

TRENDS IN
**Biomedical
Laboratory Sciences**



TRENDS IN Biomedical Laboratory Sciences

Ficha Técnica

Trends in Biomedical laboratory
Sciences
Volume 3, N.º1, 2025

Periodicidade
Anual

Direcção/Edição
Diana Martins

Conselho Editorial
Fernando Mendes
Josiana Vaz
Rúben Roque
Sílvia Fernandes
Vera Calhau

Propriedade
BioMedLab- Associação Portuguesa
de Ciências Biomédicas Laboratoriais

Imagem e Comunicação
Carolina Melo
Raquel Lopes

Contacto
revista@biomedlab.pt

Editorial 1

Destaque:

Substituição da formalina neutra a 10% por agave na
fixação de material biológico em histologia 4

Efeito da Espessura do Corte Histológico na Qualidade
da Impregnação Argêntica 17

Immune Checkpoint Inhibitors: A New Perspective in
the Context of Colorectal Carcinoma 27

O Fenómeno Postmortem dos Dentes Cor-de-rosa 45

Identificação de genes de resistência aos
carbapenemos, em amostras de urocultura na ULS
Algarve – Hospital de Faro 55

Caraterização da Prevalência da Hemoglobina S nas
dádivas sanguíneas da região do Algarve 64

Caracterização dos Tumores do Sistema Nervoso
Central na População que recorre à Unidade Local de
Saúde do Algarve 73

Playground contamination by Potentially Pathogenic
Bacteria: A Systematic Review 89

Implementation of risk matrices in Blood Bank
Services: The perspective of Biomedical Laboratory
Scientists 98

Avaliação da higienização das mãos e dos telemóveis de
estudantes de ensino superior 107

Transfusion strategies to reduce the risk of
alloimmunization in patients with sickle cell anaemia 114

Editorial

O conhecimento é um bem que deve ser para todos

A Ciência representa saber partilhado: uma informação só é ciência se for aceite, reconhecida e validada por uma comunidade científica. Neste sentido, a comunicação eficaz de descobertas científicas é essencial para o avanço do conhecimento. Com o desenvolvimento de novas ferramentas digitais, a qualidade e a eficácia da comunicação científica enfrentam alguns desafios. A Inteligência Artificial (IA) surge como uma ferramenta inovadora com o potencial de revolucionar a maneira como os textos científicos são elaborados, revistos e comunicados. Tendo por base algoritmos de processamento de linguagem natural e análise de texto, a IA oferece uma série de capacidades que podem melhorar significativamente a comunicação científica. Contudo, a utilização desta ferramenta no processo de escrita científica coloca-nos num equilíbrio delicado entre a inovação e a integridade. Devem ser ponderadas as implicações éticas e legais da aplicação destas novas ferramentas no domínio científico. É fundamental garantir a transparência, a equidade e a responsabilidade na sua implementação, garantindo que complementam e fortaleçam a prática científica e não a substituem.

É imprescindível não esquecer que hoje e sempre, são os recursos humanos o verdadeiro motor da ciência, aqueles que possuem conhecimento e que são, simultaneamente agentes de inovação. A partilha de conhecimento é essencial para a ciência, sendo a tecnologia digital facilitadora deste processo. Sinergicamente poderemos maximizar o potencial da IA, como uma importante aliada na comunicação científica e impulsionar a inovação e o progresso em todas as áreas do conhecimento.

A Trends in Biomedical Laboratory Sciences, revista da Associação Portuguesa de Ciências Biomédicas Laboratoriais (BioMedLab) entra no seu terceiro ano de existência e é com enorme satisfação que apresentamos o terceiro número da Revista, que cresce e se desenvolve na partilha e divulgação de conhecimento. Neste número, além de artigos originais, revisões sistemáticas e da literatura, incluímos um suplemento onde constam as comunicações orais e posters apresentados no III Congresso BioMedLab.

Fica a nossa intenção, que com engenho e arte possamos em conjunto divulgar a produção científica na área da Biomedicina Laboratorial, mantendo viva a chama da Ciência e do Conhecimento nas Ciências Biomédicas Laboratoriais!

Editora
Diana Martins



Editorial

Construir pontes para o futuro, rumo a uma profissão unificada, forte, diferenciada e com especializações

Durante o ano de 2024 celebraram-se os 10 anos da criação da licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais, em Portugal. Este processo teve o seu início décadas antes (1990), num relatório do Ministério da Saúde elaborado por Rui Guerra. Posteriormente durante a harmonização dos ciclos de estudo com o processo de Bolonha, esta proposta voltou a ser revisitada, não tendo sido bem acolhida, apesar de fundamentação clara e objetiva, sobre o panorama Europeu e Internacional da existência desta formação, bem como de uma só profissão.

Finalmente em 2013, a Agência de Avaliação e Acreditação do Ensino Superior criou um grupo de trabalho para elaborar um relatório com o objetivo de apresentar uma proposta de ciclo de estudos em Ciências Biomédicas Laboratoriais. Tal veio a acontecer em 2014, ano em que os primeiros alunos iniciaram a frequência neste ciclo de estudos. Em 2026, teremos uma década de licenciados em Ciências Biomédicas Laboratoriais.

Estamos no momento certo para assumir que esta foi uma aposta ganhadora em Portugal, que atualizou esta licenciatura, para uma formação de cariz universitário a ser ministrado no ensino superior politécnico. Claramente potenciou conhecimentos, competências e aptidões, anteriormente separados em dois cursos de nível superior, numa licenciatura que dota os seus licenciados de uma capacidade de conceber, desenvolver e analisar criticamente a sua profissão, sendo um ator fundamental no Sistema de saúde português.

Mas quem é licenciado em Análises Clínica e Saúde Pública e em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica, faz igualmente um percurso académico brilhante, pois diariamente atualiza conhecimentos, competências e aptidões para que estas profissões, a uma velocidade estonteante, acompanhem o desenvolvimento do conhecimento científico por forma a serem melhores profissionais de saúde.

Em Portugal, em 2025, só existe a licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais, que atualmente dá acesso a duas profissões reguladas (Técnico de Análises Clínica e Saúde Pública e Técnico Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica) e não apenas a uma profissão, que é a realidade Europeia e Internacional.

Todos sem exceção temos orgulho nas nossas profissões! Nas nossas Associações Profissionais Sindicais e Não Sindicais.

Temos orgulho no nosso passado e presente, mas o futuro é já amanhã!

A curto prazo teremos de encontrar uma solução que congregue o passado e o futuro, esbata as diferenças, potencie o comum, unifique, honre todos os nossos pioneiros e traga para Portugal, uma só profissão, como já é uma realidade na Europa e fora da Europa.

Para tal julgo que o ideal é reconhecer que todos trabalhamos na Biomedicina Laboratorial, seja em anatomia patológica, patologia clínica, serviços de sangue, serviços de sangue e medicina transfusional, saúde pública, e.t.c.

Para unir a profissão, e não dividir, não temos tempo, nem economia, nem escala, para criar um terceiro grupo profissional. Assim julgo que o ideal é criar uma profissão que respeite o passado e prepare o futuro. O Biomédico Laboratorial!

Para quem é licenciado em Análises Clínica e Saúde Pública e em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica, a proposta seria ser um Biomédico Laboratorial com a sua área de atuação restrita (devidamente identificado na sua cédula profissional) a cada uma das áreas de formação. Nos licenciados em Ciências Biomédicas Laboratoriais seria uma cédula, biomédico laboratorial sem restrição.

Ser de Análises Clínicas e Saúde Pública ou Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica não é uma especialização, é uma área da profissão!

Editorial

A proposta de eliminar o termo Técnico das designações atuais profissionais, e adquirir comparabilidade Europeia (Biomedical Scientist) e Internacional (Biomedical Laboratory Scientist) é fundamental! Facilita o recrutamento, concursos e áreas de atuação, integrando-nos todos num grupo profissional mais forte, mais unido, robusto e com ambições superiores!

Para além do acima mencionado, há uma necessidade emergente de começar a especializar a profissão, que naturalmente deverá ter reflexo nas acrescidas responsabilidades e funções a exercer pelo Biomédico laboratorial com especialização.

Em virtude de não termos ordem profissional, algo que ambicionamos a curto prazo, temos de coletivamente, entre todos os atores (academia, associações profissionais sindicais e não sindicais, e os profissionais) nos organizar num diálogo ativo, abrangente, construtivo e positivo, a pensar futuro.

É premente uma reflexão sobre as áreas de especialização, assim como que conhecimentos, competências e aptidões são necessários, mas acima de tudo como podemos adicionar valor ao sistema de saúde com esta diferenciação.

Em linha com o exposto, outros grupos profissionais, na ausência de uma Ordem Profissional, dotaram os seus profissionais dessa especialização, através da Academia. Após constituição de Ordem Profissional, estas especializações foram reconhecidas.

Outros grupos profissionais, na ausência de uma ordem profissional, dotaram os seus elementos, via academia com esses conhecimentos, competências e aptidões, mais tarde com aprovação a Ordem Profissional, passaram a colaborar e a reconhecer essas especializações.

Existem vários caminhos para o mesmo fim e tenho a certeza que para nós chegou o tempo de unir, criar pontes e mudar o presente, para ter um futuro garantidamente brilhante. Viva as Ciências Biomédicas Laboratoriais!

Termino com o desejo profundo de que um dia tenhamos só uma profissão, com especializações, em que todos estão incluídos, todos sem exceção, naturalmente com reflexo na carreira destes profissionais de saúde.

Viva o Biomédico Laboratorial!

Presidente BioMedLab
Fernando Mendes



Artigo Original

Substituição da formalina neutra a 10% por agave na fixação de material biológico em histologia

Beatriz Almeida¹, Joana Silva¹, Mariana Maria¹, Gilda Cunha^{1,2}, Paula Mendonça^{2,3}, Carina Ladeira^{2,4,5*}

¹ Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal; estesl@estesl.ipl.pt.

² H&TRC- Health & Technology Research Center, ESTeSL - Escola Superior de Tecnologia da Saúde, Instituto Politécnico de Lisboa, 1990-096 Lisbon, Portugal.

³ Centro de Investigação em Modelação e Otimização de Sistemas Multifuncionais, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.

⁴ NOVA National School of Public Health, Public Health Research Centre, Universidade NOVA de Lisboa, Lisbon, Portugal.

⁵ Comprehensive Health Research Center (CHRC), Lisbon, Portugal.

* Correspondência: carina.ladeira@estesl.ipl.pt

Resumo: A utilização de formaldeído na fixação de amostras biológicas apresenta riscos para a saúde humana e ambiente, devido à sua toxicidade e potencial carcinogénico, realçando a necessidade de encontrar alternativas mais seguras e sustentáveis. O objetivo deste estudo é testar o agave como fixador biológico, comparando os seus resultados com os da formalina neutra tamponada a 10% (FNT a 10%) em termos de preservação das estruturas histomorfológicas, com ênfase na segurança dos profissionais de saúde e minimização do impacto ambiental. Utilizaram-se três órgãos de porco doméstico (*Sus domesticus*) – coração, fígado e rim – dos quais foram retirados 15 fragmentos de cada. Estes fragmentos foram submetidos a diferentes soluções fixadoras: FNT a 10%, agave a 10% e agave a 20% em água. Após inclusão em parafina, foi realizado um corte histológico a partir de cada bloco, totalizando 45, corados com hematoxilina-eosina. Os cortes histológicos foram avaliados por dois avaliadores independentes que atribuíram valores a quatro parâmetros (Membrana Celular, Detalhe Nuclear, Qualidade da Coloração e Morfologia Tecedular). A FNT a 10% apresentou pontuações finais superiores, o que sugere melhor capacidade fixativa geral. Em relação às soluções de agave, a de 20% mostrou-se ligeiramente superior à de 10%. Dos três órgãos analisados, o coração apresentou-se como o mais bem preservado, com as médias mais altas e menores variações na maioria dos parâmetros, indicando uma melhor capacidade de preservação de estruturas histomorfológicas. Estes resultados sugerem que as soluções de agave, especialmente a 20%, podem ser consideradas alternativas viáveis com potencial para melhoria e otimização futura.

Citation: Almeida, B.; Silva, J.; Maria, M.; Mendonça, P.; Cunha, Gilda; Ladeira, C. Substituição da Formalina Neutra a 10% por Agave na fixação de tecidos biológicos. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2025 Mar 9; 3(1): 4-16.

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: November 2024

Accepted: February 2025

Published: March 2025

Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences

Palavras-chave: Agave, Formalina, Fixação, Substituto da Formalina, Anatomia Patológica, Histologia.

1. Introdução

A fixação de tecidos biológicos constitui uma etapa fundamental na técnica histológica, exigindo ser imediata após a remoção dos tecidos, de modo a mantê-los o mais semelhante possível ao estado *in vivo*. O principal objetivo é evitar a autólise celular pelas enzimas endógenas e/ou flora microbiana, permitindo a estabilização da estrutura molecular e proteção dos tecidos e células das agressões do processamento histológico e colorações (1). Este processo permite a realização de análises histológicas e diagnósticos clínicos exatos. No ambiente laboratorial, existe uma grande variedade de fixadores disponíveis, cada um com diferentes vantagens e desvantagens (2,3).

O formaldeído, comumente usado sob a forma de formalina (solução aquosa de 37 a 40% de formaldeído), é o mais usado, por ter baixo custo e grande poder de penetração nos tecidos, com artefactos de retração reduzidos (4). O seu mecanismo de ação consiste em criar ligações cruzadas entre as proteínas, estabilizando-as por pontes de metileno (5–7).

Contudo, o uso de formaldeído levanta preocupações de segurança, saúde e ambientais. É um composto carcinogénico e tóxico por inalação, contacto cutâneo e ingestão, e pode ainda provocar danos severos na pele, olhos e reações alérgicas, de acordo com a *International Agency for Research on Cancer* (IARC). Ainda de acordo com a IARC, a exposição contínua ao formaldeído é um fator de risco de cancro da nasofaringe e leucemia, tendo sido classificado como cancerígeno para o Homem (grupo 1) em 2004 (8–11). Além disso, a sua produção e eliminação inadequadas contribuem para a contaminação ambiental, surgindo a necessidade de encontrar soluções mais ecológicas e seguras (4,10). Neste contexto, é crucial a procura de alternativas à formalina de qualidade similar, mais ecologicamente sustentáveis, biodegradáveis, de menor impacto ambiental e mais seguro para os profissionais de saúde. Este projeto de investigação propôs explorar o agave como uma opção segura, sustentável e eficaz à formalina (12,13).

Uma das alternativas já avaliadas foi o mel, que demonstrou ser uma alternativa segura, agindo de forma similar à formalina. Este possui um possível mecanismo de ação em que a frutose diminui o pH e forma pontes aldeído com os grupos amina das proteínas, de maneira semelhante à formalina (14–17).

O agave é uma planta originária do sul dos Estados Unidos e América Latina, sendo historicamente utilizada de diversas formas como planta medicinal, adoçante, produtos farmacêuticos, entre outros (18).

O género *Agave* inclui mais de 210 espécies, das quais 159 estão presentes no México (18). Esta planta tem um ciclo de vida de cinco a sete anos e a sua produção é realizada quando as plantas têm pelo menos seis anos de idade, que é a idade de maturidade da planta (19). A variabilidade dos métodos de produção, tipo de agave, região de cultivo e a parte da planta utilizada nos processos de produção (por exemplo, folhas e seiva) produzem uma ampla variedade de produtos vendidos como agave. O desenvolvimento do agave é influenciado por diferentes fatores, entre eles, nutrientes e temperatura, uma vez que é pouco tolerante a baixas temperaturas (abaixo de 20°C) (18).

A seiva do agave, rica em frutose e pequenas quantidades de glicose, é obtida através de processos de hidrólise de polímeros presentes na planta. Estes processos podem ser enzimáticos, químicos ou térmicos. A hidrólise térmica é a mais usada industrialmente (18,20).

Resumindo, o produto final, de origem vegetal, é notavelmente rico em hidratos de carbono, principalmente frutose ($\geq 60\%$ de sólidos solúveis totais), seguida de glicose e sacarose. Esta composição de hidratos de carbono proporciona ao agave um baixo índice glicémico, muito menor do que o do mel. Tem propriedades antissépticas, antioxidantes e antibióticas contra, por exemplo, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (21–23). Nos últimos tempos tem sido uma alternativa bastante procurada pelas indústrias farmacêuticas e alimentares graças às suas aplicações tecnológicas, propriedades funcionais e efeitos benéficos para a saúde (18).

Dado que as propriedades do mel e do agave são semelhantes, o objetivo principal deste estudo é avaliar o potencial do agave como fixador biológico, comparando os seus efeitos com os da formalina neutra tamponada a 10% (FNT a 10%) na preservação das estruturas histomorfológicas. Além disso, este trabalho destaca a importância da segurança dos profissionais de saúde, propondo o agave como uma alternativa mais segura.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparação das soluções fixadoras

Foi utilizada uma solução comercial de FNT a 10%, *DiaPath*® (Bergamo, Itália). As soluções de agave foram preparadas a 10% (m/v) em água destilada e a 20% (m/v) em água destilada. Estas diluições foram baseadas em artigos científicos que apresentam o mel como um potencial agente fixador de tecidos biológicos (14–17).

2.2. Amostras biológicas e fixação

Foram selecionadas três amostras de órgãos de porco doméstico (*Sus domesticus*) adquiridos numa superfície comercial, que tinham como finalidade o consumo humano. Durante o exame macroscópico, foram recolhidos fragmentos dos diferentes órgãos (coração, fígado e rim) com dimensões aproximadas de 1,5 centímetros (cm) de comprimento, 1,0 cm de largura e 0,5 cm de espessura, num total de 15 fragmentos por órgão. Os diferentes fragmentos foram distribuídos pelas três soluções fixadoras, sendo que em cada uma foram imersos cinco fragmentos de cada órgão, totalizando 15 fragmentos por solução fixadora. A fixação teve uma duração de 24 horas à temperatura ambiente.

2.3. Processamento, inclusão, microtomia, coloração e montagem

O processamento histológico foi realizado *overnight* com etanol, em concentrações crescentes (70%, 96% e 100%), xileno e parafina. As amostras foram incluídas em parafina e, posteriormente, realizou-se a etapa da microtomia em que foram obtidos cortes com uma espessura de 3 µm. De cada bloco foi obtido um corte histológico, totalizando 45, corados com hematoxilina-eosina.

2.4. Instrumentos para recolha de dados

Os cortes histológicos foram avaliados por dois observadores independentes. Cada avaliador recebeu uma grelha de avaliação e a respetiva grelha explicativa dos diferentes parâmetros: Membrana Celular (MC), Detalhe Nuclear (DN), Qualidade da Coloração (QC) e Morfologia Tecidual (MT). A grelha explicativa (material suplementar) pretende garantir que os observadores possuam uma compreensão uniforme dos critérios de avaliação e respetivos parâmetros. As lâminas de cada órgão foram agrupadas, com as soluções fixadoras misturadas dentro de cada grupo de órgãos e sem ordem fixa. De modo a não influenciar a avaliação, as lâminas foram codificadas de 1 a 45. A avaliação foi feita através da atribuição de valores de 0 a 3, sendo que 0 é considerado insuficiente, 1 satisfatório, 2 bom e 3 excelente. A Pontuação Final (PF) de cada corte histológico foi calculada através da seguinte fórmula:

$$PF = MC \times 2 + DN \times 2 + QC \times 1 + MT \times 3$$

A cada parâmetro foi atribuída uma ponderação, refletindo a sua importância relativa na análise histológica. A MC e o DN são fundamentais para avaliar a integridade estrutural e a clareza dos componentes celulares, tendo sido atribuído um fator de 2, destacando a sua importância. A QC é essencial para a visibilidade e contraste das estruturas celulares, tendo sido atribuído um fator de 1. Por fim, a MT é o fator crucial para a avaliação da preservação da estrutura e forma das células, tendo recebido uma ponderação de 3. Esta ponderação diferenciada, assegura uma avaliação precisa da eficácia do agente fixador, priorizando aspetos essenciais da preservação celular. Com esta fórmula, o valor mais baixo possível é 0 e o mais alto 24. De modo a facilitar a compreensão das pontuações obtidas, estas foram convertidas numa escala de 0-100.

Os resultados deste estudo estão apresentados com recurso a tabelas e *boxplots*, analisados estatisticamente no *software IBM SPSS Statistics* (versão 29.0.2.0). A análise dos dados envolveu o cálculo de médias e respetivos desvios-padrão para cada parâmetro (MC, DN, QC e MT), de forma a obter resultados mais fidedignos e minimizar a influência dos *outliers*. Além disso, realizou-se o cálculo da PF de cada uma das soluções fixadoras testadas, baseada nos valores desses parâmetros. O mesmo esquema de análise foi aplicado a cada órgão, de forma a perceber qual deles obteve o melhor desempenho.

A normalidade dos dados foi avaliada, tendo-se optado pela aplicação do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos. Considerou-se um valor de *p* de 0,05 como critério de significância (24–26).

A comparação foi baseada nos valores médios obtidos em cada uma das soluções fixadoras testadas e diferentes amostras biológicas.

3. Resultados

3.1. Soluções fixadoras

A FNT a 10% apresentou as médias superiores em todos os parâmetros (MC, DN, QC, MT), com PF de 73,90 e desvio padrão de 7,04 (Tabela 1), destacando a sua superioridade como solução fixadora. Apesar de semelhantes, as soluções de agave a 10% e 20% obtiveram diferenças: a de agave a 20% teve médias ligeiramente superiores no DN (1,97) e MT (2,00), enquanto a de agave a 10% se destacou na QC (2,27) e MC (1,83). A PF para o agave 20% (65,42) é ligeiramente superior ao de agave a 10% (64,73), mostrando maior eficácia.

Tabela 1. Estatística descritiva com respetivas médias e desvios padrão das diferentes soluções fixadoras em estudo.

Solução Fixadora	n	Média	Desvio padrão
Agave a 10%	Membrana Celular	1,83	0,90
	Detalhe Nuclear	1,90	0,54
	Qualidade da Coloração	2,27	0,42
	Morfologia Tecidual	1,93	0,42
	Pontuação Final	1,53	3,81
	Pontuação Final (0-100)	64,73	15,90
	n (válido completo)	15	
Agave a 20%	Membrana celular	1,77	0,42
	Detalhe Nuclear	1,97	0,44
	Qualidade da Coloração	2,23	0,37
	Morfologia Tecidual	2,00	0,33
	Pontuação Final	15,70	2,02
	Pontuação Final (0-100)	65,42	8,40
	n (válido completo)	15	
Formalina Neutra Tamponada a 10%	Membrana Celular	2,20	0,49
	Detalhe Nuclear	2,37	0,23
	Qualidade da Coloração	2,30	0,32
	Morfologia Tecidual	2,10	0,28
	Pontuação Final	17,73	1,69
	Pontuação Final (0-100)	73,90	7,04
	n (válido completo)	15	

Pelo teste de Kruskal-Wallis, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o agave a 20% e a FNT a 10% ($p=0,019$), enquanto entre o agave a 10% e a 20%, assim como entre o agave a 10% e FNT a 10%, não houve diferenças significativas ($p\geq 0,05$).

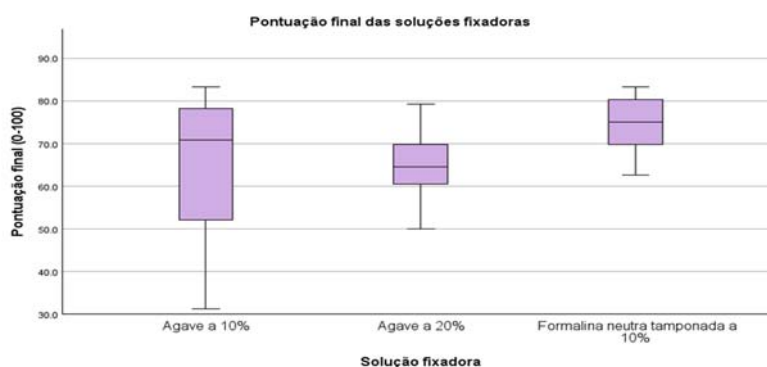


Figura 1. Boxplot da Pontuação Final (PF 0-100) das soluções fixadoras relativamente a cada fixado

3.2. Amostras biológicas

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, observou-se que o coração apresentou as médias superiores em todos os parâmetros, importando ressaltar que, no parâmetro MT, o valor observado foi equivalente ao do fígado. Além disso, a preservação das estruturas histomorfológicas foi mais eficaz no coração, o que é evidenciado pela maior PF (73,62) e menor desvio padrão (6,57).

