		4,6	
30-39			12,3		10,6		22,9	
40-49			18,0		16,8		25,7	
50-59			21,8		21,6		22,9	
60-69			24,2		25,1		18,3	
70-79			17,2		19,0		5,5	
80-90			4,1		4,8		0,0	
<b>Região</b>	—	803		690		113		0,44
Norte			19,3		19,4		18,6	
Centro			20,2		20,3		19,5	
Lisboa			20,8		19,7		27,4	
Alentejo			20,8		21,2		18,6	
Algarve			18,9		19,4		15,9	

Figura 1: Distribuição das Unidades de Alojamento que responderam ao questionário por telefone e via *web*, por tipo de questionário e NUTS II (2002).



## Conclusões

A taxa de resposta global foi cerca de 80%, valor comparável com o obtido em vagas anteriores do painel ECOS (7,8).

No que respeita, especificamente, à adesão à resposta ao questionário via *web*, a taxa de resposta foi inferior à obtida por via telefone. Contudo, comparando com estudos similares esta taxa (26%) foi superior.

No perfil demográfico dos respondentes, verificou-se que foram maioritariamente indivíduos do sexo feminino em ambas as vias de aplicação do questionário (telefone e *web*) que participaram, tendo-se registado diferenças nos grupos etários. Em concreto, verificou-se maior adesão ao questionário via *web* pelos grupos mais jovens, enquanto os grupos mais idosos responderam preferencialmente pela via telefónica.

Considerando os custos de implementação de um questionário via telefone, e a maior adesão dos grupos populacionais mais jovens às novas tecnologias de contacto, a adoção de modelos mistos de vias de aplicação de questionários (telefone e via *web*) é algo a ponderar num painel como o ECOS. Contudo, saliente-se que deverá ser realizada investigação futura que permita avaliar os potenciais viés de seleção e informação envolvidos neste tipo de metodologia mista.

## Agradecimentos:

Os autores agradecem à equipa de entrevistadores (por ordem alfabética): Ana João Santos, Ana Paula Gil, Cátia Palhas, Clarisse Martinho, Joana Santos, João Machado, João Martins, Mariana Neto, Paula Braz, Ricardo Mexia, Sónia Pinto, Susana Silva e Verónica Gomez.

## Referências bibliográficas:

- (1) Departamento de Epidemiologia. Dossier ECOS - Em Casa Observamos Saúde. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2010. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2590>
- (2) Nunes B, Contreiras T, Falcão J. Vacinação anti-gripal: cobertura da população portuguesa entre 1998/1999 a 2002/2003. *Rev Port Pneumol.* 2004;10(2):115-23. [www.elsevier.pt/en/revistas/revista-portuguesa-pneumologia-320/pdf/S0873215915305729/S350/](http://www.elsevier.pt/en/revistas/revista-portuguesa-pneumologia-320/pdf/S0873215915305729/S350/)
- (3) Branco MJ, Nogueira PJ, Contreiras T. Uma observação sobre estimativas da prevalência de algumas doenças crónicas, em Portugal Continental. Lisboa, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2005. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/285>
- (4) Sousa-Uva M, Dias CM. Prevalência de Acidente Vascular Cerebral na população portuguesa: dados da amostra ECOS 2013. Lisboa, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2014. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2341>
- (5) Branco MJ, Paixão E, Vicente LF. Uma observação sobre a utilização de cuidados preventivos pela mulher. Lisboa, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2011. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/348>
- (6) Vieira HC, Castro AE, Junior VFS. O uso de questionários via e-mail em pesquisas acadêmicas sob a ótica dos respondentes. XIII SemeAD Seminários em administração, set. 2010. [www.pucrs.br/famat/viali/recursos/inquiries/O uso de questionários via e-mail em pesquisas acadêmicas sob a ótica dos.pdf](http://www.pucrs.br/famat/viali/recursos/inquiries/O%20uso%20de%20question%C3%A1rios%20via%20e-mail%20em%20pesquisas%20acad%C3%AAmicas%20sob%20a%20%C3%B3tica%20dos%20pdf)
- (7) Nunes B, Sousa Uva M, Roquette R, et al. Vacinação antigripal da população portuguesa na época 2013-2014. Estudo na amostra ECOS. Lisboa, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2014. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2327>
- (8) Sousa Uva M, Nunes B, Roquette R, et al. Vacinação antigripal da população portuguesa na época 2014/2015. Estudo na amostra ECOS. Lisboa, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2015. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/3121>

## **A gripe em Portugal: análise preliminar da atividade gripal na época 2015/2016**

### *Influenza season in Portugal (2015/2016): preliminary data*

Patrícia Conde<sup>1</sup>, Pedro Pechirra<sup>1</sup>, Paula Cristóvão<sup>1</sup>, Inês Costa<sup>1</sup>, Ausenda Machado<sup>2</sup>, Ana Paula Rodrigues<sup>2</sup>, Baltazar Nunes<sup>2</sup>, Raquel Guiomar<sup>1</sup>

raquel.guiomar@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e outros Vírus Respiratórios. Departamento de Doenças Infecciosas; (2) Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Portugal Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

#### **\_Resumo**

Este estudo pretende divulgar a análise preliminar dos dados da atividade gripal em Portugal na época de 2015/2016 (setembro de 2015 a junho de 2016). Segundo o Programa Nacional de Vigilância da Gripe (PNVG) a atividade gripal foi considerada de baixa intensidade, tendo ocorrido o período epidémico entre as semanas 1/2016 e 9/2016. O valor máximo de incidência foi observado na semana 3/2016 (59,4 casos por 100 000 habitantes). O vírus da gripe foi detetado em 40,7% (449/1.104) dos casos de síndrome gripal (SG) estudados. O vírus da gripe do subtipo A(H1)pdm09 foi detetado em 90,4% (406/449) dos casos de gripe. O vírus A(H1)pdm09 foi o mais frequente em todos os grupos etários, sendo a percentagem mais elevada no grupo etário 65 ou mais anos (97,4%). O vírus da gripe do tipo B (linhagem Victoria) foi detetado com maior frequência nas crianças entre os 5 e os 14 anos de idade (14,3%). Todos os vírus da gripe A(H1)pdm09 isolados e caracterizados antigenicamente foram semelhantes à estirpe vacinal A/California/7/2009, contemplada na vacina antigripal do Hemisfério Norte 2015/2016. Os vírus da gripe do tipo B (linhagem Victoria) caracterizados foram antigenicamente diferentes da estirpe contemplada na vacina antigripal do Hemisfério Norte 2015-2016. Foi detetado em circulação o vírus do subtipo A(H3), semelhante à estirpe selecionada para a composição da vacina antigripal da época de 2016/2017 (A/Hong Kong/4801/2014). Os vírus da gripe A(H1)pdm09 que predominaram em circulação em Portugal durante a época de 2015/2016 foram antigenicamente semelhantes à estirpe que integrou a vacina antigripal para o mesmo inverno.

#### **\_Abstract**

This study aims to disseminate the preliminary data analysis of influenza activity in Portugal, in 2015/2016 season (September 2015 to June 2016). According to data obtained by the National Influenza Surveillance Programme (PNVG), influenza activity was low. The epidemic period occurred between week 1/2016 and 9/2016. The maximum Influenza-like illness (ILI) incidence rate was observed in week 3/2015 (59.4 cases per 100 000 inhabitants). Influenza virus was detected in 40.7% of ILI cases. Influenza A(H1)pdm09 virus was predominant during all season, was found in 90.4% of influenza cases. Influenza A(H1)pdm09 was detected in all age groups, reaching the highest proportion in patients above 65 years of age (97.4%). Influenza B viruses (Victoria lineage) was more frequent in the age group 5-14 years (14.3%). All isolated and characterized A(H1)pdm09 viruses were antigenically similar to the strain A/California/7/2009, included in the influenza vaccine in 2015/2016 (Northern hemisphere). The majority influenza B viruses are dissimilar from the strain included in flu vaccine for the northern hemisphere in 2015/2016. Few A(H3) viruses were detected in circulation, some were similar to the next winter influenza vaccine strain (A/Hong Kong/4801/2014). Predominant A(H1)pdm09 viruses circulating during 2015/2016 season were antigenically similar to the selected vaccine strain for the same winter.

#### **\_Introdução**

O Programa Nacional de Vigilância da Gripe (PNVG) assegura a vigilância epidemiológica da gripe em Portugal, integrando as componentes de vigilância clínica e laboratorial. A componente clínica integra a Rede de Médicos-Sentinela e possibilita a determinação semanal das taxas de incidência de síndrome gripal (SG), permitindo descrever a intensidade e evolução da epidemia na população portuguesa. A componente laboratorial tem por base a identificação e caracterização das estirpes do vírus da gripe em circulação em cada inverno.

Na componente laboratorial colaboram a Rede de Médicos-Sentinela, a Rede de Serviços de Urgência e os médicos do projeto EuroEVA, através do envio de amostras respiratórias para a pesquisa do vírus influenza, constituindo desta forma um indicador do início da circulação do vírus da gripe em cada época. A Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Infeção pelo Vírus da Gripe (RPLDG) realiza a pesquisa laboratorial e contribui decisivamente para a caracterização antigénica e genética do vírus da gripe, em particular nas situações de infeção respiratória detetadas a nível hospitalar.

O PNVG tem igualmente intervenção no diagnóstico de casos suspeitos de infeção por vírus da gripe de origem animal e com potencial pandémico.

#### **\_Objetivo**

Divulgação da análise preliminar dos dados da atividade gripal em Portugal na época de 2015/2016 (setembro de 2015 a junho de 2016).

## \_Material e métodos

Na época 2015/2016 foram notificados 1329 casos de SG, de acordo com a definição do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) (1). As notificações, efetuadas pela Rede dos Médicos-Sentinel, permitiram o cálculo das taxas de incidência semanais de SG. O Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e outros Vírus Respiratórios (LNRVG) recebeu 1104 exsudados nasofaríngeos para a pesquisa do vírus da gripe: 387 provenientes da Rede Médicos-Sentinel e do projeto EuroEVA e 717 dos Serviços de Urgência e Obstetria. O diagnóstico laboratorial do vírus da gripe pela metodologia RT-PCR em tempo real (2,3) permitiu a identificação dos vírus do tipo A (subtipos H1pdm09 e H3) e do tipo B (linhagens Yamagata e Victoria) em circulação. Vírus da gripe detetados em casos de SG provenientes do PNVG e da RPLDG foram isolados em linha celular MDCK/ MDCK-siat1. Foi efetuada a caracterização antigénica por reação de inibição da hemaglutinação e a caracterização genética por sequenciação da região codificante da subunidade HA1 do gene da hemaglutinina.

## \_Resultados

### Vigilância clínica e laboratorial da gripe

Na época 2015/2016, a atividade gripal foi considerada de baixa intensidade, tendo-se observado um maior número de notificações entre os meses de janeiro e março. À semelhança da época anterior (4), o período epidémico ocorreu entre as semanas 1/2016 e 9/2016. O valor máximo de incidência verificou-se na semana 3/2016, 59,4 casos de SG por 100.000 habitantes (gráfico 1).

No período em estudo, o vírus da gripe foi detetado em 40,7% (n=449/1.104) dos casos de SG analisados (gráfico 2). Em 90,4% (n=406) dos casos de gripe foi detetado o vírus da gripe do subtipo A(H1)pdm09, em 7,8% (n=35) o vírus do tipo B (linhagem Victoria), em 1,3% (n=6) o subtipo A(H3) e em 0,4% (n=2) o vírus do tipo B (linhagem Yamagata) (gráfico 2).

Gráfico 1: Distribuição semanal dos vírus da gripe detetados por RT-PCR em tempo-real, na época 2015/2016.

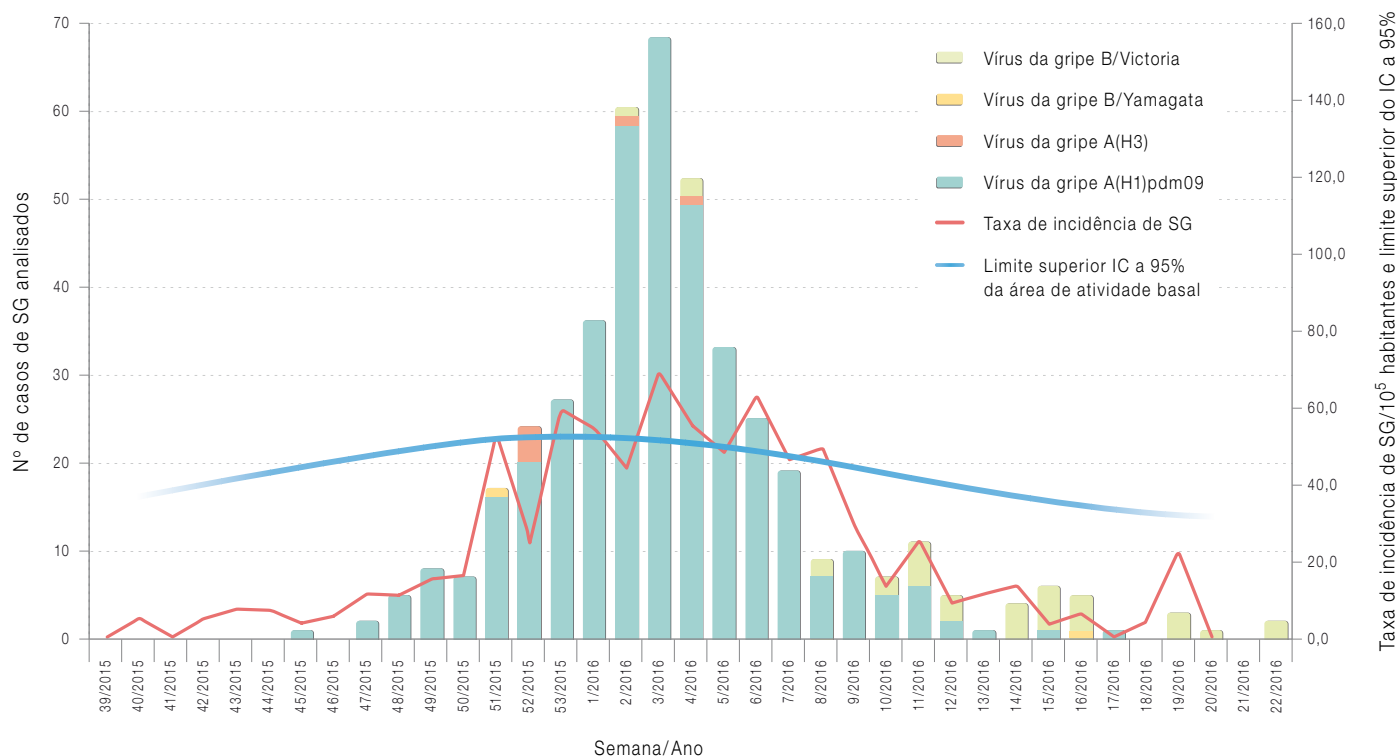
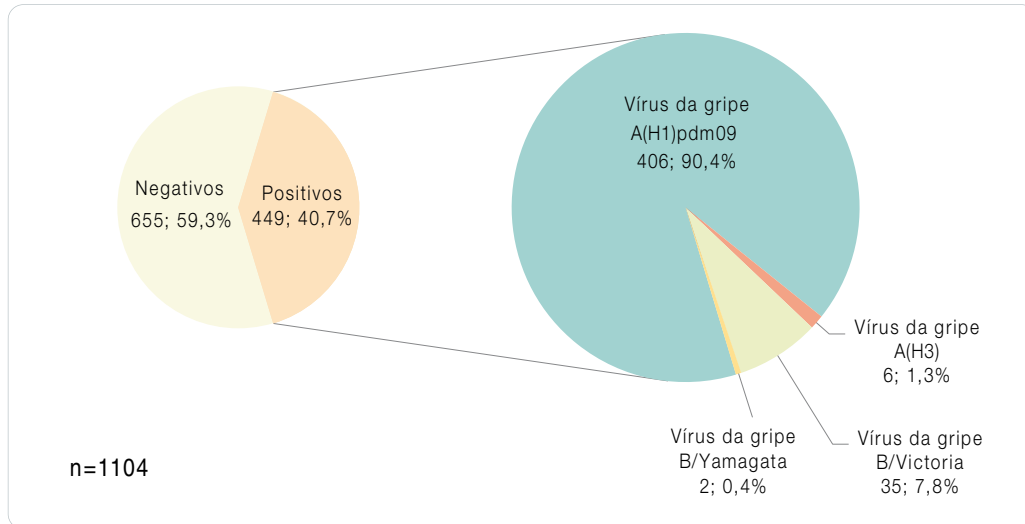


Gráfico 2: ⚓ Diagnóstico laboratorial da gripe nos casos de SG na época de 2015/2016.

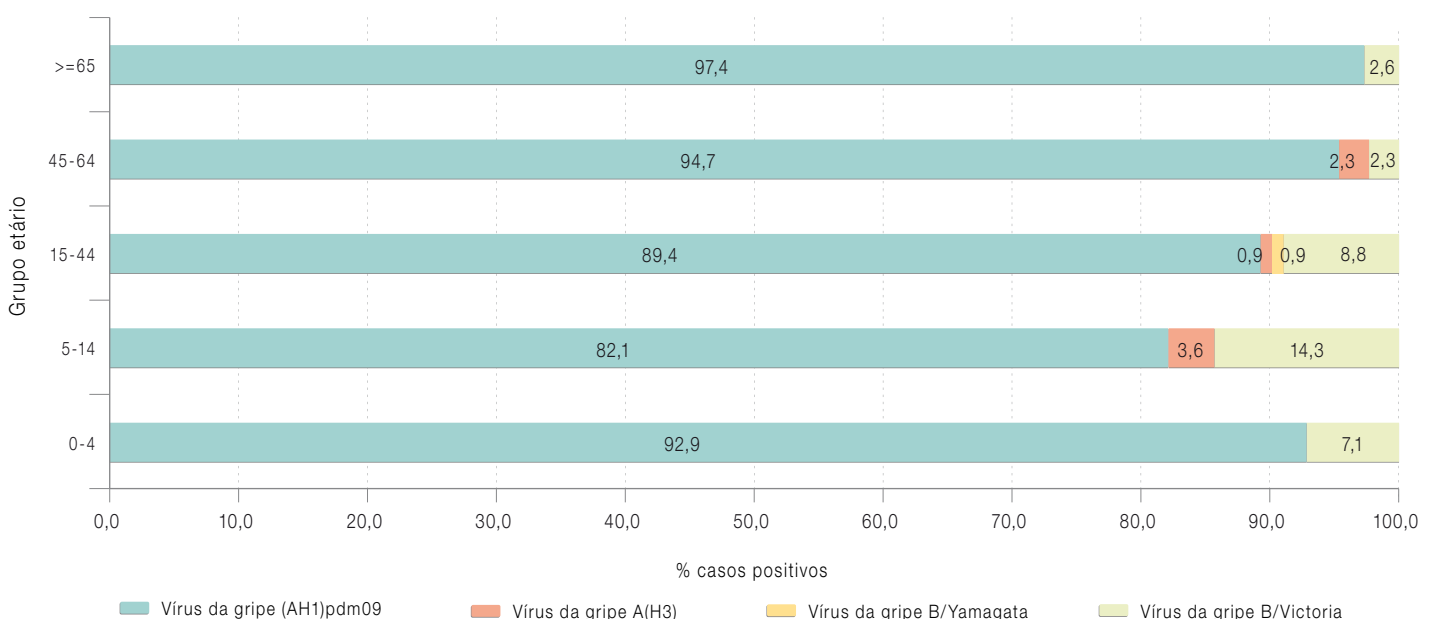


A frequência de casos de gripe mais elevada foi observada em crianças até aos 4 anos (50,0%;14/28), seguida dos adolescentes e jovens adultos dos 15 aos 44 anos (43,6%;226/518).

Em todos os grupos etários o vírus de gripe A(H1)pdm09 foi o mais frequente. Contudo, a percentagem mais elevada foi no

grupo etário 65 ou mais anos (97,4%) (gráfico 3). Os casos de infeção pelo vírus da gripe do tipo B (linhagem Victoria) foram observados principalmente no grupo etário entre os 5 e os 14 anos (14,3%). Verificou-se a deteção esporádica do vírus de gripe A(H3) em indivíduos com idades compreendidas entre os 5 e os 64 anos (gráfico 3).

Gráfico 3: ⚓ Casos de gripe por grupo etário na época de 2015/2016.



Foram excluídos da análise 20 casos, por falta de informação sobre a idade.

### Caraterização das estirpes do vírus da gripe

Na época 2015/2016 (até à semana 22/2016) foram analisados antigenicamente 210 estirpes do vírus da gripe [186 A(H1)pdm09, 20 B/Victoria, 3 A(H3) e 1 B/Yamagata]. Foi efetuada a análise genética a 139 estirpes [108 A(H1)pdm09, 17 B/Victoria, 10 A(H3) e 4 B/Yamagata].

Todas as 186 estirpes do vírus da gripe A(H1)pdm09 isoladas e caraterizadas antigenicamente foram semelhantes à estirpe vacinal A/California/7/2009, contemplada na vacina antigripal do Hemisfério Norte 2015/2016 (5). As 108 estirpes virais caraterizadas geneticamente pertenciam ao grupo genético 6B representado pela estirpe A/South Africa/3626/2013, das quais 88 apresentaram as caraterísticas do novo subgrupo 6B.1.

A maioria dos vírus da gripe do tipo B pertenciam à linhagem Victoria e são diferentes da estirpe contemplada na vacina antigripal do Hemisfério Norte 2015-2016 (linhagem Yamagata) (5). Contudo, os 17 vírus caraterizados geneticamente, pertenciam ao grupo genético 1A, representado pela estirpe de referência B/Brisbane/60/2008, que será contemplada na vacina antigripal da próxima época 2016/2017 (6). Os vírus B da linhagem Yamagata pertenciam ao grupo genético 3, sendo semelhantes à estirpe B/Phuket/3073/2013, contemplada na atual vacina antigripal do Hemisfério Norte 2015/2016 (5).

Uma das três estirpes do vírus da gripe A(H3) isoladas e caraterizadas antigenicamente revelou-se semelhante à estirpe selecionada para a composição da vacina antigripal de 2016/2017 (A/Hong Kong/4801/2014). Dos 10 vírus da gripe A(H3) sequenciados, 8 pertenciam ao grupo genético 3C.2a representado pela estirpe A/Hong Kong/4801/2014 e 2 ao grupo genético 3C.3a representado pela estirpe A/Switzerland/9715293/2013, contemplada na vacina antigripal do Hemisfério Norte 2015/2016 (5).

### Discussão e conclusões

Durante o inverno 2015/2016, a atividade gripal foi de baixa intensidade, tendo o período epidémico uma duração semelhante à época anterior. O vírus da gripe A(H1)pdm09 foi predominante, contudo verificou-se a cocirculação do tipo B/Victoria especialmente no final da época. Foram também detetados casos espo-

rádicos do vírus da gripe A(H3) e do vírus B/Yamagata. O vírus A(H1)pdm09 foi detetado em todos os grupos etários, sendo mais frequente nas crianças até aos 4 anos de idade. Por sua vez, foi nas crianças dos 5 aos 14 anos, que o vírus de gripe tipo B/Victoria foi maioritariamente detetado.

Os vírus A(H1)pdm09 foram semelhantes à estirpe vacinal da época 2015/2016 (7). Os vírus do tipo B e do subtipo A(H3) circulantes mostraram diferenças relativamente às estirpes vacinais da época 2015/2016. A maioria dos vírus detetados em 2015/2016 foram semelhantes às estirpes recomendadas para a vacina da próxima época gripal 2016/2017 (6). Apesar deste facto, a constante mutação do vírus da gripe, obriga que em cada inverno, se proceda à monitorização das caraterísticas antigénicas e genéticas das estirpes virais em circulação.

### Agradecimentos:

À Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Infecção pelo Vírus da Gripe, aos Médicos-Sentinelas, aos Médicos dos Serviços de Urgência e de Obstetrícia e aos Médicos participantes no estudo EuroEVA; À Inês Batista pela gestão administrativa da Rede Médicos-Sentinelas; À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

### Referências bibliográficas:

- (1) European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza Case Definitions [Em linha]. Sweden: ECDC. [consult. 5/7/2016]. [http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EISN/surveillance/Pages/influenza\\_cases\\_definitions.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EISN/surveillance/Pages/influenza_cases_definitions.aspx)
- (2) Wu LT, Thomas I, Curran MD, et al. Duplex molecular assay intended for point-of-care diagnosis of influenza A/B virus infection. *J Clin Microbiol.* 2013;51(9):3031-8. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3754654/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3754654/)
- (3) WHO information for molecular diagnosis of influenza virus in humans – update August 2011. Geneva: World Health Organisation, 2011. [www.who.int/influenza/resources/documents/molecular\\_diagnosis\\_influenza\\_virus\\_humans\\_update\\_201108.pdf](http://www.who.int/influenza/resources/documents/molecular_diagnosis_influenza_virus_humans_update_201108.pdf)
- (4) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2014/2015. Lisboa: INSA, 2015. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/3175>
- (5) Direção Geral da Saúde. Orientação 9/2015, de 25 de setembro. Vacinação contra a gripe com a vacina trivalente para a época 2015/2016. [www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-009-2015-de-25092015.aspx](http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-009-2015-de-25092015.aspx)
- (6) World Health Organisation. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016-2017 northern hemisphere influenza season. Geneva: WHO, 2016. [www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2016\\_17\\_north/en/](http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2016_17_north/en/)
- (7) World Health Organisation. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015-2016 northern hemisphere influenza season. Geneva: WHO, 2015. [www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201502\\_recommendation.pdf?ua=1](http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201502_recommendation.pdf?ua=1)

## Efetividade da vacina antigripal sazonal na época 2015/2016: resultados do projeto EuroEVA

### 2015/2016 Influenza vaccine effectiveness: results from the EuroEVA project

Verónica Gómez<sup>1</sup>, Raquel Guiomar<sup>2</sup>, Ana Paula Rodrigues<sup>1</sup>, Pedro Pechirra<sup>2</sup>, Patricia Conde<sup>2</sup>, Paula Cristóvão<sup>2</sup>, Inês Costa<sup>2</sup>  
Baltazar Nunes<sup>1</sup>, Ausenda Machado<sup>1</sup>

veronica.gomez@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Epidemiologia; (2) Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

#### \_Resumo

O projeto EuroEVA pretende obter estimativas da efetividade da vacina antigripal (EV), para a população geral e para o grupo-alvo para o qual é recomendada. Os resultados apresentados correspondem à sua implementação na época 2015/2016. Utilizou-se um delineamento caso-controlo teste negativo, onde os casos, indivíduos com síndrome gripal (SG) e com diagnóstico laboratorial positivo para o vírus da gripe, foram comparados com os controlos, indivíduos com SG e diagnóstico laboratorial negativo para o vírus da gripe. Os participantes foram selecionados entre os doentes com SG observados em consulta de cuidados de saúde primários. Foi recolhida informação clínica e epidemiológica e um exsudado da nasofaringe para diagnóstico laboratorial. A EV foi estimada através de 1- *odd ratio* de estar vacinado nos casos vs. controlos, ajustado para a idade, presença de doença crónica, número de consultas com médico de família (MF) nos últimos 12 meses, número de coabitantes, nível de escolaridade, sexo e mês de início de sintomas. Entre as semanas 48/2015 e 17/2016, foram recrutados 310 indivíduos com SG sendo que, após exclusão de 26 indivíduos por não cumprirem os critérios de inclusão, foram incluídos 124 casos e 186 controlos. De entre os casos, 89,5% eram positivos para o vírus da gripe do subtipo A(H1) pdm09 e 8,9% para o tipo B/Victoria. Relativamente à vacina antigripal, a cobertura era de 10,5% nos casos e 23,7% nos controlos. Após ajustamento, a EV em 2015/2016 foi de 56,1% (IC95%: 3,5%; 80,0%) e 65,8% (IC95%:12,5%; 86,7%), respetivamente na população geral e no grupo-alvo para a vacinação antigripal. Estes resultados sugerem que a vacina antigripal nesta época conferiu uma proteção moderada. As estimativas da EV estão em linha com resultados publicados por outros países europeus.

#### \_Abstract

The EuroEVA study aimed to estimate the 2015-16 end of season influenza vaccine effectiveness for all population and for the influenza vaccination target group. The presented results resulted from implementation of the study during 2015/2016 season. A case-control test negative design was used where cases (laboratory confirmed influenza-positive patients) were compared to controls (laboratory influenza-negative ILI patients). Participants were recruited among ILI patients observed on a GP consultation. Clinical, epidemiological and data and nasopharyngeal swab was collected VE was estimated as one minus the odds ratio of being vaccinated in cases versus controls. VE was adjusted for age, chronic disease, GP consultations last 12 months, cohabitants, educational group, sex and

onset month. Between weeks 48/2015 and 17/2016, 310 ILI patients were recruited. After excluding 26 individuals, 124 were cases and 186 controls. Among all cases, 89.5% were positive for A(H1) pdm09 subtype and 8.9% for B/Victoria type. Vaccine coverage was of 10.5% for cases and 23.7% for controls. After adjusting for confounders, 2015/2016 VE was 56.1% (95%CI: 3.5%; 80.0%) and 65.8% (95%CI:12.5%; 86.7.5%), for general population and target group, respectively. These results suggest that 2015-16 seasonal influenza vaccine conferred moderated protection. VE estimated are in accordance with published results from other European countries.

#### \_Introdução e objetivo

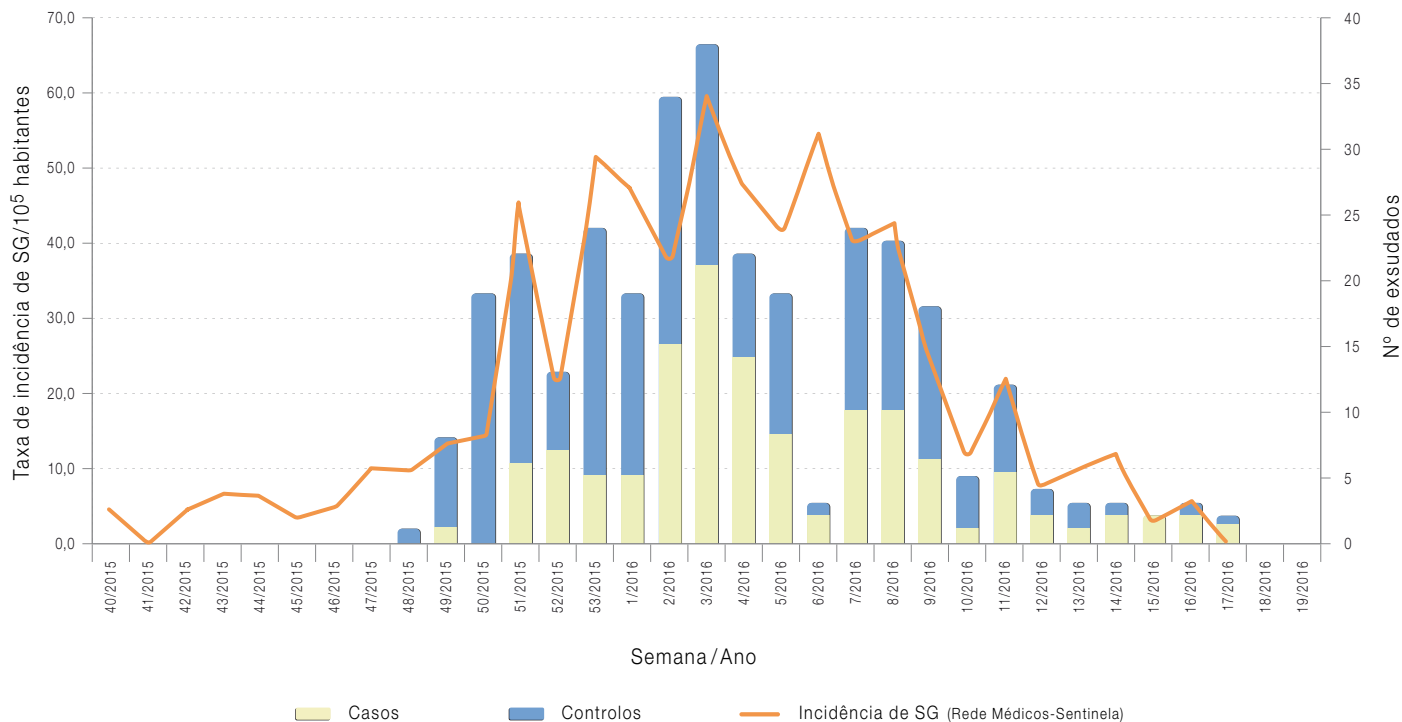
O projeto EuroEVA (Efetividade da Vacina da Gripe na Europa), componente portuguesa do estudo europeu multicêntrico I-MOVE (*Monitoring vaccine effectiveness during influenza seasons and pandemics in Europe*)<sup>(1)</sup>, tem por objetivo obter estimativas da efetividade da vacina antigripal sazonal e pandémica durante e após a época de gripe. Desde a época de 2008/2009, Portugal, juntamente com outros países europeus, tem vindo a implementar um protocolo comum, utilizando um desenho de estudo caso-controlo teste negativo. Os resultados apresentados referem-se à época 2015/2016 e destinam-se a reportar a estimativa da efetividade da vacina antigripal sazonal na população em geral e no grupo-alvo (indivíduos com 65 ou mais anos de idade, grávidas, doentes crónicos, profissionais de saúde e cuidadores) para o qual a vacina é recomendada.

#### \_Material e métodos

Foi utilizado um delineamento caso-controlo teste negativo, onde doentes com síndrome gripal (SG), com resultado laboratorial positivo para o vírus da gripe são comparados com controlos, i.e., doentes com SG com resultado laboratorial negativo para o vírus da gripe.



Gráfico 1: Distribuição semanal de casos e controlos e incidência de síndrome gripal na época 2015/2016.



Comparando casos e controlos observaram-se diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito, ao tempo entre início de sintomas e colheita, ao sexo, à toma da vacina antigripal na época anterior, à presença de doença crónica relevante para vacinação antigripal e ao número de consultas com o MF nos últimos 12 meses. A estimativa ajustada, para efeito de confundimento, da EV foi de 56,1% (IC 95%: 3,5% a 80,0%) considerando toda a amostra. No grupo-alvo da vacinação, a EV ajustada aumenta para 65,8% (IC 95%: 12,5% a 86,7%), sendo que ambas as estimativas apresentaram significado estatístico (tabela 1).

Tabela 1: Efetividade da vacina antigripal sazonal 2015/2016 contra casos de gripe (estimativa bruta e ajustada), total e no grupo-alvo da vacinação.

População	Bruta		Ajustada*	
	EV	IC95%	EV	IC95%
Total	62,2	24,1; 82,2	56,1	3,5; 80,0
Grupo-alvo	63,3	13,6; 86,5	65,8	12,5; 86,7

\* Grupo etário, presença de doença crónica, número de consultas com MF nos últimos 12m, número de coabitantes, nível de escolaridade, sexo e mês de início de sintomas.

## \_Conclusões

Em Portugal o período epidémico ocorreu entre as semanas 1/2016 e 9/2016 tendo-se verificado uma atividade gripal de intensidade baixa. O vírus da gripe do subtipo A(H1)pdm09 foi o predominante na época de 2015/2016. Com menor frequência foi também detetado o vírus da gripe B/Victoria, especialmente no final da época.

A EV antigripal ajustada para confundimento no grupo-alvo (65,8%) foi ligeiramente superior em relação à estimada na população em geral (56,1%), resultados, estes, que indicam que a vacina antigripal nesta época conferiu uma proteção moderada.

As estimativas EuroEVA estão em linha com os resultados intermédios publicados pelo Reino Unido (49,1% contra A(H1)pdm09)<sup>(4)</sup> e pelo grupo I-MOVE relativamente à análise de 10 países europeus (46,3% contra o vírus de gripe em geral)<sup>(5)</sup>.

**Referências bibliográficas:**

- (1) I-MOVE in Europe (Influenza - Monitoring Vaccine Effectiveness) [Em linha]. [consult. 15/6/2016] <http://sites.google.com/site/epiflu/>
- (2) European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza Case Definitions [Em linha]. Sweden: ECDC. [consult. 5/7/2016]. [http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EISN/surveillance/Pages/influenza\\_case\\_definitions.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EISN/surveillance/Pages/influenza_case_definitions.aspx)
- (3) European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza case definitions [Em linha]. [consult. 15/6/2016] [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/influenza/surveillance/Pages/influenza\\_case\\_definitions.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/influenza/surveillance/Pages/influenza_case_definitions.aspx)
- (4) Pebody R, Warburton F, Ellis J, et al. Effectiveness of seasonal influenza vaccine in preventing laboratory-confirmed influenza in primary care in the United Kingdom: 2015/16 mid-season results. Euro Surveill. 2016;21(13):pii=30179 [www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V21N13/art21424.pdf](http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V21N13/art21424.pdf)
- (5) Kissling E, Valenciano M. Early influenza vaccine effectiveness results 2015-16: I-MOVE multicentre case-control study. Euro Surveill. 2016;21(6):pii=30134. [www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V21N06/art21378.pdf](http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V21N06/art21378.pdf)

## **Histoplasmose em Portugal: infeção rara?**

### *Histoplasmosis in Portugal: rare infection?*

Cristina Veríssimo, Helena Simões, Raquel Sabino

cristina.verissimo@insa.min-saude.pt

Unidade de Infecções Parasitárias e Fúngicas. Departamento de Doenças infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

#### **\_Resumo**

O *Histoplasma capsulatum* é o agente etiológico da histoplasmose, apresenta duas variedades com características epidemiológicas diferentes var. *capsulatum* e var. *duboisii* endémicas no continente americano e no continente africano, respetivamente. Nas últimas décadas têm sido descritos casos de histoplasmose na Europa e em países asiáticos como a China, onde esta infeção não é considerada endémica. A facilidade de movimentação das populações tem contribuído para alterar o padrão epidemiológico desta infeção. Este trabalho tem como objetivo analisar o número de casos registados em Portugal e chamar a atenção para a importância de melhor se conhecer a epidemiologia desta infeção no nosso país. A histoplasmose não é uma doença de declaração obrigatória, os casos de histoplasmose existentes resultam de diagnósticos clínicos observados no âmbito dos internamentos hospitalares. O número médio de episódios de internamento hospitalar referenciados nos Base de dados de Grupos de Diagnóstico Homogéneo durante o período de 2009 a 2014 foi de 23 episódios/ano. No mesmo período foram descritos na literatura dez casos de Histoplasmose em Portugal, tratando-se sobretudo de apresentações clínicas de interesse científico em que algumas se referem a casos com período de latência de 40 anos após exposição. Apesar de ser considerada uma doença rara na Europa, clínicos e microbiologistas devem estar em alerta e aumentar o seu conhecimento sobre a patogenicidade, os métodos de diagnóstico diferencial, o tratamento e a evolução do padrão epidemiológico desta e de outras infeções fúngicas.

#### **\_Abstract**

*Histoplasma capsulatum* is the etiologic agent of histoplasmosis; it has two varieties with different epidemiological features: var. *capsulatum* and var. *duboisii*, endemic in America and Africa, respectively. In the last decades, several cases of histoplasmosis have been reported in European and Asian countries like China, where this infection is not considered endemic. The continuous flow of populations around the world has contributed to the change the epidemiological pattern of this infection. This work aims to analyze the number of cases registered in Portugal and raise attention to the importance of a better understanding of the epidemiology of this infection in our country. Histoplasmosis is not a notifiable disease and therefore, the existing cases of histoplasmosis in our country result of clinical diagnosis in the context of hospital admissions. The average number of hospitalization episodes referenced in the Homogeneous Diagnostic Group Database during the period 2009-2014 was of 23 episodes/year. In the same period, ten cases of histoplasmosis were published. These publications are mostly clinical presentations of scientific interest, some of which describe histoplasmosis cases with a latent period of 40 years after exposure. Although considered as a rare disease in Europe, physicians and clinical microbiol-

ogists should be aware of this infection. An increased knowledge on the pathogenicity, methods of differential diagnosis, and treatment is, therefore, mandatory to understand the evolution of the epidemiological pattern of this and other fungal infections.

#### **\_Introdução**

O *Histoplasma capsulatum* é o agente etiológico da histoplasmose, um fungo que exhibe dimorfismo térmico, ou seja, no meio ambiente (temperatura de 15-20°C) apresenta a forma filamentosa e à temperatura do corpo humano (37°C) apresenta a forma de levedura.

Esta espécie tem duas variedades com características epidemiológicas diferentes, *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*.

*Histoplasma capsulatum* está amplamente distribuído no continente americano, sendo mais prevalente em países como a Venezuela, Equador, Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina (1). Nos países onde é endémico, a variedade *capsulatum* tem como reservatório natural o solo e dejetos de morcegos e aves (2).

A infeção ocorre sobretudo por inalação de esporos em locais contaminados por *Histoplasma* (2), dando origem a um quadro assintomático ou a manifestações clínicas moderadas ou graves, semelhantes a pneumonia ou outras infeções respiratórias (3). Na maioria das situações, a cura é espontânea, sendo as formas mais graves da infeção consideradas raras nos indivíduos imunocompetentes. De facto, nos indivíduos imunocomprometidos, nomeadamente doentes com infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), a manifestação sintomática, aguda e disseminada, da doença é mais frequente, constituindo um grupo de risco acrescido para esta infeção fúngica (4).

*Histoplasma capsulatum* variedade *duboisii* tem como reservatório natural o solo. É uma espécie endémica no continente africano, sendo a prevalência mais elevada na África subsariana, no Mali, Chade, Nigéria, República Democrática do Congo e Gana (5). O modo de transmissão ainda é pouco conhecido, mas a maioria dos casos tem sido associado à transmissão direta após traumatismo. As infeções são habitualmente localizadas, afetando sobretudo a pele, tecidos subcutâneos ou ósseos. A disseminação é rara, mas pode ocorrer principalmente em indivíduos infetados pelo VIH (5). A infeção por esta espécie apresenta um grande período de latência, estando descritos casos de infeção muitos anos após exposição (6).

O método laboratorial considerado “gold standard” para a confirmação da infeção por *Histoplasma* é a cultura de amostras biológicas (7). A sensibilidade do método cultural como teste de diagnóstico é fortemente influenciada pelo tempo de incubação e pelos meios de cultura utilizados. Está recomendado um período de incubação nunca inferior a três semanas (8) e a utilização conjunta do meio de Sabouraud dextrose com outros meios mais ricos, tais como BHI (*Brain Heart Infusion*), gelose de sangue ou de chocolate.

As culturas positivas devem ser manuseadas em câmara de segurança biológica, de acordo com o estabelecido para organismos BSL3. A identificação deve ser realizada com base na observação das características fenotípicas: fase leveduriforme (37°C) apresenta leveduras de pequenas dimensões (2-4 µm) com gemulação única de base estreita (*var. capsulatum*) e leveduras de grandes dimensões (8-15 µm) com gemulação única de base estreita (*var. duboisii*) (figura 1). A fase filamentosa (27°C) é idêntica em ambas as variedades e apresenta filamentos finos septados, hialinos e esporos de grandes dimensões (6-15 µm) com parede irregular ornamentada com projeções (morfologia típica do *Histoplasma*) (figura 2). É importante ressaltar que a

Figura 1: Leveduras de *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* - Exame direto a fresco de biópsia da amígdala (400X).

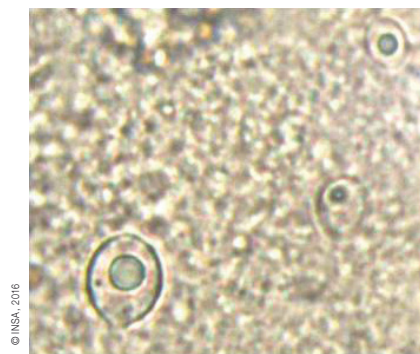
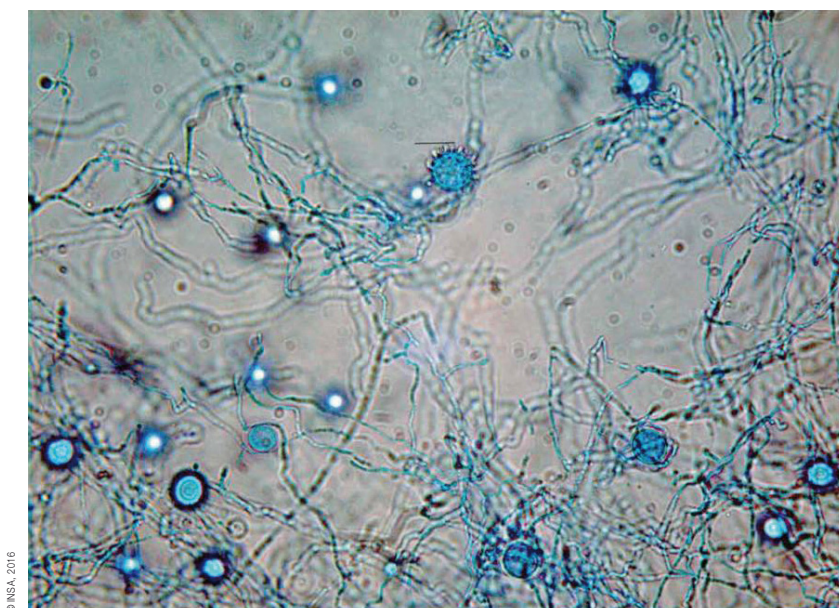


Figura 2: *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* - Fase filamentosa, após cultura a 27°C (400X).



confirmação da identificação requer a comprovação do dimorfismo térmico, ou seja a conversão da fase leveduriformes para a fase filamentososa. Este processo é muitas vezes moroso ou ineficaz, pelo que a identificação por métodos moleculares por sequenciação de genes conservados do genoma é a técnica preferencialmente utilizada.

Para além dos métodos culturais que comprovam infeção (3), o diagnóstico pode ser realizado por exame histológico com recurso a colorações específicas para fungos, tais como Grocott-Gomori methenamine-silver stain, Periodic Acid-Schiff (PAS), para observação de leveduras de pequenas dimensões, que podem ser intracelulares, no caso das infeções pelo *H. capsulatum* var. *capsulatum*, e para observação de leveduras de grandes dimensões, com gémula única de base estreita, no caso de *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*.

Os biomarcadores, nomeadamente a pesquisa de anticorpos por técnicas de aglutinação/imunodifusão, apesar de não comprovarem infeção (7), podem ser utilizados para o diagnóstico da histoplasmose variedade *capsulatum*, para a qual apresentam uma sensibilidade de 99% (1).

A pesquisa de antigénio na urina demonstrou ser útil para o diagnóstico da histoplasmose, no entanto estão descritos resultados falsos positivos em doentes com outras infeções (paracoccidiose, blastomicose), quando estas são também endémicas na mesma região geográfica (3). Os métodos moleculares para a deteção de *Histoplasma* não estão comercializados em Portugal. No entanto, têm demonstrado ser uma metodologia de eleição para o diagnóstico desta e outras micoses (9).