Ao comparar os resultados obtidos para o fígado e rim, foi verificado que o fígado apresentou médias superiores em todos os parâmetros, o que se traduz numa PF mais elevada em comparação ao rim. No entanto, ao considerar os valores do desvio padrão, constatou-se que estes foram mais elevados no fígado (12,40), especialmente nos parâmetros de MC, DN e MT, proporcionando maior variabilidade nos resultados.

Tabela 2. Estatística descritiva com respetivas médias e desvios padrão das amostras biológicas em estudo.

Amostras biológicas	n	Média	Desvio padrão
Coração	Membrana Celular	2,33	0,41
	Detalhe Nuclear	2,20	0,32
	Qualidade da Coloração	2,40	0,21
	Morfologia Tecidular	2,07	0,37
	Pontuação Final	17,67	1,56
	Pontuação Final (0-100)	73,62	6,57
	n (válido completo)	15	
Fígado	Membrana celular	2,03	0,64
	Detalhe Nuclear	2,10	0,54
	Qualidade da Coloração	2,40	0,21
	Morfologia Tecidular	2,07	0,42
	Pontuação Final	16,87	2,98
	Pontuação Final (0-100)	70,28	12,41
	n (válido completo)	15	
Rim	Membrana Celular	1,43	0,56
	Detalhe Nuclear	1,93	0,50
	Qualidade da Coloração	2,00	0,46
	Morfologia Tecidular	1,90	0,21
	Pontuação Final	14,43	2,69
	Pontuação Final (0-100)	60,14	11,22
	n (válido completo)	15	

Através do teste Kruskal-Wallis, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o rim e fígado ($p=0,009$) e rim e coração ($p=0,002$), sendo que entre fígado e coração, não se verificaram. Importa observar um *outlier* com valor 33, apresentado na Figura 2. Este valor é atribuído ao rim fixado com agave a 10%, que registou o único valor de 0 no parâmetro CC em todo o conjunto de dados.

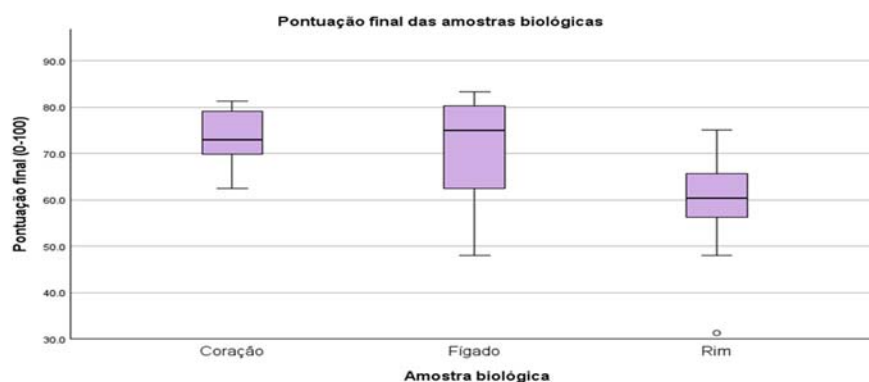


Figura 2. Boxplot da Pontuação Final (PF 0-100) relativamente a cada órgão.

3.3. Comportamento das soluções fixadoras nos diferentes tecidos

No caso do agave a 10%, observam-se resultados superiores no coração (PF=77,09), enquanto no rim são os mais baixos (PF=50,42), um padrão que se repete também no agave a 20%. Contudo, o agave a 10% proporciona uma preservação mais eficiente do coração em comparação com o agave a 20% (PF=72,92). Quanto à FNT a 10%, esta apresenta um desempenho superior na preservação do fígado (PF=80,42) mas inferior no rim (PF=70,42). A única característica comum entre as três soluções testadas é que o rim foi o órgão menos preservado em todos os casos.

Tabela 3- Desempenho das soluções fixadoras nos diferentes tecidos.

Agave a 10%			Agave a 20%			FNT a 10%		
Órgão	PF(0-100)	Média	Órgão	PF (0-100)	Média	Órgão	PF (0-100)	Média
Rim	60,42	50,42	R	64,59	59,59	Rim	66,67	70,42
Rim	58,34		R	60,42		Rim	72,92	
Rim	31,25		R	60,42		Rim	64,59	
Rim	47,92		R	50,00		Rim	75,01	
Rim	54,17		R	62,51		Rim	72,92	
Coração	81,26	77,09	C	79,17	72,92	Coração	75,01	70,84
Coração	79,17		C	70,84		Coração	72,92	
Coração	72,92		C	79,17		Coração	81,26	
Coração	81,26		C	66,67		Coração	62,51	
Coração	70,84		C	68,76		Coração	62,51	
Fígado	75,01	66,67	F	68,76	63,76	Fígado	77,09	80,42
Fígado	77,09		F	72,92		Fígado	83,34	
Fígado	50,00		F	64,59		Fígado	81,26	
Fígado	83,34		F	52,09		Fígado	81,26	
Fígado	47,92		F	60,42		Fígado	79,17	

3.4. Aspetos microscópicos das amostras biológicas

As seguintes figuras ilustradas permitem visualizar as possíveis diferenças observadas nas três soluções fixadoras aplicadas. De forma geral, a solução de FNT a 10% demonstrou melhor desempenho relativamente ao MC e DN em algumas situações, enquanto as soluções à base de agave apresentaram resultados mistos, com melhor desempenho na QC, mas apresentando limitações noutros parâmetros dependendo do órgão avaliado.

Cada conjunto de imagens nas Figuras 3, 4 e 5, apresentam as amostras biológicas fixadas com cada uma das soluções fixadoras em que foram obtidas as PF superiores, permitindo uma comparação direta dos parâmetros MC, DN, QC e MT (27).

Na Figura 3, a fixação com FNT a 10% apresenta melhor MC e DN. A solução de agave a 10% é a que demonstra pior DN. As soluções agave a 10% e agave a 20% têm uma QC superior à da FNT a 10%. Em termos MT, as três soluções fixadoras são comparáveis.

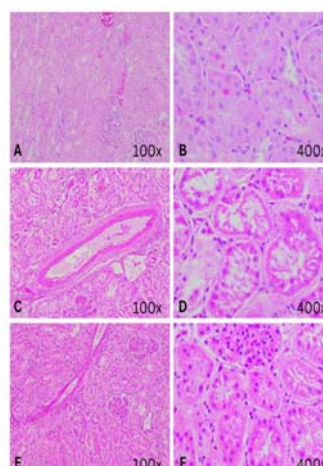


Figura 3. Aspetos microscópicos dos cortes histológicos com Pontuações Finais superiores de cortes de rim. A e B- FNT a 10%; C e D- agave a 10%; E e F- agave a 20%.

Na Figura 4, a solução de agave a 10% apresenta o melhor MC, enquanto o agave a 20% e FNT a 10% têm resultados comparáveis. As soluções agave a 10% e agave a 20% mostram um DN igual e ambas superiores ao da FNT a 10%. Relativamente à QC, as três soluções fixadoras são equivalentes. Quanto à MT, a FNT a 10% e o agave a 20% são iguais e ambos superiores ao agave a 10%.

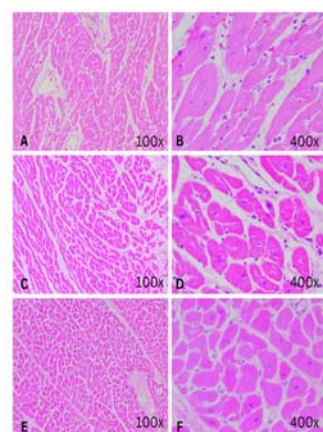


Figura 4. Aspetos microscópicos dos cortes histológicos com pontuações finais superiores de cortes de coração. A e B- FNT a 10%; C e D- agave a 10%; E e F- agave a 20%.

Na Figura 5, a FNT a 10% e o agave a 10% apresentam um MC e MT semelhantes e ambas superiores ao agave a 20%. O DN e a QC são comparáveis entre as três soluções fixadoras.

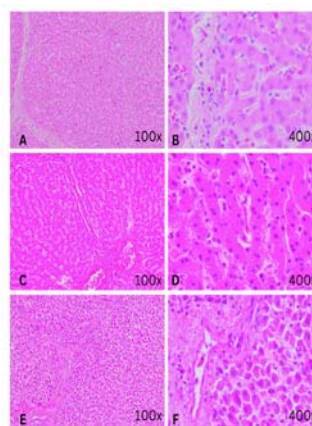


Figura 5. Aspectos microscópicos dos cortes histológicos com Pontuações Finais superiores de cortes de fígado. A e B- FNT a 10%; C e D- agave a 10%; E e F- agave a 20%.

Na figura 6, encontram-se representados os cortes histológicos que obtiveram as PF inferiores, independentemente do órgão. No caso do rim fixado com agave a 10%, o MC revelou-se insuficiente. O rim fixado com agave a 20% apresentou resultados igualmente baixos em todos os parâmetros. Para o fígado fixado com agave a 10%, os resultados foram insatisfatórios tanto no MC como no DN.

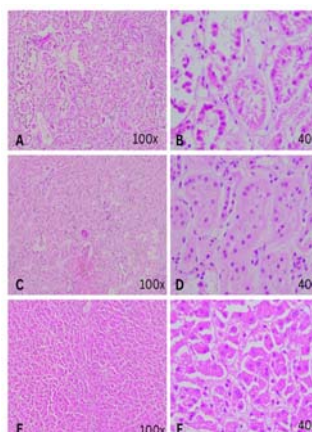


Figura 6. Aspectos microscópicos dos cortes histológicos com Pontuações Finais inferiores de cortes de rim e de fígado. A e B- rim fixado com agave a 10%; C e D- rim fixado com agave a 20%; E e F- fígado fixado com agave a 10%.

4. Discussão

Os resultados do estudo indicam que a FNT a 10% é a solução fixadora mais eficaz e confiável, tendo apresentado as pontuações finais superiores em todos os parâmetros e maior consistência nos resultados. Já a solução de agave a 20% demonstrou-se promissora, com eficácia e estabilidade superiores à solução de agave a 10%. A diferença significativa entre o agave a 20% e a FNT a 10% sustenta a argumentação apresentada anteriormente. A ausência de diferença significativa entre o agave a 10% e a FNT a 10% pode ser atribuída à alta variabilidade dos resultados, especialmente no agave a 10%, cuja capacidade fixativa não é uniforme, causando variações na preservação dos tecidos. Além disso, diferentes tipos de tecidos podem reagir de forma distinta ao mesmo fixador devido à constituição macromolecular específica, contribuindo para a variabilidade observada.

Os resultados do nosso estudo corroboram parcialmente as evidências de estudos anteriores relativamente à utilização de soluções ricas em frutose, como o mel, na fixação

de tecidos. Estudos indicam que a frutose presente no mel reduz o pH e forma pontes de aldeído com grupos amina das proteínas, similar à ação da formalina. Considerando que o agave também é rico em frutose e apresenta pH levemente ácido (entre 3,66-5,23 conforme a literatura), é plausível que compartilhe um mecanismo de fixação semelhante, especialmente porque, segundo a literatura, o processo requer um pH ácido (14–17). Uma limitação importante deste estudo, é a ausência da medição do pH das soluções de agave, no entanto, através da análise de literatura sobre diferentes tipos de adoçantes naturais, foi possível averiguar o pH das diferentes soluções realizadas.

Em alguns artigos, foi referido que o mel apresentou uma melhor capacidade de fixação no parâmetro DN, ao contrário do agave, cujos resultados no nosso estudo, foram inferiores aos da formalina. Outros estudos reforçam que a fixação com mel obteve resultados comparáveis aos da formalina, embora com a presença de mais artefactos, características igualmente observadas na fixação com agave (28). Em pesquisas adicionais foi novamente destacado que a fixação com mel ofereceu resultados equiparáveis à formalina nos parâmetros DN e QC (29).

Para resumir os resultados globais, a capacidade de fixação das soluções fixadoras foi na seguinte ordem: FNT a 10% > agave a 20% > agave a 10%, sendo que as três soluções fixadoras conseguiram preservar o tecido durante um período de 24 horas, tendo sido obtidos resultados bastantes próximos entre si. A superioridade da FNT a 10% em comparação ao agave pode ser atribuída à sua capacidade de formar ligações cruzadas mais estáveis e à sua neutralidade, que favorece uma preservação uniforme (7). Em contraste, a eficácia variável do agave pode ser causada por uma possível composição química menos consistente e por respostas variadas dos diferentes tipos de tecidos ao fixador.

Relativamente às amostras biológicas fixadas com FNT a 10%, ao contrário do esperado, não apresentaram valores ideais. Segundo a literatura, a fixação em FNT a 10% deveria funcionar como controlo, uma vez que, é o fixador universal na histopatologia de rotina. Estes resultados podem ter tido como causa o tempo de isquémia a frio. Este fator pode ter afetado significativamente a preservação das estruturas celulares e moleculares dos tecidos. Um tempo prolongado de isquémia a frio aumenta a probabilidade de degradação celular e tecidual, resultando em perda da integridade celular e artefactos histológicos que comprometem a qualidade da fixação e posterior interpretação. Se os tecidos estiverem degradados devido a um prolongado tempo de isquémia, a qualidade de preservação pode ser inferior, como observado nos resultados deste estudo, constituindo uma variável estranha, sem possibilidade de controlo por parte das investigadoras (17,30–32).

No que diz respeito às amostras biológicas, o rim apresentou uma menor consistência em termos de QC, mas mais consistente em relação à preservação de detalhes celulares específicos (MC, DN e MT). Com esta análise, conclui-se que o coração se destacou como o órgão com melhor preservação global, enquanto o fígado apresentou desempenho superior em determinados parâmetros em comparação ao rim. A análise dos dados obtidos dos diferentes órgãos revelou variações importantes na eficácia da fixação, bem como na consistência dos resultados. Os três órgãos usados apresentaram diferentes padrões de resposta aos fixadores, refletindo as características únicas de cada tecido.

Ao comparar o desempenho das soluções fixadoras entre os três órgãos, ficou claro que a fixação não foi transversal entre todos eles. O coração apresentou uma fixação superior de maneira global, refletindo a maior eficiência da fixação nesse órgão. O fígado apresentou variabilidade nos resultados, especialmente em parâmetros associados à estrutura celular, o que se traduz numa fixação globalmente menos eficaz. Estes resultados indicam que a natureza do tecido e a estrutura de cada órgão influenciam de maneira significativa a preservação histológica, sendo crucial considerar as características anatómicas e fisiológicas de cada órgão. Estes resultados podem dever-se às diferenças estruturais e metabólicas distintas entre o fígado, rim e coração. O fígado, com a sua complexa estrutura histológica e atividade metabólica diversificada, tende a apresentar uma ampla variabilidade na resposta aos agentes fixadores, refletindo-se em maiores variações nos parâmetros histológicos avaliados (1,33). Em contraste, o rim exibe uma estrutura mais homogênea e organizada, com células e tecidos mais uniformes, o que pode resultar numa resposta mais consistente à fixação e,

consequentemente, em menor variabilidade nos parâmetros histológicos (34). Quanto ao coração, embora seja menos complexo estruturalmente em comparação com o fígado, as suas características funcionais específicas conferem padrões únicos de resposta à fixação histológica, como evidenciado pela capacidade superior de fixação observada nos resultados deste estudo. A capacidade superior de fixação observada no coração pode ser atribuída à sua estrutura mais uniforme e organizada, facilitando a preservação da morfologia celular e dos detalhes histológicos (35–39).

Entre o rim e o fígado e entre o rim e o coração, os valores de p obtidos foram inferiores ao nível de significância tido em conta, o que se traduz numa menor capacidade de o rim manter a integridade histológica em relação ao fígado e ao coração. Isto sugere ainda que, tanto o fígado como o coração apresentam uma eficácia comparável na preservação das estruturas histológicas após o processo de fixação.

Para resumir os resultados globais, a capacidade de fixação das diferentes soluções fixadoras de acordo com o órgão foi na seguinte ordem: coração > fígado > rim.

A singularidade da presença do *outlier* sugere que o evento é provavelmente aleatório, uma vez que, não foram identificados outros valores extremos que pudessem indicar um problema sistémico.

Embora a literatura existente acerca do mel como agente fixador indique a sua eficácia comparável à formalina, não há consenso na literatura sobre qual órgão apresenta os melhores resultados. Esta ausência de dados limita comparações diretas entre os resultados do agave e do mel, dificultando a generalização do potencial do agave como fixador (40). Contudo, as características químicas e funcionais semelhantes entre o mel e o agave sugerem que este último pode ser uma alternativa promissora.

5. Conclusão

A observação microscópica das lâminas com cortes histológicos, obtidos a partir de diferentes protocolos de fixação, revelou que a solução de FNT a 10% foi a mais eficaz e consistente entre as três testadas. Entre as duas soluções de agave, a de agave a 20% demonstrou-se ligeiramente superior em termos de eficácia e com menor variabilidade nos resultados, quando comparada com a solução de agave a 10%. No entanto, ambas apresentaram capacidade fixativa inferior à da FNT a 10%. Apesar das diferenças na generalidade terem sido pouco significativas, os parâmetros MC e DN apresentaram maior qualidade quando fixadas com FNT a 10%.

Entre os três órgãos analisados, o coração destacou-se pela melhor preservação, exibindo as maiores médias e menor variabilidade na maioria dos parâmetros, evidenciando uma capacidade superior de preservação das estruturas histomorfológicas. Já o fígado apresentou resultados superiores em comparação ao rim. No entanto, é importante destacar a impossibilidade de controlo do tempo de isquémia a frio, que pode ter impactado os resultados. Embora todos os protocolos testados tenham utilizado amostras sujeitas às mesmas condições, este pode ter influenciado significativamente a preservação das estruturas celulares/tecidulares e moleculares dos tecidos.

Estudos futuros devem incluir maior número e diversidade de amostras, bem como definir a concentração ideal e a estabilidade do agave como fixador a longo prazo. Deve-se também avaliar a compatibilidade de técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas de forma a garantir que o agave seja uma alternativa viável e confiável à formalina. É ainda importante referir a possibilidade de resistência à mudança na implementação de uma nova substância diferente do normal quotidiano laboratorial, devido à familiaridade e confiança na formalina.

Apesar de ambas as soluções de agave terem apresentado resultados inferiores aos da FNT a 10%, o seu desempenho foi notavelmente bom e promissor, sugerindo que as soluções de agave, especialmente a de 20%, podem ser consideradas alternativas viáveis com potencial para melhoria e otimização futura.

Material Suplementar: Grelha da avaliação das lâminas obtidas por valores.

Tabela 4. Grelha explicativa da avaliação dos cortes observados ao microscópio ótico com coloração de hematoxilina-eosina.

	Membrana Celular	Detalhe Nuclear	Qualidade de Coloração	Morfologia Tecidual
0 Insuficiente	Dificuldade na análise e identificação de estruturas celulares (contorno das células individuais).	Núcleos praticamente invisíveis ou sem estrutura definível.	Coloração inadequada, e dificuldade de identificação clara das estruturas e células.	Preservação morfológica insatisfatória. Alterações morfológicas graves que comprometem a interpretação histológica. Inclui distorções severas na forma celular, perda substancial da arquitetura tecidual ou presença de artefactos de fixação que tornam a amostra inadequada para análise histopatológica.
1 Satisfatório	Visualização razoável das estruturas celulares.	Núcleos visíveis, mas com dificuldade, sem contornos nítidos ou detalhes facilmente perceptíveis.	Identificação das estruturas, com possibilidade de inconsistências ou falta de nitidez em certas áreas.	Preservação morfológica razoável. As alterações morfológicas são moderadas e podem afetar a interpretação histológica. Algumas células ou estruturas teciduais podem apresentar distorções significativas, mas a maioria dos componentes permanece reconhecível.
2 Bom	Visualização clara e nítida das estruturas celulares	Núcleos bem definidos e facilmente identificáveis, com boa qualidade, mas com algumas áreas de menor clareza.	Coloração uniforme, estruturas bem visíveis e facilmente distinguíveis, com diferenciação celular adequada.	Boa preservação morfológica. Há algumas alterações morfológicas, mas sem impacto significativo na interpretação histológica. A maioria dos componentes celulares está bem preservada, com apenas pequenas distorções na forma ou estrutura.
3 Excelente	Estruturas celulares definidas, análise detalhada e clara.	Núcleos claramente visíveis, bem definidos, com alta resolução e detalhe, sem áreas comprometidas.	Coloração nítida, uniforme e com excelente diferenciação das estruturas teciduais, sem artefactos ou distorções.	Excelente preservação morfológica. As células e tecidos mantêm uma morfologia normal e bem preservada, sem evidências de artefactos ou danos de fixação. Todos os componentes celulares estão claramente definidos, e a arquitetura tecidual é nítida e bem preservada.

Contribuição dos autores: A concetualização do estudo é da responsabilidade de Beatriz Almeida, Joana Silva, Mariana Maria, Gilda Cunha, Paula Mendonça e Carina Ladeira, enquanto o trabalho experimental é da autoria de Beatriz Almeida, Joana Silva, Mariana Maria, Gilda Cunha. A supervisão e validação é da responsabilidade de Paula Mendonça e Carina Ladeira. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Agradecimentos: Os autores agradecem o apoio institucional dado pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa e do H&TRC FCT/MCTES UIDB/05608/2020 (<https://doi.org/10.54499/UIDB/05608/2020>). Este trabalho não obteve financiamento externo. Agradecem também ao João Palma, Mário Maia Matos e Pedro Gonçalo Rodrigues, por terem realizado a avaliação histológica deste estudo.

Conflito de Interesses: Os autores declaram que não existem conflito de interesses.

6. Referências

- Parkinson M, Mortimer A, Jones C, Larking S, Swartz A. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques Content Strategist: Michael Houston Content Development Specialists. 2013.
- Borges Ferro A. Imunohistoquímica [Internet]. 2014 [cited 2024 Mar 5]. Available from: www.amadeuferro.pt.vu.
- De Souza Nunes C, Alves Cinsa L. Princípios do Processamento Histológico de Rotina. In: Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais. Minas Gerais, Brasil; 2016. p. 31–40.
- U.S Departmente of Health and Human Services. Toxicological Profile For Formaldehyde. Atlanta: Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 1999.
- Kiernan JA. Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde And Glutaraldehyde: What They Are And What They Do [Internet]. [cited 2024 Sep 29]. Available from: <https://academic.oup.com/mt/article/8/1/8/6822388>
- Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. Vol. 16, Journal of Oral and Maxillofacial Pathology. 2012. p. 400–5.
- Metz B, Kersten GFA, Hoogerhout P, Brugghe HF, Timmermans HAM, De Jong A, et al. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: Reactions with model peptides. Journal of Biological Chemistry. 2004 Feb 20;279(8):6235–43.
- Luce D, Gérin M, Leclerc A, Morcet J -F, Brugère J, Goldberg M. Sinonasal cancer and occupational exposure to formaldehyde and other substances. Int J Cancer [Internet]. 1993 [cited 2024 Sep 19];53(2):224–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8425759/>
- Olsen, JH, Asnaes S. Formaldehyde and the risk of squamous cell carcinoma of the sinonasal cavities. Vol. 43, British Journal of Industrial Medicine. 1986.
- Pires A, Pais A, Faria T, Silva S, Pinhal H, Nogueira A. Occupational Exposure to Formaldehyde in Pathology Laboratories [Internet]. [cited 2024 Sep 5]. Available from: www.insa.pt
- World Health Organization International Agency For Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Vol. 88. Lyon; 2006.