Nas últimas década têm sido descritos casos de histoplasmose na Europa (10,11) e em países asiáticos como a China, onde esta infeção não é considerada endémica (12). A facilidade de movimentação das populações tem contribuído em muito para alterar o padrão epidemiológico desta e outras infeções. De facto, micoses endémicas como a histoplasmose, coccidiomicose e penicilliose marnefeii, têm vindo a emergir como uma ameaça grave para a saúde da população viajante e migrante (13,14).

Portugal é um dos países da Europa com uma taxa elevada de imigrantes provenientes da América do Sul, sobretudo do Brasil, e do continente africano. A guerra colonial e a independência das colónias portuguesas em África expuseram muitos portugueses a estes fungos endémicos, estando descritos alguns casos de infeção que se manifestaram 40 anos após exposição (6,15). De acordo com o sistema de vigilância epidemiológica da infeção VIH/SIDA foram registados oito casos de histoplasmose em doentes VIH entre 1983 e 2015 (16). Não sendo a histoplasmose uma doença de declaração obrigatória em Portugal, os casos existentes resultam de diagnósticos clínicos observados no âmbito dos internamentos hospitalares.

### \_Objetivos

Este trabalho tem como objetivo analisar o número de casos de Histoplasmose registados em Portugal e chamar a atenção para a importância de melhor se conhecer a epidemiologia desta infeção no nosso país.

### \_Material e métodos

Para a pesquisa de casos de histoplasmose em Portugal foi feito um levantamento bibliográfico exaustivo, com recurso à base de dados PubMed (U.S. National Library of Medicine, NLM) e ao portal português B-on (Biblioteca do Conhecimento Online). Foram utilizados os seguintes termos de pesquisa: histoplasmose; histoplasma-Portugal; epidemiologia-histoplasmose-Portugal; portuguese-histoplasmosis.

Foi igualmente consultada a base de dados do sistema de vigilância epidemiológica da infeção VIH/SIDA relativamente às infeções por *Histoplasma capsulatum*, bem como os dados provenientes da rede laboratorial do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) no âmbito da vigilância laboratorial de infeções invasivas e subcutâneas (IFIs).

Foi ainda consultada a Base de dados de Grupos de Diagnóstico Homogéneo (GDH), disponibilizada pela Administração Central do Sistema de Saúde, sobre os episódios de internamento hospitalar do Sistema Nacional de Saúde (SNS), durante o período de 2009 a 2014.

## \_Resultados

Após pesquisa bibliográfica, reuniram-se todos os dados publicados na literatura científica relativos à histoplasmose em Portugal, cujos resultados se encontram sistematizados no **quadro 1**.

O número médio de episódios de internamento hospitalar referenciados nos GDH durante o período de 2009 a 2015 foi de 23 episódios/ano com número máximo de episódios registados em 2012 (n=33) e número mínimo em 2014 (n=16) (**tabela 1**).

## \_Discussão

De acordo com os recursos de informação utilizados foram descritos na literatura 10 casos de Histoplasmose entre 2009 e 2015, sendo a maioria diagnosticados na região de Lisboa e Vale do Tejo. Cinco casos correspondem à variedade africana (*H. capsulatum duboisii*) e os restantes à variedade americana (*H. capsulatum capsulatum*). As publicações encontradas são sobretudo apresentações clínicas de interesse científico em que algumas se referem a casos com período de latência

**Quadro 1:** ↓ Casos de histoplasmose em Portugal descritos na literatura entre 2009 e 2015.

Ano	Local diagnóstico	Espécie variedade	Tipo infeção	Patologia base	Naturalidade doente	Fonte/referência
2009	Lisboa	<i>H. capsulatum duboisii</i>	Localizada	nenhum	Guiné-Bissau	Vieira R (20)
2011	Lisboa	<i>H. capsulatum capsulatum</i>	Disseminada	HIV	Congo	Borges Costa J (18)
2012	Setúbal	<i>H. capsulatum capsulatum</i>	Disseminada	Transplantado renal	Portugal	Outerelo C (19)
2012	Lisboa	<i>H. capsulatum capsulatum</i>	Disseminada	HIV	Brasil	Carvalho D (23)
2013	Lisboa	<i>H. capsulatum duboisii</i>	Localizada	HIV	Portugal	Toscano C (6)
2013	Coimbra	<i>H. capsulatum capsulatum</i>	Localizada	Doente de hemodialise	Portugal	Marques N (22)
2014	Setúbal	<i>H. capsulatum capsulatum</i>	Disseminada	Transplantado renal	Portugal	Cardoso P (17)
2014	Paris, França	<i>H. capsulatum duboisii</i>	Localizada	nenhum	Portugal	Richaud C (15)
2015	Lisboa	<i>H. capsulatum duboisii</i>	Localizada	Doença hepática	Portugal	Lopes MJ (21)
2015	Coimbra	<i>H. capsulatum duboisii</i>	Localizada	não referido	Guiné-Bissau	INSA IFI 15

**Tabela 1:** ↓ Episódios de internamento hospitalar com diagnóstico de histoplasmose registados no GDH entre 2009 e 2014.

Ano	Norte	Centro	LVT	Alentejo	Algarve	Açores	Indeterminada	Total de episódios
2009	8	2	18	2	2	1	0	33
2010	7	3	5	1	1	0	1	18
2011	9	4	8	1	0	0	0	22
2012	4	3	14	1	1	0	0	23
2013	5	5	12	0	0	0	1	23
2014	6	3	7	0	0	0	0	16

de 40 anos após exposição em África. Não sendo a histoplasmose uma doença de declaração obrigatória em Portugal, os episódios de internamento registados nos GDH dão informação apenas sobre as situações graves da doença, resultante de infeções primárias ou de comorbilidade. Apesar dos GDH registarem episódios de internamento e não doentes e de existir alguma heterogeneidade na codificação dos mesmos entre hospitais, podemos assumir que o número de episódios de internamento em Portugal se tem mantido constante entre 2009 e 2015, observando um ligeiro decréscimo ao longo dos anos.

Tratando-se de uma doença que apresenta na maioria das vezes um quadro clínico semelhante a outras infeções respiratórias, a interpretação do número de casos de histoplasmose notificados deve ter em atenção a possibilidade de subdiagnóstico desta infeção fúngica. Por outro lado, sendo a cultura o método de diagnóstico mais frequentemente utilizado nas diferentes unidades hospitalares, pode dar origem a resultados falsos negativos, possivelmente devido ao não cumprimento do tempo de incubação recomendado. Outros métodos de diagnóstico, tais como a pesquisa de anticorpos ou de antígeno, bem como a deteção por métodos moleculares, não são ainda utilizados na maioria das unidades hospitalares, sendo necessário o envio, para laboratórios de referência. Acresce que, a pouca formação em Micologia dada aos profissionais de saúde nas diferentes especialidades tem sido também apontada como um dos motivos para o subdiagnóstico desta e de outras infeções fúngicas. De acordo com os últimos dados publicados pelo *European Confederation on Medical Mycology Working Group*, foram apenas declarados 118 casos de histoplasmose na Europa entre 1995 e 1999 (11), sugerindo uma possível subnotificação ou subdiagnóstico.

## Conclusão

Com o aumento da mobilidade intercontinental das populações aumenta também o número de indivíduos em risco para a infeção por fungos endémicos em alguns países do globo. Assim, e apesar de ser considerada uma doença rara na Europa, a suspeita clínica e consequente diagnóstico da histoplasmose começa a ser mais frequente pelo que devem ser desenvolvidos

sistemas de monitorização e vigilância desta infeção. Clínicos e microbiologistas devem estar em alerta e aumentar o seu conhecimento sobre a patogenicidade, os métodos de diagnóstico diferencial, o tratamento e a evolução do padrão epidemiológico desta e de outras infeções fúngicas.

## Agradecimentos:

Os autores agradecem à Doutora Cristina Furtado pelas sugestões e revisão científica do artigo e ao Doutor Carlos Dias e à Dra. Rita Roquette, do Departamento de Epidemiologia do INSA, pelo apuramento dos dados relativos aos internamentos hospitalares dos GDH.

## Referências bibliográficas:

- (1) Guimaraes AJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Diagnosis of histoplasmosis. *Braz J Microbiol.* 2006;37(1):1-13. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2863343/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2863343/)
- (2) Bonifaz A, Vázquez-González D, Perusquia-Ortiz AM. Endemic systemic mycoses: coccidioidomycosis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and blastomycosis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2011;9(9):705-14.
- (3) Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):115-32. Review. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1797635/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1797635/)
- (4) Loulergue P, Bastides F, Baudouin V, et al. Literature review and case histories of *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* infections in HIV-infected patients. *Emerg Infect Dis.* 2007 Nov;13(11):1647-52. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3375808/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3375808/)
- (5) Antinori S. *Histoplasma capsulatum*: more widespread than previously thought. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(6):982-3. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4047757/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4047757/)
- (6) Toscano V, Batista J, Carvalho R, et al. Imported african histoplasmosis by *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* in a HIV-2 infected patient. 6th Trends in Medical Mycology, Copenhagen, 2013. Poster. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/1813>
- (7) De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al.; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infections. Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008;46(12):1813-21. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2671227/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2671227/)
- (8) Clinical and Laboratory Standards Institute. M54-A - Principles and procedures for detection of Fungi in clinical specimens: direct examination and culture (Approved Guideline, Oct. 2012).
- (9) Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Castelli MV, et al. Performance of panfungal- and specific-PCR-based procedures for etiological diagnosis of invasive fungal diseases on tissue biopsy specimens with proven infection: a 7-year retrospective analysis from a reference laboratory. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1737-40. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3993636/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3993636/)
- (10) Warnock DW, Dupont B, Kauffman CA, et al. Imported mycoses in Europe. *Med Mycol.* 1998;36(Suppl 1):87-94.
- (11) Ashbee HR, Evans EG, Viviani MA, et al.; ECMM Working Group on Histoplasmosis. Histoplasmosis in Europe: report on an epidemiological survey from the European Confederation of Medical Mycology Working Group. *Med Mycol.* 2008;46(1):57-65.
- (12) Wang Y, Pan B, Wu J, et al. Detection and Phylogenetic Characterization of a Case of *Histoplasma capsulatum* Infection in Mainland China. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(6):1180-3. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4047751/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4047751/)
- (13) Panackal AA, Hajjeh RA, Cetron MS, et al. Fungal infections among returning travelers. *Clin Infect Dis.* 2002;35(9):1088-95. <http://cid.oxfordjournals.org/content/35/9/1088.long>

artigos breves\_ n. 5

- (14) Fujio J, Nishimura K, Miyaji M. Epidemiological survey of the imported mycoses in Japan. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 1999;40(2):103-9.  
[www.jstage.jst.go.jp/article/ijmm1990/40/2/40\\_2\\_103/\\_pdf](http://www.jstage.jst.go.jp/article/ijmm1990/40/2/40_2_103/_pdf)
- (15) Richaud C, Chandesris M-O, Lanternier F, et al. Imported African Histoplasmosis in an Immunocompetent Patient 40 Years after Staying in a Disease-Endemic Area. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;91(5):1011-4. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4228866/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4228866/)
- (16) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Infeção por VIH/SIDA em Portugal: situação a 31 de dezembro de 2014. Lisboa: INSA, 2015. (Documento SIDA; 146).  
<http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2448>
- (17) Figueiredo, PC, Pinto-Marques P, Freitas J. Histoplasmose disseminada: apresentação endoscópica. *J Port Gastrenterol*. 2014; 21(4): 167-8.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpg.2013.11.005>
- (18) Borges-Costa J, Marques T, Sacramento-Marques M, et al. Progressive disseminated histoplasmosis as a presentation of AIDS in a patient from the Congo: the role of skin biopsy, 2011. *Trop Doct*. 2011;41(4):251-2.
- (19) Outerelo C, Nortadas R, Gouveia R, et al. Gastrointestinal presentation of disseminated histoplasmosis a transplant recipient. *Port J Nephrol Hypert*. 2012;26(3): 213-6.  
[www.scielo.mec.pt/pdf/nep/v26n3/v26n3a05.pdf](http://www.scielo.mec.pt/pdf/nep/v26n3/v26n3a05.pdf)
- (20) Vieira R, Botelho MM, Lima C, et al. Intra-abdominal abscess: a clinical manifestation of african histoplasmosis. *J Mycol Med*. 2009;19(2):134-7.
- (21) Lopes MJ, Batista J, Trigo D, et al. Histoplasmose africana: apresentação atípica 40 anos após exposição. 14º Encontro Nacional de Atualização em infeciologia, Porto, 2015. Poster
- (22) Marques N, Lebre A, Marques F, et al. Isolated oral histoplasmosis presenting as Fever of unknown origin in a Portuguese hemodialysis patient. *Mycopathologia*.2013;176(1-2):89-93.
- (23) Carvalho D. Histoplasmosis not only a Tropical Disease. *Circulo de Conferencias de Microbiologia, HSM, Lisboa, 2012. Apresentação oral.*

## Caraterização *in vitro* dos efeitos tóxicos da patulina na integridade do epitélio intestinal e potenciais efeitos protetores da cisteína

*In vitro* characterization of patulin toxic effects on intestinal epithelial integrity and potential cysteine protective effects

Ricardo Assunção<sup>1-3</sup>, Carla Martins<sup>1</sup>, Mariana Ferreira<sup>1,4</sup>, Paula Alvito<sup>1,3</sup>

ricardo.assuncao@insa.min-saude.pt

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

(2) Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Évora, Portugal

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

(4) Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

### \_Resumo

A mucosa intestinal é a primeira barreira biológica encontrada pelas micotoxinas presentes nos alimentos, sendo a patulina, uma micotoxina produzida por fungos do género *Penicillium* spp., uma preocupação particular atendendo a que a exposição humana a esta micotoxina pode conduzir a efeitos imunológicos, neurológicos e gastrointestinais. Considerando estes efeitos para a saúde, o presente estudo tem como objetivos a avaliação do efeito tóxico da exposição intestinal a patulina, bem como a determinação do potencial efeito protetor da coadministração de patulina e cisteína na membrana intestinal, utilizando para o efeito células Caco-2. A integridade da membrana intestinal foi determinada pela medição da resistência elétrica transepitelial (TEER). Os resultados evidenciaram um decréscimo acentuado nos valores de TEER após 24 horas de exposição celular a 95 µM de patulina. Para as concentrações mais reduzidas verificou-se uma redução máxima inferior a 25% após 24 horas de exposição. A coadministração de patulina (95 µM) e cisteína (40 µM) revelou um decréscimo nos valores de TEER. O tratamento com cisteína em concentrações superiores (≥400 µM) revelou efeito protetor da membrana intestinal, tendo em conta os valores de TEER. Estes resultados contribuem para uma avaliação do risco mais precisa associada à exposição a contaminantes alimentares.

### \_Abstract

The intestinal mucosa is the first biological barrier encountered by mycotoxins potentially present in foods. Patulin, a mycotoxin produced by fungi of genera *Penicillium*, constitutes an especial concern considering the immunological, neurological and gastrointestinal effects resulting from human exposure. The present work aims to evaluate the intestinal membrane toxic effects occurring after exposure to patulin and the potential protective effects of co-administration of cysteine, using Caco-2 cells. The membrane integrity was determined by evaluation of transepithelial electrical resistance (TEER). Results showed a marked decrease of TEER values after 24 hours of exposure to 95 µM of patulin. For lower concentrations, a TEER reduction below 25% after 24 hours of exposure was verified. Co-administration of patulin (95 µM) and cysteine (40 µM) revealed a TEER decrease. For higher cysteine concentrations (≥400 µM), a protective effect of the intestinal membrane was verified. These results contribute to a more accurate food contaminants risk assessment.

### \_Introdução

O trato gastrointestinal constitui uma importante barreira que separa o interior do corpo humano do ambiente externo, estando diretamente envolvido no metabolismo e transporte de substâncias endógenas e exógenas (1). A mucosa intestinal é a primeira barreira biológica encontrada pelas toxinas presentes na dieta, podendo assim ser exposta a teores elevados destes contaminantes presentes nos alimentos, nomeadamente, as micotoxinas (2,3). As micotoxinas são metabolitos secundários tóxicos de baixo peso molecular produzidos por fungos e representam uma preocupação crescente no domínio da saúde pública. Esta preocupação deve-se essencialmente à toxicidade crónica associada a estes compostos (4). O trato gastrointestinal é a via mais frequente para a exposição a contaminantes alimentares, sendo que os efeitos das micotoxinas na integridade da barreira intestinal deverão ser bem conhecidos e caraterizados. Apesar das centenas de compostos já identificados, as micotoxinas que se consideram de maior importância para a saúde pública são as aflatoxinas, ocratoxina A, patulina, fumonisinas, zearalenona e o grupo dos tricotecenos (5).

A patulina, uma micotoxina produzida por fungos do género *Penicillium* spp. durante o processo de deterioração da fruta, representa uma preocupação particular uma vez que a exposição humana a esta micotoxina pode resultar em toxicidade aguda ou crónica, descrevendo-se como potenciais efeitos de exposição os efeitos imunológicos, neurológicos e gastrointestinais (3). Considerando estes efeitos para a saúde, afigura-se de maior importância um completo entendimento do efeito desta micotoxina na estrutura e função da mucosa intestinal.

artigos breves\_ n. 6

A utilização de metodologias *in vitro* que permitam uma melhor compreensão do comportamento dos contaminantes alimentares no trato gastrointestinal tem despertado um interesse crescente nos últimos anos. Neste sentido, a utilização de culturas de células, nomeadamente células Caco-2, permite uma aproximação ao ambiente do epitélio intestinal humano, constituindo uma ferramenta importante para o estudo dos efeitos da exposição intestinal a micotoxinas, nomeadamente a patulina (6).

A prevenção e/ou redução dos efeitos adversos causados pelas micotoxinas quer nos animais quer para o Homem representa também um assunto de importância crucial, dado o potencial impacto que poderá representar para a proteção da saúde humana.

### \_Objetivos

O presente estudo tem como objetivos a avaliação do efeito tóxico da exposição intestinal a patulina, bem como a determinação do potencial efeito protetor da coadministração de patulina e cisteína na membrana intestinal.

### \_Material e métodos

Os efeitos da exposição a patulina e os potenciais efeitos protetores da coadministração de patulina e cisteína foram aferidos pela caracterização dos seus efeitos *in vitro* na integridade da membrana intestinal, utilizando para o efeito células Caco-2, uma linha celular que constitui um dos modelos celulares *in vitro* mais utilizados para o estudo dos efeitos intestinais de contaminantes químicos. Estas células foram adquiridas à *American Tissue Culture Collection* (ATCC) e mantidas em crescimento em atmosfera de 5% dióxido de carbono a 37°C. As condições para diferenciação das células, desenvolvimento da monocamada de células intestinais Caco-2 e ensaio da integridade da membrana foram realizados de acordo com as condições descritas por Brand e colaboradores, 2010 (7). Por forma a obter uma monocamada de células intestinais diferenciadas (apresentando polos apical e basolateral) as células foram cultivadas em placas de 12 poços de policarbonato com *inserts* (Costar, Corning®) com 0,4 µm de poro. Os ensaios para determinação da integridade da membrana intestinal foram efetuados

após 18 a 21 dias de cultura, por forma a garantir a correta diferenciação das células e a obtenção de monocamada.

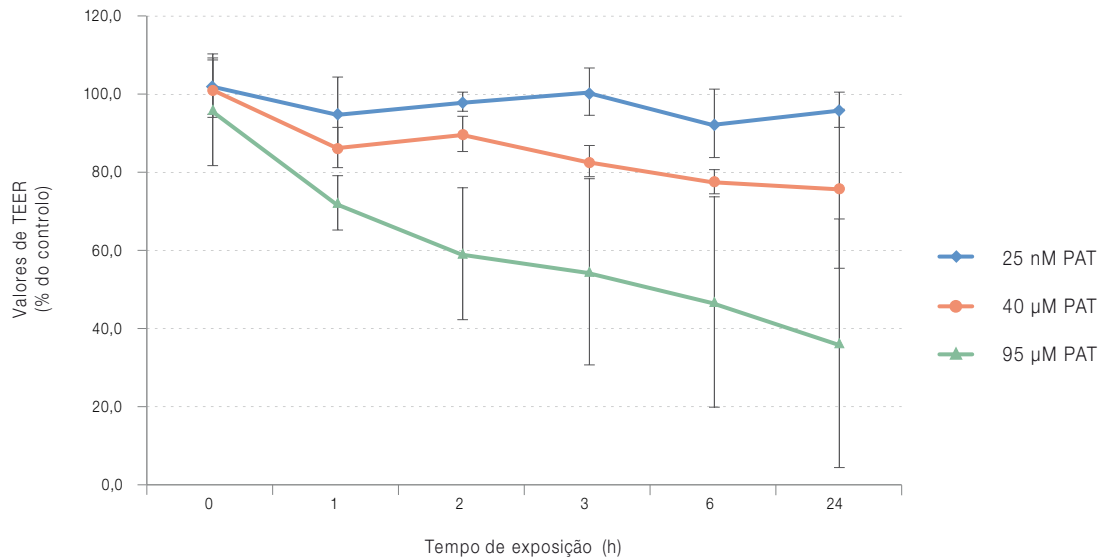
A integridade da membrana após exposição a patulina foi determinada pela medição da resistência elétrica transepitelial (TEER) utilizando para o efeito o equipamento Millicell® ERS Voltohmmeter e testando três concentrações crescentes de patulina diferentes: 25 nM (concentração próxima da exposição real humana através da ingestão de alimentos consumidos na Europa, segundo Majerus e Kapp, 2002) (8), 40 µM e 95 µM. A TEER foi avaliada às 0, 1, 2, 3, 6 e 24 horas exposição. Nos ensaios de coadministração, adicionaram-se três concentrações de cisteína (VWR, Portugal) (40, 400 e 4000 µM) para a mais elevada concentração de patulina testada (95 µM).

### \_Resultados e discussão

Os resultados evidenciaram um decréscimo acentuado (80%) nos valores de TEER após 24 horas de exposição celular a 95 µM de patulina, sendo que este decréscimo se iniciou após 1 hora de exposição. Para as concentrações mais reduzidas (25 nM e 40 µM) verificou-se uma redução máxima inferior a 25% após 24 horas de exposição, conforme expressa a [gráfico 1](#). Estes resultados revelam-se concordantes com os estudos realizados por alguns autores, sugerindo que a patulina altera a função da barreira do epitélio intestinal, nomeadamente através da alteração das *tigh junctions*, apesar deste fenómeno não estar ainda totalmente esclarecido (9-11).

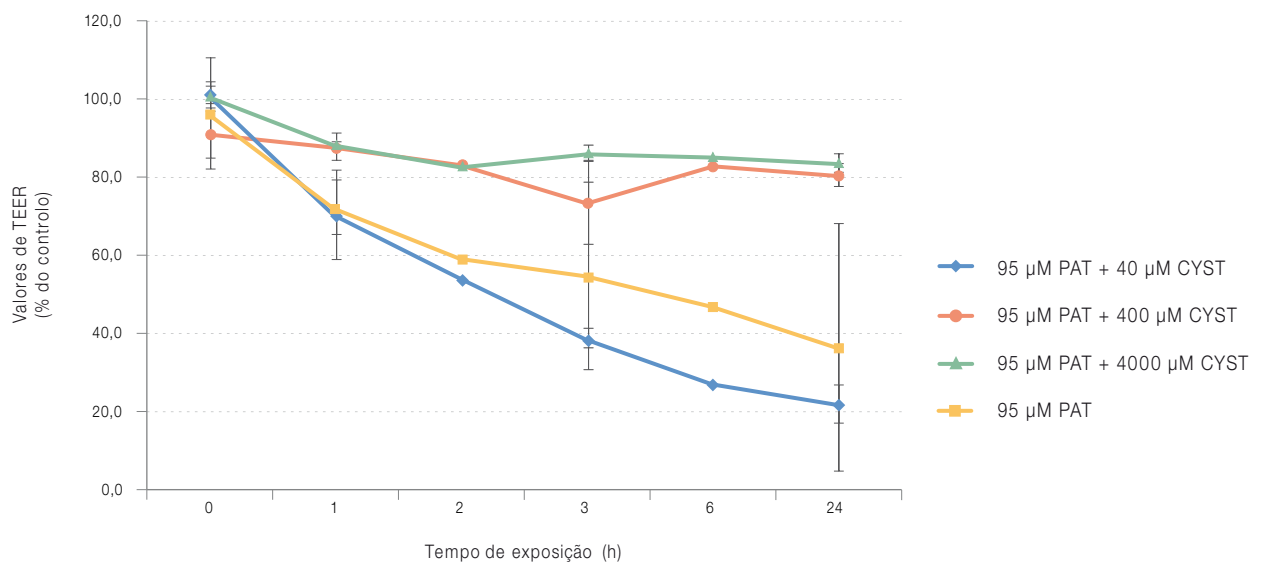
A coadministração de patulina (95 µM) e cisteína (40 µM) revelou um decréscimo nos valores de TEER, contrastando de forma estatisticamente significativa, com os resultados obtidos aquando do tratamento com cisteína em concentração igual ou superior a 400 µM, nos quais não se observaram alterações nos valores de TEER ([gráfico 2](#)). Melo e colaboradores, 2012 (12) estudaram *in vivo* os potenciais efeitos protetores da N-acetilcisteína na degradação do ADN dos órgãos de rato após exposição intraperitoneal a patulina, tendo verificado um efeito protetor dos danos oxidativos motivados por esta toxina, e concordantes com o que foi obtido no presente estudo.

Gráfico 1: Efeito da exposição da monocamada de células Caco-2 a diferentes concentrações de patulina ao longo de 24 horas: 25 nM (n = 2), 40 µM (n = 3) e 95 µM (n = 4).



Os resultados representam a variação na resistência elétrica transepitelial (TEER) relativamente ao controlo (patulina, 0 µM) após 24 horas de exposição e correspondem à média das percentagens de TEER ± DP (desvio padrão).

Gráfico 2: Efeito da coadministração de patulina (95 µM) e cisteína na resistência elétrica transepitelial (TEER) da monocamada de células Caco-2 a diferentes concentrações de cisteína ao longo de 24 horas: 40 µM (n = 2), 400 µM (n = 2) e 4000 µM (n = 2).



Os valores representam a variação na TEER relativamente ao controlo (patulina, 0 µM) após 24 horas de exposição.

Os resultados apresentam a média dos valores de percentagem (do controlo) de TEER ± DP (desvio padrão).

A significância estatística foi avaliada pelo teste *Wilcoxon signed rank test*, comparando os resultados das diferentes concentrações de cisteína e evidenciando  $p < 0,05$  para as concentrações de 400 µM e 4000 µM.

## Conclusões

O presente estudo sugere que a exposição das células Caco-2 a patulina reduz a integridade da barreira da monocamada epitelial do intestino, o que poderá ser minimizado com a co-administração de 400 ou 4000 µM de cisteína.

A utilização de células Caco-2 revela-se assim muito útil na avaliação dos possíveis efeitos da exposição a patulina, nomeadamente no estudo dos mecanismos de ação decorrentes da exposição do intestino a contaminantes alimentares. Estes resultados disponibilizam uma abordagem preliminar ao processo de absorção e transporte que ocorre após o processo de digestão de alimentos contaminados com micotoxinas, contribuindo para uma avaliação do risco mais precisa associada à exposição a contaminantes alimentares.

## Financiamento:

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto "MycoMix" (PTDC/DTP-FTO/0417/2012) e CESAM: UID/AMB/50017/2013, ambos financiados pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

## Artigo baseado em:

Assunção R, Ferreira M, Martins C, Diaz I, Padilla B, Dupont D, Bragança M, Alvito P. Applicability of in vitro methods to study patulin bioaccessibility and its effects on intestinal membrane integrity. *J Toxicol Environ Health A*. 2014;77(14-16):983-92.

## Referências bibliográficas:

- (1) Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):141-53.
- (2) Pinton P, Oswald IP. Effect of deoxynivalenol and other Type B trichothecenes on the intestine: a review. *Toxins (Basel)*. 2014;6(5):1615-43. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4052256/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4052256/)
- (3) Puel O, Galtier P, Oswald IP. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins (Basel)*. 2010;2(4):613-31. Review. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3153204/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3153204/)
- (4) Kuiper-Goodman T. Food safety: mycotoxins and phycotoxins in perspective. In: Miraglia M, van Edmond H, Brera C, et al. (eds.). *Mycotoxins and phycotoxins—developments in chemistry, toxicology and food safety*. Fort Collins, CO: Alaken, 1998, pp. 25-48.
- (5) Yang J, Li J, Jiang Y, et al. Natural occurrence, analysis, and prevention of mycotoxins in fruits and their processed products. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(1):64-83.
- (6) Turco L, Catone T, Caloni F, et al. Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: how reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicol In Vitro*. 2011;25(1):13-20. Epub 2010 Aug 21.
- (7) Brand W, Padilla B, van Bladeren PJ, et al. The effect of co-administered flavonoids on the metabolism of hesperetin and the disposition of its metabolites in Caco-2 cell monolayers. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(6):851-60.
- (8) Majerus P, Kapp K. Assessment of dietary intake of Patulin by the population of EU Member States: report on tasks for scientific cooperation: report of experts participating in Task 3.2.8. Brussels: Directorate General Health and Consumer Protection, 2002. [http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.8\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.8_en.pdf)
- (9) Mohan HM, Collins D, Maher S, et al. The mycotoxin patulin increases colonic epithelial permeability in vitro. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(11):4097-102.
- (10) McLaughlin J, Lambert D, Padfield PJ, et al. The mycotoxin patulin, modulates tight junctions in caco-2 cells. *Toxicol In Vitro*. 2009;23(1):83-9. Epub 2008 Oct 29.
- (11) Mahfoud R, Maresca M, Garmy N, et al. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002;181(3):209-18.
- (12) de Melo FT, de Oliveira IM, Greggio S, et al. DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(10):3548-55. Epub 2011 Dec 23.

## Quantificação de iodo em alimentos consumidos em Portugal: resultados preliminares

### Iodine quantification in food consumed in Portugal: preliminary results

Inês Delgado<sup>1</sup>, Inês Coelho<sup>1</sup>, Pedro Andrade<sup>2</sup>, Carolina Antunes<sup>3</sup>, Isabel Castanheira<sup>1</sup>, Maria Antónia Calhau<sup>1</sup>

Isabel.castanheira@insa.min-saude.pt

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

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

(3) Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Lisboa, Portugal

#### \_Resumo

O iodo é um oligoelemento indispensável para a síntese das hormonas da tiroide. A alimentação é a maior fonte natural de iodo. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi a determinação de iodo em alimentos como consumidos e representativos da dieta portuguesa. A metodologia escolhida para a quantificação deste nutriente foi a espectrometria de massa acoplada ao plasma indutivo (ICP-MS). Analisaram-se seis grupos de alimentos: peixes, mariscos e bivalves, leite e derivados, vegetais, fruta e refeições compostas. Os grupos do pescado (peixe, marisco e bivalves) foram os que apresentaram concentrações de iodo mais elevadas, com um valor médio de 114 µg/100g. Os laticínios são também uma fonte importante para suprir o aporte diário de iodo (150 µg/dia) apresentados valores médios de 22 µg/100g. Os resultados permitem concluir que em Portugal uma alimentação rica em pescado e laticínios supre a dose diária recomendada de iodo para um adulto saudável.

#### \_Abstract

Iodine is an essential trace element for the synthesis of thyroid hormones. Food is the largest natural source of iodine. Therefore, the main objective of this work was the determination of iodine in foods as consumed and representative of the Portuguese diet. The methodology selected for the quantification of this nutrient was inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Six groups of food were analyzed: fish, seafood and shellfish, dairy products, vegetables, fruit and meals. Seafood groups (fish, shellfish and bivalves) showed the highest concentrations of iodine, with an average of 114 µg/100g. Dairy products are also a major source to supply the daily intake of iodine (150 µg/day) presented average values of 22 µg/100g. The results show that in Portugal a diet rich in fish and dairy products supplies the recommended daily intake of iodine for a healthy adult.

#### \_Introdução

O iodo é um elemento vestigial essencial na dieta humana e animal, com uma importância nutricional bem estabelecida. É indispensável para a síntese das hormonas da tiroide, tiroxina e triiodotironina, cujo principal papel está relacionado com o crescimento e desenvolvimento dos órgãos, em particular do

cérebro. A fonte natural de iodo são os alimentos. A deficiência crónica de iodo pode levar a distúrbios que incluem alterações cognitivas com diminuição das capacidades de aprendizagem, bócio, mortalidade infantil e hipotiroidismo (1).

Na Europa, de acordo com as recentes publicações da OMS e do projeto EURRECA, mais de metade da população sofre de insuficiência moderada de iodo e em um terço da população mundial, gestantes, crianças e adultos saudáveis não gestantes é observada carência iodada (2,3). Em Portugal, estudos recentes mostraram deficiências de iodo significativas em mulheres grávidas e um aporte inadequado em mais de 50% das crianças portuguesas, com especial incidência nos Açores e Madeira (4). Deste modo, desde 2013 que a Direção-Geral da Saúde recomenda a suplementação de grávidas com iodeto de potássio e a Direção-Geral da Educação introduziu sal iodado nas cantinas escolares (5,6).

#### \_Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal a caracterização do teor de iodo em alimentos representativos da dieta portuguesa. Compreendeu ainda o estabelecimento de procedimentos analíticos robustos por ICP-MS, em condições de reprodutibilidade para realização de medições rastreáveis às unidades do Sistema Internacional.

#### \_Materiais e métodos

A recolha dos alimentos para análise seguiu um plano de amostragem, representativo da dieta portuguesa, delineado no projeto *Total Diet Study Exposure*. O plano incluiu seis grupos de alimentos: peixes, mariscos e bivalves, leite e derivados, vegetais, fruta e refeições compostas. Os 480 alimentos recolhidos

artigos breves\_ n. 7

foram analisados, como consumidos, em 40 *pools*, cada uma constituída por 12 alimentos idênticos.

O teor de iodo foi determinado por espectrometria de massa com plasma indutivo acoplado (ICP-MS) tendo como referência a Norma EN 15111:2007 (7). Os resultados foram obtidos em triplicado em condições de garantia da qualidade suportados pelos requisitos descritos na Norma NP EN ISO/IEC 17025:2005 (8). O teor de iodo foi expresso em  $\mu\text{g}$  de iodo por 100g de alimento, seguindo as recomendações do EuroFIR (*European Food Information Resource*), sobre modos de expressão dos nutrientes nas bases de dados de composição de alimentos.

**Resultados e discussão**

No gráfico 1 são apresentados exemplos dos teores de iodo obtidos em diferentes grupos de alimentos. Os resultados de iodo obtidos para os grupos são, de um modo geral diferentes. Os dados foram sequenciados por ordem decrescente da sua concentração em Marisco/Bivalves > Peixe > Laticínios > Refeições > Vegetais > Frutas.

O pescado, compreendendo todos os alimentos provenientes do mar, é o grupo mais rico em iodo, variando entre um máximo de  $114 \mu\text{g}/100\text{g}$  (mariscos e bivalves) e um mínimo de  $32 \mu\text{g}/100\text{g}$  (peixe). Entre os alimentos estudados, no grupo dos laticínios, constatou-se semelhança entre o teor de iodo no leite ( $16 \pm 1 \mu\text{g}/100\text{g}$ ) e no iogurte ( $18 \pm 0,2 \mu\text{g}/100\text{g}$ ). As refeições à base de pescado apresentaram teores médios de iodo de  $10 \mu\text{g}/100\text{g}$ , um valor muito inferior ao observado no primeiro grupo, devido provavelmente ao baixo teor de iodo no arroz e batata, ingredientes que compõem para além do peixe, estas refeições. A concentração de iodo nos produtos agroalimentares (vegetais e frutas) é próxima do limite de quantificação do método, refletindo provavelmente a escassez de iodo nos solos e as práticas de cultivo.

Considerando que, para um adulto a dose diária recomendada (DDR) de iodo é de  $150 \mu\text{g}$  por dia e tendo em conta as porções de 100 g ou 100 ml de alimento calculou-se a contribuição de cada grupo para a Dose Diária Recomendada, os resultados são apresentados no gráfico 2.

Gráfico 1: Teor de iodo em alimentos portugueses expressos pela média e desvio padrão (n=3).

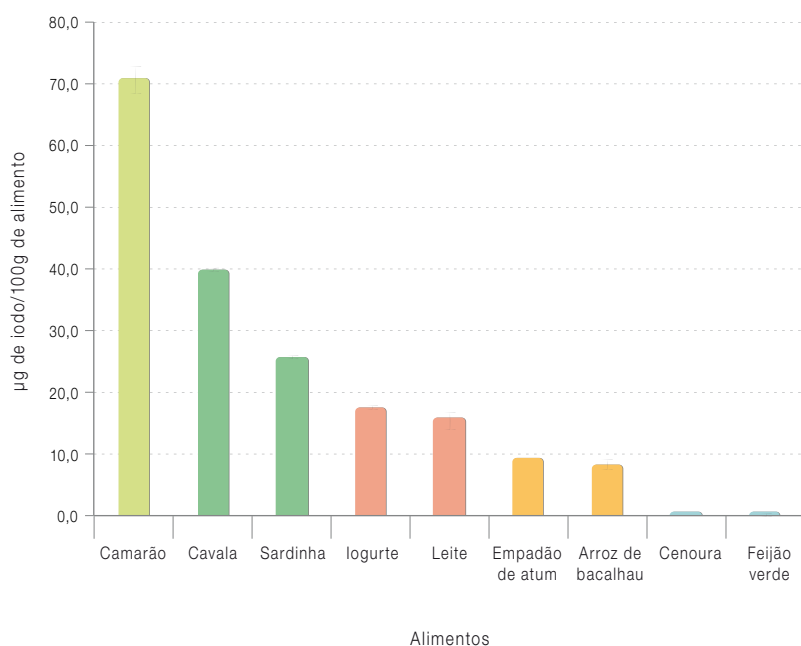
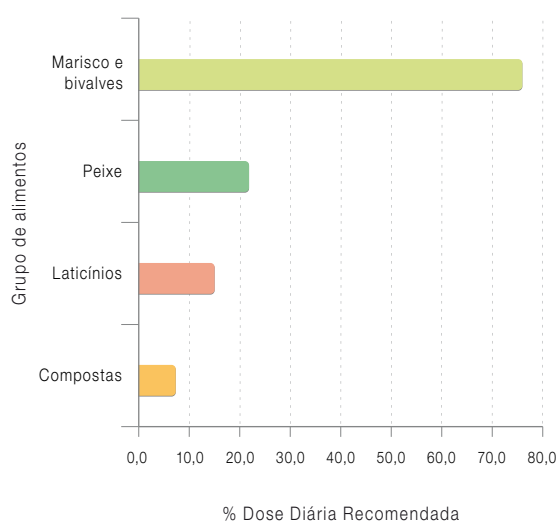


Gráfico 2: Contribuição de cada grupo de alimentos portugueses para o aporte diário de iodo, em adultos.



Como se pode observar pela análise do gráfico, o pescado é a maior fonte de iodo, seguida pelos laticínios. Os grupos da fruta e dos vegetais não foram considerados relevantes para o cálculo do aporte de iodo, por o seu valor ser próximo do limite de quantificação do método.

## \_Conclusões

O método analítico reportado neste trabalho, evidencia a importância de determinar quantidades de iodo na ordem dos ppb. O desempenho do ICP-MS é por isso adequado para avaliar o teor de iodo num leque bastante largo de alimentos.

Quantificar iodo em alimentos como consumidos, permite estimar o seu aporte diário, com dados reais revelando-se muito útil por não existirem, na literatura científica tabelas com dados de retenção de iodo em alimentos quando cozinhados.

O pescado analisado é uma boa fonte de iodo enquanto os laticínios e as refeições compostas à base de peixe contribuem para assegurar uma percentagem relevante da dose diária de iodo. Assim, os dados ainda que preliminares, permitem concluir que uma alimentação rica em peixe e laticínios supre a dose diária adequada (150 µg/dia) para adultos saudáveis, não gestantes.

### Referências bibliográficas:

- (1) Rohner F, Zimmermann M, Jooste P, et al. Biomarkers of nutrition for development-iodine review. *J Nutr.* 2014;144(8):1322S-42S. Review. <http://jn.nutrition.org/content/144/8/1322S.long>
- (2) Santana Lopes M, Jácome de Castro J, Marcelino M, et al.; Grupo de Estudos da Tiróide. Iodo e tiróide: o que o clínico deve saber. *Acta Med Port.* 2012;25(3):174-8. [www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/44/46](http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/44/46)
- (3) Ristić-Medić D, Novaković R, Glibetić M, et al. EURRECA-Estimating iodine requirements for deriving dietary reference values. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(10):1051-63.
- (4) Limbert E, Prazeres S, Madureira D, et al. Aporte do iodo nas Regiões Autónomas da Madeira e dos Açores. *Rev Port Endocrinol Diabetes Metab.* 2012;7(2):2-7. [www.elsevier.pt/pt/revistas/revista-portuguesa-endocrinologia-diabetes-e-metabolismo-356/artigo/aporte-do-iodo-nas-regioes-autonomas-da-madeira-X1646343912851983](http://www.elsevier.pt/pt/revistas/revista-portuguesa-endocrinologia-diabetes-e-metabolismo-356/artigo/aporte-do-iodo-nas-regioes-autonomas-da-madeira-X1646343912851983)
- (5) Direção-Geral da Saúde. Orientação nº 11/2013, de 26 de agosto. Aporte de iodo em mulheres na pré-conceção, gravidez e amamentação. [www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-0112013-de-26082013-png.aspx](http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-0112013-de-26082013-png.aspx)
- (6) Direção-Geral da Educação. Circular nº 3/DSEEAS/DGE/2013, de 2 de agosto. Orientações sobre ementas e refeitórios escolares - 2013/2014. [www.dge.mec.pt/sites/default/files/AcaoSocialEscolar/orientacoes\\_ementas\\_e\\_refeitorios\\_escolares\\_circular\\_1\\_agosto.pdf](http://www.dge.mec.pt/sites/default/files/AcaoSocialEscolar/orientacoes_ementas_e_refeitorios_escolares_circular_1_agosto.pdf)
- (7) ES EN 15111:2007. Foodstuffs. Determination of trace elements. Determination of iodine by ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry).
- (8) NP EN ISO/IEC 17025:2005. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.

## Doenças do metabolismo do colesterol: cromatografia de esteróis no diagnóstico de 25 casos em Portugal

*Cholesterol synthesis defects: sterol analysis in the diagnosis of 25 Portuguese patients*

Carla Valongo, Aureliano Jorge Dias, Mónica Sofia Leite, Laura Vilarinho

[laura.vilarinho@insa.min-saude.pt](mailto:laura.vilarinho@insa.min-saude.pt)

Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética, Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal.

### \_Resumo

Os esteróis desempenham um papel fundamental nos processos fisiológicos de praticamente todos os organismos vivos. O esterol mais abundante nos seres humanos é o colesterol, o qual desempenha uma multiplicidade de funções desde a estrutural à sinalização. A extração e análise de esteróis no plasma é complexa devido à sua insolubilidade, sequestração dentro das lipoproteínas e à grande diferença entre cada tipo de esterol. Os autores apresentam a casuística referentes à análise de 13 esteróis e fitosteróis em plasma e líquido amniótico.

### \_Abstract

*Sterols play essential roles in the physiological processes of virtually all living organisms. In Man, the most abundant sterol is cholesterol, which has a myriad of functions in biology, ranging from structural to signaling. The extraction and analysis of sterols in human plasma present a unique challenge due to their virtual insolubility, sequestration within lipoproteins, and dramatic differences in the levels of individual sterols. We present our positive results of the analysis of 13 sterols and phytosterols from human plasma and amniotic fluid in a single GC-MS run.*

### \_Introdução

O colesterol é o principal lípido encontrado nas células de mamíferos (1). Para além de desempenhar um papel estrutural nas membranas celulares e na bainha de mielina é também um precursor de vários compostos tais como ácidos biliares, oxisteróis, neuroesteróis, glucocorticoides, mineralocorticoides e hormonas sexuais (testosterona e estrogénio). O colesterol encontra-se igualmente envolvido no ciclo celular, na sinalização durante o desenvolvimento embrionário e, devido à variedade de funções biológicas atribuídas ao colesterol, a sua depleção durante a gravidez provoca consequências graves no desenvolvimento fetal (2,3).

Na literatura, diferentes estudos têm demonstrado que várias síndromes malformativas humanas são devidas a mutações genéticas que envolvem enzimas da biossíntese do colesterol e são caracterizadas pela acumulação de níveis anormais de esteróis nos fluídos biológicos e tecidos, nomeadamente: síndrome de Smith-Lemli-Opitz; desmosterolose; síndrome de Conradi-Hünemann-Happle (Condrodisplasia puntacta tipo 2 dominante ligada ao X) e latosterolose. Outras Doenças Hereditárias do Metabolismo envolvidas nos defeitos de absorção e catabolismo do colesterol estão igualmente descritas, nomeadamente a sitosterolinemia e a xantomatose cerebrotendinosa (quadro 1) (4-9).

*Síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS, MIM #270400):* É a doença metabólica da biossíntese do colesterol mais frequente e melhor caracterizada, descrita pela primeira vez em 1964 e com uma incidência estimada de 1/10.000 a 1/60.000 recém-nascidos vivos (8).

*Desmosterolose (MIM #602398):* Desta patologia encontram-se descritos na literatura apenas três casos, todos com diferente apresentação clínica (9-10). O quadro clínico é sobreponível com a SLOS e até à data não existe tratamento eficaz para a desmosterolose (9).

*Síndrome de Conradi-Hünemann-Happle (CDPX2, MIM #302960):* A CDPX2 tem uma hereditariedade ligada ao cromossoma X e é frequentemente letal nos indivíduos do sexo masculino. O fenótipo nos doentes afetados do sexo feminino é extremamente variado, podendo os casos mais graves ser incompatíveis com a vida devido a alterações esqueléticas

Quadro 1: ⬇ Erros inatos da síntese, absorção e catabolismo do colesterol diagnosticados pela cromatografia de esteróis (5-10).