12. Fischer MH, Francisco S. The Toxic Effects of Formaldehyde and Formalin. In: Rockefeller University Press. Chicago; 1905 [cited 2025 Feb 19]. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2124506/>
13. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile For Formaldehyde. Atlanta; 1999.
14. Al-Maaini. Honey as an Alternative to Formalin in the Demonstration of Connective Tissue Components. J Histotechnol. 2008 May;
15. Özkan N, Şalva E, Çakalağaoğlu F, Tüzüner B. Honey as a substitute for formalin? Biotechnic & Histochemistry [Internet]. 2012 Feb [cited 2024 Jan 27];87(2):148–53. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10520295.2011.590155>
16. Muddana K, Muppala JNK, Dorankula SPR, Maloth AK, Kulkarni PG, Thadudari D. Honey and olive oil as bio-friendly substitutes for formalin and xylene in routine histopathology. Indian J Dent Res [Internet]. 2017 May 1 [cited 2024 Jan 27];28(3):286–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28721993/>
17. Patil S, R PB, Rao RS, Ganavi B S. Revelation in the Field of Tissue Preservation-A Preliminary Study on Natural Formalin Substitutes. Vol. 5, Journal of International Oral Health. 2012 Dec.
18. Saraiva A, Carrascosa C, Ramos F, Raheem D, Raposo A. Agave Syrup: Chemical Analysis and Nutritional Profile, Applications in the Food Industry and Health Impacts. Vol. 19, International Journal of Environmental Research and Public Health. MDPI; 2022.
19. Mellado-Mojica E, López-Pérez MGpe. Comparative analysis between blue agave syrup (Agave tequilana Weber var. azul) and other natural syrups. 2013 Apr;
20. Velázquez Ríos IO, González-García G, Mellado-Mojica E, Veloz García RA, Dzul Cauich JG, López MG, et al. Phytochemical profiles and classification of Agave syrups using 1H-NMR and chemometrics. Food Sci Nutr. 2019 Jan 1;7(1):3–13.
21. Xarope de Agave: verdades e mentiras | Auchan&Eu [Internet]. [cited 2024 Jan 25]. Available from: <https://auchaneu.auchan.pt/vida-saudavel/nutricao/xarope-de-agave/>
22. Cruz M, Laborde J. Bebidas Alcoólicas, Capítulo 18, vol.1. 2009.
23. Agave (Agave americana L. var. marginata) | Herbalist [Internet]. [cited 2024 Jan 28]. Available from: <https://lunaedew.wordpress.com/2015/04/22/agave/>
24. Instituto Nacional de Estatística. Teste de Kruskal-Wallis [Internet]. [cited 2024 Sep 19]. Available from: http://www.apis2.com.br/?page_id=268
25. Guo S, Zhong S, Zhang A. Privacy-preserving Kruskal–Wallis test. Comput Methods Programs Biomed. 2013 Oct 1;112(1):135–45.
26. Testes Não Paramétricos de Amostras Independentes - Documentação da IBM [Internet]. [cited 2024 Sep 19]. Available from: <https://www.ibm.com/docs/pt-br/spss-statistics/29.0.0?topic=tests-independent-samples-nonparametric>
27. ImperiaL I, Santos L, Ilgenfrit R, Gonçalves B. Comparação da fixação em Formol Vs Formol-zinco nas propriedades histoquímicas e imunocitoquímicas do cérebro fetal. Mícron. 2012;
28. Sabarinath B, Suresh S, Protyusha GB, Dhanarathna S. Standardization of honey as a tissue fixative for histopathology: A morphometric study. Dent Res J (Isfahan) [Internet]. 2024 [cited 2024 Oct 4];1. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1480
29. Paula Martins Gomes S, Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho, Eng Paula Cristina Azevedo Rodrigues. Caracterização e Avaliação Biológica de Mel Comercial. Bragança; 2009.
30. Filipa Dourado Sotero A, Pedro Neto Santos Barros Moreira M DE. Técnicas de Preservação de Enxertos para Transplante Renal. Artigo de revisão. [Internet]. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 2015 [cited 2024 Jun 20]. Available from: <https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/30568/1/tecnicasdepreservacaodeenxertosparatransplante.pdf>
31. Helena Ribeiro E. Impacto do Tempo de Isquémia na Análise de Expressão Gênica Global em Tecidos Criopreservados [Internet]. Fundação Antônio Prudente. São Paulo; 2019 [cited 2024 May 22]. Available from: <https://accamargo.phlnet.com.br/Doutorado/2019/EHROLivieri/EHROLivieri.pdf>
32. Ponticelli CE. The impact of cold ischemia time on renal transplant outcome. Vol. 87, Kidney International. Nature Publishing Group; 2015. p. 272–5.
33. Abdel-Misih SRZ, Bloomston M. Liver Anatomy. Surgical Clinics of North America. 2010;643–53.
34. Seeley.R, Stephens.D, Tate.P. Anatomia e Fisiologia . 6th ed. Lusociência. 2003.
35. John E. Hall PhD, Arthur C. Guyton. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology [Internet]. 13th ed. 2016 [cited 2024 Sep 28]. Available from: <http://avaxho.me/blogs/ChrisRedfield>

36. Tortora GJ. *Princípios de Anatomia Humana*. 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;; 2007.
37. Netter FH. *Atlas de Anatomia Humana*. 4th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
38. Putz R; PR. Sobotta, *Atlas de Anatomia Humana*. 22nd ed. Vol. 1,2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
39. Moore KL; DAF. *Anatomia orientada para a clínica*. 5th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.
40. Alwahaibi N, Al Dhahli B, Al Issaei H, Al Wahaibi L, Al Sinawi S. Effectiveness of neutral honey as a tissue fixative in histopathology. *F1000Res*. 2022 Sep 7;11:1014.

Artigo Original

Efeito da Espessura do Corte Histológico na Qualidade da Impregnação Argêntica

Carolina Coelho ^{1*}, Susana Silva ^{2,3}, Ana Rita Cardoso ², João Carlos Almeida ^{2,3,4} & Regina A. Silva ^{3,5*}¹ Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto² Serviço de Anatomia Patológica, Unidade Local de Saúde de São João, EPE³ Área Técnico-Científica de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto⁴ Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP), Porto, Portugal⁵ REQUIMTE/LAQV, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto* Correspondence: ras@ess.ipp.pt

Resumo: O estroma hepático é constituído maioritariamente por colagénio do tipo III, formando uma complexa rede reticular que fornece suporte aos hepatócitos. Diversas condições patológicas provocam alterações no padrão normal das fibras reticulares, que podem ser evidenciadas por métodos de impregnação argêntica. A qualidade destes métodos pode ser afetada por diversos fatores, como a fixação e o processamento. O presente estudo pretende avaliar o efeito da espessura do corte histológico de diferentes amostras hepáticas na qualidade da impregnação argêntica das fibras reticulares. Foram usadas 61 amostras de tecido hepático fixado em formol e embebido em parafina. De cada amostra, foram obtidos dois cortes histológicos seriados (3µm e 4µm de espessura) para a realização da técnica de impregnação argêntica de *Gordon & Sweets*. Para avaliação microscópica foram usados parâmetros, como a uniformidade e sensibilidade da impregnação. Os resultados mostraram que a qualidade da impregnação é significativamente superior nos cortes com uma espessura de 4µm comparativamente aos de 3µm ($p<0.001$), independentemente do tipo de amostra, notando-se maiores diferenças ao nível da uniformidade e da sensibilidade. Quando comparados os diferentes tipos de amostras, as peças cirúrgicas foram as que mostraram uma melhor uniformidade de impregnação para ambas as espessuras de corte ($p\leq 0,010$), tendo mostrado uma maior sensibilidade de impregnação apenas nos cortes de 3µm de espessura ($p=0,046$) relativamente às microbiópsias. O presente estudo evidencia uma melhor qualidade das impregnações argênticas em cortes com 4µm de espessura. A fixação e o processamento também poderão influenciar a qualidade da impregnação, principalmente nas microbiópsias.

Palavras-chave: Fibras reticulares; Fígado; *Gordon & Sweets*; Impregnação; Qualidade

Citation: Coelho, C.; Silva, S.; Cardoso, A.; Almeida, J.C.; Silva, R.A. Efeito da Espessura do Corte Histológico na Qualidade da Impregnação Argêntica. Trends in Biomedical Laboratory Sciences. 2025 Mar 9; 3(1): 17- 26.

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: February 2025

Accepted: February 2025

Published: March 2025

Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences

1. Introdução

O fígado é o segundo maior órgão do corpo, sendo a sua principal função metabolizar os nutrientes absorvidos no trato gastrointestinal e fornecer substratos/biomoléculas a outros órgãos. Este é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo que se ramifica para o interior do parênquima hepático, organizando-o em lóbulos que são constituídos por placas radiais e anastomosadas de hepatócitos. O estroma hepático é constituído maioritariamente por colagénio do tipo III, formando uma complexa rede de fibras reticulares ramificadas, que fornece suporte aos hepatócitos e às células endoteliais dos capilares sinusoides. (1,2)

Diversas condições patológicas provocam em maior ou menor extensão a destruição, colapso ou alterações do padrão normal das fibras reticulares. (3) A avaliação do padrão reticular em patologia hepática é comumente utilizada para a caracterização de diferentes lesões benignas, mas também para o diagnóstico diferencial entre carcinoma hepatocelular e lesões hepatocelulares benignas. (4)

Embora o diagnóstico microscópico destas patologias se inicie pela observação de preparações histológicas coradas pela coloração de rotina, a Hematoxilina e Eosina, é usual recorrer à histoquímica para identificar características morfológicas que não são facilmente observadas por esta coloração, como é o caso das fibras de reticulina. (5) Estas são constituídas por fibrilas muito finas e não são distinguíveis das fibras de colagénio pela coloração de rotina ou pelos métodos tricrómicos. (3) Por esse motivo, para a demonstração das fibras reticulares são utilizadas as impregnações argênticas, que se baseiam no seu componente glucídico interfibrilar e que não existe nas fibras de colagénio. (3) Ao evidenciar apenas as fibras reticulares, estas técnicas auxiliam na avaliação da arquitetura das placas hepáticas, nomeadamente, a expansão nas condições regenerativas e neoplásicas, a compressão das placas na hiperplasia regenerativa nodular e o colapso da estrutura de reticulina na necrose. (5,6)

Os métodos de impregnação argêntica são baseados na utilização de sais de prata, que precipitam e se depositam em locais previamente sensibilizados do tecido, proporcionando um contraste elevado e uma fácil observação ao microscópico ótico. (7,8) Existem vários métodos de impregnação argêntica para a demonstração das fibras reticulares, sendo um dos mais comuns a técnica de *Gordon & Sweets*, que se baseia na argirofilia destas fibras. (9)

A qualidade das colorações histoquímicas pode ser afetada por vários fatores, como a fixação, o processamento histológico e a espessura dos cortes histológicos. (10) A fixação pode alterar a capacidade de os tecidos reagirem com corantes, através de uma alteração química dos tecidos.

Embora na literatura não esteja bem documentada a espessura ideal para a demonstração das fibras reticulares pelas técnicas de impregnação argêntica em tecido hepático, alguns *kits* comerciais da técnica de *Gordon & Sweets* recomendam a utilização de cortes com espessuras entre 4 a 6 µm. (11–17)

No Serviço de Anatomia Patológica da Unidade Local de Saúde São João (SAP-ULSSJ), foi identificada uma problemática relacionada com a impregnação argêntica das fibras reticulares. Neste Serviço foi observado que a impregnação das fibras reticulares com a solução de prata amoniacal é mais fraca e heterogênea ou, por vezes, totalmente ausente no tecido de microbiópsias hepáticas, quando comparada com a impregnação obtida no tecido de controlo positivo, proveniente de uma peça cirúrgica hepática. Perante esta situação, é importante averiguar quais os possíveis fatores que podem estar a influenciar a qualidade da impregnação argêntica e procurar soluções adequadas para a resolução do problema.

O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da espessura do corte histológico de diferentes tipos de amostras de tecido hepático na qualidade da impregnação argêntica das fibras de reticulina e determinar se a espessura do corte tem valor preditivo na qualidade da impregnação.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostra

Para o presente estudo foram utilizadas 61 amostras de tecido hepático fixadas em formol neutro tamponado a 10% e embebidas em parafina, rececionadas no SAP-ULSSJ, entre 1 de janeiro de 2023 e 31 de dezembro de 2023. Foram incluídas amostras de tecido hepático provenientes de diferentes procedimentos de colheita: 26 microbiópsias, 17 biópsias em cunha e 18 de tecidos provenientes de peças cirúrgicas, reconhecidas para o estudo como diferentes tipos de amostras.

Após consulta do diagnóstico anatomopatológico, foram excluídas todas as microbiópsias e biópsias em cunha com neoplasia, devido a possíveis alterações ou ausência das fibras de reticulina nestes tecidos. Nas peças cirúrgicas, foi utilizado o bloco com o fragmento representativo do tecido hepático preservado. Além disso, foram excluídas amostras com evidências de autólise e necrose, bem como amostras em que, após impregnação, não se observavam fibras reticulares.

2.2. Processamento Histológico

As amostras foram submetidas a diferentes processamentos histológicos: os fragmentos das peças cirúrgicas e biópsias em cunha foram processados *overnight*, com cerca de 14 horas, enquanto algumas microbiópsias foram submetidas a um processamento rápido, com cerca de 2 horas, e outras a um processamento *overnight*, mediante a urgência do exame e a hora de receção da amostra no SAP-ULSSJ.

O processamento *overnight* foi realizado no equipamento *Tissue-Tek® VIP®* (Sakura Finetek, Tóquio, Japão), enquanto o processamento rápido foi efetuado no equipamento *Shandon Excelsior™ ES* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), de acordo com os protocolos registados nas Tabela 1 e Tabela 2, respetivamente.

Tabela 1 - Protocolo do processamento de tecidos *overnight* realizado no equipamento *Tissue-Tek® VIP®*

Processamento Overnight				
Reagente	Tempo	Temperatura	Pressão e Vácuo	Agitação
Formol	1 hora	Ambiente	Não	Sim
Formol	1 hora	Ambiente	Sim	Sim
Etanol Absoluto	1 hora	Ambiente	Sim	Sim
Etanol Absoluto	1 hora	Ambiente	Sim	Sim
Etanol Absoluto	1 hora	Ambiente	Sim	Sim
Etanol Absoluto	1 hora	Ambiente	Sim	Sim
Xilol	1 hora	Ambiente	Sim	Sim
Xilol	1 hora	Ambiente	Sim	Sim
Xilol	1 hora	35°C	Sim	Sim
Parafina	1 hora	63°C	Sim	Não
Parafina	1 hora	63°C	Sim	Não
Parafina	1 hora	63°C	Sim	Não
Parafina	1 hora	63°C	Sim	Não

Tabela 2 - Protocolo de processamento de tecidos rápido realizado no equipamento *Excelsior™ ES*

Processamento Rápido				
Reagente	Tempo	Temperatura	Pressão e Vácuo	Agitação
Formol	5 minutos	Ambiente	Não	Sim
Formol	5 minutos	Ambiente	Não	Sim
Etanol Absoluto	5 minutos	30°C	Sim	Sim
Etanol Absoluto	10 minutos	30°C	Sim	Sim
Etanol Absoluto	10 minutos	30°C	Sim	Sim
Etanol Absoluto	10 minutos	30°C	Sim	Sim
Etanol Absoluto	10 minutos	30°C	Sim	Sim
Xilol	10 minutos	30°C	Sim	Sim
Xilol	5 minutos	30°C	Sim	Sim
Xilol	10 minutos	30°C	Sim	Sim
Parafina	10 minutos	30°C	Sim	Sim
Parafina	20 minutos	64°C	Sim	Sim
Parafina	10 minutos	64°C	Sim	Sim
Parafina	10 minutos	64°C	Sim	Sim

2.3. Impregnação Argêntica

Após a seleção dos casos mais adequados para o presente estudo, foram realizados dois cortes histológicos seriados de cada bloco, de 3 µm e 4 µm de espessura, que foram estendidos em lâminas de vidro não adesivadas e, posteriormente, colocadas na estufa a 70°C durante 30 minutos.

Em todos os cortes foi realizada uma impregnação argêntica pela técnica de *Gordon & Swets* para a demonstração das fibras reticulares. (3) Após a desparafinação e hidratação, os cortes histológicos foram oxidados com uma solução de permanganato sulfúrico, durante 5 minutos, seguindo-se um branqueamento com uma solução de ácido oxálico a 1%, até os cortes ficarem brancos. Posteriormente, foram incubados numa solução de alúmen de ferro a 2,5%, durante 20 minutos. De seguida, os cortes foram incubados com uma solução extemporânea de nitrato de prata amoniacal, durante 2 minutos.

Após a impregnação, foi realizada a redução da prata com uma solução aquosa de formol a 10%, durante 2 minutos, seguida da viragem com uma solução de cloreto de ouro a 5%, durante 5 minutos. O excesso de prata e ouro foi removido com uma solução de hipossulfito de sódio a 5%, durante outros 5 minutos. Para finalizar, os cortes foram contrastados com verde luz, durante 1 minuto, desidratados, diafanizados e montados em meio sintético.

Desde a oxidação dos tecidos até ao contraste, entre as sucessivas incubações, foram realizadas lavagens uniformes com água destilada.

Para confirmar a sensibilidade da solução extemporânea de nitrato de prata amoniacal e verificar a conformidade de todos os reagentes, a técnica de impregnação argêntica de *Gordon & Sweets* foi testada previamente numa lâmina com tecido controlo.

2.4. Avaliação Microscópica

As preparações histológicas foram observadas por três observadores independentes e avaliadas nos seguintes parâmetros: impregnação da rede reticular, uniformidade da impregnação, sensibilidade da impregnação, ausência/presença de precipitado inespecífico e contraste (Tabela 3). Cada parâmetro foi avaliado mediante uma escala pré-definida (Tabela 3) e a qualidade da impregnação foi determinada pelo somatório da pontuação atribuída a cada parâmetro. Uma vez que o somatório da pontuação máxima atribuída é 12, foi considerada uma impregnação aceitável quando a sua pontuação total é de pelo menos 9 (igual ou superior a 75% do somatório máximo).

Tabela 3 - Parâmetros e escalas utilizadas para a avaliação microscópica da impregnação argêntica pela técnica de *Gordon & Sweets*

Parâmetro de Avaliação	Escala (pontos)
Impregnação da rede reticular	0. Ausente (0%)
	1. Incompleta (<75%)
	2. Quase completa (75-95%)
	3. Completa (>95%)
Uniformidade da impregnação	0. Impregnação fraca ou ausente, com dificuldade na identificação das fibras
	1. Impregnação heterogénea ou homogénea fraca, que não permite identificar claramente muitas das fibras
	2. Impregnação heterogénea, mas que permite identificar a maioria das fibras
	3. Impregnação homogénea e com intensidade ótima para identificação clara das fibras
Sensibilidade da impregnação	0. Pouco sensível → não se observam as fibras de menor calibre, numa objetiva de 40x
	1. Moderadamente sensível → as fibras de menor calibre observam-se apenas na objetiva de 40x
	2. Muito sensível → observam-se as fibras de maior e de menor calibre, numa objetiva de 10x
Precipitado inespecífico	0. Muito precipitado → presença de precipitado inespecífico em grande quantidade, dificultado a identificação das fibras
	1. Precipitado ligeiro → observa-se uma ligeira presença de precipitado inespecífico no corte, no entanto não influencia a identificação das fibras
	2. Sem precipitado → não se observa a presença de precipitado inespecífico
Contraste	0. Inaceitável → contraste pouco intenso ou excessivo, dificultando a identificação das fibras
	1. Aceitável
	2. Desejável → contraste com intensidade ideal para a identificação das fibras

2.5. Análise Estatística

Os resultados obtidos nas diferentes avaliações microscópicas foram analisados estatisticamente no programa informático *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 29. Inicialmente, foram determinadas as médias e os respetivos desvios-padrão para todos os parâmetros avaliados. Para averiguar a existência de diferenças estatisticamente significativas, a pontuação média obtida em cada parâmetro e também na qualidade da impregnação foram comparados através do Teste T *Student* para as duas espessuras de corte e, através do Teste de *Tukey HSD* (do inglês *Honestly Significant Difference*), para os diferentes tipos de amostras, considerando-se um nível de significância (*p*) de 0,05.

Para determinar o valor preditivo da espessura do corte histológico na qualidade da impregnação, foi realizada uma avaliação por Regressão Logística Binária.

3. Resultados

O presente estudo foi realizado em 26 microbiópsias, 17 biópsias em cunha e 18 tecidos provenientes de peças cirúrgicas, num total de 61 amostras.

A análise das avaliações microscópicas das referidas amostras demonstrou que a qualidade da impregnação argêntica foi significativamente superior nos cortes com 4 µm de espessura, comparativamente à encontrada nos cortes com 3 µm de espessura, independentemente do tipo de amostra (Figura 1A e Figura 1B).

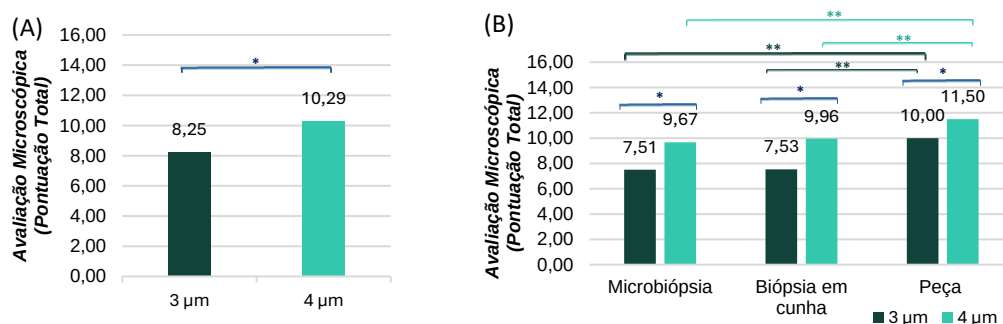


Figura 1 - Qualidade da impregnação argêntica: (A) De acordo com a espessura do corte histológico, independentemente do tipo de amostra. (B) De acordo com a espessura do corte histológico e o tipo de amostra.

Representados graficamente os valores médios encontrados para um N=61. Microbx – microbiópsias; Bx – biópsias em cunha; Peça – peças cirúrgicas. * $p < 0,05$ pelo teste T Student; ** $p < 0,05$ pelo teste Tukey HSD.

Os resultados obtidos na qualidade da impregnação foram devidos principalmente aos parâmetros da impregnação da rede reticular, uniformidade da impregnação e sensibilidade da impregnação, para os quais foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as duas espessuras de corte ($p < 0,001$ para os três parâmetros) (Figura 2).

Em contrapartida, a ausência/presença de precipitado e a qualidade do contraste não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, relativamente à espessura do corte histológico e aos tipos de amostras hepáticas (Figura 3). No entanto, na primeira série de lâminas impregnadas, verificou-se a presença de precipitado inespecífico ligeiro a abundante e o contraste foi insuficiente.

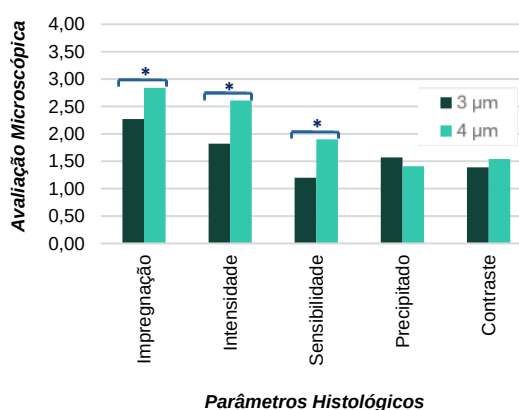


Figura 2 - Avaliação dos diferentes parâmetros microscópicos, de acordo com a espessura do corte histológico.

Representados graficamente os valores médios encontrados para um N=61. * $p < 0,05$ pelo teste T Student

Quando comparados os tipos de amostras, a uniformidade da impregnação nos tecidos de peças cirúrgicas foi estatisticamente superior à verificada nas microbiópsias e biópsias em cunha, tanto nos cortes histológicos com 3µm ($p>0,001$ e $p=0,003$, respetivamente), como nos cortes com 4µm de espessura ($p>0,01$ e $p=0,010$, respetivamente) (Figura 3).