Patologia	Enzima/proteína deficitária	Gene, Cromossoma e Modo transmissão	Cromatografia de esteróis	Clínica
CDPX2	3β-hidroxiesterol Δ8-Δ7 isomerase	<i>EBP</i> Xp11.22-23 AD, ligada ao X	↑8(9)-colestenol ↑8-DHC N-↓Colesterol	Alterações cutâneas (eritoderma icforme no recém-nascido, lesões lineares, atróficas e pigmentares em criança e hiperqueratose estriada e alopecia em adultos), cataratas e alterações esqueléticas (baixa estatura, encurtamento assimétrico dos ossos longos, baixa estatura, escoliose, calcificações da traqueia, laringe e epífises dos ossos longos e alterações crânio-faciais).
Desmosterolose	3β-hidroxiesterol Δ24 redutase	<i>DHCR24</i> 1p3.1-33 AR	↑Desmosterol N-↓Colesterol	Malformações congénitas múltiplas esqueléticas e do SNC (macrocefalia, ponte nasal hipoplástica, nódulos gengivais, fenda palatina, ambiguidade sexual, encurtamento dos membros e osteoclerose generalizada, dismoria facial, microcefalia, e atraso de desenvolvimento profundo).
Latosterolose	3β-hidroxiesterol Δ5 insaturase	<i>SC5D</i> 11q23.3 AR	↑Latosterol N-Colesterol	Microcefalia grave, testa ampla, narinas antevertidas, micrognatia, lábio superior proeminente, palato arqueado, hexadactilia pós-axial do pé direito e sindactilia entre o 2º e 4º dedo e entre o 5º e um extra. Desde a infância com doença hepática colestática e atraso de desenvolvimento psicomotor grave.
SLO	3β-hidroxiesterol Δ7 redutase	<i>DHCR7</i> 11q12-13 AR	↑7-DHC ↑8-DHC N-↓↓Colesterol	Microcefalia, narinas antevertidas, queixo pequeno, micrognatia, fenda palatina ou úvula bífida, esteatose do piloro, cataratas, ptose, estrabismo, nistagmo, fotossensibilidade, rizomelia e polidactilia pós-axial das mãos ou dos pés, sindactilia dos 2º e 3º dedos dos pés e polegares de implantação proximal e curtos. Anomalias genitais, cardiovasculares, gastrointestinais, pulmonares e renais. Atraso de desenvolvimento profundo pré e pós-natal, atraso mental, ascite neonatal, icterícia colestática, fotossensibilidade, múltiplos traços autistas, hiperatividade, comportamento auto-agressivo e perturbações do sono.
CTX	esterol 27-hidroxiase	<i>CTX</i> 2q35 AR	↑Colestanol N-Colesterol	Icterícia colestática, cataratas, atraso mental na infância. Alterações motoras e xantomas tendinosos na 2ª ou 3ª década de vida. Arteriosclerose prematura que pode levar à morte de alguns doentes devido a enfarte do miocárdio. Noutros casos a doença neurológica progressiva torna-se letal.
β-sitosterolemia	transportador heterodimérico ABCG5/G8	<i>ABCG5/ ABCG8</i> 2p21 AR	↑β-sitosterol(nol), ↑Campesterol(nol), ↑Estigmasterol N-↑Colesterol	Xantomas tuberosos e tendinosos, doença cardiovascular, arteriosclerose precoce. Alterações hemolíticas (anemia, hemólise esporádica, reticulatose, estomatose e macrotrombocitopenia). Artrite, esplenomegalia e dor abdominal

AD- transmissão autossómica dominante; AR- transmissão autossómica recessiva, CDPX- síndrome de Conradi-Hünemann-Happle ligada ao X dominante; CTX- xantomatose cerebrotendinosa; N- Normal; SLO- síndrome de Smith-Lemli-Opitz; ↑- aumento; ↓- diminuição

e internas graves. Com uma incidência estimada inferior a 1/400.000 nados-vivos a qual poderá estar subestimada devido à dificuldade de diagnóstico dos casos mais ligeiros bem como aos possíveis diagnósticos incorretos (10).

*Latosterolose (MIM #607330)*: O primeiro caso a ser diagnosticado foi em 2002 por Burnett-Pierr e colaboradores, e apenas se encontram descritos na literatura quatro casos (8). A apresentação clínica assemelha-se à SLOS podendo, por vezes, levar a erros de diagnóstico.

*Sitosterolinemia (fitosterolinemia, MIM #210250)*: É uma doença rara da captação e armazenamento de esteróis originando um aumento da absorção dietética de colesterol e esteróis vegetais, associado à incapacidade hepática em excretar esses esteróis pela biliar (5,6). Estudos recentes demonstraram que as alterações hematológicas características da sitosterolinemia podem estar subvalorizadas, podendo até esta doença ser confundida com outros tipos de trombocitopenia crónica, corroborando o conceito de que a fitosterolinemia pode não ser tão rara quanto se estima (5). A terapêutica disponível passa por uma restrição alimentar em fitosteróis e marisco, compostos sequestrantes de ácidos biliares (colesteramina) e inibidores da absorção de esteróis (ezetimibe), esta última tem-se revelado bastante promissora (5,6).

*Xantomatose cerebrotendinosa (CTX, MIM #213700)*: A CTX, doença rara do metabolismo dos sais biliares, é caracterizada pela acumulação de colesterol e colestanol nos fluidos biológicos e tecidos (7).

Estudos apontam que a idade média de doentes diagnosticados com CTX é de 35 anos e o diagnóstico definitivo demora cerca de 16 anos. O diagnóstico precoce e o tratamento a longo prazo com ácido quenodeoxicólico (750 mg/d) podem trazer melhorias a nível dos sintomas neurológicos e contribuir para um prognóstico favorável (7).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) tem sido a técnica de eleição na análise de esteróis plasmáticos. A sua aplicabilidade ao líquido amniótico (LA) e às vilosidades coriônicas permite o diagnóstico pré-natal de SLOS (2).

### **\_Objetivo**

No presente trabalho é evidenciada a importância da cromatografia de esteróis no diagnóstico pré e pós-natal de Doenças Hereditárias do Metabolismo que afetam a biossíntese, absorção e catabolismo do colesterol, sendo apresentada a casuística referentes à análise de 13 esteróis e fitosteróis em plasma e líquido amniótico.

### **\_Material e métodos**

A análise é efetuada sobre amostras de sangue (plasma ou soro) e de LA proveniente de diferentes hospitais distribuídos em Portugal. O sangue é colhido para tubos contendo EDTA/heparina de lítio e posteriormente é centrifugado 10 min a 3500 rpm. O LA é centrifugado 10 min a 2000 rpm para remover todo o material celular e o respetivo sobrenadante é conservado a -20°C para posterior análise.

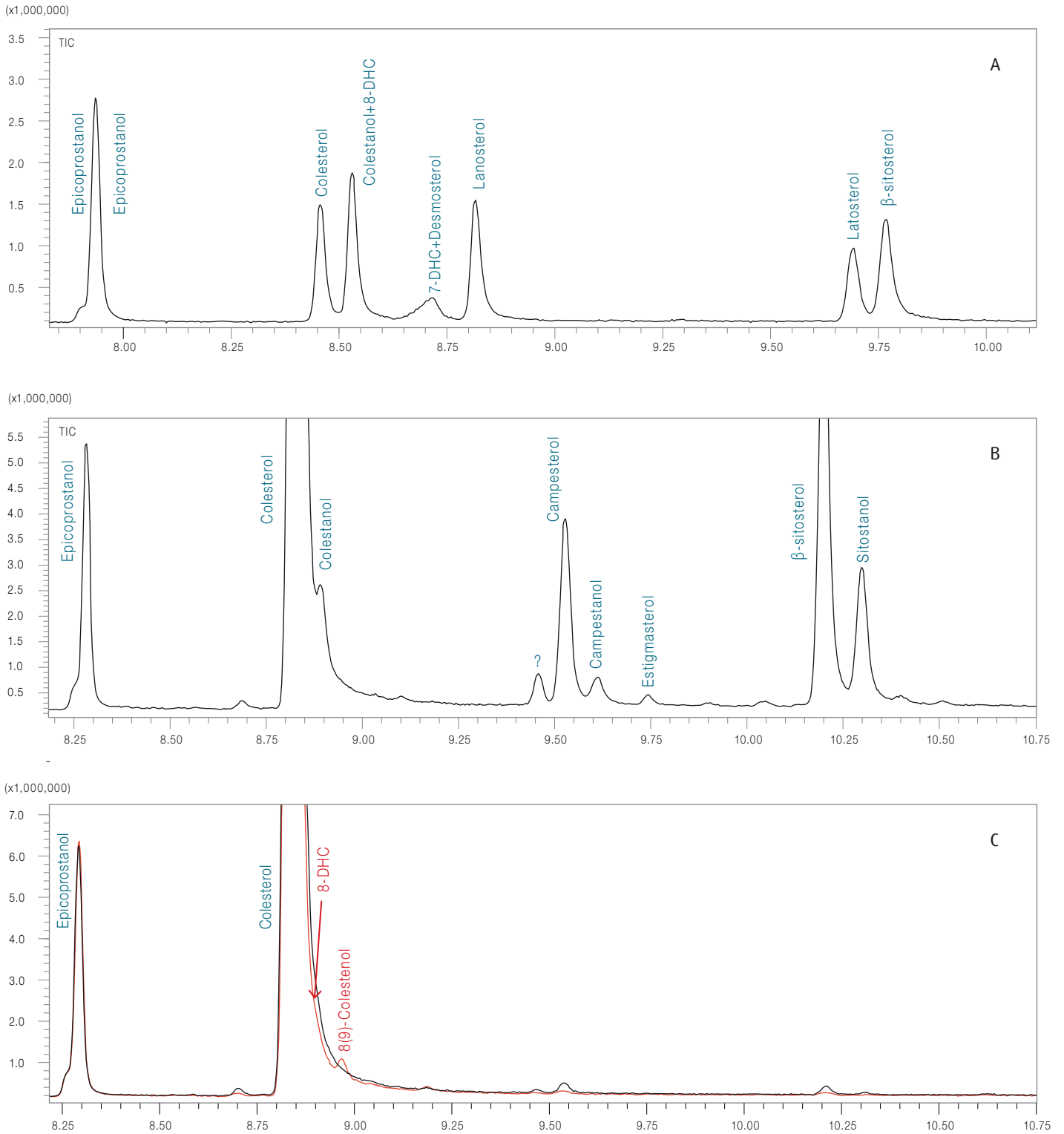
O método de extração e análise utilizado foi previamente descrito (2,11). O equipamento usado é um GC-MS-Fast QP2010Plus (Shimadzu Co., Duisburg, Alemanha) para a análise simultânea de sete produtos da biossíntese do colesterol (8-deidrocolesterol (8-DHC), 7-DHC, 8(9)-colestenol, desmosterol, lanosterol, latosterol e colesterol), um produto do catabolismo do colesterol (colestanol) e vários fitosteróis e fitostanois (b-sitosterol, campesterol, estigmasterol, sitostanol e campestanol) (figura 1).

### **\_Resultados e discussão**

Desde a implementação da cromatografia de esteróis para diagnóstico de doenças da biossíntese do colesterol, em 2002, foram identificados 25 doentes: 17 doentes com SLOS (15 diagnósticos pós-natal e dois de pré-natal), dois casos de CDPX2, sendo um deles do sexo masculino, cinco doentes com CTX e um caso de sitosterolinemia.

Para além das patologias descritas anteriormente, outro défice da síntese do colesterol foi também diagnosticado mas recorrendo a estudos moleculares como é o caso da síndrome de CHILD (Hemidisplasia Congénita com Eritrodermia Ictiosiforme) (4). Nas restantes doenças do metabolismo do colesterol que não dispõem de um marcador bioquímico patognomónico recorre-se a estudos genéticos de forma a confirmar/excluir a suspeita clínica como é o caso do síndrome de Antley-Bixley, síndrome CK, displasia de Greenberg, défice da oxidase dos C4-metilesteróis, para além do síndrome de CHILD.

Figura 1: Cromatografia de esteróis plasmáticos por CG-MS-Fast.



Epicoprostanol- padrão interno; 7-DHC- 7-dehidrocolesterol; 8-DHC- dehidrocolesterol.

A- Cromatograma de uma solução padrão de esteróis (10 μmol/L); B- Cromatograma de doente com sitosterolinemia; C- Comparação de perfis cromatográficos: traçado preto - perfil normal, traçado vermelho - perfil de doente com CDPX2.

## Conclusões

A Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge disponibiliza, a nível nacional, o diagnóstico bioquímico e molecular dos erros inatos da síntese, absorção (fitosteróis) e catabolismo (via metabólica dos sais biliares) do colesterol.

A alta sensibilidade, que permite o uso de pequenos volumes de amostra, bem como um reduzido tempo de análise, corroboram o facto de a cromatografia de esteróis ser a abordagem preferencial na análise destes metabolitos em amostras biológicas.

Nestas doenças, a heterogeneidade fenotípica dificulta o seu reconhecimento pelo clínico, o que contribuiu para o subdiagnóstico deste grupo de patologias raras.

### Referências bibliográficas:

- (1) Honda A, Yamashita K, Miyazaki H, et al. Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS. *J Lipid Res.* 2008;49(9):2063-73. [www.jlr.org/content/49/9/2063.long](http://www.jlr.org/content/49/9/2063.long)
- (2) Amaral C, Gallardo E, Rodrigues R, et al. Quantitative analysis of five sterols in amniotic fluid by GC-MS: application to the diagnosis of cholesterol biosynthesis defects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(23):2130-6.
- (3) Cardoso ML, Bandeira A, Lopes A, et al. A síndrome de Smith-Lemli-Opitz: características fenotípicas e genotípicas dos doentes portugueses. *Acta Pediatr Port.* 2012;43(2):47-52. <http://actapediatrica.spp.pt/article/view/1100/893>
- (4) Cardoso ML, Barbosa M, Serra D, et al. Living with inborn errors of cholesterol biosynthesis: lessons from adult patients. *Clin Genet.* 2013;85(2):184-8.
- (5) Escolà-Gil JC, Quesada H, Julve J, et al. Sitosterolemia: Diagnosis, Investigation, and Management. *Curr Atheroscler Rep.* 2014;16:424.
- (6) Ajagbe BO, Othman RA, Myrie S B. Plant Sterols, Stanols, and Sitosterolemia. *J AOAC Int.* 2015;98(3):716-23. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4514516/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4514516/)
- (7) Nie S, Chen G, Cao X, et al. Cerebrotendinous xanthomatosis: a comprehensive review of pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and management. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:179. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4264335/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4264335/)
- (8) Porter FD, Herman GE. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *Lipid Res.* 2011;52(1):6-34. [www.jlr.org/content/52/1/6.long](http://www.jlr.org/content/52/1/6.long)
- (9) Kanungo S, Soares N, He M, et al. Sterol metabolism disorders and neurodevelopment - an update. *Dev Disabil Res Rev.* 2013;17(3):197-210.
- (10) Herman GE, Kratz L. Disorders of sterol synthesis: beyond Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2012;160C(4):301-21.
- (10) Cardoso ML, Balreira A, Martins E, et al. Molecular studies in Portuguese patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome and report of three new mutations in DHCR7. *Mol Genet Metab.* 2005;85(3):228-35.

## A importância do uso de métodos complementares para a avaliação da toxicidade de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

*Toxicity assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: the importance of the use of complementary methods*

Patrícia I. Morgado, Luísa Jordão

maria.jordao@insa.min-saude.pt

Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

### \_Resumo

Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) e seus derivados Halogenados (HHAPs) são conhecidos como um conjunto de contaminantes ambientais, classificados como potencialmente tóxicos, mutagénicos e carcinogénicos, sendo um assunto de extrema importância e preocupação para a saúde pública. Diversos estudos têm reportado o potencial efeito tóxico destes compostos após longos períodos de exposição, pelo uso de métodos colorimétricos como o ensaio de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e vermelho neutro. Contudo, apesar de estes métodos clássicos de avaliação da citotoxicidade *in vitro* permitirem, de forma rápida, identificar as propriedades nocivas dos compostos, não permitem compreender os mecanismos moleculares subjacentes responsáveis pela sua toxicidade. Deste modo, no presente estudo, para avaliar os efeitos à exposição aos compostos Pireno (Pir) e seu derivado resultante da desinfecção de águas por bromação, 1-BromoPireno (1-BrPir), foram utilizados outros métodos complementares como avaliação do stress oxidativo e vários fenómenos associados à morte celular programada. Os resultados obtidos comprovam não só a existência de efeitos citotóxicos dos poluentes quando acumulados, como também possíveis efeitos genotóxicos. Assim, pelos métodos complementares, foi possível a identificação de alvos moleculares passíveis de ação farmacológica, o que pode constituir o primeiro passo para o desenho de estratégias terapêuticas que visem prevenir ou tratar os danos provocados por estes poluentes no Homem.

### \_Abstract

*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and their halogenated derivatives (HPAHs) are known as a set of environmental contaminants classified as potentially toxic, mutagenic and carcinogenic, being a matter of utmost importance and concern to public health. Several studies have reported the potential toxic effects of these compounds after long periods of exposure by the use of colorimetric methods such as 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and neutral red. Nonetheless, despite these classic *in vitro* cytotoxicity assays allow, in a faster way, the identification of the harmful properties of the compounds, they fail in elucidating the underlying molecular mechanisms responsible for their toxicity. Taking into account these mentioned aspects, in the present work, other complementary methods were used in order to evaluate the effects of the exposure to Pyrene (Pyr) and to a brominated-pyrene derivative (resulted from water disinfection), 1-BromoPyrene (1-BrPyr). Effectively, by the evaluation of the oxidative stress and programmed cell death induced by PAHs it was not only possible*

*to verify the cytotoxic effects of PAHs when accumulated but also their potential genotoxic effects. In conclusion, through the use of other tests than the classic cytotoxicity assays, it was possible to identify potential druggable molecular targets which can be the first step towards the development of new therapeutic strategies either to prevent or treat the damage caused by these compounds in Humans.*

### \_Introdução

Os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) são conhecidos como um conjunto de contaminantes ambientais, formados por dois ou mais anéis aromáticos condensados, sendo as suas principais fontes de emissão a queima espontânea de florestas, incêndios, emissões vulcânicas, combustão incompleta de matéria orgânica e, de uma forma mais próxima, através das emissões automóveis e fumo de tabaco (1).

HAPs estão amplamente distribuídos na atmosfera e foram dos primeiros poluentes classificados como potencialmente tóxicos, mutagénicos e carcinogénicos, sendo um assunto de extrema importância e preocupação para a saúde pública (2). O facto de serem compostos altamente hidrofóbicos e lipofílicos facilita a sua absorção pelos pulmões, tubo digestivo e pele e posterior acumulação no tecido adiposo dos seres humanos. Uma vez na atmosfera podem ser transportados para longas distâncias antes de serem depositados, por precipitação, nos solos, vegetações e águas (1).

Apesar de ainda pouca explorada a contaminação de águas por HAPs, é de igual ou maior importância estudar a presença e efeitos nefastos dos HAPs neste tão indispensável recurso para todos os seres vivos na Natureza (3). Efetivamente, a presença destes compostos em cursos de água constitui um grave problema, uma vez que os processos convencionais de

tratamento de águas (como a coagulação ou filtração) não garantem a sua completa remoção. Acresce ainda o facto, reportado em alguns estudos científicos, da formação de derivados clorados ou bromados destes compostos, com o uso de hipoclorito de sódio ou brometo de potássio como agentes de desinfecção, respetivamente. Estes derivados halogenados, de um modo geral são mais tóxicos que os seus compostos parentais (4).

Tendo em consideração todos estes aspetos mencionados e a já demonstrada capacidade destes poluentes ambientais causarem graves problemas de saúde após longos períodos de exposição, no presente trabalho procurámos estudar e compreender os mecanismos moleculares envolvidos na citotoxicidade dos HAPs pelo uso de métodos complementares aos clássicos ensaios de avaliação de citotoxicidade *in vitro*. Pireno (Pir) e o seu derivado halogenado resultante da desinfecção de águas por bromação, 1-BromoPireno (1-BrPir), foram utilizados como HAPs modelo, podendo estes métodos complementares serem adotados para o estudo de muitos outros HAPs presentes no ambiente.

### \_Objetivo

Contribuir para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade de HAPs e seus derivados através da identificação de possíveis alvos moleculares usando como modelo as células HePG2 de origem hepática (órgão de desintoxicação por excelência).

### \_Materiais e métodos

**Poluentes orgânicos e linha celular:** o poluente parental Pir e seu derivado halogenado 1-BrPir foram obtidos comercialmente. A linha celular de hepatocarcinoma humano HepG2 (ATCC HB-8065) foi cultivada em DMEM-F12 contendo L-Glutamax, tampão HEPES (25mM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI de penicilina e estreptomicina, a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Este meio de cultura, descrito anteriormente, foi designado como meio de crescimento. Um meio de composição idêntica à descrita, mas apenas suplementado com 2% de SFB foi designado como meio de trata-

mento e usado em todos os ensaios de avaliação da citotoxicidade dos compostos em estudo. A propagação celular foi realizada quando havia uma confluência de aproximadamente 80%, usando tripsina-EDTA (0.5%) para destacar as células.

**Avaliação dos efeitos citotóxicos dos compostos orgânicos pelo ensaio de MTT e vermelho neutro (VN):** inicialmente a citotoxicidade induzida pelos compostos foi avaliada através da determinação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT (viabilidade mitocondrial) e através do VN (viabilidade lisossomal) (4,5), após diferentes tempos de exposição das células a uma dose única ou a múltiplas doses dos compostos por reposição diária até um máximo de 6 µM. Este estudo foi assim efetuado de maneira a mimetizar a bioacumulação dos compostos após longos períodos de exposição, tal como acontece no organismo humano.

**Acumulação intracelular dos compostos:** a bioacumulação dos compostos nas células foi visualizada por microscopia confocal (Leica, SP2) após a exposição das células a diferentes concentrações dos poluentes até um máximo de 20 µM. As doses de composto foram repartidas por 3 vezes ao dia de modo a evitar a precipitação do poluente ambiental e permitir a sua internalização na célula. A marcação do citoesqueleto de actina foi efetuada com uma solução de faloidina marcada com Alexa 568 (6). As células não expostas aos HAPs foram usadas como controlo negativo.

**Avaliação do stress oxidativo induzido pelos HAPs:** a avaliação da produção de radicais de oxigénio das células tratadas com 2 µM de Pir e 1-BrPir foi indiretamente avaliada por um método espectrofotométrico que determina a atividade da catalase a 240nm (7).

**Avaliação do potencial de membrana mitocondrial e área nuclear das células:** a avaliação do potencial da membrana mitocondrial foi efectuada através de um ensaio com Mitotracker red, enquanto a avaliação da área nuclear das células foi efectuada usando Hoescht como corante (8). As células foram expostas a 2 µM de Pir e 1-BrPir por 24, 48 e 72h. Os efeitos da despolarização mitocondrial e da alteração do tamanho do núcleo das células foram avaliados por comparação com o

controlo negativo (células não tratadas) e controlo positivo com a exposição celular a 50  $\mu\text{M}$  de carbonilcianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) durante 24h. As células foram observadas ao microscópio confocal (Leica, SP2). A área nuclear foi determinada usando um software de análise de imagem, ImageJ (Scion Corp., Frederick, MD).

**Avaliação da morte celular por apoptose:** a indução de apoptose foi estudada através de ensaios para a detecção de marcadores apoptóticos, nomeadamente Anexina-V (marcador de apoptose precoce) e de duas caspases efectoras (caspases 3 e 7), envolvidas na indução da morte celular por apoptose tardia (9). Em ambos os ensaios as células foram expostas a 2  $\mu\text{M}$  dos compostos. As amostras foram observadas ao microscópio confocal. A incubação com 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de camptotecina durante 24h e 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS de *K. pneumoniae* durante 24h e 3 mM de ATP durante 30 minutos foi utilizada como controlo positivo para os ensaios de marcação com Anexina-V e caspase 3/7, respetivamente. Para ambos os ensaios, as células não expostas aos poluentes orgânicos foram utilizadas como controlo negativo.

**Fragmentação do ADN:** a morte por apoptose nas células tratadas com os compostos foi ainda avaliada através do perfil de mobilidade electroforética do ADN (10). Após a exposição das células a 2  $\mu\text{M}$  de Pir e 1-BrPir por 24h, o ADN genómico foi extraído com QiAmp DNA Kit e uma electroforese em gel de agarose (1,5%) com *syber safe* foi efectuada. A revelação foi efectuada por exposição à luz ultravioleta num transiluminador tendo as imagens sido adquiridas através do *software* Geldoc.

## Resultados e discussão

### A importância do uso de métodos complementares para avaliar a toxicidade de HAPs

Inicialmente, e como métodos simples e rápidos de avaliação da citotoxicidade dos poluentes ambientais, a viabilidade mitocondrial e lisossomal das células expostas aos compostos foi avaliada pelos ensaios clássicos de MTT e VN, respetivamente. Foi observada uma diminuição da viabilidade celular com a bioacumulação dos poluentes. Efetivamente, as células

tratadas com 6  $\mu\text{M}$  de 1-BrPir (doses de 2  $\mu\text{M}$  repostas diariamente), apresentaram uma viabilidade mitocondrial inferior a 60%. Adicionalmente, o 1-BrPir demonstrou ser mais tóxico que o respetivo composto parental (Pir), indo ao encontro do que tem vindo a ser descrito (figura 1A). Contudo, o teste de VN demonstrou que após 48h de exposição a 2  $\mu\text{M}$  de Pir e do seu derivado bromado a toxicidade do composto parental é superior (dados não apresentados).

Contudo, e como já dito anteriormente, estes ensaios permitem identificar o efeito citotóxico mas não o mecanismo pelo qual o mesmo é induzido. Podem, assim, induzir em erro o investigador que, perante os resultados aparentemente contraditórios, pode minimizar a toxicidade de um composto ou outro qualquer material em estudo. Tendo estes aspetos em consideração, no presente trabalho, foi decidido realizar outros métodos complementares que ajudassem a perceber como é que estes compostos afetam a célula e, consequentemente, o organismo humano.

### Visualização da acumulação intracelular dos compostos

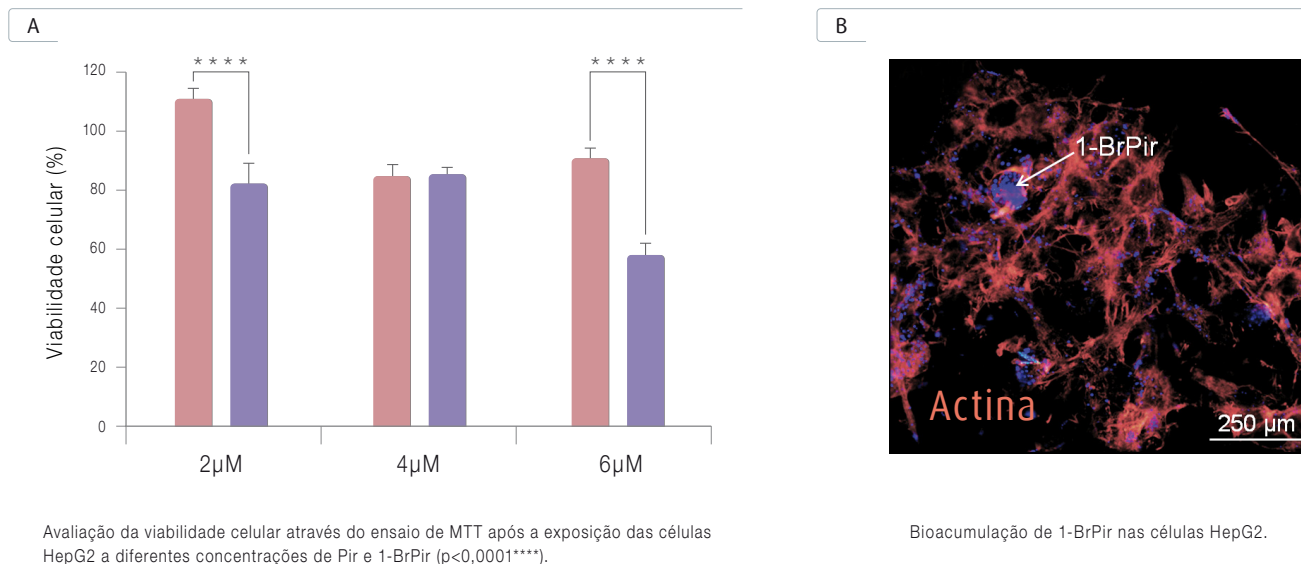
Uma das características particulares destes compostos é a sua fluorescência intrínseca. Esta característica permitiu monitorizar a acumulação/localização intracelular dos compostos validando os resultados dos testes de viabilidade celular.

Por microscopia confocal verificou-se, um aumento da fluorescência proporcional à concentração de composto. Como exemplo, na figura 1B é possível visualizar o HAP 1-BrPir numa concentração de 20  $\mu\text{M}$  internalizado na célula (pontos azuis). Estes resultados vieram uma vez mais confirmar a bioacumulação dos compostos nas células e a sua fácil difusão através da membrana celular devido ao seu carácter lipofílico. A quantificação da concentração intracelular dos compostos é a sequência lógica deste estudo.

### Avaliação da produção de radicais de oxigénio

Está descrito que, durante o processo metabólico, os HAPs produzem Espécies Reativas de Oxigénio (ROS) via citocromo P450. Posteriormente, estes ROS e metabolitos podem causar danos oxidativos no ADN e formar fragmentos, iniciando a cadeia mutagénica responsável pelo início de um tumor (10).

Figura 1A-B: Citotoxicidade dos HAPs e sua bioacumulação.



A avaliação de produção de ROS foi, neste estudo, indiretamente avaliada pela atividade da catalase, uma enzima intracelular que decompõe o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) em oxigénio e água. Assim, a degradação de  $H_2O_2$  foi usada para quantificar a atividade da catalase das células expostas aos compostos (tabela 1). Após 24h de exposição à concentração

mais baixa de compostos (2 µM) foi observado um aumento da atividade da catalase em comparação com as células não tratadas (C.N.). Este resultado demonstra a capacidade dos HAPs em estudo interagirem com o citocromo P450 levando a uma maior produção de ROS e possivelmente apresentando algum efeito mutagénico e genotóxico.

Tabela 1: Avaliação da produção de radicais de oxigénio, despolarização mitocondrial, células positivas para as caspases 3/7, área e fragmentação nuclear das células HePG2.

Compostos	Citoplasma							Núcleo			
	Catalase 24h	Despolarização Mitocondrial			Caspases 3/7			Área 24h	Área 48h	Área 72h	Fragmentação 24h
		24h	48h	72h	24h	48h	72h				
Pir	+	+	+	+	++	++	+++	++	++	+	+
1-BrPir	++	-	(+/-)	(+/-)	+	+++	+++++	++	+	-	++
C.N.	-	+	+	+	-	-	-	++++	+++	+++	-
C.P.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+++	+++	+++	-	-	-	++

Todos os resultados estão apresentados de uma forma qualitativa.

C.N. controlo negativo, C.P. controlo positivo, n.a. não aplicável, - linha de base.

Para a atividade da catalase (valor correspondente a 100%), células positivas para as caspases 3/7 (sem células positivas) e fragmentação do ADN (sem fragmentação), o C.N. foi considerado como linha de base. Na determinação da área nuclear, o C.P. foi considerado como linha de base (menor área nuclear).

Despolarização mitocondrial: + mitocôndria polarizada, - mitocôndria despolarizada, (+/-) células com as mitocôndrias polarizadas e despolarizadas. Nos restantes estudos, quanto maior o número de símbolos +, mais intenso é o fenómeno pesquisado.

## Avaliação de mecanismos de morte celular programada envolvidos na toxicidade dos HAPs

A morte celular programada também denominada por apoptose consiste numa cascata de eventos bem definidos a nível celular. Entre estes encontram-se alterações morfológicas e biológicas a nível celular, tais como a alteração da composição lipídica da membrana, alteração do potencial da membrana mitocondrial, ativação de caspases e fragmentação do ADN com a formação de corpos apoptóticos. Neste trabalho foram conduzidos estudos preliminares que visaram detetar algumas destas alterações despoletadas pela exposição aos HAPs.

### Anexina-V

De modo a verificar se os poluentes orgânicos inibem a proliferação celular por morte celular programada (apoptose), foi inicialmente quantificada a presença do mediador precoce de apoptose, Anexina-V, pela incubação das células expostas aos HAPs ao mesmo marcador. A Anexina-V tem vindo a ser usada como um marcador não quantitativo que se liga à fosfatidilserina para identificar células apoptóticas. Em células saudáveis, a fosfatidilserina encontra-se no lado citosólico da membrana plasmática da célula. Após o início da apoptose, ela perde a sua distribuição assimétrica e desloca-se para a membrana extracelular, ligando-se, deste modo, à Anexina-V.

Contudo, após 12 e 24h de exposição das células aos compostos não se verificou a presença de Anexina-V, pelo que podemos concluir que as células poderão sofrer uma apoptose mais tardia ou mediada por vias de sinalização independentes da Anexina-V.

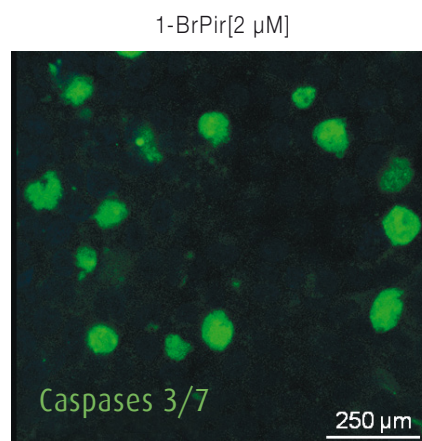
### Despolarização da membrana mitocondrial

Ao mesmo tempo, foi avaliado o potencial de membrana mitocondrial através de um ensaio com Mitotraker red. As células foram tratadas com os diferentes compostos nas doses mais baixas, numa escala temporal de 24, 48 e 72h. Foi efectuada uma avaliação qualitativa após a visualização das células por microscopia confocal. Como é possível observar na [tabela 1](#), não foi verificada uma despolarização mitocondrial significativa ao longo do tempo. Contudo, na maior parte dos casos a verificação de uma maior despolarização mitocondrial é coincidente com uma maior citotoxicidade do composto.

### Caspases 3/7

Após não se ter verificado uma apoptose precoce das células utilizando a Anexina-V, resolvemos estudar outros mediadores de apoptose (mais tardia), nomeadamente as caspases 3 e 7, ditas como efetoras. As células foram tratadas com 2  $\mu$ M de HAPs e foi observado, através de microscopia confocal, um aumento de células positivas para as caspases 3 e 7, após 72h de exposição. Tal aumento foi mais significativo para 1-BrPir ([tabela 1](#), [figura 2](#)). Uma vez que a Anexina-V não foi detectada, a apoptose induzida pelos compostos estudados nas células HepG2 é mediada pela ativação da cascata apoptótica das caspases 3/7.

Figura 2: Avaliação da morte celular por apoptose via caspase 3/7.



A ativação das caspases 3 e 7 foi pesquisada após 24, 48 e 72h de exposição a 2  $\mu$ M de 1-BrPir.

A imagem é representativa do efeito observado após 72h de exposição, na qual são visíveis células positivas para a presença da forma ativa das caspases 3/7 (verde).

### Alterações do núcleo celular

A área dos núcleos das células expostas aos HAPs foi determinada ao longo do tempo, por um período de 72h. Como resumido na [tabela 1](#), a área dos núcleos das células diminui ao longo do tempo. Efetivamente, após 72h de exposição das células aos compostos a área dos núcleos das células tratadas com Pir (sem diferença estatisticamente significativa) e 1-BrPir ( $p < 0,05$ ), aproximou-se da área nuclear das células do controlo positivo. Está descrito que a diminuição da área do núcleo é

uma evidência de morte celular programada, isto é, por apoptose, e tal como visto no ensaio das caspases 3/7 o composto 1-BrPir parece ser aquele com maior ativação das caspases e, conseqüentemente, o que promove uma diminuição maior no tamanho dos núcleos das células.

Por fim, a morte por apoptose das células tratadas com os compostos após 24h, foi avaliada pela demonstração eletroforética da fragmentação do ADN. Os HAPs estudados provocaram a fragmentação do ADN genómico das células, apresentando bandas com pesos moleculares e intensidades semelhantes ao controlo positivo (C.P.). No controlo negativo (células não tratadas) tal fragmentação não se verificou (tabela 1). Este resultado indica que os compostos provocam uma morte celular programada por lesões no material genético das células, evidenciando, uma vez mais, o possível efeito genotóxico dos compostos em estudo.

## Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que os métodos clássicos de avaliação da citotoxicidade não permitem identificar alterações a nível de determinados compartimentos celulares que podem vir a desencadear efeitos nocivos para o ser humano. Na concentração testada mais baixa (2 µM) nenhum dos compostos revelou ser citotóxico pelos métodos clássicos contudo os métodos complementares revelaram a existência de alterações significativas ao nível do ADN. Este resultado alerta para o possível efeito genotóxico dos compostos que podem ser potencialmente mutagénicos ou cancerígenos.

Em suma, os resultados apresentados neste trabalho mostram a necessidade de utilizar outros métodos para além dos ensaios clássicos de avaliação de citotoxicidade de modo a compreender os mecanismos moleculares subjacentes responsáveis pela toxicidade dos HAPs para os seres humanos.

## Financiamento:

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto RECI/QEQ-MED/0330/2012, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

## Referências bibliográficas:

- (1) Kim KH, Jahan SA, Kabir E, et al. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int.* 2013;60:71-80.
- (2) Sun JL, Jing X, Chang WJ, et al. Cumulative health risk assessment of halogenated and parent polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particulate matters in urban air. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015;113:31-7. Epub 2014 Dec 5.
- (3) Martinez E, Gros M, Lacorte S, et al. Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels. *J Chromatogr A.* 2004;1047(2):181-8.
- (4) Pinto M, Rebola M, Louro H, et al. Chlorinated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Drinking Water Disinfection: Synthesis, Formation under Aqueous Chlorination Conditions and Genotoxic Effects. *Polycyclic Aromat. Compd.* 2014; 34(4): 356-71.
- (5) Deng WJ, Louie PKK, Liu WK, et al. Atmospheric levels and cytotoxicity of PAHs and heavy metals in TSP and PM2.5 at an electronic waste recycling site in southeast China. *Atmos. Environ.* 2006;40:6945-55.
- (6) Bialkowska K, Byzova TV, Plow EF. Site-specific phosphorylation of kindlin-3 protein regulates its capacity to control cellular responses mediated by integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *J Biol Chem.* 2015;290(10):6226-42. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4358261/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4358261/)
- (7) Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
- (8) Wilson J, Berntsen HF, Zimmer KE, et al. Effects of defined mixtures of persistent organic pollutants (POPs) on multiple cellular responses in the human hepatocarcinoma cell line, HepG2, using high content analysis screening. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016;294:21-31.
- (9) Shen W, Guan Y, Wang J, et al. A polysaccharide from pumpkin induces apoptosis of HepG2 cells by activation of mitochondrial pathway. *Tumour Biol.* 2016;37(4):5239-45. Epub 2015 Nov 10.
- (10) Park SY, Lee SM, Ye SK, et al. Benzo[a]pyrene-induced DNA damage and p53 modulation in human hepatoma HepG2 cells for the identification of potential biomarkers for PAH monitoring and risk assessment. *Toxicol Lett.* 2006;167(1):27-33.

## Remoção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em águas utilizando subprodutos da indústria da cortiça

Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, using byproducts of cork industry

Sílvia S. José<sup>1</sup>, Ana S. Mestre<sup>3</sup>, Susana P. Silva<sup>2</sup>, Ana S. Cardoso<sup>1</sup>, Helena Rebelo<sup>1</sup>, Ana P. Carvalho<sup>3</sup>

silvia.jose@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório de Química e Toxicologia de Águas. Unidade de Água e Solos. Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Corticeira Amorim, SGPS, SA, S. Paio de Oleiros, Portugal

(3) Centro de Química e Bioquímica. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

### \_Resumo

Os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) são contaminantes persistentes em meio aquoso. Estes compostos são conhecidos pelas suas propriedades carcinogénicas, mutagénicas e genotóxicas. O principal objetivo deste trabalho consistiu na avaliação das potencialidades de subprodutos da indústria corticeira, como adsorventes alternativos para a remoção de cinco HAPs em meio aquoso: benzo(a)pireno, benzo(ghi)perileno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e indeno(1,2,3-cd)pireno. A metodologia analítica para quantificar os HAPs envolveu a preparação das amostras, através da técnica de extração em fase sólida (SPE), e a quantificação dos compostos analisados por cromatografia líquida com detetor de fluorescência (LC-FLD). O método foi otimizado e validado, obtendo-se limites de quantificação de 0,004 µg/L para todos os HAPs. Os estudos incidiram na utilização de uma amostra de cortiça, pó de aglomerado de cortiça expandida (PACE), obtida por aglutinação de cortiça em condições hidrotermicas, a qual nos estudos preliminares revelou desempenho semelhante aos carvões ativados. Com exceção do benzo(ghi)perileno, os resultados mostram que o processo de adsorção dos HAPs na amostra PACE segue uma cinética de pseudo-segunda ordem e as isotérmicas ajustam-se ao modelo de Langmuir.

### \_Abstract

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are persistent contaminants present in aqueous media. These compounds are known for their carcinogenic, mutagenic and genotoxic properties. The main objective of this work was to evaluate the potential of cork industry by-products as alternative adsorbents for the removal of five PAHs in aqueous media: benzo(a)pyrene, benzo(ghi)perylene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene and indeno(1,2,3-cd)pyrene. The analytical methodology used to quantify PAHs consisted in the first step of sample preparation using solid phase extraction (SPE) technique, followed by quantification by liquid chromatography with a fluorescence detector (LC-FLD). The method was optimized and validated, yielding limits of quantification of 0.004 µg L<sup>-1</sup> for all PAHs. The studies have focused on the use of a sample cork (PACE), obtained by agglutination of cork under hydrothermal conditions, which in preliminary studies attained removal efficiencies similar to those of activated carbons. With the exception of benzo(ghi)perylene, the results reveal that adsorption process of PAHs on sample PACE obey to the pseudo-second order kinetic equation and to the Langmuir model.

### \_Introdução

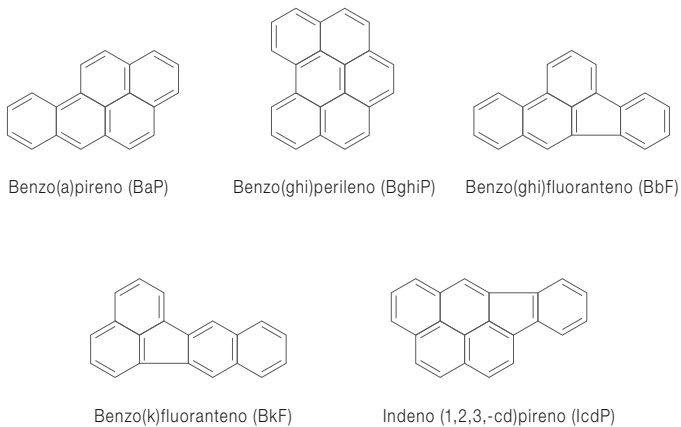
A toxicidade de certas substâncias, associada à incapacidade dos ecossistemas e dos sistemas de tratamento de águas residuais e de águas para consumo humano promoverem a sua degradação, origina a sua dispersão e conseqüente bioacumulação no meio ambiente. Assim, é cada vez mais necessário o controlo da exposição humana a substâncias com propriedades carcinogénicas, mutagénicas e de desregulação endócrina e, conseqüentemente, desenvolver processos mais eficientes de remoção para este tipo de compostos.

Os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) são poluentes orgânicos, classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como carcinogénicos, mutagénicos e desreguladores endócrinos. Estes compostos resultam de processos de combustão incompleta de compostos de carbono e, devido à sua elevada toxicidade, existem medidas de controlo para a sua presença nomeadamente em águas de consumo humano (1).

A legislação portuguesa (DL nº 306/2007, de 27 de agosto) (2) estabelece valores paramétricos para cinco HAPs: benzo(a)pireno (BaP), benzo(ghi)perileno (BghiP), benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(k)fluoranteno (BkF), indeno(1,2,3-cd)pireno (IcdP) (figura 1). A concentração máxima admitida é de 0,01 µg L<sup>-1</sup> para o BaP e de 0,10 µg L<sup>-1</sup> para a soma dos outros quatro HAPs (BbF, BkF, BghiP, IcdP).

A presença destes compostos em cursos de água constitui um grave problema ambiental e de saúde pública, uma vez que os processos convencionais de tratamento de água podem não os

Figura 1: Estruturas dos cinco HAPs considerados na legislação portuguesa (DL nº 306/2007).



remover de forma eficaz (3,4). O adsorvente mais utilizado no processo de remoção de HAPs em águas é o carvão ativado, sendo a sua eficiência resultante de áreas superficiais e volume de microporos muito elevados, assim como da sua química superficial (5). Contudo, o elevado custo e a dificuldade de regeneração impõem uma limitação na aplicação deste material no tratamento de águas em larga escala. Como alternativa ao uso do carvão ativado encontram-se na literatura estudos de adsorção de diversos poluentes com materiais de baixo custo, nomeadamente biomassa como, por exemplo, resíduos de madeira, cascas de cereais, fibras de coco e cortiça (6-12).

### \_Objetivo

O principal objetivo deste trabalho consistiu na avaliação das potencialidades de subprodutos da indústria corticeira como adsorventes alternativos para a remoção de cinco HAPs em meio aquoso.

### \_Materiais e métodos

Para os estudos de adsorção dos cinco HAPs foram selecionadas duas amostras de cortiça: pó de aglomerado de cortiça expandida (PACE), obtida por aglutinação de cortiça sob condições hidrotérmicas; e granulado de cortiça natural (GCN). Foram também usadas duas amostras comerciais de carvão

ativado; uma amostra em pó (CP900, Quimitejo) e outra granular (GAC 830, Norit).

A metodologia utilizada para a determinação dos HAPs foi a extração em fase sólida associada à técnica de cromatografia líquida com detetor de fluorescência (SPE-LC-FLD). A metodologia foi otimizada e validada, obtendo-se limites de quantificação de 0,004 µg/L para todos os HAPs.

### \_Resultados e discussão

Antes de serem utilizadas como adsorventes, as amostras de cortiça foram submetidas a um processo de lavagem (15h a 100°C), pois em suspensão aquosa a cortiça liberta matéria orgânica. As condições experimentais usadas permitiram alcançar o valor paramétrico para a oxidabilidade em águas de consumo humano (5 mg L<sup>-1</sup> de O<sub>2</sub>) definido no DL nº 306/2007. A determinação da oxidabilidade foi feita segundo o procedimento descrito na norma NP EN ISSO 8467 (13). Os resultados obtidos revelam que a utilização das amostras tratadas não compromete a qualidade da água (tabela 1).

Num ensaio prévio foi testada a eficiência dos vários adsorventes (amostras de cortiça e carvões comerciais) na remoção de HAPs em água (concentração de cada composto em solução: 0,1 µg L<sup>-1</sup>) nas condições de 5 g L<sup>-1</sup>, para um tempo de contacto de 15 min (tabela 2).

Os resultados expressam a percentagem de remoção calculada em função da concentração inicial (C<sub>0</sub>) e da concentração em equilíbrio (C<sub>eq</sub>) através da seguinte expressão:

$$\% \text{ remoção} = [(C_0 - C_{eq}) / C_0] \times 100.$$

Tabela 1: Valores da oxidabilidade das suspensões aquosas das duas amostras de cortiça.

Oxidabilidade da solução aquosa (mg L <sup>-1</sup> de O <sub>2</sub> )		
Antes da lavagem	GCN	176±12
	PACE	73±10
Depois da lavagem	GCN	4,0±0,1
	PACE	2,8±0,1

artigos breves\_ n. 10

Tabela 2: Remoção de HAPs de uma solução aquosa em que cada composto se encontra numa concentração de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ , usando diferentes adsorventes ( $5 \text{g L}^{-1}$ ).