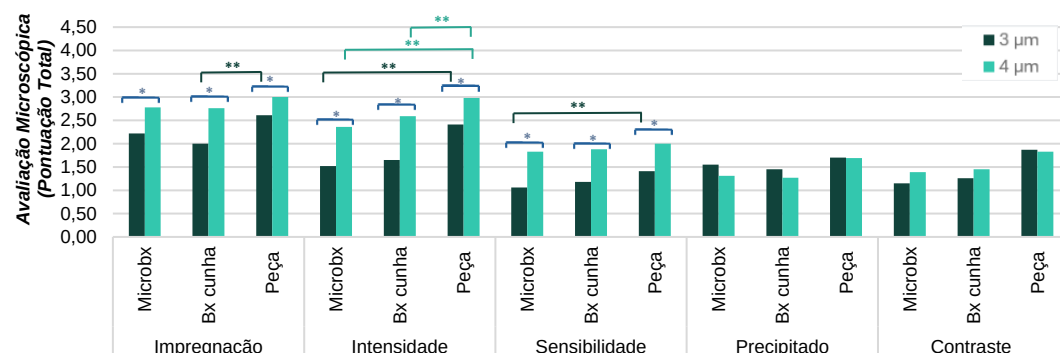


Figura 3 – Avaliação dos diferentes parâmetros microscópicos, de acordo com a espessura do corte histológico e o tipo de amostra.

Representados graficamente os valores médios encontrados para um N=61. Microbx – microbiópsias; Bx cunha – biópsias em cunha; Peça – peças cirúrgicas. * $p<0,05$ pelo teste T Student; ** $p<0,05$ pelo teste Tukey HSD

De uma forma geral, nos tecidos provenientes de peças cirúrgicas, a impregnação encontrada foi mais homogênea e intensa, facilitando a observação da arquitetura da rede reticular hepática (Figura 4). De referir que, independentemente da espessura do corte histológico, na margem cirúrgica de biópsias em cunha foi observada uma impregnação menos intensa e, por vezes, ausente das fibras reticulares, mesmo na presença de placas de hepatócitos preservadas.

Embora a impregnação argêntica em cortes histológicos provenientes de peças cirúrgicas apresentasse uma intensidade (sensibilidade) maior do que a obtida nos outros tipos de amostras, apenas foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos cortes histológicos com 3µm de espessura entre as peças cirúrgicas e as microbiópsias ($p=0,037$).

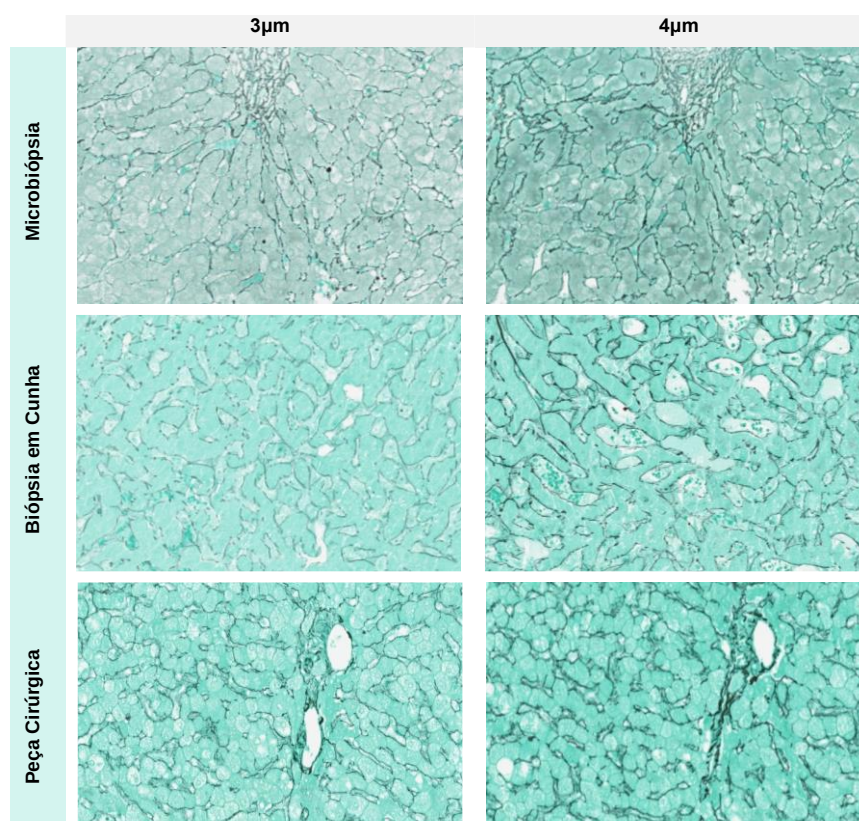


Figura 4 - Microfotografias representativas das impregnações argênticas realizadas nos diferentes tipos de amostra de tecido hepático com diferentes espessuras. Nas peças cirúrgicas, a impregnação é mais intensa e uniforme, enquanto nas biópsias em cunha e nas microbiópsias, a impregnação é de menor intensidade e não uniforme. Técnica de Gordon e Sweets, numa ampliação de 400x.

De acordo com a pontuação obtida para a qualidade da impregnação, cada preparação histológica foi classificada como aceitável ou não aceitável, verificando-se que das 61 amostras estudadas, apenas 36% das impregnações efetuadas em cortes com 3µm de espessura foram consideradas aceitáveis, enquanto para as efetuadas em cortes com 4µm de espessura, o valor obtido foi de 87% (Figura 5).

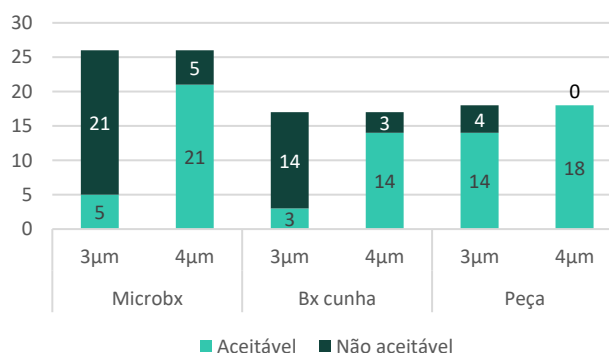


Figura 5 - Classificação das impregnações argênticas como aceitáveis ou não aceitáveis, de acordo com a espessura do corte histológico e o tipo de amostra. Microbx – microbiópsias; Bx cunha – biópsias em cunha; Peça – peças cirúrgicas

Quando avaliado o valor preditivo da espessura do corte, verificou-se que uma impregnação num corte histológico com 4µm de espessura tem cerca de 11,7 vezes maior probabilidade de ser aceitável do que uma impregnação num corte com 3µm de espessura, confirmando que a

espessura do corte histológico tem valor preditivo na qualidade da impregnação argêntica para as fibras de reticulina.

4. Discussão

Os resultados do presente estudo evidenciam que a espessura de um corte histológico de tecido hepático afeta a qualidade das impregnações argênticas. A sua análise demonstrou que a qualidade da impregnação argêntica foi significativamente superior nos cortes histológicos com 4µm de espessura, comparativamente às efetuadas em cortes com 3µm de espessura, independentemente do tipo de amostra em estudo.

As diferenças observadas na qualidade da impregnação são um reflexo dos valores encontrados nos parâmetros da impregnação, uniformidade e sensibilidade, apontando para que nos cortes histológicos com 4µm de espessura, por serem mais espessos, a impregnação da rede de fibras reticulares é completa ou quase completa, mais intensa e homogênea e também com melhor demonstração das fibras de menor calibre, em comparação com os cortes de 3µm de espessura. Estes resultados sugerem que cortes histológicos mais espessos permitem uma maior deposição de prata metálica nas fibras de reticulina, facto que melhora a sua demonstração. De acordo com *Izuta et al.* (2023), a utilização de cortes mais espessos facilita a visualização tridimensional da rede reticular, bem como das alterações estruturais, por vezes subtis, que ocorrem em contextos neoplásicos e inflamatórios. (4)

Deste modo, uma vez que a demonstração da rede reticular tem como objetivo a observação detalhada da arquitetura do fígado, uma impregnação mais intensa (sensível) e uniforme é essencial para a identificação de alterações estruturais associadas a diversas patologias. No caso das patologias benignas, como a cirrose, a impregnação argêntica deve auxiliar o delineamento dos nódulos e a identificação de certas características, como a distribuição e a espessura das fibras reticulares ao seu redor. De referir que esta técnica de impregnação das fibras reticulares é também usada para a caracterização das lesões tumorais, revelando a diminuição e desorganização das fibras em torno das células tumorais, o que permite distinguir adenomas de carcinomas hepatocelulares. (11)

De acordo com a literatura, a espessura de corte para a maioria das colorações especiais deve variar entre 3 a 5µm, consoante o tipo de tecido e o que se pretende demonstrar, por permitir um equilíbrio entre a qualidade da coloração e a integridade estrutural dos tecidos. É essencial que o corte histológico seja fino o suficiente para permitir uma boa penetração dos reagentes, sem sobreposição significativa de estruturas celulares, mas também espesso o suficiente para manter a integridade do tecido e das fibras. (4,9) Relativamente aos métodos de impregnação, podem ser necessários cortes histológicos de diferentes espessuras, dependendo da estrutura ou componente que se pretende demonstrar. Por exemplo, para a demonstração das neurofibrilas e de placas senis no cérebro, os métodos devem ser realizados em cortes mais espessos (>10µm), por permitirem uma melhor visualização das estruturas e consequentemente uma melhor diferenciação (12), enquanto para a demonstração de bactérias os métodos devem ser realizados em cortes menos espessos ($\leq 3\text{ }\mu\text{m}$), para diminuir a impregnação inespecífica de fundo. (13) Especificamente para a técnica de *Gordon & Sweets*, a espessura de corte ideal não está bem documentada na literatura, contudo alguns autores e alguns *kits* comerciais sugerem a utilização de cortes histológicos com uma espessura entre 4 a 6 µm. (11-17, 18)

Embora os parâmetros precipitado e contraste não tenham revelado diferenças estatisticamente significativas entre as duas espessuras de corte, as pontuações médias obtidas para estes parâmetros foram inferiores ao esperado. Estes resultados podem ser explicados pela presença de precipitado moderado e um contraste fraco nas primeiras séries de cortes histológicos impregnados. A realização de lavagens mais intensas após a etapa da impregnação e o aumento do tempo de incubação com o contrastante verde luz permitiram ultrapassar estes problemas.

Quando comparados os três tipos de amostras hepáticas, a sensibilidade da impregnação revelou ser significativamente diferente nos cortes com 3µm de espessura entre os tecidos provenientes de peças cirúrgicas e as microbiópsias, verificando-se que a utilização de cortes histológicos com 4µm de espessura permite obter uma sensibilidade semelhante entre os diferentes tipos de amostra. Tal resultado sugere que a utilização de cortes mais espessos permite ultrapassar as diferenças de sensibilidade da impregnação encontradas nos cortes com espessura de 3 µm entre os fragmentos de peças cirúrgicas e microbiópsias.

A uniformidade da impregnação também revelou ser estatisticamente superior nos tecidos provenientes de peças cirúrgicas comparativamente aos outros tipos de amostras, para ambas as

espessuras de corte. Estes resultados podem estar relacionados com o facto de as amostras terem sido sujeitas a processos de fixação e processamento histológico diferentes. Etapas, como a fixação e o processamento histológico, inadequadas, podem diminuir a qualidade da coloração, pelo que é de extrema importância garantir a sua eficácia. (19) Um tempo de isquemia a frio longo, associado a necrose e consequente destruição dos constituintes celulares interfere com a qualidade das colorações histológicas, assim como um período de fixação insuficiente, que pode causar fixação zonal dos tecidos, alterando a morfologia e as características tintoriais dos mesmos. (18,20) Além disso, o processamento altera a reatividade e a afinidade dos componentes teciduais, interferindo com a capacidade de penetração dos corantes nos tecidos e substâncias-alvo. (11)

Neste estudo não foi possível avaliar a influência da fixação na qualidade da impregnação por não existirem registos sobre o tempo de fixação de cada amostra, assim como não foi possível avaliar a influência do processamento histológico por apenas quatro das microbiópsias terem sido sujeitas a processamento rápido e todas as restantes amostras a processamento *overnight*. Em estudos futuros, pretende-se monitorizar os tempos de fixação dos fragmentos e avaliar o impacto dos diferentes processamentos histológicos na impregnação argêntica das fibras reticulares.

Foi, ainda, observada uma impregnação menos intensa e, por vezes, ausente das fibras reticulares, na margem cirúrgica de biópsias em cunha, mesmo na presença de placas de hepatócitos preservadas, tanto nos cortes com 3µm como nos cortes com 4µm de espessura, provavelmente causada pela utilização de bisturi elétrico e consequente cauterização do tecido.

Além disso, achados semelhantes foram observados na periferia de algumas microbiópsias, em cortes de ambas as espessuras, cuja causa mais provável será o processamento histológico excessivo, uma vez que a maioria das microbiópsias neste estudo foram submetidas a um processamento *overnight*. Este processamento mais longo pode ter causado danos teciduais na periferia destas amostras, principalmente devido à etapa de embebição do tecido em parafina a altas temperaturas, durante 4 horas.

De todas as amostras avaliadas neste estudo, 61% obtiveram uma impregnação aceitável, constatando-se que a percentagem de resultados não aceitáveis foi sempre superior nos cortes histológicos de 3µm de espessura. Pelo exposto, a espessura dos cortes histológicos possui valor preditivo na qualidade da impregnação argêntica, onde cortes histológicos mais espessos proporcionam melhores resultados, especialmente em microbiópsias e em biópsias em cunha.

5. Conclusões

No presente trabalho foi estudada a influência da espessura do corte histológico na qualidade da impregnação argêntica em diferentes tipos de amostras de tecido hepático. Os resultados obtidos sugerem que, independentemente do tipo de amostra, a espessura dos cortes histológicos desempenha um papel crucial na qualidade da impregnação argêntica das fibras reticulares.

Foi possível concluir que cortes histológicos com 4µm de espessura apresentam uma melhor qualidade de impregnação, comparativamente aos cortes com 3µm de espessura, uma vez que a impregnação da rede reticular é mais completa, intensa e homogênea, o que favorece a sua demonstração que é crucial para identificar alterações associadas a diversas patologias. Como perspetiva futura, pretende-se avaliar a influência da fixação e do processamento histológico na qualidade da impregnação argêntica.

Todos os autores leram e concordaram com a versão do manuscrito publicada. A autoria do trabalho deve estar limitada àqueles que contribuíram substancialmente para o trabalho.

Financiamento: Esta investigação não recebeu financiamento externo.

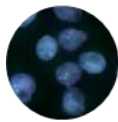
Agradecimentos: Ao Serviço de Anatomia Patológica da Unidade Local de Saúde de São João por ter possibilitado a realização da componente experimental e disponibilizado as amostras para a concretização do presente estudo.

Conflitos de Interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

6. Referências

1. Junqueira LC, Carneiro J. Órgãos Associados ao Trato Digestivo. In: Histologia Básica. 12th ed. Guanabara Koogan Ltda.; 2013. p. 318–29.

2. VanPutte CL, Regan JL, Russo AF, Seeley R, Stephens T, Tate P. *Anatomia e Fisiologia de Seeley*. 10th ed. AMGH Editora Ltda.; 2016. 898 p.
3. Bancroft J, Layton C. Connective and Other Mesenchymal Tissues with their Stains. In: Survana SK, Layton C, Bancroft JD, editors. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 8th ed. Elsevier; 2019. p. 170–2.
4. Izuta M, Kuwamoto S, Kamiya T, Nagata K, Matsushita M, Inaga S, et al. Imaging of Liver Tissues Using a Combination of Silver Impregnation and Low-Vacuum Scanning Electron Microscopy; A Simple Method for the High-Resolution Visualization of Reticulin Structures with Applicability to a Quantitative Analysis. *Yonago Acta Med*. 2023;66(1):78–86.
5. Krishna M. Role of Special Stains in Diagnostic Liver Pathology. *Clin Liver Dis* [Internet]. 2013 Mar 1;2(1):8–10. Available from: <https://doi.org/10.1002/cld.148>.
6. Iezzoni JC. Diagnostic Histochemistry in Hepatic Pathology. *Semin Diagn Pathol*. 2018;35(6):381–9.
7. Spencer LT. Reticulin. In: Brown R, editor. *Histologic Preparations: Common Problems and Their Solutions*. College of American Pathologists; 2009. p. 103–8.
8. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 5th ed. Scion Publishing Ltd; 2015. 426–442 p.
9. Luna LG. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd ed. McGraw-Hill; 1968.
10. Horobin RW. Theory of Histological Staining. In: Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 8th ed. Elsevier; 2019. p. 114–25.
11. Wolfe D. Tissue Processing. In: Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 8th ed. Elsevier; 2019. p. 73–83.
12. Polysciences Inc. Reticulin Stain Kit. 2015; Available from: https://www.labce.com/spg747577reticulin_stain.aspx.
13. American MasterTech Scientific. Chandler's Precision® Reticulum Stain Kit Procedure P. 2019.
14. ThermoFisher Scientific. Thermo Scientific Richard-Allan Scientific Chromaview – Advanced Testing Reticulin Silver Stain. 2012.
15. BioGnost. Reticulin Contrast Kit. 2019.
16. Sigma-Aldrich. Reticulin silver plating kit acc. to Gordon & Sweets. 2020;(October). Available from: <http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/MANUALS/RETIC.PDF>.
17. Newcomer Supply. Reticulum, Gordon & Sweets Stain Kit. 2019.
18. Carson FL, Hladik C. Connective and Muscle Tissue. In: Carson FL, Hladik C, editors. *Histotechnology: A Self-Instructional Text*. 3rd ed. American Society for Clinical Pathology Press; 2009. p. 162–83.
19. DakoCytomator. Guide to Special Stains - Microscopy. 2004;14–46. Available from: http://www.dako.com/08066_guide_to_special_stains.pdf.
20. Layton C, Bancroft J. Fixation of Tissues. In: Layton, Christopher; Bancroft, John; Survana S, editor. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 8th ed. Elsevier; 2019; p. 40.



Systematic Review

Immune Checkpoint Inhibitors: A New Perspective in the Context of Colorectal Carcinoma

Neuza Costa¹, Maria de Fátima Silva^{1,2}, Diana Martins^{1,3,4,5}, Fernando Mendes^{1,3,4,5,6} & Paulo Teixeira^{2,7*}

¹ Coimbra Health School (ESTeSC), Polytechnic University of Coimbra, 3046-854 Coimbra, Portugal;

² Pathology Department, Coimbra Hospital and University Centre;

³ H&TRC—Health & Technology Research Center, Coimbra Health School, Polytechnic University of Coimbra, 3045-043 Coimbra, Portugal;

⁴ Biophysics Institute of Faculty of Medicine, Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR) Area of Environment Genetics and Oncobiology (CIMAGO), University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal;

⁵ Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal, 3046-854 Coimbra, Portugal;

⁶ European Association for Professions in Biomedical Sciences, 1000 Brussels, Belgium;

⁷ Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal, 3046-854 Coimbra, Portugal;

* Correspondence: paulocmiranda@ulscoimbra.min-saude.pt

Abstract: Colorectal carcinoma (CRC) is the third most common cancer worldwide. Although conventional treatments and targeted therapies, most patients respond poorly to these treatments. The five-year survival rate for patients with advanced CRC is around 14%, and metastasis occurs in more than 50% of patients with CRC. Immunotherapy has emerged as a promising treatment approach, potentially improving positive clinical outcomes while addressing the limitations of conventional therapies. However, patients with CRC who benefit from immunotherapy remain a minority, and resistance to treatment continues to be a challenge. In this systematic literature review, we aimed to assess the efficacy of immunotherapy, with a focus on immune checkpoint inhibitors and combined action strategies to optimize their performance. This review followed the PRISMA guidelines, and the research was conducted in PubMed, Embase, and Web of Science databases, with additional research on the ClinicalTrials.gov website. A total of 20 studies were included. Combining immune checkpoint inhibitors with standard therapies (radiotherapy and chemotherapy) and targeted treatments (such as angiogenesis inhibitors, tyrosine kinase inhibitors, and MEK inhibitors) demonstrated modest safety and efficacy. Preliminary data suggest that local and systemic immunosuppression limits treatment efficacy, particularly in hepatic metastases. This review highlights the need for further studies on therapeutic combination strategies with immune checkpoint inhibitors and their optimization for treating CRC patients.

Keywords: Immunotherapy, Colorectal Cancer, Immune Checkpoint Inhibitors, Treatment Outcome.

Citation: Costa, N.; Silva, MF.; Martins, D.; Mendes, F.; Teixeira, P. Immune Checkpoint Inhibitors: A New Perspective in the Context of Colorectal. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2025 Mar 9; 3(1): 27- 44.

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: February 2025

Accepted: February 2025

Published: March 2025

Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences

1. Introduction

Colorectal carcinoma (CRC) is the third most common type of cancer worldwide (1). Its incidence and mortality have been increasing in recent years, becoming the second leading cause of cancer-related death globally (2–4).

Colorectal cancer is a heterogeneous disease, and the underlying genetic differences among tumours can define the behaviour and prognosis of the disease (5,6). Although screening has reduced the incidence and mortality, approximately 25% of CRC patients present advanced-stage disease at the time of diagnosis, and 50% will develop metastasis (3). The five-year survival rate for patients with advanced CRC is around 14% (3).

Most CRC cases are sporadic and exhibit more frequent mutations in tumour suppressor genes and oncogenes, such as the *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) gene in 81% of cases, the *Tumor Protein 53* (TP53) gene in 60%, and the *Kirsten Rat Sarcoma Virus* (KRAS) gene in 43% (7). Regarding genomic alterations, three main instability pathways are identified: the Wnt/ β -catenin pathway, the microsatellite instability (MSI) pathway, and the serrated pathway with CpG island methylation (8, 9,10). Given the loss of expression of proteins involved in the DNA mismatch repair (MMR) and the status of microsatellite instability (MSI), it is possible to classify CRC into three

main types: deficient mismatch repair-high microsatellite instability (dMMR-MSI-H), proficient mismatch repair-low microsatellite instability (pMMR-MSI-L), and proficient mismatch repair-microsatellite stability (pMMR-MSS) without MSI characteristics (11).

Colorectal tumours may thus present a dMMR-MSI-H signature with a high mutational burden or a pMMR-MSI-L signature with a low mutational burden (12). The incidence of dMMR-MSI-H tumours is about 14%, accounting for only 3 to 5% of metastatic CRC cases (13). In this subtype, MSI promotes the accumulation of mutations in tumour DNA, which induces immunogenicity (14), representing a window of opportunity for new therapeutic strategies.

Regarding treatment strategies, conventional treatments for CRC include surgery, chemotherapy and radiotherapy, either in combination or monotherapy (15, 16). Despite combined regimens and new targeted therapies significantly improving clinical response, 50% of patients still experience recurrence (17,18).

Immunotherapy has emerged as a promising therapeutic area that aims to harness the immune system, using highly specific and targeted strategies to overcome the immune deficiency induced by the tumour (19). Immune Checkpoint Inhibitors (ICI) are the most promising among the numerous strategies already developed. The action of immune checkpoint inhibitors targets co-inhibitory receptors such as "Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4" (CTLA4) and "Programmed Death-1" (PD1) on T cells and other immune cell subpopulations, as well as their ligands like "Programmed Death-Ligand 1" (PDL1) on tumour cells and/or other cells of the immune system (13). In this context, the main goal of this therapeutic strategy is to prevent T cell dysfunction and apoptosis while enhancing T cell activation and boosting the cytotoxic death of neoplastic cells (13). Clinical studies have shown that patients receiving immunotherapy experience longer long-term survival. However, there are still reports of patients with metastatic dMMR-MSI-H CRC who experience disease progression within a short period, especially in monotherapy regimens (6).

This systematic literature review aimed to assess the efficacy of immunotherapy in treating CRC and the current and future challenges in administering immune checkpoint inhibitors in this context. Therefore, the central objective focuses on immune checkpoint inhibitors and combined action strategies to optimise their effectiveness.

2. Materials and Methods

This review followed the guidelines proposed by the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA, 2020). The research question was formulated, serving as the guiding principle for the entire study. The topics integrated into the PICO acronym (P - Population, I - Intervention, C - Comparison, O - Outcome) were followed for its formulation. The research question was: "What is the impact of combined therapeutic strategies with immune checkpoint inhibitors in colorectal carcinoma?"

An extensive bibliographic search was conducted concerning three main databases: PubMed, Embase, and Web of Science. Additionally, a search was carried out on the ClinicalTrials.gov website, focusing on clinical trials of immune checkpoint inhibitors in the context of colorectal carcinoma. The search was conducted between January and May 2024, and the search strategy is presented in the following table.