	Oxidabilidade da solução aquosa ( $\text{mg L}^{-1}$ de $\text{O}_2$ )				
	BaP	BghiP	BbF	BkF	IcdP
PACE	-	89,8	-	-	-
GCN	-	87,3	94,6	-	-
CP900	-	93,0	-	-	-
GAC 830	-	94,1	-	-	-

(-) não foi possível determinar a % remoção, devido ao valor de  $C_e$  ser inferior ao LQ do método ( $0,004 \mu\text{g L}^{-1}$ ), pelo que se considera a remoção completa do HAP.

Os valores mostram que a amostra PACE tem um desempenho comparável ao dos carvões ativados, e superior ao apresentado pelo granulado de cortiça. Estes resultados poderão ser justificados pelo facto da dimensão das partículas da amostra PACE ser maioritariamente  $0,25 \text{mm}$ , enquanto que a amostra GCN é composta, na sua maioria, por grânulos com  $1 \text{mm}$ . O melhor desempenho da amostra PACE poderá igualmente estar relacionado com o processo de preparação (aglutinação sob condições hidrotérmicas) que lhe confere propriedades diferentes da cortiça natural, nomeadamente o enriquecimento

em lenhina ( $53\% \text{ versus } 24\%$ ) (14), que de acordo com a literatura está associado a uma maior capacidade de adsorção (15).

Considerando os resultados dos testes de remoção a amostra PACE foi escolhida para a continuação dos estudos de adsorção de HAPs em meio aquoso.

As cinéticas de adsorção foram realizadas para uma concentração individual de HAPs mais elevada,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  para evitar a remoção completa dos compostos ao longo do tempo de ensaio (gráfico 1).

Os resultados demonstram que, com exceção do BghiP, o equilíbrio foi atingido ao fim de 180 min. No caso do BghiP observou-se a percentagem de remoção mais baixa, não tendo sido alcançado o equilíbrio do processo de adsorção após 180 min de contacto.

A aplicação de modelos cinéticos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem, demonstrou que, com exceção do BghiP, o processo de adsorção dos HAPs em meio aquoso à amostra PACE segue uma cinética de pseudo-segunda ordem (16), verificando-se que os valores dos coeficientes de determinação se situam entre 0,985 e 1 (tabela 3).

Gráfico 1: Cinética de adsorção para a remoção de HAPs ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) com a amostra PACE ( $5 \text{g L}^{-1}$ ).

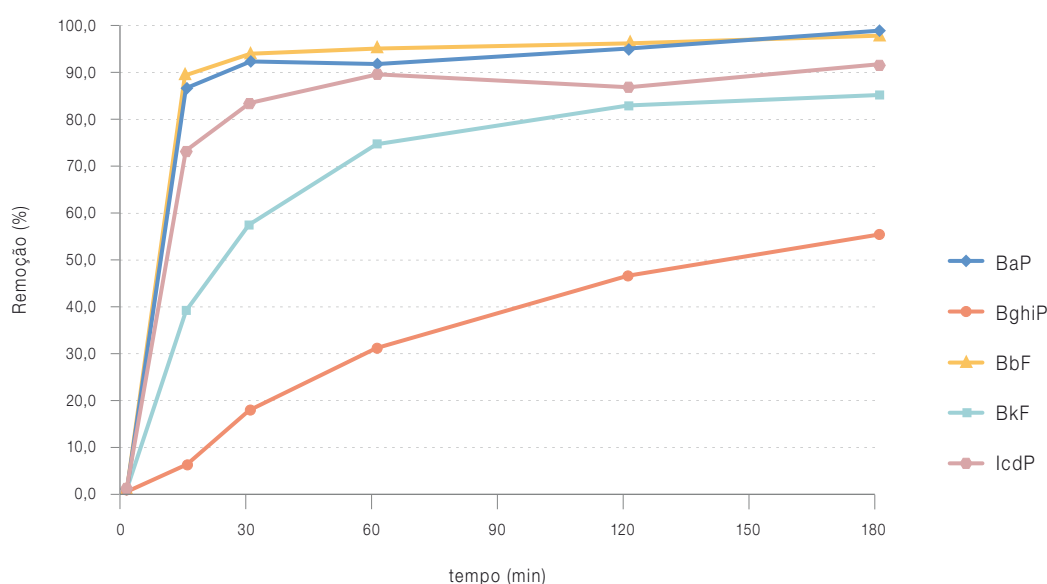


Tabela 3: ↓ Parâmetros das cinéticas de adsorção de pseudo-segunda ordem dos HAPs ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) para a amostra de PACE ( $5 \text{g L}^{-1}$ ).

Parâmetros	HAPs				
	BaP	BghiP	BbF	BkF	IcdP
$R^2$	0,999	0,738	1,000	0,997	1,000
$K_2$ ( $\text{g } \mu\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	0,189	n.d.	0,304	0,022	0,129
$q_e$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	1,69	n.d.	1,60	1,99	1,14
$h$ ( $\mu\text{g g}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	0,54	n.d.	0,78	0,09	0,17
$t_{1/2}$ (min)	3,13	n.d.	2,06	23,12	6,77

n.d.- não determinado.

$k_2$  (constante de velocidade);  $q_e$  (quantidade de HAPs adsorvidos);  $h$  (velocidade de adsorção inicial);  $R^2$  (coeficiente de determinação da regressão linear);  $t_{1/2}$  (tempo de meia vida).

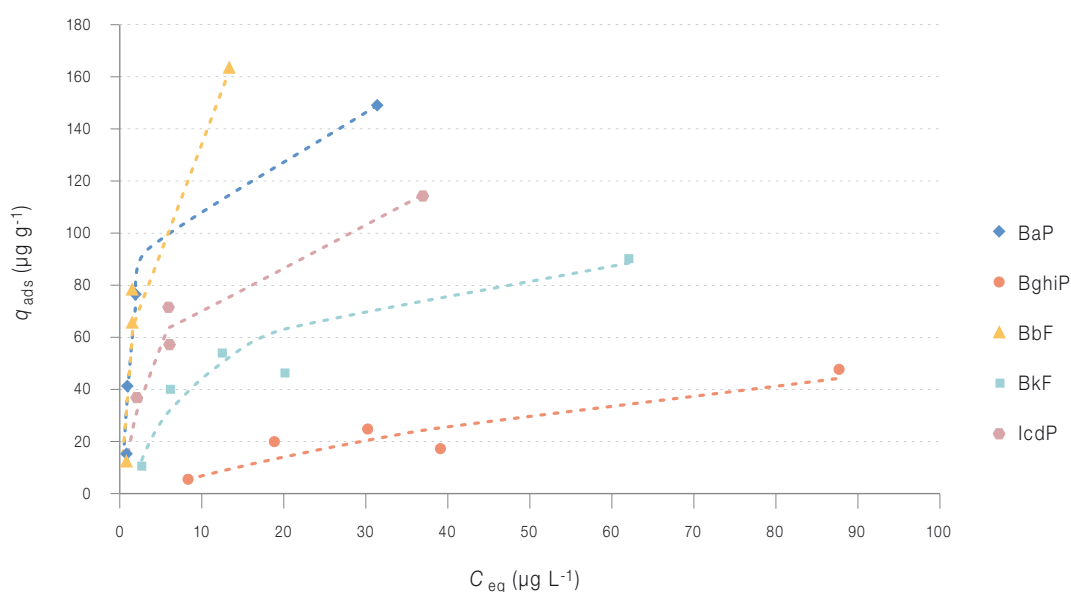
Estabelecido o tempo de equilíbrio (180 min), realizaram-se os ensaios de equilíbrio para o traçado das isotérmicas de adsorção (17), isto é, curvas que traduzem a forma como o soluto é adsorvido pela superfície do sólido. Graficamente correspondem à representação da quantidade de soluto adsorvido por massa do adsorvente ( $q_{\text{ads}}$ ) em função da concentração de soluto na solução em equilíbrio ( $C_{\text{eq}}$ ) (gráfico 2).

O ajuste dos dados experimentais aos modelos teóricos de Langmuir e Freundlich revelou que a equação que melhor se ajusta às isotérmicas obtidas é o modelo de Langmuir. Com efeito, este modelo traduz uma isotérmica em que à medida que aumenta a concentração da fase líquida a quantidade adsorvida vai diminuindo, até se atingir um patamar que corresponde à saturação da superfície. Os resultados demonstram de facto que, com exceção do BghiP, para as concentrações de equilíbrio mais elevadas as curvas mostram uma tendência para alcançar um patamar.

### \_Conclusões

Sobre a aplicação de um subproduto da indústria da cortiça na remoção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) em solução aquosa, conclui-se que os resultados obtidos neste trabalho demonstraram, inequivocamente, que a amostra obtida por aglutinação de cortiça em condições hidrotérmicas (PACE) poderá constituir uma alternativa viável face aos adsorventes atualmente utilizados para esse efeito, nomeadamente carvões ativados.

Gráfico 2: ↓ Isotérmicas de adsorção de HAPs para a amostra de cortiça PACE à temperatura ambiente.



Os símbolos correspondem aos pontos experimentais e a linha representa o ajuste pelo modelo Langmuir.

### Financiamento e agradecimentos:

Este trabalho foi suportado financeiramente pelo programa QREN-COMPETE, através do projeto de investigação Watercork (nº 2009/5523). Os autores agradecem à Corticeira Amorim pela preparação e fornecimento das amostras de cortiça; e às empresas Quimitejo e Norit pelo fornecimento das amostras dos carvões ativados.

### Referências bibliográficas:

- (1) Ghiselli G, Jardim W. Interferentes endócrinos no ambiente. *Quím. Nova.* 2007;30(3):695-706. [www.scielo.br/pdf/qn/v30n3/31.pdf](http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n3/31.pdf)
- (2) Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de agosto. DR 1ª Série, nº 164: 5747:65. Estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano. <https://dre.pt/application/file/640836>
- (3) Wu B, Zhang Y, Zhang XX, et al. Health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the source water and drinking water of China: Quantitative analysis based on published monitoring data. *Sci Total Environ.* 2011;410-411:112-8.
- (4) Chen B, Yuan M, Liu H. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solution using plant residue materials as a biosorbent. *J Hazard Mater.* 2011;188(1-3):436-42
- (5) Pérez-Gregorio MR, García-Falcón MS, Martínez-Carballo E, et al. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from organic solvents by ashes wastes. *J Hazard Mater.* 2010;178(1-3):273-81.
- (6) Silva M, Fernandes A, Mendes A, et al. Preliminary feasibility study for the use of an adsorption/bio-regeneration system for molinate removal from effluents. *Water Res.* 2004;38(11):2677-84.
- (7) Boving TB, Zhang W. Removal of aqueous-phase polynuclear aromatic hydrocarbons using aspen wood fibers. *Chemosphere.* 2004;54(7):831-9.
- (8) Rodríguez-Cruz S, Andrades MS, Sanchez-Camazano M, et al. Relationship between the adsorption capacity of pesticides by wood residues and the properties of woods and pesticides. *Environ Sci Technol.* 2007;41(10):3613-9.
- (9) Adachi A, Takagi S, Okano T. Studies on removal efficiency of rice bran for pesticides. *J. Health Sci.* 2001;47(2):94-8.
- (10) Robinson T, Chandran B, Nigam P. Removal of dyes from an artificial textile dye effluent by two agricultural waste residues, corncob and barley husk. *Environ Int.* 2002;28(1-2):29-33.
- (11) Namasivayam C, Radhika R, Suba S. Uptake of dyes by a promising locally available agricultural solid waste: coir pith. *Waste Manag.* 2001;21(4):381-7.
- (12) Olivella MÀ, Jové P, Oliveras A. The use of cork waste as a biosorbent for persistent organic pollutants-Study of adsorption/desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2011;46(8):824-32.
- (13) NP EN ISO 8467:1986. Qualidade da água - determinação do Índice de Permanganato.
- (14) José S. Valorização de subprodutos da indústria de cortiça na remoção de contaminantes (orgânicos) em águas: relatório final do projeto QREN WaterCork, 2013. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2102>
- (15) Mackay AA, Gschwend PM. Sorption of monoaromatic hydrocarbons to wood. *Environ. Sci. Technol.* 2000;34(5):839-45.
- (16) Ho YS. Review of second-order models for adsorption systems. *J Hazard Mater.* 2006;136(3):681-9.
- (17) Langmuir I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* 1918;40(9):1361-1403.

## **Perspetivas da comunidade do autismo em relação à investigação em autismo**

### *Autism community perspectives on autism research*

*Inês C. Conceição, Célia Rasga, Natércia Miranda, Astrid M. Vicente*

*astrid.vicente@insa.min-saude.pt*

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

#### **\_Resumo**

Dada a sua elevada prevalência global (cerca de 1 em 100), gravidade e complexidade etiológica, o autismo é hoje uma importante área de investigação. O presente trabalho teve como objetivo compreender quais as preocupações éticas, perspetivas e expectativas de pais e profissionais da saúde e educadores ligados ao autismo, no que diz respeito à investigação desta patologia. O trabalho foi desenvolvido no âmbito de uma rede de investigação europeia sobre sinais precoces de autismo. Em paralelo em vários países da Europa, foram identificados os tópicos de maior interesse para pais e profissionais através de grupos de foco, na sequência dos quais se elaborou um inquérito *online* que foi distribuído por esta comunidade ligada ao autismo. Em Portugal, os inquiridos (n=331) mostraram um interesse global pela investigação em autismo, nomeadamente sobre as bases genéticas e sobre sinais precoces de autismo. Relativamente aos benefícios resultantes da participação em projetos de investigação, os pais privilegiaram o acesso a intervenção e a formação pessoal, enquanto que os profissionais deram mais importância ao acesso a mais conhecimento e a equipas especializadas. Os três grupos deram ênfase ao acesso à informação completa obtida durante a investigação e às conclusões gerais do estudo. Os resultados obtidos reforçam a importância da investigação do autismo, indicando também linhas claras de atuação que têm em observação as perspetivas da comunidade ligada ao autismo.

#### **\_Abstract**

*Given its high global prevalence, clinical severity and etiological complexity, autism has become an important research area. This work was developed within a European research network on early signs of autism, and aimed to understand the specific ethical concerns of parents and practitioners in health and education, with regard to research in autism, and understand their perspectives and expectations. Using focus groups, the topics of greatest interest for this community were identified and an online survey was developed and distributed to the community. Respondents in Portugal (n = 331) showed a global interest in autism research, with special focus on autism genetics and early signs of autism. Concerning the participation in research projects and its direct benefits, parents privileged access to intervention and training, while professionals wanted access to more knowledge and specialized teams. The three groups favored access to the full information obtained from research and the general conclusions of the studies. Thus, the results reinforce the interest of parents and professionals in autism research and provide clear lines of conduct taking into account this community's perspectives and expectations.*

#### **\_Introdução objetivo**

As Perturbações do Espectro do Autismo (PEA) são um conjunto de perturbações que têm em comum um défice na comunicação e interação social e a presença de comportamentos repetitivos, restritivos e estereotipados (1). Dada a sua elevada prevalência global (cerca de 1 em 100), gravidade e complexidade etiológica, o autismo é hoje uma importante área de investigação (2,3).

O Programa de Investigação do Autismo em Portugal existe há 15 anos e pretende contribuir para a compreensão das causas biológicas desta perturbação. Assim, tem desenvolvido projetos em várias áreas, incluindo a epidemiologia, os mecanismos biológicos e a farmacogenética, e colaborado extensamente com grupos e consórcios internacionais.

A investigação sobre sinais precoces de autismo em crianças é de particular relevância, uma vez que um diagnóstico precoce permite uma intervenção mais específica mais cedo e com melhor prognóstico. Porque os trabalhos desenvolvidos por esta equipa são o resultado de uma cooperação intensa com pais, profissionais de saúde e educadores, é importante perceber qual a perceção destes grupos sobre a investigação do autismo, quais as áreas de maior interesse e como é possível incorporar este conhecimento na prática de investigação. Para isso, foi desenvolvido um questionário *online*, dirigido à comunidade de pais e profissionais ligados ao autismo, sobre a importância da investigação do autismo (4). Este estudo foi desenvolvido em paralelo em vários países europeus, no âmbito da rede *COST Enhancing the Scientific Study of Early Autism* (ESSEA), na qual participámos.

Neste trabalho são apresentados os resultados relativos à população inquirida em Portugal.

## \_Material e métodos

No contexto do estudo europeu *Engaging in Autism Research*, conduzido pela rede ESSEA, foram realizados cinco grupos de foco em três países europeus (Itália, Portugal e Reino Unido) para identificar os principais tópicos a abordar neste estudo. Cada grupo de foco incluiu pais ou cuidadores principais de crianças com autismo, profissionais de serviços de saúde e de serviços de educação.

Após seleção dos tópicos de maior interesse foi criado um questionário incluindo: informações básicas sobre o inquirido; a sua categoria como parte interessada, ou seja, pais ou cuidadores principais, profissionais de saúde (por exemplo, médico, terapeuta) ou profissionais de educação (por exemplo, professor); questões específicas de cada grupo, por exemplo questões sobre a criança autista aos pais ou qualificações e experiência aos profissionais de saúde e de educação, e questões globais como opinião sobre apoios médicos e educativos; questões sobre as suas atitudes em relação à investigação do autismo, em cinco domínios baseadas nos grupos de foco: (1) razões e objetivos da investigação, (2) envolvimento em projetos de investigação, (3) parâmetros avaliados e resposta, (4) intervenção e (5) terminologia.

## \_Resultados e discussão

Os resultados apresentados são apenas relativos à população inquirida em Portugal. Um total de 331 entrevistados foram divididos em três grupos: pais (18,7%), profissionais de saúde (36,3%) e educadores (45,1%). Os participantes dos diferentes grupos tinham idades médias idênticas (42 anos) e eram na sua grande maioria do género feminino (90%). Entre os dois grupos profissionais, 32% dos educadores e 64% dos profissionais de saúde tinham mais de 5 anos de experiência no trabalho com crianças diagnosticadas com uma perturbação do espectro do autismo.

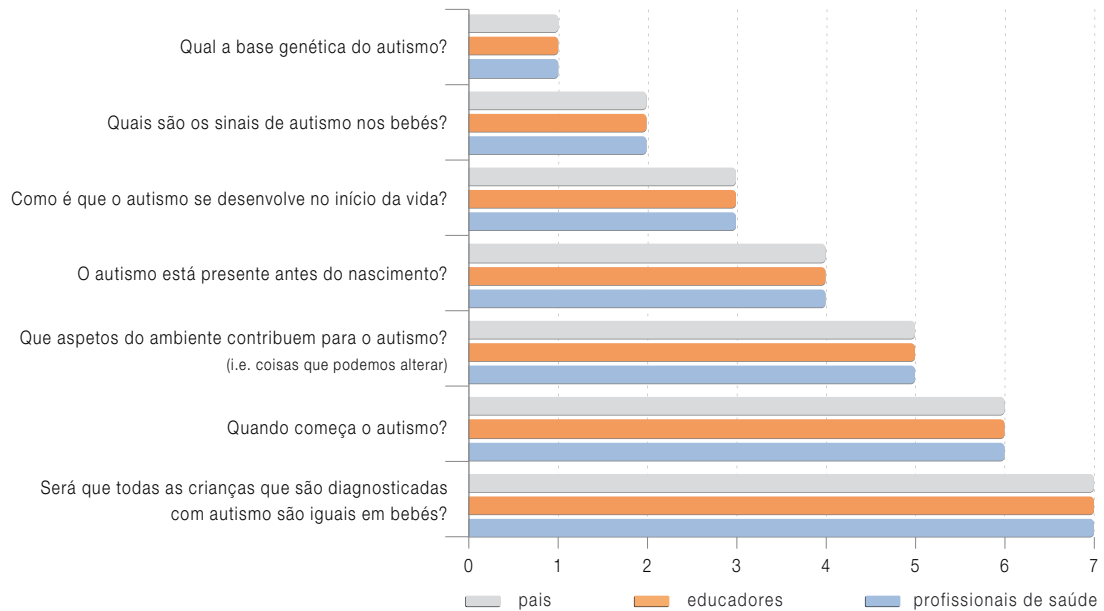
Relativamente às razões da investigação em autismo, à questão principal “Acha que a investigação dos sinais precoces de autismo deve ser feita?”, 98% dos inquiridos respondeu que “Claramente Sim” ou “Provavelmente Sim”. Os três grupos inquiridos, pais, profissionais de saúde e educadores também foram unânimes

sobre as áreas que consideravam mais importantes. Foi pedido aos inquiridos que colocassem por ordem de prioridade as diferentes questões sobre áreas de investigação do autismo, sendo 1 a principal prioridade e 7 a última (**gráfico 1**). A ordem de prioridades foi igual para os três grupos: as duas questões que suscitaram mais interesse foram “Qual a base genética do autismo” e “Quais os sinais de autismo nos bebés”, sugerindo que esta comunidade quer primariamente saber o porquê do autismo e como identificá-lo o mais precocemente possível. Sobre os objetivos da investigação, os participantes indicaram como mais prioritários “Identificar o autismo mais cedo na vida” e “Melhorar os conhecimentos e compreensão dos médicos sobre os sinais precoces de autismo”. Os participantes consideraram ainda que a informação sobre os sinais precoces do autismo em bebés, assim como quais são as intervenções precoces mais eficazes, são as informações práticas resultantes da investigação mais relevantes.

Foi importante perceber a terminologia que os participantes consideravam mais adequada para descrever os grupos infantis que participam em investigação do autismo precoce. O termo “em risco” ou “de risco” é frequentemente utilizado entre os investigadores para descrever bebés que têm maior probabilidade de vir a ter um diagnóstico de autismo mais tarde, por exemplo porque têm um irmão(ã) mais velho(a) com autismo ou por serem muito prematuros. Sobre isto os participantes indicaram que o termo “bebés com maior probabilidade de desenvolver autismo” seria o mais adequado.

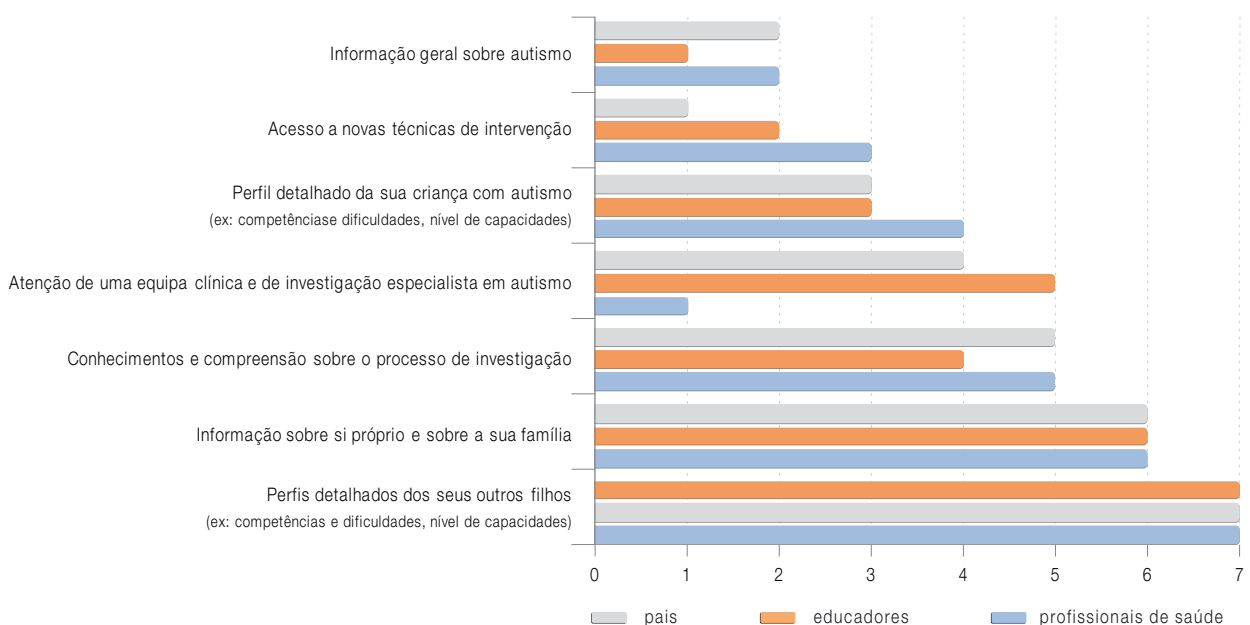
Quanto à perceção dos benefícios de participar num projeto de investigação em autismo, a opinião variou consoante o grupo analisado (**gráfico 2**). Os pais deram mais ênfase ao acesso a novas intervenções, enquanto os educadores valorizaram a formação e os profissionais de saúde a colaboração de especialistas na área. As questões dos profissionais de saúde e educadores prendem-se eventualmente com o nível de conhecimento sobre autismo que referiram ter: menos de 50% dos profissionais de saúde e 25% dos educadores referiram ter um “Bom” conhecimento sobre autismo, e os restantes tinham apenas um conhecimento “Médio” ou “Algum”.

Gráfico 1: Escala de prioridades quando colocada a questão “Na sua opinião, quais são as questões mais importantes que os cientistas deveriam colocar sobre o autismo?”.



As questões estão apresentadas por ordem de prioridade, sendo que 1 é a principal prioridade e assim sucessivamente. A ordem de prioridades foi igual para os vários grupos.

Gráfico 2: Escala de prioridades quando colocada a questão “Quais deveriam ser os benefícios diretos para as pessoas que participam em trabalhos de investigação do autismo?”.



Ordem de prioridades - 1 é a principal prioridade e assim sucessivamente. A ordem de prioridades variou entre os vários grupos.

Os três grupos indicaram que a principal motivação que os faria participar num projeto de investigação seria o conhecimento científico em que se baseia a investigação. Os profissionais, tanto de saúde como de educação, consideraram que a disponibilidade de tempo é o segundo aspeto mais importante para a decisão de participação num projeto. Para os pais, o segundo aspeto mais importante é a componente de intervenção que o projeto possa ter. Globalmente, cerca de 75% dos participantes considerou que é essencial uma componente de intervenção para aceitarem participar num projeto de investigação. Os três grupos deram grande ênfase à importância de ter um diagnóstico de autismo mais cedo (entre 55 e 62% concordavam completamente) e à componente de intervenção, e não apenas de observação, nos estudos (cerca de um terço concordou completamente). Em relação ao tipo de intervenção, os três grupos preferiram a formação dos pais e terapias em casa, mostrando que os pais querem ter um papel ativo no seguimento dos seus filhos.

Relativamente ao tipo de informação que os pais permitiriam que fosse colhida sobre o seu filho(a), as respostas positivas situaram-se todas acima dos 80% no que diz respeito às amostras biológicas (amostras de sangue e DNA), avaliação de competências e diagnóstico, avaliação por imagiologia, filmagens e cópias de registos médicos.

Finalmente, à pergunta “Depois dos dados serem recolhidos, que informação acha que deve ser dada aos pais?”, a maioria dos intervenientes (>75%) indicou querer a informação completa e as conclusões gerais do estudo.

## **\_Conclusões**

Em conclusão, a comunidade de pais e profissionais ligados ao autismo em Portugal é a favor da investigação do autismo, tendo como prioridades o estudo das bases genéticas do autismo e da identificação precoce do autismo. Para decidirem participar num projeto de investigação do autismo, os pais querem acesso a intervenções e formação, enquanto os educadores e profissionais de saúde preferem acesso a mais conhecimento e a equipas especializadas. A maioria dos inquiridos claramente pretende ter acesso à informação completa obtida durante a investigação.

### **Referências bibliográficas:**

- (1) American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing, 2013.
- (2) Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, et al. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res.* 2012;5(3):160-79. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3763210/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3763210/)
- (3) Jeste SS, Geschwind DH. Disentangling the heterogeneity of autism spectrum disorder through genetic findings. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(2):74-81. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4125617/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4125617/)
- (4) Fletcher-Watson S, Apicella F, Auyeung B, et al. Attitudes of the autism community to early autism research. *Autism.* 2016 Mar 14. pii: 1362361315626577.

## Diminuição da expressão dos genes *APP* e *CP* em doentes de Alzheimer sugere alteração da exportação de ferro celular nesta demência

*Decrease in APP and CP mRNA expression in Alzheimer's disease patients suggests impairment of cellular iron export in this dementia*

Cláudia Guerreiro<sup>1</sup>, Bruno Silva<sup>2</sup>, Ângela C. Crespo<sup>1,3</sup>, Liliana Marques<sup>1,4</sup>, Sónia Costa<sup>5</sup>, Ângela Timóteo<sup>5</sup>, Erica Marcelino<sup>6</sup>, Carolina Maruta<sup>6</sup>, Arminda Vilares<sup>1</sup>, Mafalda Matos<sup>6</sup>, Frederico Simões Couto<sup>6</sup>, Paula Faustino<sup>2</sup>, Ana Verdelho<sup>6</sup>, Manuela Guerreiro<sup>6</sup>, Ana Herrero<sup>5</sup>, Cristina Costa<sup>5</sup>, Alexandre de Mendonça<sup>6</sup>, Madalena Martins<sup>3,6</sup>, Luciana Costa<sup>1,4</sup>

luciana.costa@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis; (2) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(3) Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal

(4) Center for Biodiversity, Functional and Integrative Genomics, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(5) Departamento de Neurologia, Hospital Prof. Dr. Fernando Fonseca, E.P.E., Amadora, Portugal

(6) Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

### \_Resumo

Recentemente tem-se assistido a um acumular de evidência sugerindo a implicação de uma desregulação do metabolismo do ferro (Fe) na fisiopatologia da doença de Alzheimer (DA). Neste trabalho, pretendemos esclarecer melhor os mecanismos moleculares subjacentes à homeostasia deste metal na DA, particularmente ao nível do efluxo celular. Assim, mediu-se em células mononucleares do sangue periférico de 73 doentes com DA e 74 controlos a expressão de genes diretamente envolvidos na regulação e exportação celular de Fe, utilizando a técnica de PCR quantitativo. Os resultados mostraram uma diminuição significativa na expressão dos genes aconitase (*ACO1*;  $P=0,007$ ); ceruloplasmina (*CP*;  $P<0,001$ ) e proteína precursora de beta amiloide (*APP*;  $P=0,006$ ) em doentes com DA comparativamente com os voluntários saudáveis. Estas observações apontam para uma diminuição significativa da expressão dos genes associados com a exportação de Fe celular mediada pela ferroportina na DA. Assim, o presente estudo reforça resultados anteriores que mostram alterações no metabolismo do Fe e podem estar na origem da retenção intracelular deste metal e aumento de stress oxidativo característicos desta patologia.

### \_Abstract

A dysregulation of iron (Fe) metabolism in Alzheimer's disease (AD) has been suggested previously. Herein, we intended to further clarify the molecular mechanisms underlying Fe homeostasis in AD particularly at the level of cellular iron efflux. Thus, the expression of specific Fe metabolism-related genes directly involved in Fe regulation and export was assessed by quantitative PCR in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 73 AD patients and 74 controls. A significant decrease in the expression of aconitase 1 (*ACO1*;  $P=0.007$ ); ceruloplasmin (*CP*;  $P<0.001$ ) and amyloid peptide precursor (*APP*;  $P=0.006$ ) genes was found in AD patients compared with healthy volunteers. These observations point out to a significant downregulation of the expression of genes associated with ferroportin-mediated cellular Fe export in PBMCs from AD patients. The present findings support previous studies suggesting impairment of Fe homeostasis in AD, which may lead to cellular Fe retention and oxidative stress, a typical feature of this disease.

### \_Introdução e objetivo

A Doença de Alzheimer (DA) é a doença neurodegenerativa mais comum e uma das formas mais predominantes de demência em todo o mundo (1).

Os eventos patológicos iniciais no desenvolvimento da DA parecem estar associados à formação de formas diméricas e oligoméricas de peptídeos  $\beta$  amilóides ( $A\beta$ ), que são formadas por clivagem específica na proteína precursora de beta amiloide (*APP*) (2) e se acumulam no cérebro. Embora os mecanismos subjacentes ao processo de deposição de  $A\beta$  sejam ainda pouco compreendidos, várias linhas de evidência indicam que o ferro (Fe) através da mediação da formação de radicais oxidativos, pode estar intimamente implicado neste processo (3). Estudos anteriores mostraram que a *APP* é capaz de facilitar o efluxo de Fe celular através da interação com ferroportina (FPN), o único exportador de Fe conhecido até ao momento em mamíferos (4). Além disso, a *APP* apresenta várias semelhanças com outras ferroxidasas, como a ceruloplasmina (Cp) (5), nomeadamente na capacidade de interação com a FPN a exportar Fe mas também a nível da regulação da sua expressão através de citocinas pró-inflamatórias (6) sugerindo uma estreita associação entre DA, metabolismo Fe e resposta imune.

Estudos anteriores sugerem que algumas variantes genéticas em diversos genes relacionados com o metabolismo de Fe representam fatores de risco para a DA. Recentemente, o trabalho desenvolvido pelo presente grupo de investigação mostrou a

existência de associações significativas entre esta doença e SNPs encontrados em vários genes como o *TF*, receptor da *TF2* (*TFR2*), aconitase 1 (*ACO1*) e a *FPN* (*SLC40A1*), apoiando o envolvimento de vias específicas do metabolismo do Fe na fisiopatologia da DA (7).

Neste contexto e a fim de melhor esclarecer a desregulação sistémica da homeostase do Fe na DA, propusemo-nos investigar mais profundamente nestes doentes a expressão de genes específicos do metabolismo do Fe, particularmente os relacionados com o efluxo celular deste metal.

## \_Materiais e métodos

### População do estudo

Um total de 73 doentes com DA e 74 indivíduos caucasianos saudáveis foram incluídos neste trabalho. O diagnóstico de DA foi realizado de acordo com as diretrizes do *National Institute of Neurological Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) (8). O estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética das instituições envolvidas e todos os participantes ou seus representantes legais assinaram um termo de consentimento informado, de acordo com a Declaração de Helsínki.

### Análises bioquímicas e de expressão génica

Amostras de sangue total de todos os participantes no estudo foram tratadas para isolamento de soro e células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), para posterior análise. Para as determinações bioquímicas, realizou-se a medição da concentração da Cp utilizando o método imunonefelométrico (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). A medição da atividade oxidásica da Cp (CPO) foi avaliada utilizando um ensaio colorimétrico manual, seguindo um protocolo adaptado (9).

Para o estudo de expressão génica, extraiu-se ARN total das PBMCs utilizando o kit miRNeasy Mini (Qiagen). A quantificação da expressão dos genes alvo foi realizada por PCR quantitativo num ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Warrington, UK). O desenho dos *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos específicos dos

genes *HPRT1*, *FURIN*, *FTH*, *FTL*, *ACO1*, *TF*, *HMOX1*, *NRF2*, *APP* e *CP*, realizou-se através do uso do *software* ABI Primer Express (Applied Biosystems). A síntese da primeira cadeia de cDNA foi realizada usando 1 µg de ARN total, oligo (dT) 12-18 e a SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Pasadena, EUA). Cada amostra de cDNA foi diluída 5 vezes, 5 µl da diluição foi adicionado a 5 pmol de *primers* e SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) para um volume de reação final de 15 µl. Os parâmetros para a amplificação foram: 10' a 95°C, 40 ciclos de 15'' a 95°C e 30'' a 60°C. Quantificou-se a expressão génica com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando o *HPRT1* como controle endógeno e um *pool* de ADNc como uma amostra de normalização.

O *software* PASW Statistics 18.0® (SPSS Inc.) foi utilizado para realizar a análise de variância univariada dos dados bioquímicos e de expressão génica, ajustados para idade e género (ANCOVA).

## \_Resultados

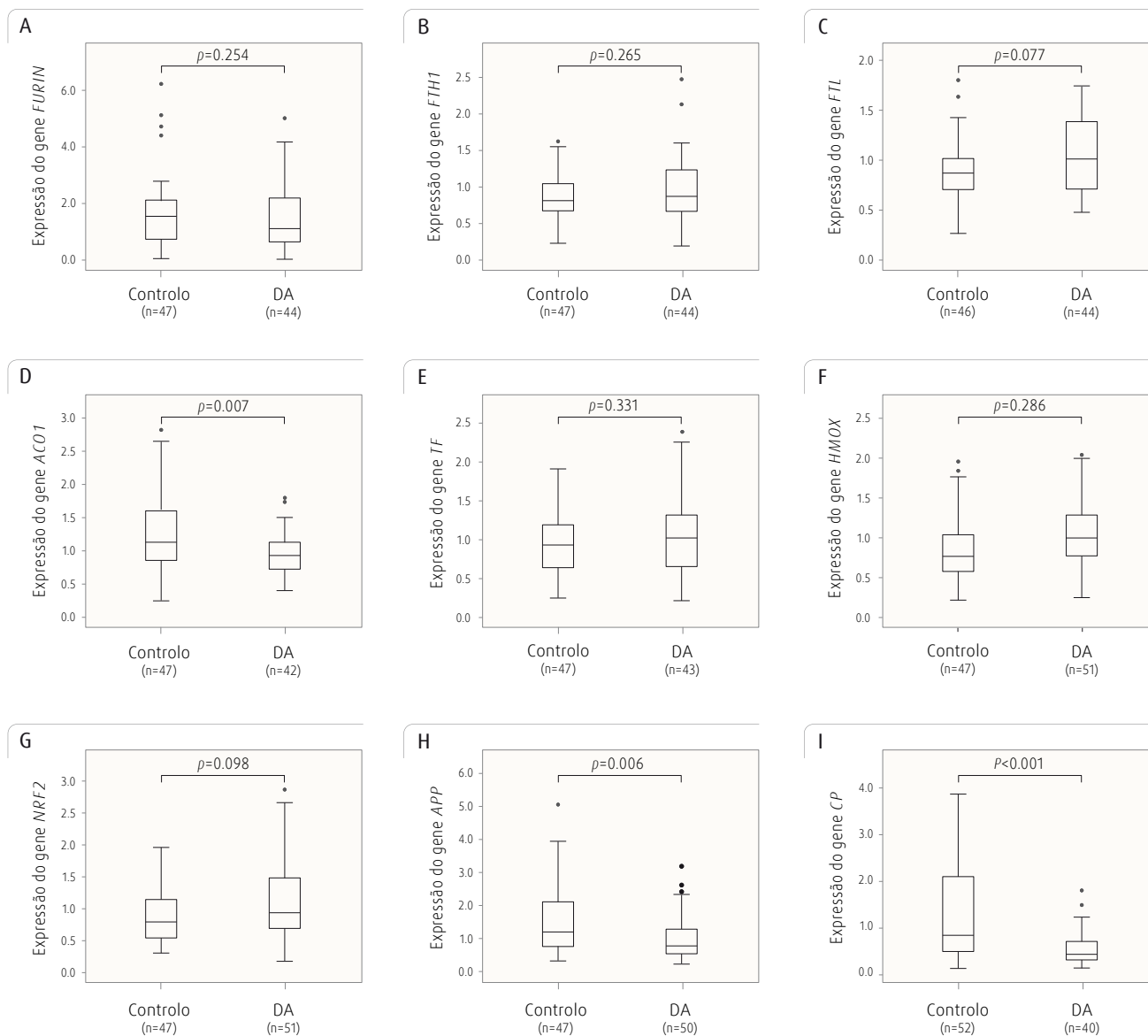
Os resultados obtidos a partir da análise qPCR mostraram uma diminuição significativa na expressão dos genes *ACO1* ( $P=0,007$ ), *CP* ( $P<0,001$ ) e *APP* ( $P=0,006$ ) de doentes com DA em comparação com voluntários saudáveis (figura 1). Não foram observadas diferenças significativas entre estes dois grupos na expressão dos genes *FURIN*, *FTH*, *FTL*, *TF*, *HMOX1* e *NRF2*, nem na concentração de Cp no soro e sua atividade oxidásica (tabela 1).

## \_Discussão e conclusão

Neste trabalho, verificou-se uma diminuição significativa na expressão da *CP* e da *APP* em doentes com DA em comparação com voluntários saudáveis. Estudos anteriores indicam o envolvimento destas duas proteínas no efluxo celular de Fe através da interação com a *FPN* (5, 10) corroborando a nossa hipótese de que o comprometimento da exportação de Fe celular representa um mecanismo chave na patogénese da DA.

Por outro lado, a Cp é expressa quer como uma proteína solúvel segregada para o meio extracelular (CPs), ou como uma

Figura 1: Níveis de expressão de vários genes do metabolismo do ferro em doentes com DA em comparação com controlos.



A distribuição dos níveis de expressão (A) furina, (B) *FTH1*, (C) *FTL*, (D) *ACO1*, (E) *TF*, (F) *HMOX1*, (L) *NRF2*, (H) *APP* e (I) *CP* de doentes com DA e controlos é representada pelas *box-plots*. A quantificação foi efetuada através da normalização de cada amostra relativamente a um *pool* de indivíduos e usando o *HPRT1* como um gene *housekeeping*. Os pontos representam *outliers* moderados. O número de indivíduos analisados está indicado dentro de parêntesis. Utilizou-se a análise de variância univariada, ajustada para idade e género (ANCOVA) para comparar os níveis de expressão entre os dois grupos.

Tabela 1: Quantificação da ceruloplasmina (Cp) e da atividade oxidásica da ceruloplasmina (CPO) em soro de doentes de DA e indivíduos controlo.

Parâmetros	Casos de DA		Controlos		ANCOVA significância (F)
	n	média ± DP	n	média ± DP	
Cp (mg/dL)	67	37,37 ± 8,75	67	34,34 ± 8,76	0,307 (1,05)
CPO	70	121,68 ± 36,70	73	116,98 ± 37,04	0,923 (0,01)

proteína de membrana ancorada à superfície celular através de um motivo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (11), constituindo esta última (GPI-Cp) a forma predominante de CP expressa no cérebro, onde desempenha um papel crucial na homeostase do Fe e na defesa antioxidante (12). Estudos anteriores mostram que a atividade ferroxidásica de ambas as isoformas da CP é crucial para a exportação de Fe mediada pela FPN. Neste trabalho, medimos a concentração da CPs bem como a sua atividade oxidásica no soro, mas não foram encontradas diferenças significativas entre doentes com DA e controlos. No entanto, não se pode descartar a hipótese da atividade oxidásica da CP estar alterada no cérebro dos doentes estudados. Além disso, estes resultados sugerem que a diminuição na expressão do ARNm total da CP encontrados em PBMCs de doentes com DA poderia ser atribuída a uma diminuição nos níveis de ARNm da GPI-Cp, em vez de uma diminuição da expressão de CPs.

Adicionalmente, neste estudo observou-se também uma diminuição da expressão da *ACO1* (ou *IRP1*) em PBMCs de doentes com DA, quando comparados com os controlos. Visto a *IRP1* ser uma proteína-chave no principal sistema de regulação celular pós-transcricional do metabolismo do ferro (*IRP/IRE*), pode-se especular sobre o impacto que a alteração da sua expressão pode ter nos mecanismos subjacentes à manutenção da homeostasia do Fe celular. De facto, alguns estudos demonstraram que os *IRP* estão implicados na regulação do Fe no cérebro. Por exemplo, os níveis de *APP* são modulados por *IRP1* (13) aumentando a sua expressão no hipocampo de ratos *IREB2*<sup>-/-</sup> (14). Além disso, também foi demonstrado que a regulação negativa da expressão de *ACO1* é induzida pela hipóxia (15). Curiosamente, um número substancial de evidências mostra a hipóxia como um importante fator ambiental que pode contribuir para a patogénese da DA (16). Assim, muito embora se desconheça os mecanismos pelos quais a diminuição de expressão *IRP1* em PBMC de doentes com DA tem um efeito na desregulação da homeostase do Fe, não se poderá subestimar o seu putativo impacto fisiológico neste contexto.

Em resumo, os dados obtidos neste estudo integram várias linhas de evidência que sugerem o comprometimento do efluxo de Fe celular na fisiopatologia da DA. Estes resultados obtidos com base numa estratégia de integração de dados genéticos e fenotípicos pode ser crucial para fornecer novas pistas para o desenvolvimento de novas formas de tratamento e diagnóstico desta patologia.

#### Referências bibliográficas:

- (1) Wortmann M. Dementia: a global health priority - highlights from an ADI and World Health Organization report. *Alzheimers Res Ther.* 2012;4(5):40. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3580397/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3580397/)
- (2) Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem.* 2007;101(5):1172-84. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x/full>
- (3) Duce JA, Bush AI. Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics. *Prog Neurobiol.* 2010;92(1):1-18.
- (4) Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature.* 2000;403(6771):776-81.
- (5) Duce JA, Tsatsanis A, Cater MA, et al. Iron-export ferroxidase activity of  $\beta$ -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell.* 2010;142(6):857-67. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2943017/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2943017/)
- (6) Rogers JT, Leiter LM, McPhee J, et al. Translation of the alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. *J Biol Chem.* 1999;274(10):6421-31. [www.jbc.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=10037734](http://www.jbc.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=10037734)
- (7) Crespo AC, Silva B, Marques L, et al. Genetic and biochemical markers in patients with Alzheimer's disease support a concerted systemic iron homeostasis dysregulation. *Neurobiol Aging.* 2014;35(4):777-85. Epub 2013 Oct 17.
- (8) McKhann G, Drachman D, Folstein M, et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 1984;34(7):939-44.
- (9) Schosinsky KH, Lehmann HP, Beeler MF. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. *Clin Chem.* 1974;20(12):1556-63.
- (10) Marques L, Auriac A, Willemetz A, et al. Immune cells and hepatocytes express glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin at their cell surface. *Blood Cells Mol Dis.* 2012;48(2):110-20. Epub 2011 Dec 16.
- (11) Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:439-58. Epub 2002 Apr 4.
- (12) Patel BN, Dunn RJ, Jeong SY, et al. Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *J Neurosci.* 2002;22(15):6578-86. [www.jneurosci.org/content/22/15/6578.long](http://www.jneurosci.org/content/22/15/6578.long)
- (13) Cho HH, Cahill CM, Vanderburg CR, et al. Selective translational control of the Alzheimer amyloid precursor protein transcript by iron regulatory protein-1. *J Biol Chem.* 2010;285(41):31217-32. [www.jbc.org/content/285/41/31217.long](http://www.jbc.org/content/285/41/31217.long)
- (14) Mueller C, Magaki S, Schrag M, et al. Iron regulatory protein 2 is involved in brain copper homeostasis. *J Alzheimers Dis.* 2009;18(1):201-10. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19584448/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19584448/)
- (15) Luo QQ, Wang D, Yu MY, et al. Effect of hypoxia on the expression of iron regulatory proteins 1 and the mechanisms involved. *IUBMB Life.* 2011;63(2):120-8. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.419/full>
- (16) Daulatzai MA. Death by a thousand cuts in Alzheimer's disease: hypoxia--the prodrome. *Neurotox Res.* 2013;24(2):216-43.

*ficha técnica*

**\_ Título:** Boletim Epidemiológico Observações

**\_ Periodicidade:** Quadrimestral

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

**\_ Numeração:** 2ª série

Volume 5, número 16

Maio - Agosto 2016

**\_ 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 Caniça**, Conselho Científico do INSA

**Manuela Cano**, Departamento de Saúde Ambiental

**Peter Jordan**, Departamento de Genética Humana

**Silvia Viegas**, Departamento de Alimentação e Nutrição

**\_ 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 2016.

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**