The inclusion criteria were established as follows: (i) free full-text articles, (ii) randomised clinical trials, (iii) non-randomized clinical trials, and (iv) prospective studies. A defined period was set for inclusion, selecting only studies published in the last 5 years. The exclusion criteria were defined as: (i) studies that do not include "colorectal carcinoma"; (ii) studies that do not include "immunotherapy"; (iii) studies *in vitro* cell culture; (iv) *in vivo* studies in animal models; (v) studies that do not provide access to data/results; and (vi) literature reviews and meta-analyses.

All selected articles were imported into the Mendeley Desktop reference management software, and removed duplicate articles. Subsequently, these articles were analysed based on the "Title/Abstract" to identify their potential relevance, relying on the eligibility criteria previously mentioned. The articles selected at this stage proceeded to full-text reading, detailed analysis, and data extraction. Two independent reviewers performed this process, and in the case of non-consensual selection and analysis of the studies, a third reviewer was consulted.

Table 1. Literature research strategy.

Databases	Search
Pubmed	Search: ("Colorectal Cancer" [MeSH Terms] OR "Colorectal Cancers" OR "Colorectal Carcinoma" OR "Colorectal Carcinomas")) AND ("Immunotherapy" OR "Immunotherapies")) AND ("Treatment Outcome" [MeSH Terms] OR "Outcome, Treatment" OR "Patient-Relevant Outcome" OR "Outcome, Patient-Relevant" OR "Patient Relevant Outcome" OR "Patient-Relevant Outcomes" OR "Clinical Effectiveness" OR "Effectiveness, Clinical" OR "Treatment Effectiveness" OR "Effectiveness, Treatment" OR "Treatment Efficacy" OR "Efficacy, Treatment" OR "Clinical Efficacy" OR "Efficacy, Clinical")) OR/AND ("Drug Resistance, Neoplasm" [MeSH Terms] OR "Drug Resistance, Antineoplastic" OR "Neoplasm Drug Resistance" OR "Antineoplastic Agent Resistance" OR "Antineoplastic Drug Resistance")) OR/AND ("Immune Checkpoint Inhibitors" [MeSH Terms] OR "Checkpoint Blockade, Immune" OR "Checkpoint Blockers, Immune" OR "Checkpoint Inhibition, Immune" OR "Checkpoint Inhibitor, Immune" OR "Checkpoint Inhibitors, Immune" OR "Immune Checkpoint Blockade" OR "Immune Checkpoint Blockers" OR "Checkpoint Inhibition" OR "Immune Checkpoint Inhibitor") Filters: Last 5 years; "Full text"; "Free full text"
Embase	Search: ("Colorectal Cancer") AND ("Immunotherapy") AND ("Immune Checkpoint Inhibitors") OR/AND ("Treatment Outcome") OR/AND ("Drug Resistance") Filters: Last 5 years; "Clinical trial"; "Clinical trial topic"; "Randomized Controlled trial"; "Randomized Controlled trial topic"
Web of Science	Search: ("Colorectal Cancer") AND ("Immunotherapy") AND ("Immune Checkpoint Inhibitors") OR/AND ("Treatment Outcome") OR/AND ("Drug Resistance") Filters: Last 5 years; "Open access"; "Article"

Abbreviations Legend: MeSH = Medical Subject Headings

The flowchart that reflects the research methodology and study selection process is outlined in Figure 1.

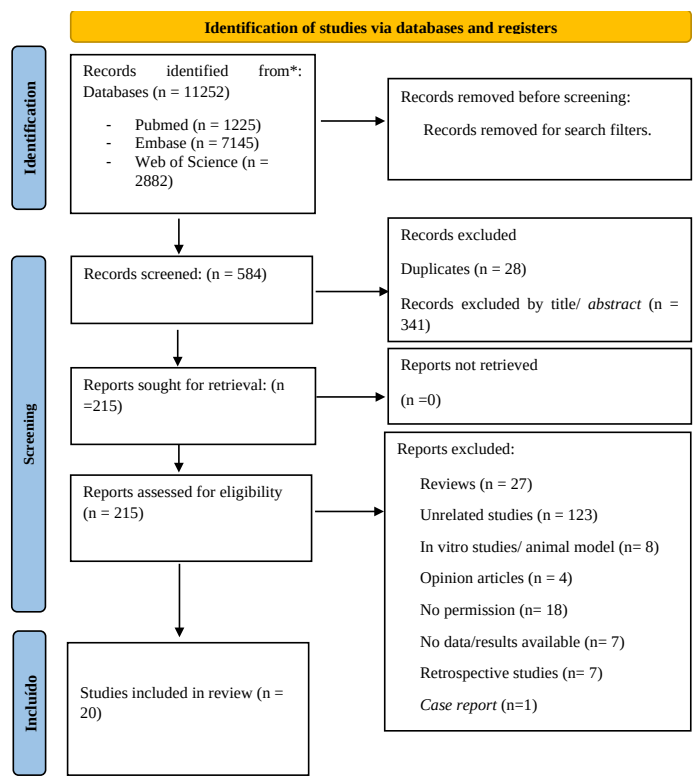


Figure 1. Research flowchart.

As shown in Figure 1, 1252 potentially relevant articles were identified, and after applying the previously mentioned search filters, this number was reduced to 584. Subsequently, duplicate articles were removed, and the remaining articles were analysed by title and abstract, narrowing the search down to 215 articles. Full-text reading was performed, and the following were excluded: 27 review articles and meta-analyses, 123 articles that were not related to the topic, 8 *in vitro* (cell culture) and *in vivo* animal model studies, four opinion articles, seven retrospective studies, 1 case report, seven studies without presented results, and finally, 18 articles without access permission. In the end, 22 articles were selected for this review.

The studies highlight the mechanisms of immune checkpoint inhibitors in the context of colorectal carcinoma. Therapeutic combination strategies are discussed, including the combination of these drugs with conventional methods (chemotherapy and radiotherapy) and with targeted therapies (angiogenesis inhibitors, epidermal growth factor receptor inhibitors (EGFR), tyrosine kinase inhibitors (TKI), MEK inhibitors, and antiretroviral treatment). To assess the quality of evidence from each of the studies selected for inclusion in this systematic review, two tools from the Cochrane risk of bias tool were used: one aimed at evaluating the risk of bias in non-randomized intervention studies, ROBINS-I (21), and another for assessing the risk of bias in randomised clinical trials, ROB 2 (22). After analysis, it was found that most of the articles included in this review presented a low risk of bias.

3. Results

Twenty studies were included, focusing on therapeutic combination strategies with immune checkpoint inhibitors in the context of colorectal carcinoma.

3.1. Immune Checkpoint Inhibitors and Conventional Treatments (Chemotherapy and Radiotherapy):

In the Phase 2 clinical trial (NCT03104439), the aim was to investigate the impact of the therapeutic combination of ICI anti-CTLA-4 (Ipilimumab) and anti-PD-1 (Nivolumab) with radiotherapy and its influence on Disease Control Rate (DCR) (23). The sample included 40 patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). After the intervention, the DCR was 25% (10/40 participants; 95% CI: 13–41%) with an objective response rate (ORR) of 10% (4/40; 95% CI: 3–24%) (23). In a per-protocol analysis with radiotherapy, the DCR was 37% (10/27; 95% CI: 10–56%), and the ORR was 18% (3/17; 95% CI: 4–43%) (23). The mCRC cohort also showed a median Progression-Free Survival (PFS) of 2.4 months (95% CI: 1.8–2.5) and a median Overall Survival (OS) of 7.1 months (95% CI: 4.3–10.9) (23). During the study, adverse events related to dual immunotherapy were reported in 53% of patients at grade 3, 15% at grade 4, and 3% at grade 5 (23). The most frequent grade ≥ 3 adverse events were lymphopenia and fatigue, with pneumonitis being the most notable at grade 5 (23). The 10 patients who showed disease control as a response to treatment had a higher PFS than the 17 patients who did not achieve disease control (5.2 months *versus* 2.4 months) (23).

A Phase 2 randomised study conducted at 27 oncology centres investigated whether the combination of PD-L1 inhibition and CTLA-4 inhibition, along with the best supportive care, would improve survival in patients with refractory mCRC (24). In this context, the group of patients who received the treatment with Tremelimumab (anti-CTLA-4) and Durvalumab (anti-PD-L1) demonstrate a median OS of 6.6 months (90% CI, 6.0–7.4 months), compared to 4.1 months for the group that received only supportive care (90% CI, 3.3–6.0 months) (24). The median PFS was 1.8 months in the treatment group (90% CI, 1.8–1.9 months) and 1.9 months in the supportive care group (90% CI, 1.8–1.9 months) (24). No complete responses were observed in the treatment group. However, one patient classified as MSS in this group had a partial response lasting over 21 months (27). Stable disease (SD) was the best response achieved in 26 patients (21.8%) in the treatment group compared to 4 patients (6.6%) in the supportive care group (24).

To investigate the mutational burden, 165 plasma samples were also analysed for circulating free DNA, and it was found that the median tumour mutational burden (TMB) was 15.3 (range 0.96–85.4) in the treatment group and 20.9 (range 1.9–114.9) in the supportive care group ($P = 0.07$) (24). Patients with $TMB \geq 28$ (35 out of 163 cases) showed a more significant benefit in OS in the treatment group; however, a high TMB was associated with poorer OS in the supportive care group (Hazard Ratio: 2.59; 90% CI, 1.46–4.62; $P = 0.007$) (24). All patients in the treatment group experienced treatment-related adverse events (24). 62% had at least one adverse event $\geq$

grade 3 compared to 20% of patients who received only supportive care ($P < 0.001$) (24). The incidence of all grades was significantly higher in the treatment group (24).

In another Phase 2 study, patients with metastatic pMMR colorectal cancer (mCRC) refractory to chemotherapy received Durvalumab 1,500 mg and Tremelimumab 75 mg every 4 weeks, in combination with radiotherapy (25). The ORR was 8.3% (corresponding to 2 patients), the median PFS was approximately 1.8 months, and 25% experienced grade 3 and 4 treatment-related adverse events (25). The two patients with an objective response to the treatment showed a partial response regarding overall non-irradiated tumour burden (outside the radiotherapy field) (25). None of the patients required complete discontinuation of the treatment, but three patients discontinued Tremelimumab due to associated toxicity (25). Two patients partially responded to the overall non-irradiated tumour burden (outside the radiotherapy field) (25). Regarding the immune cell profile resulting from the treatment, an increase in activation, differentiation, and proliferation of circulating CD8+ T cells was observed in patients who showed an objective response (25). A sustained rise in HLA-DR, Ki-67, and PD-1 was noted, along with an elevation in effector memory CD8+ T lymphocytes in the patients who responded to the treatment (25).

In the multicenter, single-arm Phase Ib clinical trial (NCT02375672), the hypothesis of the safe combination of Pembrolizumab (anti-PD-1) with mFOLFOX6 (standard therapy composed of 5-Fluorouracil/Leucovorin+Oxaliplatin) in patients with mCRC was investigated. Overall, the combination was well tolerated. The median PFS achieved with the combination therapy was 8.8 months (80% CI, 7.7–11.3 months); however, the median OS was not reached (80% CI, NA-NA) (26). Of the 30 patients in the study, two patients (6.7%) had complete responses, 15 patients (50.0%) had partial responses, and 13 patients (43.3%) had stable disease with the treatment (26). The ORR was 56.7%, and among the responding patients, the median duration of response was 37.57 weeks. It was considered that the primary endpoint was not superior to the control (26). Nonetheless, after the study, a subset of patients underwent surgery to remove their colorectal tumour (10%) or liver metastasis (6.7%), and it was suggested that the combination of mFOLFOX6 and Pembrolizumab could reduce tumour burden and allow these patients access to surgical options (26).

Table 2- Studies included from database research.

Title/ NCT/ Reference	Methodology	Objectives	Sample	Intervention	Results
Radiation therapy enhances immunotherapy response in microsatellite stable colorectal and pancreatic adenocarcinoma in a phase II trial (NCT03104439) 2022 (23)	Non-randomized, single-arm Phase 2 clinical trial: the combination of radiation, Ipilimumab and Nivolumab	DCR with intent to treat.	Patients with metastatic CRC (n=40) and pancreatic adenocarcinoma (n=25).	Cycle 1 - Day 1: Intravenous (IV) infusion of Nivolumab followed by Ipilimumab (30 min apart). Nivolumab 240 mg once every two weeks, on days 15 and 29 of a 42-day cycle. Cycle 2 - Day 1, Nivolumab 240 mg and Ipilimumab 1 mg/kg and radiation (24 Gy total: 3 fractions of 8 Gy administered every other day or 2 days (as needed). After radiation, Nivolumab 240mg daily every other week on days 15 and 29 of a 42-day cycle. Cycle 3 - Ipilimumab 1 mg/kg on day 1 with Nivolumab 240 mg	DCR=25%(10/40; IC95%:13-41%); In both cohorts, 32% (CRC 13/40; PAC 8/25) discontinued treatment prior to radiotherapy due to immune-mediated toxicity (N=4), clinical progression (N=7) or progression proven by tests (N=10); Grade ≥ 3 immunotherapy-related adverse events (AE) in 70% of patients; All patients had low TMB with <10 mutations/Mb, and there was no difference between non-responders PD compared to responders' SD, PR, and CR; No change in TMB before, during or after treatment; Of the 15 patients who obtained clinical benefit, only one showed evidence of any response before radiation. ORR=10% (4/40 IC 95%: 3-24%); CCR cohort: median PFS of 2.4 months and median OS of 7.1 months.

				followed by Nivolumab every other week for a 42-day cycle until disease progression is defined according to RECIST version 1.1, unacceptable toxicity, or withdrawal.	Radiotherapy protocol: DCR of 37% (10/27; 95% CI: 10-56%) and ORR of 18% (3/17; 95% CI: 4-43%). Statistically higher NK cells in responders compared with progressive disease.
Pembrolizumab plus azacitidine in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a single-arm phase 2 trial and correlative biomarker analysis. (NCT02260440) 2022 (31)	Phase 2, single-arm study: Pembrolizumab plus Azacitidine combination.	Primary endpoint: ORR; Secondary endpoints: PFS and OS.	30 patients with metastatic CRC refractory to chemotherapy.	Patients received pembrolizumab 200 mg IV on day 1 and azacitidine 100 mg SQ on days 1–5 every 3 weeks.	One patient achieved PR, and one patient had SD, the confirmed best response. The ORR was 3%, the median PFS was 1.9 months (95% CI, 1.3-2.0), and the median OS was 6.3 months (95% CI, 3.4-8.5 months). The combination regimen was well tolerated, and 96% of TRAE were grade 1/2, including nausea, fever, anaemia, leukopenia, increased ALT, and constipation. CD8+ TIL density was higher on-treatment compared to pre-treatment. This trial was terminated early due to lack of clinical efficacy.
Phase IB study of Ziv-aflibercept plus Pembrolizumab in patients with advanced solid tumours 2022 (33)	Multicenter, open-label, phase IB, dose-escalation study: Ziv-aflibercept and Pembrolizumab combination.	Determine the MTD and the recommended dose of the combination; Evaluate ORR and OS. Investigate the correlation of clinical efficacy with tumour and peripheral immune population densities.	33 patients: 6 melanoma (18%), eight ovarian carcinomas (27%), seven renal cell carcinomas (21%), 6 CRC (18%), and 6 (18%) with other solid tumours.	3+3 dose escalation in patients with metastatic solid tumours (cohort 1) and dose expansion in PD-1 inhibitor-naïve metastatic melanoma, renal cell carcinoma, MSS colon carcinoma and ovarian carcinoma (cohort 2). Combination of pembrolizumab (2 mg/kg) with Ziv-aflibercept 2 mg/kg (DL1) or 4 mg/kg (DL2) administered IV every 2 weeks.	No dose-limiting toxicities were reported at the starting dose level. As MTD, ziv-aflibercept 4 mg/kg and pembrolizumab 2 mg/kg every 2 weeks were established. Grade ≥ 3 AE occurred in 19/33 patients (58%). One treatment-related death occurred. The ORR in the dose expansion cohort was 16.7%. PR was observed in one CRC case. 14% (CR and PR) in CRC; Median PFS of 2.5 months (90% CI, 0.6-3.3); Median OS in CRC was 3.3 months (90% CI, 0.6-3.4). The presence of activated tumour-infiltrating CD8+ T cells at baseline (CD8+PD1+), high CD40L expression and increased peripheral memory CD8+ T cells correlated with clinical response.

A phase 1/2 trial of ibrutinib in combination with pembrolizumab in patients with mismatch repair proficient metastatic colorectal cancer 2021 (32)	Open-label, phase 1/2, single-arm trial: Ibrutinib combination with Pembrolizumab.	Determine the MTD and DCR. Assess safety, PFS and OS.	38 patients with metastatic and refractory pMMR CRC.	Patients received ibrutinib (PO) once daily and a fixed dose of pembrolizumab 200 mg IV every 3 weeks until disease progression or unacceptable toxicity. The starting dose of ibrutinib was 420 mg daily (Cohort 1) and was increased to 560 mg (Cohort 2) based on the safety and tolerability profile of the combination in Cohort 1.	DCR was achieved in 3 patients in cohort 1 and 1 in cohort 2. Median PFS and OS were 1.4 months (95% CI: 1.4-1.5) and 6.6 months (95% CI: 4.3-12.2), respectively. Survival rates were 52% at 6 months, 35% at 12 months and 22% at 18 months. The combination of Ibrutinib and Pembrolizumab showed acceptable safety. Only one of the 31 patients had controlled disease for 4 months in cohort 2. The study did not meet the primary endpoint.
A phase 2 trial of trifluridine/tipiracil plus nivolumab in patients with heavily pretreated microsatellite-stable metastatic colorectal cancer 2020 (30)	Multicenter, single-arm, safety lead-in, phase 2 study.	Estimate the irORR	18 patients.	Trifluridine/tipiracil (FTD/TPI) 35 mg/m ² twice daily PO days 1-5 and 8-12 of a 28-day cycle and Nivolumab IV (3 mg/kg/dose).	All patients discontinued treatment due to disease progression. Among the 18 patients enrolled in stage 1, no patient had an objective response (partial or complete) by irCR or RECIST. Eight patients had stable disease. The trial was stopped, and no patients were enrolled in stage 2.
Effect of Combined Immune Checkpoint Inhibition vs Best Supportive Care Alone in Patients with Advanced Colorectal Cancer: The Canadian Cancer Trials Group CO.26 Study 2020 (24)	Randomised phase 2 study.	To assess whether OS is improved in patients with metastatic refractory CRC.	One hundred eighty patients were randomised, with 119 in the treatment group.	Patients were randomised to receive 75 mg Tremelimumab and 1500 mg Durvalumab every 28 days versus supportive care alone (BSC) in a 2:1 ratio.	One hundred seventy-nine patients were treated with a median follow-up of 15.2 months. OS was 6.6 months for durvalumab and tremelimumab and 4.1 months for BSC. PFS was 1.8 months in the treatment group (90% CI: 1.8-1.9) and 1.9 months in the BSC group (90% CI: 1.8-1.9). One patient with an MSS tumour in the treatment group had a PR lasting more than 21 months. SD was the best response observed in 26 patients in the treatment group and four in the BSC group. Disease control was observed in 27 (22.7%) and 4 (6.6%) patients in the treatment and BSC groups, respectively. Grade 3 or 4 adverse events were significantly more frequent with immunotherapy.
Phase II trial of nivolumab and metformin in patients with treatment-refractory microsatellite stable metastatic colorectal cancer	Prospective, non-randomized, phase 2 trial.	Evaluate ORR, according to RECIST v.1.1 criteria; PFS	24 patients.	Nivolumab (480 mg IV) was administered every 4 weeks, and Metformin (1000 mg PO) was administered twice daily after a	Two patients had stable disease, but none had an objective response, so the study was stopped. The median OS and PFS were 5.2 months (95% CI: 3.2-11.7) and 2.3 (95% CI: 1.7-2.3) months. The combination of

2023 (36)		and OS up to 2 years and biochemical response, CEA levels up to 1 year; TME and systemic circulation.		14-day lead-in phase with Metformin alone.	Metformin and Nivolumab increased the percentages of tumor-infiltrating leukocytes. Dual treatment also increased tissue levels of Tim3+ and CD45+ and decreased naïve CD8+ T cells. Nivolumab and Metformin were well tolerated but showed no evidence of efficacy.
Phase II Single-arm Study of Durvalumab and Tremelimumab with Concurrent Radiotherapy in Patients with Mismatch Repair-proficient Metastatic Colorectal Cancer 2021 (25)	Single-centre, phase 2 study.	ORR in non-irradiated lesions.	24 patients with pMMR mCRC refractory to chemotherapy.	Patients received Durvalumab 1,500 mg plus Tremelimumab 75 mg every 4 weeks and radiotherapy.	2 patients with ORR of 8.3% (95% CI: 1.0-27). Median PFS was 1.8 months (95% CI: 1.7-1.9). Median OS of 11.4 (95% CI: 10.1-17.4). 2 patients with PR regarding non-irradiated overall tumour burden. 25% of patients (n=6) had grade 3-4 treatment-associated adverse events. Increased activation, differentiation and proliferation of circulating CD8+ T cells were observed in patients with objective response.
Atezolizumab with or without cobimetinib versus regorafenib in previously treated metastatic colorectal cancer (IMblaze370): a multicentre, open-label, phase 3, randomised, controlled trial. 2019 (38)	Multicenter, open-label, phase 3, randomised, controlled trial.	OS, with intent to treat.	363 patients (183 patients in the Atezolizumab plus Cobimetinib group, 90 in the Atezolizumab group and 90 in the Regorafenib group).	Randomisation in permuted blocks for patient assignment (2:1:1): Atezolizumab (840 mg IV every 2 weeks) plus Cobimetinib (60 mg PO once daily on days 1-21 of a 28-day cycle), Atezolizumab monotherapy (1,200 mg IV every 3 weeks), or Regorafenib (160 mg PO once daily on days 1-21 of a 28-day cycle).	The median OS was 8.87 months with Atezolizumab plus cobimetinib, 7.10 months with Atezolizumab and 8.51 months with Regorafenib. Grade 3-4 adverse events were reported in 109 (61%) of 179 patients in the Atezolizumab plus cobimetinib group, 28 (31%) of 90 in the Atezolizumab group and 46 (58%) of 80 in the Regorafenib group. There were two treatment-related deaths in the combination group (sepsis) and one in the Regorafenib group (bowel perforation). IMblaze370 did not meet its primary endpoint.
A phase I/Ib study of regorafenib and nivolumab in mismatch repair proficient advanced refractory colorectal cancer 2022 (40)	Phase I/Ib study.	To evaluate the safety and efficacy of Regorafenib plus Nivolumab in pMMR mCRC: DLT and MTD.	Fifty-two patients were enrolled, and 51 received at least one treatment dose.	Standard 3+3 design plus dose expansion.	Three patients experienced DLT. MTD: Regorafenib 80 mg and Nivolumab 240 mg every 2 weeks. The most common treatment-related adverse events were grade 3/4. Among the 40 evaluable patients, four (10%) achieved partial response, 21 (53%) achieved stable disease, and the disease control rate was 63%. PFS and OS were 4.3 and 11.1 months, respectively. Regorafenib and Nivolumab appear well tolerated,

with limited activity in metastatic pMMR

CRC.

Abbreviations legend: Adverse Events (AE); Alanine Transaminase (ALT); Best Supportive Care (BSC); Carcinoembryonic Antigen (CEA); Cluster of Differentiation 8 (CD8); Colorectal Carcinoma (CRC); Complete Response (CR); Disease Control Rate (DCR); Dose-Limiting Toxicity (DLT); Immune-related response criteria (irCR); Trifluridine-tipiracil (FTD/TPI); Immune-Related Objective Response Rate (irORR); Metastatic Colorectal Carcinoma (mCRC); Maximum Tolerated Dose (MTD); Natural Killer (NK); Overall Response Rate (ORR); Overall Survival (OS); PAC (Pancreatic Adenocarcinoma); Progressive Disease (PD); Progression-Free Survival (PFS); Mismatch-Repair-Proficient (pMMR); Partial Response (PR); Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST); Stable Disease (SD); Subcutaneous (SQ); Tumor Immune Microenvironment (TME); Treatment-Related Adverse Events (TRAE)

The open-label, single-arm Phase 2 trial, registered as NCT04194359, was designed to evaluate the antitumor activity and safety of Sintilimab (anti-PD-1) in combination with Bevacizumab, Oxaliplatin, and Capecitabine, as a first-line treatment in patients with mCRC with MSS status and RAS mutation (27). Of the 25 unresectable colorectal adenocarcinomas included in the study, 21 (84%) presented an OR based on RECIST criteria, and the DCR was 100% (27). Patients with liver metastases (N=15) showed a higher ORR (14/15, 93%) compared to the overall ORR (84%) (27). Two patients (8%) had a complete response, 19 (76%) had a partial response, and 4 (16%) had stable disease (30). The median PFS was 18.2 months (27). All 25 patients showed tumor reduction (27). Additionally, there was better infiltration of cells in the tumour immune microenvironment in patients with complete/partial response compared to the other patients, which translated into a longer PFS (≥ 12.5 months) (30). The treatment was generally well tolerated (27).

The SAMCO-PRODIGE 54 trial (NCT03186326), a Phase 2 study, aimed to evaluate the efficacy and safety of Avelumab (anti-PD-L1) as a second-line treatment in patients with dMMR/MSI mCRC who had not been previously treated with immunotherapy and whose first-line standard treatment had failed (28). A comparative study was conducted with a second-line standard therapy in 122 randomised patients to receive either Avelumab or second-line chemotherapy (28). A decrease in treatment-related adverse events was observed in the Avelumab group compared to the chemotherapy group (20 [31.7%] *versus* 34 [53.1%]) (28). Regarding PFS, Avelumab was superior to chemotherapy (15 patients *versus* five patients), with 12-month PFS rates of 31.2% (Avelumab group) and 19.4% (chemotherapy group), and 18-month PFS rates of 27.4% (Avelumab group) and 9.1% (chemotherapy group). Finally, it was found that 18 patients (75.7%) in the Avelumab group had disease control, compared to 9 patients (19.1%) in the control group (28).

To further investigate the influence of immunotherapy and standard therapy, a study evaluated the combination of Nivolumab (anti-PD1) with standard chemotherapy (Standard of Care - SOC) and Bevacizumab as a first-line treatment, compared to SOC alone (29).

In Arm A, corresponding to the combination of "Nivolumab + mFOLFOX + Bevacizumab," the results were as follows: PFS was 11.86 months (8.94 to 15.70), and PFS was 13.77 months (11.53 to 15.70). The ORR was 60.6% (51.6 to 69.2) based on BICR and 60.6% (51.6 to 69.2) according to the investigator (29). Regarding the Duration of Response (DOR), this was 12.88 months (9.00 to 14.72) according to BICR and 12.48 months (8.87 to 16.72) according to the investigator (29). The OS was 30.52 months (25.20 to 39.39) (32). A total of 122 participants (99.2%) experienced adverse events, with 57 participants having severe adverse events (29).

In Arm B, corresponding to the combination of "mFOLFOX + Bevacizumab," the results were as follows: PFS according to Blinded Independent Central Review (BICR) was 11.93 months (10.09 to 12.19), and PFS (investigator assessment) was 12.19 months (10.25 to 14.06). The Objective Response Rate (ORR) was 45.6% (33.5 to 58.1) based on BICR and 52.9% (40.4 to 65.2) according to the investigator (29). Regarding the Duration of Response (DOR), this was 9.26 months (7.49 to 11.30) according to BICR and 11.07 months (9.43 to 17.31) according to the investigator (29). The OS was 31.77 months (24.38 to 38.70) (29). Sixty-one participants (98.4%) experienced adverse events, with 20 participants having severe adverse events (29). Finally, DCR was evaluated, with results of 83.8% (72.9 to 91.6) according to BICR and 77.9% (66.2 to 87.1) according to the investigator's assessment (29).

In another therapeutic combination perspective, a multicenter Phase 2 study was conducted to investigate the safety of the combined administration of Trifluridine/Tipiracil and Nivolumab in highly pretreated MSS mCRC patients (30). This study included 18 patients, with an initial safety phase involving six patients (30). In this proposed early stage, none of the 18 patients showed an objective response (partial or complete), and all of them discontinued the treatment due to disease progression, leading to the discontinuation of the trial (30).

3.2. Immune checkpoint inhibitors and their combination with targeted therapies:

A Phase 2 study focused on the therapeutic combination strategy of Pembrolizumab with Azacitidine (a cytidine analogue drug belonging to DNA methyltransferase inhibitors - DNMTi) in patients with chemotherapy-refractory mCRC (31). In a sample of 30 patients included in the study, it was found that one patient achieved partial response, and one patient had stable disease (31). The ORR was around 3%, the median PFS was 1.9 months, and the median OS was 6.3 months (31). 4 out of 30 patients appeared to benefit clinically from the therapy; however, the trial was prematurely terminated for not reaching the primary ORR goal of 20%, as observed in Table 2 (31).

In another Phase 1/2 trial, the combination of Pembrolizumab with a kinase inhibitor, Ibrutinib, was studied in patients with pMMR mCRC (32). In a sample of 38 patients included in the study, it was found that DCR was achieved in 3 patients in cohort 1 (Ibrutinib 420 mg) and one patient in cohort 2 (Ibrutinib 560 mg) (32). The median PFS and OS were 1.4 months and 6.6 months, respectively (32). Thirty-one patients discontinued treatment due to disease progression, two due to adverse events, and five due to withdrawal of consent (32). Disease control at 4 months was achieved in only three patients in Phase 1 and 1 patient in Phase 2, so the study's primary endpoint was unmet (Table 2) (32).

From another perspective of therapeutic combination, the strategy of combined administration of Pembrolizumab and Ziv-aflibercept, an antiangiogenic agent that inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF), was explored in patients with advanced solid tumours (33). The Phase 1b study allowed the identification of Ziv-aflibercept at a dose of 4 mg/kg and Pembrolizumab at 2 mg/kg every 2 weeks as the maximum tolerated dose ("Maximum Tolerated Dose" - MTD) (33). Adverse events of grade ≥ 3 occurred in 19 of the 33 patients (58%) (33). A partial response was observed in one case of mCRC. The median OS in mCRC was 3.3 months (33). The study also found the presence of infiltrating activated CD8+ T cells in the tumour (CD8+PD1+), high expression of CD40L, and an increase in peripheral memory CD8+ T cells correlated with clinical response (33). In patients with controlled disease, higher baseline levels of CXCL2, CXCL5, and CD40L—cytokines associated with promoting angiogenesis—were observed in Table 2 (33).

In the Phase 1 PICASSO study, the combination of Pembrolizumab and Maraviroc (an antiretroviral) was investigated to assess the viability and safety of this combination in patients with MSS mCRC (34). The viability rate was 94.7%, the ORR was 5.3%, the median PFS was 2.10 months, and the median OS was 9.83 months (34). Translational analyses showed increased antitumor chemokines, notably eotaxins, in the treatment group (Table 2) (34).

In the ECHO-206 clinical trial, Pembrolizumab combined with Azacitidine and Epacadostat (an inhibitor of Indoleamine-2,3-dioxygenase - IDO) was investigated in patients with advanced solid tumours (35). Initially, the study was designed to include three treatment groups (A: Azacitidine + Pembrolizumab + Epacadostat; B: INCB057643 + Pembrolizumab + Epacadostat; and C: INCB059872 + Pembrolizumab + Epacadostat), but the study was discontinued, and no participants were enrolled in groups B and C (35). Focusing on group A and administering 100 mg of INCB24360, it was found that all 62 participants experienced treatment-related adverse events, with 28 of them having severe adverse events (66.13%) (35). An ORR was observed in 3 participants (4.8%), 14 participants had an increase in intra-tumoral CD8+ T cells, the CD8+/FoxP3+ ratio in 10 participants was 52.6%, and the PFS was 2.07 months (1.97 to 2.17) (35). In the same group, A, but with the administration of 300 mg of INCB24360, all 8 participants had treatment-related adverse events, with 3 of them having severe adverse events (37.50%) (35). At this dosage, ORR was observed in 1 participant (12.5%), and the PFS was 2.64 months, as observed in Table 2 (35).

A Phase 2 clinical trial conducted in patients with MSS mCRC refractory to treatment sought to study the effect of the combined therapy of Nivolumab and Metformin (an oral antidiabetic) on tumour response and immune modulation activity (36). A total of 24 patients were included in the sample, with median OS and PFS of 5.2 months and 2.3 months, respectively (36). With this combination, an increase in the percentage of infiltrating leukocytes in the tumour microenvironment was observed, along with an increase in Tim3+ levels in the tissues and a decrease in naïve CD8+ T cells (36). A statistically significant difference in the percentage of effector CD4+ T cells was also noted between the two groups, favouring the treatment group ($p=0.004$) (36). Although the combination therapy was well tolerated, only two patients showed stable disease, and none showed an objective response, leading to the discontinuation of the studies described in Table 2 (36).

Another clinical trial, called PIVOT-02, was conducted as a Phase 1 and 2 study to perform dose escalation and cohort expansion of the combination of NKTR-214 (an IL2 pathway agonist) with Nivolumab and other anti-tumour therapies (37). This trial included a total of 557 participants with advanced solid tumours and involved, in the first phase, five dose escalation steps and, in the second phase, dose expansion with "NKTR-214 (0.006 mg/kg) + Nivolumab (360 mg)" (37). In this study, the ORR was achieved in 64 participants (14.9%), and severe adverse events were observed in 291 of 476 participants (44.75%) (37). Subsequently, three dosing regimens for the combination "NKTR-214 + Nivolumab + Ipilimumab" were studied. In regimen 1, severe adverse events were observed in 6/10 patients (60.00%), in regimen 2 in 5/8 patients (62.50%), and in regimen 3 in 2/6 patients (33.33%) (37). Finally, the dose expansion of "NKTR-214 + Nivolumab + Ipilimumab" was analysed, achieving an ORR in 3 participants (17.6%), with severe adverse events occurring in 8 of the 19 participants (42.11%) (Table 2) (37).

Another monoclonal antibody studied was Atezolizumab (anti-PD-L1), with or without Cobimetinib (a MEK inhibitor), compared to Regorafenib (a multi-kinase inhibitor targeting proteins involved in tumour angiogenesis, oncogenesis, metastatic processes, and tumour immunity) (38). In this Phase 3 study, called IMblaze 370, the median OS achieved was 8.87 months for the group receiving "Atezolizumab plus Cobimetinib," 7.10 months for the "Atezolizumab" group, and 8.51 months for the "Regorafenib" group (38). The median PFS was 1.91 months (95% CI 1.87–1.97) in the combination group, 1.94 months (1.91–2.10) in the Atezolizumab group, and 2.00 months (1.87–3.61) in the Regorafenib group (38). Regarding adverse events, they were reported in about 61% of patients in the "Atezolizumab plus Cobimetinib" group, 31% in the "Atezolizumab" group, and 58% in the "Regorafenib" group (38). Notably, two treatment-related deaths occurred in the combination group (sepsis) and 1 in the Regorafenib group (intestinal perforation) (38). The IMblaze370 study did not achieve its primary endpoint (Table 2) (38).

In 2022, a Phase 1/1b clinical trial was conducted to assess the safety and efficacy of Regorafenib plus Nivolumab in pMMR mCRC (39). The established MTD was 80 mg of Regorafenib and 240 mg of Nivolumab, administered every 2 weeks (39). With a total of 52 patients, the achieved PFS and OS were 4.3 and 11.1 months, respectively (39). Among the 40 patients who were evaluated, four patients (10%) achieved a partial response, and 21 patients (53%) had stable disease (39). Patients with metastatic lung disease had a better PFS than those with non-lung metastatic disease (median PFS of 5.6 months vs 2.3 months) (39). Regarding treatment-related adverse events, grade 3 and 4 occurred in 26 patients (51%), as Table 2 (39) described.

In the MORPHEUS clinical trial, the efficacy and safety of multiple immunotherapy combinations were evaluated (Atezolizumab + Imprime PGG + Bevacizumab; Atezolizumab + Isatuximab; Atezolizumab + Selicrelumab + Bevacizumab; Atezolizumab + Idasanutlin; Atezolizumab + Regorafenib; Atezolizumab + Regorafenib + AB928; and Atezolizumab + LOAd703) in the treatment of mCRC patients (40). In the overall analysis of the different experimental groups, PFS and OS were superior in the "Atezolizumab + Selicrelumab + Bevacizumab" group, with a PFS of 4.21 months and an OS of 14.36 months, respectively (40). A stable disease rate of 53.3% was observed in the "Atezolizumab + Regorafenib + AB928" group (40). Adverse events of grades 3 to 5 occurred in a higher number of participants in the "Atezolizumab + Idasanutlin" group, corresponding to about 75% of the participants (Table 2) (40).

In the NCT03428126 study, a Phase 2 clinical trial, the combination of Trametinib (a MEK inhibitor) with Durvalumab (anti-PD-L1) was investigated to determine whether it could alter the tumour immune microenvironment, potentially enhancing an anti-tumour response (41). In this study, patients with refractory MSS mCRC were included, and it was found that one patient had a partial response, and 7 had stable disease; however, 17 patients experienced disease progression (41). Additionally, five patients (1 partial response, four disease progression) showed a decrease in carcinoembryonic antigen (CEA) levels (41). The response rate in the first stage of the study did not meet the efficacy criteria, so the study did not proceed to a second stage (Table 2) (41).

In another therapeutic combination strategy, a Phase 1/1b study was conducted to investigate the combination of the monoclonal anti-TGF- β antibody, NIS793, with Spartalizumab (anti-PD1) in adult patients with advanced tumours (42). This preliminary study showed that with the dosage of NIS793 30mg/kg and Spartalizumab 300 mg, a partial response was achieved in one renal cell carcinoma and two cases of MSS CRC, as described in Table 2 (42).

In another perspective, Ma *et al.* (2023) conducted a study to assess the safety and efficacy of combining Toripalimab with Fruquintinib (an oral inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor - VEGFR) in patients with advanced and refractory mCRC (43). In a sample of 19 patients, four patients (21.05%) achieved a partial response, 10 patients (52.63%) had stable

disease, and four patients (21.05%) had disease progression (43). The median PFS was 5.98 months, the 1-year PFS rate was 26.95%, and the median OS was 11.10 months. The four patients who achieved an objective response had a median duration of response of 7.41 months, as observed in Table 2 (43).

In 2020, a study was conducted to investigate the combination of SHR-1210 (Camrelizumab, anti-PD1) and Apatinib (a tyrosine kinase inhibitor) in the context of mCRC (44). The achieved PFS was 1.83 months, and the OS was 7.80 months (44). All patients included in the study experienced treatment-related adverse events, and the objective response rate was 0%, indicating that this combination was not relevant for improving efficacy in the treatment of mCRC (Table 2) (44).

4. Discussion

Regarding standard therapies, combining immunotherapy with radiotherapy has been suggested as an important modality to enhance the systemic response and the susceptibility of tumour cells to immune-mediated death (23).

Parikh *et al.* (2022) conducted a study to evaluate the dual blockade of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 with radiotherapy, demonstrating modest safety and efficacy with this combined strategy (23). The response rate observed in the group receiving Ipilimumab, Nivolumab, and radiation modestly surpassed those of conventional treatment, particularly in disease control duration. However, the toxicity associated with the combined therapy remained high (23). Preclinical models studied so far have focused on the role of radiotherapy in increasing T-cell receptors (TCR) in intra-tumoral T cells and enhancing dendritic cell infiltration in the tumour microenvironment. However, the present study had no consistent response pattern to these findings (23). Still, the significant expression of RNA repeats with increased NK cells in patients who showed control or response to the treatment was consistent and similar to results previously achieved in urothelial carcinoma (23). NK cells emerge as potential effector cells in the context of anti-PD1/PD-L1 therapies, and their association with cytolytic T cells has proven crucial for a complete anti-tumour immune response, further supporting the benefit of the combined strategy (23).

Another perspective studied regarding combining radiotherapy with immune checkpoint inhibitors was the impact on reducing non-irradiated tumours (abscopal effect) in pMMR mCRC patients (25). In this context, the combined administration of Durvalumab, Tremelimumab, and radiotherapy in metastatic pMMR CRC demonstrated potential for reducing non-irradiated tumours, with two confirmed objective responses observed outside the radiation field, a median PFS of 1.8 months, and a median OS of 11.4 months (25). In this context, Parikh *et al.*'s study corroborates these results. Therefore, combining all these studies suggests an abscopal immunity was achieved in 7 of the 75 pMMR mCRC patients who underwent this combinatory strategy (25).

The study by Parikh *et al.* demonstrates an increase in the activation, differentiation, and proliferation of circulating CD8+ T lymphocytes, which was also observed in patients who showed an objective response. Although only two patients exhibited this condition, this finding emphasised the hypothesis of the influence of adaptive immunity from CD8+ T cells on the observed clinical benefit.

Indeed, a favourable trend suggests that this combination promotes systemic immunity and immunomodulation in the context of metastatic colorectal cancer (mCRC). However, more in-depth studies will be needed, focusing on using radiotherapy at an earlier stage, with different dosing regimens and alternative treatment protocols, to better understand the clinical benefit of immunotherapy and radiotherapy as a combined strategy (23,25).

Another proposed therapeutic combination involves the association of immune checkpoint inhibitors with chemotherapy. In the phase 1b clinical trial conducted by Herting *et al.*, this combined regimen was administered, and its results were compared with those previously reported in the literature for these therapies when used alone. This study effectively confirmed the safety of coadministering chemotherapy with Pembrolizumab. However, the primary endpoint achieved was not superior to the historical results (26). The previous data, reporting a median PFS of 9 months and a median OS of 16.2 months for the monotherapies, contrasts with the results obtained in this study combining FOLFOX+Pembrolizumab, which achieved a median PFS of 8.8 months and an OS that was not reached (26). Despite this, the trial provided some insight into the immune infiltrate, particularly regarding the peripheral expression of LAG3 and its role in inhibiting T cell activation and maintaining immune tolerance, thus suggesting the need for future studies to include therapeutic strategies involving LAG3 inhibition in combination with mFOLFOX6 and Pembrolizumab (26)."

In another phase 2 trial, conducted by Fang *et al.*, the aim was to investigate whether the addition of Sintilimab in combination with Bevacizumab, Oxaliplatin, and Capecitabine, as a first-line treatment mCRC patients with MSS status and RAS mutation, could improve ORR and PFS (27). This combination was considered safe and tolerable and achieved its primary endpoint (27). Comparing the results obtained with known data from standard therapy (double chemotherapy with Bevacizumab) with an ORR of 43-59% and PFS of 8-9 months, this combination showed more significant clinical benefit, achieving an ORR of 84% and a PFS of 18.2 months (27).

To investigate the responses to this combined strategy in the pMMR subgroup, the AtezoTRIBE clinical trial included an experimental arm of 'FOLFOXIRI + Bevacizumab + Atezolizumab' (45). This trial achieved a clear clinical benefit, reflected in a median PFS of 12.9 months compared to a median PFS of 11.4 months in the control group (FOLFOXIRI + Bevacizumab) (45).

Also, in this context, a comparative study was conducted between the combined administration of Durvalumab (anti-PD-L1) and Tremelimumab (anti-CTLA-4) and the provision of the best supportive care in heavily pre-treated, refractory mCRC patients (44). In this study conducted by the Canadian Cancer Trials Group CO.26, a benefit of the combination was observed in OS of 6.6 months *versus* 4.1 months for supportive care. However, this benefit was not achieved in PFS, which remained short (24).

Subsequently, in the SAMCO-PRODRIGE 54 trial, the impact on PFS of Avelumab administration *versus* chemotherapy was investigated as a second-line treatment in dMMR/MSI mCRC patients (28). In this trial, Avelumab was superior to chemotherapy, with or without targeted agents, concerning PFS rates at 12 months (31.2% vs 19.4%) and at 18 months (27.4% vs 9.1%) (28). The impact of Avelumab was also superior in disease control duration, tolerance and the occurrence of adverse events, with a statistically significant difference in grade 3 and 4 adverse events (28). Such data support its potential selection over standard second-line treatments (28).

Combined strategies between immune checkpoint inhibitors and targeted therapies have been a rapidly expanding area of research, emerging as one of the most promising approaches to overcome the resistance observed in mCRC to immunotherapy.

The combination of Pembrolizumab with Azacitidine (a DNMTi) was studied in a phase 2 clinical trial, being well tolerated with an appropriate safety profile. However, clinical efficacy was very modest, with only one patient achieving a partial response and one presenting stable disease (31). The study observed the presence of CD8+ TILs in the tumours, which was considered a positive sign for the anti-tumour immune response and indicative of a potential immunomodulatory effect of this combined regimen. However, this trial was discontinued due to lacking clinical evidence (31).

On the other hand, in the study by Rahma *et al.*, the combination of Pembrolizumab with Ziv-aflibercept, an antiangiogenic agent, was investigated, and it was found that only melanoma and mCRC tumours responded to the therapy (33). This response was corroborated by the observation of an increase in tumour infiltrates of activated CD8+ T cells and an increase in peripheral memory CD8+ T cells (33). Interestingly, patients who achieved disease control had higher levels of cytokines associated with angiogenesis (33). Still, this combination proved more promising than the previous one, encouraging future studies following this pharmacological approach (33).

To achieve a favourable anti-tumour response from immunotherapy in the context of pMMR mCRC, the combination of Pembrolizumab with Ibrutinib, a tyrosine kinase inhibitor, was investigated (32). This combination was selected for a phase 1/2 study because preclinical data had previously demonstrated the cytotoxic and immunomodulatory effects of Ibrutinib, with the conversion of this pMMR mCRC subtype, known to be a 'cold, immunosuppressive tumour,' into a 'hot' more immunogenic tumour (35). Despite these promising *a priori* data, the study did not achieve its primary endpoint, with only one patient showing controlled disease during the 4 months of the phase 2 study (32).

Another combination attempt studied was the association of Pembrolizumab with Maraviroc (an antiretroviral drug) and CCR5 (receptor antagonist) in pMMR/MSS mCRC patients (34). In the PICASSO study, the treatment responses were also below expectations, as only a minority of patients showed a response or stable disease. However, a median OS of around 9 months was achieved, significantly higher than expected for these heavily pre-treated patients (34). Translational analyses also revealed increased anti-tumour chemokines during treatment, which may indicate an associated immunomodulatory effect (34).

Nivolumab has been another immune checkpoint inhibitor studied in various combinatory strategies. In the phase 2 clinical trial, the combination of Nivolumab with Metformin was studied, as preclinical data highlighted its action in altering the tumour microenvironment through its

influence on the AMPK activation pathway, inhibition of the mTOR/pS6 kinase, reduction of hypoxia, and suppression of macrophage polarisation toward the M2 phenotype (36). In this regard, it was investigated whether the combination could increase sensitivity to Nivolumab in patients with refractory MSS mCRC (36). Indeed, this combination was well tolerated and maintained the expected safety; however, no objective responses were observed, with only two patients achieving stable disease (36). Despite the promising results in *in vitro* studies and animal models, the metabolic modulation expected from the action of Metformin was not statistically significant in human studies. However, an increase in circulating effector CD8⁺ T cells was observed (36). Interestingly, there was an increase in Tim3⁺ cells in the tumour microenvironment, which were found to be associated with immunosuppressive activity (36).

The results were somewhat more optimistic in the combination of Nivolumab with Regorafenib (a tyrosine kinase inhibitor), with this combination being well tolerated and showing modest activity in pMMR mCRC patients (39). This translated into 10% of patients showing a partial response and 53% achieving stable disease (39). An association was also observed between the presence of liver metastases (in 73% of patients) and a worse outcome with the combined therapy, with a lower ORR, compared to other patients (4% *versus* 25%, respectively), as well as a shorter PFS (2.3 months *versus* 8.9 months) (39). This finding correlates with some preclinical data already published, suggesting that liver metastases may induce local and systemic immunosuppression by eliminating activated CD8⁺ T cells and activating regulatory T cells (Tregs), with tolerogenic modulation by myeloid-derived immune cells (MDSCs) (46).

In another clinical trial, studying the safety and efficacy of the combination of Regorafenib with Toripalimab (anti-PD-1) in mCRC MMS/pMMR/MSI-L patients, it was also found that patients with liver metastases had a lower ORR compared to patients without liver metastases (8.7% *versus* 30%) (47). No patient with liver metastasis responded to the treatment, in contrast to a complete response from patients with lung metastases (47). Still, this combination achieved better efficacy compared to Regorafenib monotherapy (47).

In the context of combining ICI with kinase inhibitors, a study was conducted on combining Atezolizumab with MEK inhibitors, such as Cobimetinib. In the IMblaze 370 study, the combination did not show an OS superior to the combination with Regorafenib or Atezolizumab alone, with a combined response being found in only 3% of patients (38).

The combination of Durvalumab (anti-PD-L1) with Trametinib (MEK inhibitor) was also studied to determine whether this combination would lead to a better anti-tumor response in refractory MSS mCRC (41). Safety was observed with this combination strategy; however, its efficacy was very limited, with only one of the 29 patients showing a partial response lasting about 9 months, who, interestingly, had pulmonary metastatic lesions (41). The study thus corroborated previous data indicating that the location of metastatic disease, with its different immune microenvironments, may impact the response to immunotherapy, leading to different outcomes in PFS and DCR, and further exploratory studies are needed to address these discrepancies (41). Another discovery in this study was the positive regulation of PD-1 and Tim3 by infiltrating CD8⁺ T lymphocytes, which had not been observed previously in animal model studies (41). It was also found that CD4⁺ T cells play a significant role in regulating CD73, which has an important immunosuppressive role by inhibiting the activation and proliferation of T cells and NK cells (41). Therefore, this could be an area to explore in new approaches within immunotherapy.

In the study of the combined administration of Toripalimab with Fruquintinib, a VEGFR-targeted tyrosine kinase inhibitor, an ORR of 21.05% was achieved (43). This result was higher than the ORR of patients who received Fruquintinib alone (ORR of 4.7%) (43). In this research, four patients (21.05%) achieved a partial response, 10 patients (52.63%) had stable disease, and four patients (21.05%) had progressive disease. These data support a synergistic effect between anti-angiogenic therapy and immunotherapy, with potential for use as a third-line treatment (43).

Currently, several trials have studied numerous combination strategies with anti-angiogenic drugs and anti-PD-1/PD-L1 to convert an immunosuppressive microenvironment into a more immunopermissive one, which will enhance the anti-tumour effect of immune checkpoint inhibitors, a crucial factor in the context of refractory mCRC and/or MSS/pMMR (43).

Globally, the resistance to immunotherapy and the modest results from the application of immunotherapy strategies in the context of CRC, particularly metastatic, refractory CRC, and in patients who have been heavily pretreated with various lines of conventional treatment, support the need for optimisation and innovation of approaches with immune checkpoint inhibitors.

The mechanisms underlying the modest treatment outcomes can be associated with resistance. However, the causes are not fully understood, suggesting that intrinsic and extrinsic

tumour factors should be studied. The low infiltration of T cells in the tumour microenvironment, their inadequate effector function, and the deficient production of memory T cells have been highlighted as three major factors contributing to the lack of efficacy of this therapy. However, other factors can increase not only innate resistance but also acquired resistance (20). Therefore, optimising immunotherapy strategies for the dMMR-MSI-H CRC treatment and, especially, for pMMR-MSI-L CRC is crucial to improve the prognosis of these patients. In this study, we explore the advances and challenges of ICI in immune-based therapeutic approaches in colorectal cancer. The limitations associated with this study are the differences between the number of patients involved (sample size) in each research and methodology, such as being non-randomized and single-arm studies, which affect the reliability of the study.

5. Conclusions

This review observed limited and modest efficacy in most of the presented combination strategies. Overall, combinations with standard therapies and targeted therapies (such as antiangiogenic agents and MEK inhibitors) showed modest improvements in OS and PFS in response to immune checkpoint inhibitors. Immunomodulatory benefits, including greater immune activation primarily related to T and B cells, were among the highlights of most clinical trials. However, these findings are still in the early stages of research. Interestingly, the responses observed were promising across various stages of the disease, ranging from early-stage to advanced and unresectable stages. The combinations were also, overall, well tolerated and considered safe for the subpopulations of CRC included in the study samples.

It is also imperative to have a deeper understanding of the heterogeneity of the CRC tumour microenvironment and the mechanisms of evasion by tumour cells that may be associated with resistance to immunotherapy, remarkably immune checkpoint inhibitors. In this regard, future strategies focused on enhancing stimulatory signals (e.g., CD40) in the immune system and blocking inhibitory signals (e.g., Tim3 and LAG3) emerge as strategies to be developed in the short/medium term in the field of immunotherapy. Additionally, toxicity and the occurrence of adverse events that limit the efficacy and safety of immunotherapy, whether combined or as monotherapy, are critical factors to address in future studies.

Author Contributions: All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work reported.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

6. References

1. Colorectal cancer – IARC [Internet]. [cited 2023 Dec 29]. Available from: <https://www.iarc.who.int/cancer-type/colorectal-cancer/>
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019 Apr 15;144(8):1941–53.
3. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Dennis J, Ahnen J, Reinier J, *et al.* Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2017 May 6 [cited 2023 Dec 29];67(3):177–93. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21395>
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
5. Morgan E, Arnold M, Gini A, Lorenzoni V, Cabañas CJ, Laversanne M, *et al.* Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: Incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*. 2023;72(2):338–44.
6. Lichtenstern CR, Ngu RK, Shalapour S, Karin M. Immunotherapy, Inflammation and Colorectal Cancer. *Cells*. 2020;9(3):1–18.
7. Robles AI, Traverso G, Zhang M, Roberts NJ, Khan MA, Joseph C, *et al.* Whole-Exome Sequencing Analyses of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancers. *Gastroenterology* [Internet]. 2016 [cited 2024 May 10];150:931–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.12.036>

8. El Bali M, Bakkach J, Bennani Mechita M. Colorectal Cancer: From Genetic Landscape to Targeted Therapy. *J Oncol* [Internet]. 2021 [cited 2024 May 10];2021. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34326875/>
9. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJC. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* [Internet]. 2002 [cited 2024 May 10];89(7):845–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12081733/>
10. Taylor DP, Burt RW, Williams MS, Haug PJ, Cannon-Albright LA. Population-based family history-specific risks for colorectal cancer: a constellation approach. *Gastroenterology* [Internet]. 2010 [cited 2024 May 10];138(3):877–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19932107/>
11. Ashktorab H, Smoot DT, Farzanmehr H, Fidelia-Lambert M, Momen B, Hyland L, *et al.* Clinicopathological features and microsatellite instability (MSI) in colorectal cancers from African Americans. *Int J Cancer* [Internet]. 2005 Oct 10 [cited 2024 May 10];116(6):914. Available from: </pmc/articles/PMC4155490/>
12. Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond JA, Fowler G, *et al.* Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nat* 2012 4877407 [Internet]. 2012 Jul 18 [cited 2024 May 10];487(7407):330–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature11252>
13. Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, Mendelsohn RB, Shia J, Segal NH, *et al.* Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. [cited 2023 Dec 29]; Available from: <https://doi.org/10.1038/>
14. Weng J, Li S, Zhu Z, Liu Q, Zhang R, Yang Y, *et al.* Exploring immunotherapy in colorectal cancer. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Dec 29];15(1):95. Available from: </pmc/articles/PMC9288068/>
15. Colon Cancer - StatPearls - NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2023 Dec 29]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>
16. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd Gastroenterol* [Internet]. 2019 [cited 2023 Dec 29];14(2):89. Available from: </pmc/articles/PMC6791134/>
17. Ogura A, Konishi T, Cunningham C, Garcia-Aguilar J, Iversen H, Toda S, *et al.* Neoadjuvant (Chemo)radiotherapy With Total Mesorectal Excision Only Is Not Sufficient to Prevent Lateral Local Recurrence in Enlarged Nodes: Results of the Multicenter Lateral Node Study of Patients With Low cT3/4 Rectal Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Dec 29];37(1):33. Available from: </pmc/articles/PMC6366816/>
18. Garg MB, Lincz LF, Adler K, Scorgie FE, Ackland SP, Sakoff JA. Predicting 5-fluorouracil toxicity in colorectal cancer patients from peripheral blood cell telomere length: a multivariate analysis. *Br J Cancer* [Internet]. 2012 [cited 2023 Dec 29];107:1525–33. Available from: www.bjccancer.com
19. Gupta SL, Basu S, Soni V, Jaiswal RK. Immunotherapy: an alternative promising therapeutic approach against cancers. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2024 May 10];49(10):9903. Available from: </pmc/articles/PMC9244230/>
20. Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. 2018 [cited 2024 Jan 9]; Available from: www.bjccancer.com
21. ROBINS-I | Cochrane Bias [Internet]. [cited 2024 May 27]. Available from: <https://methods.cochrane.org/bias/risk-bias-non-randomized-studies-interventions>
22. RoB 2: A revised Cochrane risk-of-bias tool for randomized trials | Cochrane Bias [Internet]. [cited 2024 May 27]. Available from: <https://methods.cochrane.org/bias/resources/rob-2-revised-cochrane-risk-bias-tool-randomized-trials>
23. Parikh AR, Szabolcs A, Allen JN, Clark JW, Wo JY, Raabe M, *et al.* Radiation therapy enhances immunotherapy response in microsatellite stable colorectal and pancreatic adenocarcinoma in a phase II trial. *Nat cancer* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2024 Feb 8];2(11):1124–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35122060/>
24. Chen EX, Jonker DJ, Loree JM, Kennecke HF, Berry SR, Couture F, *et al.* Effect of Combined Immune Checkpoint Inhibition vs Best Supportive Care Alone in Patients With Advanced Colorectal Cancer: The Canadian Cancer Trials Group CO.26 Study. *JAMA Oncol* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2024 Feb 10];6(6):831–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32379280/>
25. Segal NH, Cercek A, Ku G, Wu AJ, Rimner A, Khalil DN, *et al.* Phase II Single-arm Study of Durvalumab and Tremelimumab with Concurrent Radiotherapy in Patients with Mismatch Repair-proficient Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2024 Feb 10];27(8):2200–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33504552/>

26. Herting CJ, Farren MR, Tong Y, Liu Z, O'Neil B, Bekaii-Saab T, *et al.* A multi-center, single-arm, phase Ib study of pembrolizumab (MK-3475) in combination with chemotherapy for patients with advanced colorectal cancer: HCRN GI14-186. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2024 Feb 10];70(11):3337–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34160684/>
27. Fang X, Zhu N, Zhong C, Wang L, Li J, Weng S, *et al.* Sintilimab plus bevacizumab, oxaliplatin and capecitabine as first-line therapy in RAS-mutant, microsatellite stable, unresectable metastatic colorectal cancer: an open-label, single-arm, phase II trial. *eClinicalMedicine*. 2023;62:1–13.
28. Taïeb J, Bouche O, André T, Le Malicot K, Laurent-Puig P, Bez J, *et al.* Avelumab vs Standard Second-Line Chemotherapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer and Microsatellite Instability: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2023;9(10):1356–63.
29. Study Details | An Investigational Immunotherapy Study of Nivolumab With Standard of Care Therapy vs Standard of Care Therapy for First-Line Treatment of Colorectal Cancer That Has Spread | ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2024 May 20]. Available from: [https://clinicaltrials.gov/study/NCT03414983?cond=%22Colorectal Cancer%22&term=IMMUNOTHERAPY AND Treatment Outcome&intr=Immune checkpoint inhibitor&aggFilters=ages:adult,results:with&rank=1](https://clinicaltrials.gov/study/NCT03414983?cond=%22Colorectal+Cancer%22&term=IMMUNOTHERAPY+AND+Treatment+Outcome&intr=Immune+checkpoint+inhibitor&aggFilters=ages:adult,results:with&rank=1)
30. Patel MR, Falchook GS, Hamada K, Makris L, Bendell JC. A phase 2 trial of trifluridine/tipiracil plus nivolumab in patients with heavily pretreated microsatellite-stable metastatic colorectal cancer. *Cancer Med* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2024 Feb 8];10(4):1183–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33544407/>
31. Kuang C, Park Y, Augustin RC, Lin Y, Hartman DJ, Seigh L, *et al.* Pembrolizumab plus azacitidine in patients with chemotherapy refractory metastatic colorectal cancer: a single-arm phase 2 trial and correlative biomarker analysis. *Clin Epigenetics* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Feb 8];14(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34991708/>
32. Kim DW, Tan E, Zhou JM, Schell MJ, Martinez M, Yu J, *et al.* A phase 1/2 trial of ibrutinib in combination with pembrolizumab in patients with mismatch repair proficient metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2021 May 25 [cited 2024 Feb 8];124(11):1803–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33828254/>
33. Rahma OE, Tyan K, Giobbie-Hurder A, Brohl AS, Bedard PL, Renouf DJ, *et al.* Phase IB study of ziv-aflibercept plus pembrolizumab in patients with advanced solid tumors. *J Immunother cancer* [Internet]. 2022 Mar 9 [cited 2024 Feb 8];10(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35264434/>
34. Haag GM, Springfield C, Grün B, Apostolidis L, Zschäbitz S, Dietrich M, *et al.* Pembrolizumab and maraviroc in refractory mismatch repair proficient/microsatellite-stable metastatic colorectal cancer - The PICCASSO phase I trial. *Eur J Cancer* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2024 Feb 25];167:112–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35427833/>
35. Study Details | Azacitidine Combined With Pembrolizumab and Epacadostat in Subjects With Advanced Solid Tumors (ECHO-206) | ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2024 May 20]. Available from: [https://clinicaltrials.gov/study/NCT02959437?cond=%22Colorectal Cancer%22&term=IMMUNOTHERAPY AND Efficacy&intr=Immune checkpoint inhibitor&aggFilters=ages:adult,results:with&rank=4](https://clinicaltrials.gov/study/NCT02959437?cond=%22Colorectal+Cancer%22&term=IMMUNOTHERAPY+AND+Efficacy&intr=Immune+checkpoint+inhibitor&aggFilters=ages:adult,results:with&rank=4)
36. Akce M, Farran B, Switchenko JM, Rupji M, Kang S, Khalil L, *et al.* Phase II trial of nivolumab and metformin in patients with treatment-refractory microsatellite stable metastatic colorectal cancer. *J Immunother cancer* [Internet]. 2023 Oct 18 [cited 2024 Feb 10];11(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37852737/>
37. Study Details | A Dose Escalation and Cohort Expansion Study of NKTR-214 in Combination With Nivolumab and Other Anti-Cancer Therapies in Patients With Select Advanced Solid Tumors | ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2024 May 20]. Available from: [https://clinicaltrials.gov/study/NCT02983045?cond=%22Colorectal Cancer%22&term=IMMUNOTHERAPY AND Efficacy&intr=Immune checkpoint inhibitor&aggFilters=ages:adult,results:with&rank=6](https://clinicaltrials.gov/study/NCT02983045?cond=%22Colorectal+Cancer%22&term=IMMUNOTHERAPY+AND+Efficacy&intr=Immune+checkpoint+inhibitor&aggFilters=ages:adult,results:with&rank=6)
38. Eng C, Kim TWY, Bendell J, Argilés G, Tebbutt NC, Di Bartolomeo M, *et al.* Atezolizumab with or without cobimetinib *versus* regorafenib in previously treated metastatic colorectal cancer (IM-blaze370): a multicentre, open-label, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2024 Feb 25];20(6):849–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31003911>
39. Kim RD, Kovari BP, Martinez M, Xie H, Sahin IH, Mehta R, *et al.* A phase I/Ib study of regorafenib and nivolumab in mismatch repair proficient advanced refractory colorectal cancer. *Eur J Cancer* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2024 Feb 25];169:93–102. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35526308/>

40. Study Details | A Study Evaluating the Efficacy and Safety of Multiple Immunotherapy-Based Treatment Combinations in Patients With Metastatic Colorectal Cancer (Morpheus-CRC) | ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2024 May 20]. Available from: [https://clinicaltrials.gov/study/NCT03555149?cond=%22Colorectal Cancer%22&term=IMMUNOTHERAPY AND Efficacy&intr=Immune checkpoint inhibitor&aggFilters=ages:adult,results:with&rank=1](https://clinicaltrials.gov/study/NCT03555149?cond=%22Colorectal+Cancer%22&term=IMMUNOTHERAPY+AND+Efficacy&intr=Immune+checkpoint+inhibitor&aggFilters=ages:adult,results:with&rank=1)
41. Johnson B, Haymaker CL, Parra ER, Soto LMS, Wang X, Thomas J V., *et al.* Phase II study of durvalumab (anti-PD-L1) and trametinib (MEKi) in microsatellite stable (MSS) metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Immunother cancer* [Internet]. 2022 Aug 25 [cited 2024 Feb 25];10(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36007963/>
42. Bauer TM, Santoro A, Lin CC, Garrido-Laguna I, Joerger M, Greil R, *et al.* Phase I/Ib, open-label, multicenter, dose-escalation study of the anti-TGF- β monoclonal antibody, NIS793, in combination with spartalizumab in adult patients with advanced tumors. *J Immunother cancer* [Internet]. 2023 Nov 29 [cited 2024 Feb 10];11(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38030303/>
43. Ma S, Chen R, Duan L, Li C, Yang T, Wang J, *et al.* Efficacy and safety of toripalimab with fruquintinib in the third-line treatment of refractory advanced metastatic colorectal cancer: results of a single-arm, single-center, prospective, phase II clinical study. *J Gastrointest Oncol*. 2023;14(2):1052–63.
44. Ren C, Mai ZJ, Jin Y, He MM, Wang ZQ, Luo HY, *et al.* Anti-PD-1 antibody SHR-1210 plus apatinib for metastatic colorectal cancer: a prospective, single-arm, open-label, phase II trial. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2020;10(9):2946–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33042628%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC7539766>
45. Antoniotti C, Borelli B, Rossini D, Pietrantonio F, Morano F, Salvatore L, *et al.* AtezoTRIBE: a randomised phase II study of FOLFOXIRI plus bevacizumab alone or in combination with atezolizumab as initial therapy for patients with unresectable metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2020 Jul 22 [cited 2024 Feb 10];20(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32698790/>
46. Lee JC, Mehdizadeh S, Smith J, Young A, Mufazalov IA, Mowery CT, *et al.* Regulatory T cell control of systemic immunity and immunotherapy response in liver metastasis. 2020;5(52).
47. Wang FH, He MM, Yao YC, Zhao X, Wang ZQ, Jin Y, *et al.* Regorafenib plus toripalimab in patients with metastatic colorectal cancer: a phase Ib/II clinic

Revisão

O Fenómeno *Postmortem* dos Dentes Cor-de-rosa

Catarina Ferreira ^{1*} e Cláudia Córdova ¹¹ Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, 6000-767 Castelo Branco

* Correspondência: ferreira.catarinasb@gmail.com

Abstract: The *postmortem* phenomenon of pink teeth is a cadaveric change characterized by a pink coloration of the teeth due to the infiltration of hemoglobin into the dentinal tubules after death, usually associated with trauma or conditions that increase venous pressure in the cranial region. This study aimed to understand and explain the *postmortem* phenomenon of pink teeth through a literature review. Initially, the *postmortem* phenomenon of pink teeth was interpreted as an indicator of violent death, such as drowning, strangulation, or asphyxiation. Currently, it is considered a nonspecific thanatological finding. Case studies indicate that this phenomenon can be observed in various situations, including drownings, hangings, strangulation, and in bodies exposed to humid environments. However, this coloration can also occur in living individuals, associated with dental trauma or orthodontic treatments. Although its manifestation varies depending on age, environmental conditions, and other factors, the *postmortem* phenomenon of pink teeth can provide important evidence in the context of forensic autopsies. In summary, despite this *postmortem* phenomenon's nonspecific nature, it can provide relevant information regarding the decomposition process and the causes of death. A detailed analysis of this phenomenon contributes to the death circumstances' interpretation, helping in the reconstruction of the events leading to death.

Keywords: *Postmortem* Pink teeth; Dental Decomposition; Death by Asphyxiation; Cadaveric Changes; Pulp Necrosis.

1. Introdução

Citation: Ferreira, Catarina.; Córdova, Cláudia. O Fenómeno *Postmortem* dos Dentes Cor-de-rosa *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2025 Mar 9; 3(1): 45-54.

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: February 2025

Accepted: February 2025

Published: March 2025

Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences

As catástrofes naturais e crimes continuam a persistir na vida humana (1). O corpo humano reage à morte de várias formas. Alterações na cor, temperatura, tamanho, forma, consistência e integridade podem resultar em várias formas de alteração cadavéricas (2). A decomposição do corpo humano depende do ambiente físico (água, vento, luz solar, tipo de solo, etc.) e do ambiente biológico (plantas, animais, insetos, etc.) (3). Estes achados tanatológicos são estudados no âmbito da Medicina Legal, especialmente durante a investigação da causa da morte (2).

Os achados *postmortem* são uma fonte de informação importante para a investigação forense (3), desempenhando um papel crucial na investigação de mortes violentas ou suspeitas, fornecendo informações detalhadas sobre a causa e a dinâmica das lesões que levaram ao óbito, que devem ser devidamente registados e estudados (2–4)

A Tanatognose é o ramo da Tanatologia que estuda o diagnóstico da causa de morte, através de numerosos sinais, denominados sinais de morte. Estes são classificados como: duvidosos, prováveis ou certos. A determinação do momento da morte é muito complexa, pois, muitas vezes, trata-se de casos em estado avançado de decomposição cadavérica ou em fase de esqueletização. Existe, contudo, uma série de linhas orientadoras desta avaliação: fases de decomposição cadavérica, estudo da fauna necrófaga encontrada no corpo (entomologia forense), estudo das modificações da composição química do osso (relação entre matéria orgânica e inorgânica) (5).

Ao longo dos últimos tempos, a Odontologia Forense juntamente com a Medicina Legal tem vindo a promover estudos com o intuito de desenvolver técnicas cada vez mais precisas na identificação humana e outras áreas de interesse pericial (5). A informação obtida pelos dentes deve-se à natureza do dente e das suas estruturas de suporte, que são resistentes a várias condições ambientais e climáticas extremas (3).

A Odontologia Forense tem sido essencial nos processos de identificação *postmortem*, contribuindo para a identificação geral, determinação de sexo, estimativas de idade, etnia, estatura e identificação individual, sendo uma das áreas de atuação do odontologista mais conhecidas e bastante explorada pela comunicação social, principalmente em casos de grandes acidentes e desastres em massa. Estabelece-se a identificação como um conjunto de procedimentos diversos para individualizar uma pessoa ou um objeto (5).

O fenómeno dos dentes cor-de-rosa, foi descrito pela primeira vez em 1829, sendo uma alteração cadavérica de cor, onde os dentes decíduos ou permanentes do cadáver apresentam um aspeto rosado, avermelhado ou acastanhado (2). É uma alteração *postmortem* que ocorre em cadáveres, é geralmente associada à decomposição avançada que auxilia na confirmação e deteção da causa da morte, bem como na estimativa do intervalo *postmortem* (3,4).

O estudo dos elementos dentários no processo de identificação humana pode constituir a peça chave na elucidação de casos periciais com indivíduos desconhecidos, por falta de história jurídica, familiar, médica e/ou odontológica. Assim, a aplicação dos métodos de identificação é necessário, tanto em indivíduos vivos como em cadáveres, restos cadavéricos, esqueletos, ossadas e até mesmo em armas, roupas ou outros objetos. Sabe-se também, que o tempo de preservação da estabilidade da polpa dentária varia de quatro dias a duas semanas, dependendo das variações ambientais, existindo três condições que afetam a conservação da polpa dentária: condições de degradação do DNA *postmortem*; condições em que foi feito o sepultamento; questões relacionadas à causa morte (5).

Em cadáveres que foram submetidos à ação de fatores ambientais, como restos de cadáveres, cadáveres carbonizados, submersos ou enterrados, é possível obter algumas informações biológicas tais como a quantidade de DNA viável para exame, condições dentárias, presença de microrganismos, degradação física, química e biológica. No entanto, é muito comum a dentição estar intacta e fornecer informações preciosas por meio da comparação entre registos *postmortem* e *antemortem*, tais como radiografias odontológicas e fichas clínicas de tratamentos realizados, onde a presença e posição individual dos dentes e suas respetivas características anatómicas, restaurações e componentes patológicos podem fornecer informações permitindo assim a individualização (5, 6).

Na prática, a ocorrência do fenómeno dos dentes cor-de-rosa varia de caso para caso, e como tal, também a sua interpretação. Inicialmente descrito com uma potencial associação com a causa da morte, este tornou-se gradualmente um achado tanatológico inespecífico (2). No entanto, este fenómeno tem sido frequentemente observado em vítimas de morte violenta como mortes por afogamento, estrangulamento, enforcamento, envenenamento, mortes repentinas e não naturais (1).

Este trabalho tem como objetivo compreender e explicar a ocorrência da descoloração característica observada nos dentes após a morte, fenómeno este designado por fenómeno *postmortem* dos dentes cor-de-rosa.

2. Metodologia

Foi realizada uma revisão da literatura. Foram utilizadas como fonte as bases de dados bibliográficas da PubMed e da Web of Science através da introdução de palavras-chave articuladas: dentes cor-de-rosa; dentes rosados; fenómeno *postmortem*; odontologia forense; medicina legal, em português e em inglês. Uma vez recolhidos alguns artigos, a seleção dos mesmos foi feita, numa primeira fase, através do título dos artigos, excluindo os artigos não relevantes. Destes, numa segunda fase, foram excluídos os não relevantes pela leitura do abstract. Numa terceira fase foram incluídos apenas os que possuíam importância para a temática abordada, através da leitura completa de cada artigo. Foram selecionados os artigos com data entre 2011 e 2025.

3. O Fenómeno *Postmortem* dos dentes cor-de-rosa

O fenómeno dos dentes cor-de-rosa foi descrito pela primeira vez por Thomas Bell em 1829, num caso de morte de uma vítima por afogamento. Desde então, não há muitos estudos publicados sobre o fenómeno dos dentes cor-de-rosa *postmortem* (3,7).

Apenas em 1953, Miles et al., descreveram o aparecimento de dentes cor-de-rosa *postmortem* em indivíduos cuja morte decorreu de um incêndio. Mais tarde, em 1989, Van Wyk et al. também referenciaram dentes cor-de-rosa em vítimas de uma morte violenta por esfaqueamento (7,8). Embora o fenómeno de dentes cor-de-rosa seja conhecido desde 1829, a sua aplicação na medicina forense tem sido limitada (9). O fenómeno *postmortem* dos dentes cor-de-rosa tem vindo a fazer parte dos achados tanatológicos detetados nas autópsias dentárias. A literatura científica atual ainda carece de estudos sistemáticos que expliquem precisamente da ocorrência do fenómeno em algumas vítimas e não em outras com condições semelhantes de causa de morte. A revisão de casos forenses indica que o fenómeno se pode manifestar tanto em corpos encontrados em meios aquáticos quanto em ambientes secos, reforçando a hipótese de que está mais relacionado à decomposição do sangue e da penetração da hemoglobina da polpa dentária na dentina do que à causa específica da morte (3).

3.1. Aspetos Anatômicos e Fisiológicos

Os dentes são considerados o tecido mais resistente do organismo e podem manter as suas características mesmo em condições de decomposição avançada após a morte, pelo que podem ser muito úteis na identificação de cadáveres e na interpretação conjunta com outros achados tanatológicos. Um registo dentário de dados *antemortem* deve ser tão completo quanto possível e pode incluir dados importantes à perícia forense, tais como: a morfologia da coroa e da raiz, o número de raízes dentárias, anomalias do esmalte, da dentina e do cimento, bem como registos de doenças relacionadas com condições dentárias e orais (3).

O fenómeno dos dentes cor-de-rosa torna-se de difícil compreensão, uma vez que pode aparecer ao longo da vida ou como um fenómeno *postmortem* (1). É por isso que um registo *antemortem* quando completo ou sequer existente, é tão valioso à perícia legal. O registo sobre a presença ou ausência de dentes, a sua posição individual e as suas características anatômicas, bem como os tratamentos ou patologias ao nível dos dentes, podem fornecer informações importantes à perícia forense, tanto na identificação de cadáveres como na investigação da causa da morte (5).

A coloração dos dentes é definida por fatores intrínsecos e extrínsecos. Mudanças na composição da estrutura do dente e mudanças na densidade dos tecidos duros do dente, são fatores intrínsecos na descoloração dos dentes. Tais fatores são provocados por alterações nas condições sistémicas devido a doenças, distúrbios, entre outras causas. Os fatores extrínsecos que provocam a descoloração dos dentes podem ser causados por materiais metálicos ou não metálicos. A coloração rosa dos dentes é caracterizada pela coloração rosa/rosada na área da raiz do dente que se desvanece em direção à junção cimento-esmalte e não atinge o esmalte (3). Para além disso, demonstrou-se que a frequência deste fenómeno é predominante em dentes anteriores de raiz única, surgindo em menor escala em dentes posteriores de duas ou mais raízes. (2,10)

A hiperplasia pulpar idiopática é uma condição que pode proporcionar uma imagem de dentes cor-de-rosa devido à reabsorção da dentina que é substituída por tecido de granulação com uma condição pulpar necrótica na área coronal, permanecendo vital na área apical. Os dentes cor-de-rosa em condições idiopáticas de hiperplasia pulpar são comumente referidos como dentes cor-de-rosa de Mummery (3). Caracteriza-se por uma descoloração dentária em tons rosa, normalmente localizada no terço cervical do dente. Esta alteração dental é indicativa de uma possível reabsorção radicular interna que conduz à necrose pulpar parcial ou completa, que pode dever-se a fenómenos fisiológicos (em dentes decíduos) ou patológicos (em dentes permanentes). A perda dos tecidos duros dentários cria espaço pulpar que permite que mais vasos sanguíneos preencham a área e, conseqüentemente, ocorra uma descoloração dentária rosada na estrutura da coroa (12,13).

Sabe-se que a condição de dentes cor-de-rosa também pode ocorrer em indivíduos vivos devido a tratamento endodôntico, trauma dentário ou doença sistémica. Imagens radiográficas de dentes cor-de-rosa em indivíduos vivos mostram um aspeto de alargamento do canal radicular (3).

Maiores dimensões do canal radicular e dos túbulos dentinários facilitam a presença de sangue suficiente na cavidade pulpar, permitindo que durante a hemólise, exista uma quantidade suficiente de hemoglobina para se dispersar na dentina. Desta forma, a capacidade dos dentes

apresentarem essa coloração *postmortem* depende da vitalidade e vascularização da polpa *antemortem* (1).

3.2. Mecanismo de Formação da Coloração Rosada

Há várias teorias para explicar o fenômeno dos dentes cor-de-rosa e todas sugerem que a cor rosa ocorre devido à presença de hemoglobina dentro da câmara pulpar devido ao acúmulo de sangue no segmento cefálico (9). Um aumento extremo da taxa de pressão sanguínea devido a condições involuntárias, pode levar ao rompimento de vasos sanguíneos na polpa dentária, ficando os eritrócitos dispersos. A falha do mecanismo de coagulação, provocada pela morte súbita, traz-se na manutenção das propriedades líquidas do sangue *postmortem* (3).

Os glóbulos vermelhos medem cerca de 7,5 µm de diâmetro e os túbulos dentinários têm apenas cerca de 3 µm de diâmetro, é a lise dos eritrócitos e dos produtos dos eritrócitos (como a hemoglobina, as porfirinas e as hemossiderinas), juntamente com a biliar e os pigmentos relacionados, que são responsáveis pelo aspecto rosado. Devido à presença de hemoglobina, o teor de ferro presente na polpa dentária dos dentes cor-de-rosa revela-se superior ao da polpa de um dente (2,3,7)

Os eritrócitos intravasados e extravasados por hemorragia congestiva libertam a hemoglobina e os seus produtos, sendo que a coloração rosa dos dentes ocorre devido à difusão destes produtos e seus derivados nos túbulos dentinários e, por isso, quanto maior diâmetro do túbulo dentinário existente, maior a probabilidade de ocorrência de dentes rosados *postmortem*. A protoporfirina é o composto degradado da hemoglobina responsável pela coloração rosa da dentina (1).

O processo hemolítico ocorre a uma temperatura inferior a 10 °C, o que pode explicar a rápida ocorrência deste fenômeno *postmortem* em condições frias, como na água do mar. Outros estudos demonstraram que também o monóxido de carbono pode causar hemólise intravascular, levando à libertação de hemoglobina no sangue. (3).

Sendo assim, aliados a outros fatores, têm de decorrer alguns dias, entre a eventual morte e a autópsia para se dar a passagem da hemoglobina e derivados para os túbulos dentinários e, assim, o fenômeno poder ser visualizado (1).

Há uma variação da intensidade da cor entre os diferentes dentes e também entre as regiões dos dentes, sendo que o aparecimento de dentes cor-de-rosa pode ser mais comum entre os dentes incisivos e os dentes caninos, seguidos dos pré-molares (3,7). A coloração ocorre mais a nível cervical, é mais viva na zona da junção cimento-esmalte no colo dos dentes e raramente se encontra na região apical da raiz.

Um aumento súbito da pressão intravascular a nível facial pode provocar a libertação de eritrócitos na polpa dentária, ocorrendo hemorragias pulpaes sem afetar o esmalte. As explicações para o aumento da pressão arterial dependem da congestão sanguínea *perimortem* na cabeça e, eventualmente, na câmara pulpar. A pigmentação e a intensidade do fenômeno variam de cor na dentina aquando da difusão *postmortem* dos produtos da hemoglobina nos túbulos dentinários, principalmente na zona radicular perto do colo do dente, quando a quantidade de hemoglobina aumenta.

A ocorrência do fenômeno *postmortem* e a estabilidade da cor rosa dependem das condições anatómicas especiais da dentina, como a existência e número de estruturas porosas na forma de túbulos dentinários na dentina dura e densa. O esmalte, por ser mais compacto que a dentina, não está tão sujeito à coloração (1).

Fatores como a idade do indivíduo, a posição do corpo no momento da morte, o tempo e o estado de decomposição do cadáver e o ambiente onde se encontra o cadáver parecem influenciar também o fenômeno.

Em indivíduos jovens o fenômeno dos dentes cor-de-rosa é, normalmente, mais pronunciado. Devido a alterações do canal radicular em indivíduos de idade mais avançada, a penetração nos túbulos dentinários pelo pigmento responsável pela coloração rosada é dificultada (4). Tais alterações devem-se à degradação gradual da dentina secundária, que provoca a contração do canal radicular e o estreitamento da câmara pulpar ao longo do tempo, tornando os túbulos dentinários mais permeáveis a alterações de pigmentação (1,10). Desta forma, pode assumir-se que a capacidade dos dentes apresentarem essa coloração depende da vitalidade e vascularização da polpa *antemortem* (1). Também devido a vários fatores, nomeadamente a espessura da dentina, a espessura mais fina do esmalte e a fatores extrínsecos (alimentos, medicamentos, mastigação, etc.), os dentes tendem a escurecer o que dificulta a visualização da cor rosa *postmortem* (3).

A posição do cadáver no local da morte é descrita na literatura como um fator importante e que deve ser investigada com precisão, pois pode explicar alguns achados cadavéricos, como hemorragia auricular ou outros marcadores de aumento da pressão venosa cefálica, como dentes cor-de-rosa, petéquias faciais e conjuntivais ou manchas de Tardieu (14). A condição dos dentes cor-de-rosa pode ser atribuída à gravidade, onde os dentes cor-de-rosa ocorrem normalmente porque a mandíbula se torna o centro de acumulação de sangue, uma vez que o processo gravitacional é o mesmo que o *livor mortis* (3).

Quanto mais avançada a decomposição, maior a possibilidade de infiltração de hemoglobina na dentina, assim como vários estudos descrevem que em ambientes húmidos o processo de aparecimento de dentes cor-de-rosa é acelerado (7,15).

O fenómeno *postmortem* consoante o sexo do indivíduo, a literatura descreve que existe um maior número de homens que apresentam registos de autópsia do fenómeno *postmortem* dos dentes cor-de-rosa. No entanto, esta variação não será dependente do sexo, mas sim do contexto em que a morte ocorre e se é requerida ou não autópsia médico-legal, sendo que há também um maior número de homens envolvidos em mortes violentas (tipo de morte que requiere autópsia médico-legal) (1).

3.3. Fatores Contribuintes e Condições Associadas

Fatores como condições ambientais, condições específicas do momento da morte e o tipo de morte parecem influenciar este fenómeno *postmortem* dos dentes rosados, podendo, em algumas circunstâncias, desenvolvê-lo ou acelerar o seu processo de formação, em detrimento de outros fenómenos. (1,4)

Com a morte, sucedem-se fenómenos cadavéricos mediatos, como a putrefação e a autólise. A putrefação consiste em alterações cadavéricas originados por microrganismos, já a autólise é um conjunto de processos fermentativos que ocorrem quando não há oxigénio dentro das células e sem ação bacteriana. O tecido pulpar pode sofrer autólise ou congestão sanguínea, fatores que desempenham também um papel fundamental no desenvolvimento do fenómeno dos dentes cor-de-rosa. O estado do corpo após a morte tem vindo a demonstrar um papel essencial para a correlação com a mecânica do fenómeno dos dentes cor-de-rosa. Sendo que, os casos de cadáveres que apresentam este fenómeno, encontram-se normalmente em elevado estado de putrefação, decomposição ou adipocera (1). Num estudo realizado *Sumi et al*, em 2023, obtiveram-se resultados sugestivos de que o estado avançado de decomposição (putrefação) afeta significativamente o fenómeno *postmortem*.(10,16)

Kirkham et al., em 1977, observaram dentes cor-de-rosa em autópsias e mencionaram que muitos casos estavam associados à decomposição num ambiente húmido. Gowda et al. destacaram que um ambiente húmido pode desempenhar um papel como fator desencadeante do fenómeno. No entanto, nem sempre está associado a essas condições e a causa exata da coloração permanece inexplicada (7).

Mais recentemente, Hartomo et al., em 2019, vem mesmo afirmar que as condições ambientais húmidas contribuem como um fator que acelera a ocorrência de dentes cor-de-rosa. Também destacam a ação de soluções ácidas por imersão dentária capaz de provocar a descoloração dos dentes (3). Da mesma forma, condições como congelação, calor, imersão em água fria e exposição a toxinas podem acelerar a hemólise e assim facilitar a coloração, podendo variar a tonalidade da coloração. Por exemplo, dependendo de diferentes condições de temperatura ambiental, luz solar e clima seco, a coloração pode variar de vermelho rosado a castanho (1).

Apesar do fenómeno se encontrar descrito na literatura, frequentemente em casos de asfixia (por afogamento e enforcamento), tem-se vindo também a verificar em casos de homicídio, por armas de fogo, estrangulamentos, trauma crânio-encefálico, em casos em que o corpo permanece escondido ou submerso em ambientes húmidos, mortes súbitas e não naturais, intoxicações por drogas e envenenamento por monóxido de carbono. O facto de o fenómeno não aparecer em todas as situações de morte relatadas por estrangulamento ou enforcamento, por exemplo, impõe a existência de outros pressupostos, para além da congestão sanguínea na cabeça. Poderão ser, a permanência do corpo em água por um longo período de tempo, o seu estado de putrefação ou a adipocera, os fatores predisponentes a que o fenómeno ocorra. As condições de humidade contribuem significativamente para acelerar a decomposição do corpo. Percebe-se então que o fenómeno *postmortem* dos dentes cor-de-rosa não é um achado cadavérico específico para uma causa de morte. Assim, o estado de decomposição do corpo é o único aspeto comum a quase

todos os casos relatados com a presença do fenómeno *postmortem*, com diferentes tipos de morte (1,7).

3.4 Achados Forenses e Relevância na Investigação *Postmortem*

O fenómeno dos dentes cor-de-rosa mantém-se como achado *postmortem* importante na perícia forense, e a sua observação frequente em vítimas de mortes violentas, o que justifica a sua investigação contínua (1). É considerado um fenómeno inespecífico, sendo a sua aplicação na identificação da causa da morte limitada. Não existe, atualmente, um consenso entre a sua correlação definitiva (10). Porém, fornece informações valiosas sobre os processos de decomposição do corpo humano, o intervalo *postmortem* e na análise das causas da morte (1, 2). Alguns estudos defendem que o seu desenvolvimento está mais relacionado com fatores ambientais e com o estado de decomposição do cadáver. (10,17)

Bhuyan et al., em 2020, e Carrasco et al., em 2017, constataram que as alterações morfológicas e histológicas *postmortem* da polpa dentária podem auxiliar a estimar o intervalo *postmortem*. Na avaliação morfológica da polpa por Bhuyan et al. (2020), verificaram a mudança gradual da tonalidade da cor do tecido pulpar, este mudou gradualmente em 24, 48 e 72 horas e a consistência variou de mole, firme a gelatinosa até 72 horas e ao fim de 2 anos tornou-se desidratada, seca e friável. Observaram também uma rápida degeneração até 72 horas *postmortem*. De acordo com o estudo, o intervalo *postmortem* pode ser estimado até 2 anos histomorfologicamente, o que revela implicação significativa na investigação forense. Através dos resultados de estudos mais recentes, verifica-se que o intervalo *postmortem* varia bastante de caso para caso, não devendo ser considerado como uma prova pericial específica, uma vez que todos os processos relacionados com a pigmentação ocorrem num período que varia de dias a semanas depois da morte (1). Por este motivo, o estudo da correlação do intervalo *postmortem* com as diferentes causas de morte e alterações cadavéricas encontradas, tem necessidade de ser desmistificado.

Numa tentativa de se compreender melhor o fenómeno *postmortem* dos dentes cor-de-rosa no âmbito das investigações médico-legais, em 2022, Minegishi et al desenvolveram um método de classificação para o grau de pigmentação dos dentes, denominado “Score of Pink Teeth Colour”, e um método de classificação que diferencia as regiões do dente abrangidas pela pigmentação, de seu nome “Score of Pink Teeth Region”. Estas classificações carecem de validação. No entanto, a utilização de critérios padronizados, poderão ser um ponto de partida para uma melhor interpretação dos achados e uma base para o futuro aprimoramento de técnicas, para além de permitem reduzir a subjetividade associada ao observador. (10,17).

3.5. Casos Documentados e Estudos Forenses

3.5.1. CASO 1

Bugelli et al., em 2020, descreveram um caso de um agricultor de 81 anos, após algumas horas de busca, foi encontrado morto num celeiro, preso de cabeça para baixo num túnel estreito criado por alguns fardos de feno e, no fundo desse túnel, um pequeno cordeiro ainda estava vivo.

No exame externo, foi detetado um sangramento bilateral das orelhas e uma vasta coloração púrpura na testa. Observou-se também intenso edema conjuntival e petéquias conjuntivais.

Os achados da autópsia revelaram apenas uma intensa congestão polivisceral e petéquias subpleurais, sem sinais de lesões traumáticas. Após dissecação anatómica da área arroxeadada da testa, não foi verificada infiltração hemorrágica dos tecidos moles, resultando numa coloração hipostática. As amostras histológicas confirmaram a congestão polivisceral em associação com múltiplas áreas de enfisema pulmonar agudo.

A causa da morte foi determinada como asfixia posicional e o modo de morte foi considerado acidental. A posição invertida resultou na compressão do diafragma, causando insuficiência respiratória. Nestes casos, o retorno venoso regular ao coração não pode ocorrer, causando hipóxia cerebral letal e congestão grave. A importância da investigação cuidadosa da posição do cadáver no local da morte pode explicar a hemorragia auricular ou outros marcadores de aumento da pressão venosa cefálica, como dentes cor-de-rosa, petéquias faciais e conjuntivais ou manchas de Tardieu (14).

3.5.2. CASO 2

Em 2013, Montenegro et al. observou o fenômeno dos dentes cor-de-rosa num cadáver exumado quatro meses após a morte. A vítima, uma mulher de 32 anos, foi assassinada por estrangulamento, e durante a exumação foi constatado que o corpo estava parcialmente preservado pela saponificação com fraturas na mandíbula e no osso zigomático, além de outros traumas (**Figura 1**). Alguns dentes da arcada inferior apresentaram uma coloração rosada onde apresentava também aparelho ortodôntico (**Figura 2**). O cadáver da vítima foi exumado para investigação e foram observadas várias fraturas e contusões, com a causa da morte determinada como asfixia por estrangulamento. A vítima apresentava o fenômeno dos dentes cor-de-rosa em alguns dentes da arcada inferior que ocorreu pelo extravasamento de sangue na câmara pulpar dos dentes, geralmente associado a traumas que causam aumento da pressão sanguínea no segmento cefálico. A vítima usava aparelho ortodôntico na arcada inferior, sugerindo uma influência deste na forma como o sangue é distribuído e armazenado na câmara pulpar. Ou seja, a manutenção da integridade dos dentes e a vascularização da polpa dental, afetada pelo aparelho, podem desempenhar um papel no fenômeno observado. Mas a relação específica entre o uso do aparelho e a coloração rosada não é completamente compreendida.

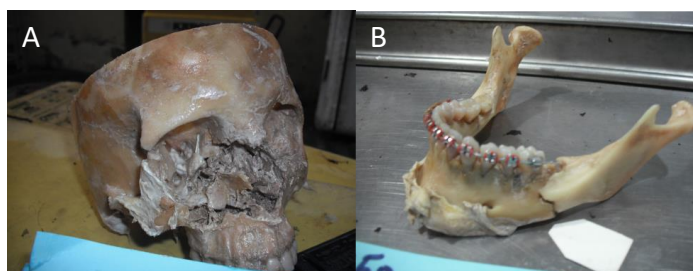


Figura 1. (A) Fratura de forma irregular comprometendo os ossos nasais, malar direito, cavidade orbitária direita, arco zigomático direito; (B) Fratura completa, de forma irregular no lado esquerdo do corpo da mandíbula. Adaptado de Montenegro JB et al. 2013;1–7.



Figura 2. Presença de aparelho ortodôntico e fenômeno dos dentes cor-de-rosa em alguns dentes da arcada inferior. Adaptado de Montenegro JB et al. 2013;1–7.

A ocorrência de dentes cor-de-rosa não é um sinal patognomônico de asfixia, mas a sua presença em casos de morte violenta levanta questões importantes para a medicina legal.

O aparecimento deste tipo de coloração, após tratamento endodôntico, pode estar relacionado com o material usado ou com a existência de hemorragia durante o tratamento. Esta coloração também pode estar relacionada a mortes naturais e violentas, sendo encontrado nos casos de cardiopatias onde há dificuldade no retorno venoso ao coração, aumento da pressão sanguínea, ruptura dos vasos e extravasamento de sangue na câmara pulpar.

Em suma, os dentes cor-de-rosa podem estar associados a situações de asfixia e traumas, e a relação com o uso de aparelho ortodôntico é uma área que merece mais investigação para melhor compreensão (9).

3.5.3 CASO 3

León e Chaves, em 2016, descreveram um caso investigado em Quepos, na Costa Rica, de um corpo de um jovem de 17 anos encontrado sem vida com um historial de ter desaparecido há três dias. De acordo com a história médico-legal, o indivíduo tinha sido arrastado pela corrente enquanto nadava no mar e o seu corpo foi encontrado três dias depois.

Os achados da autópsia revelaram um aspeto hemorrágico na zona dos ouvidos e dos seios paranasais etmoidais, uma dilatação das cavidades cardíacas direitas e um aumento do peso dos pulmões, o que sugere uma asfixia por submersão, que é compatível com as informações policiais.

Devido às alterações resultantes do estado avançado de putrefação e alterações decorrentes da antropofagia (partes do corpo comidas), a fisionomia do cadáver não permitia a identificação exata do mesmo, pelo que foi solicitada uma avaliação por odontologia forense, tendo sido observada uma coloração rosa em todas as peças dentárias (**Figura 3**).

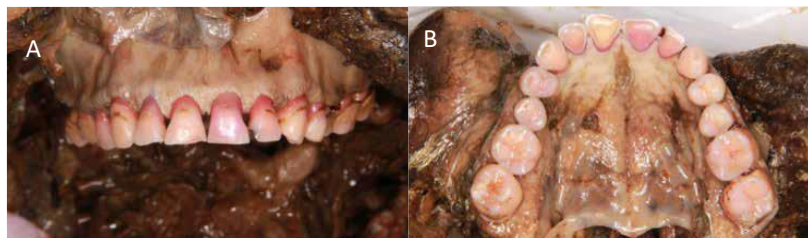


Figura 3. A e B) Apresentação do fenómeno *postmortem* dos dentes cor-de-rosa na dentição de um jovem de 17 anos morto por afogamento. Adaptado de León KV *et al.* 2016;33(2):133–7.

A pigmentação rosada presente nos dentes do cadáver foi associada a uma mudança de coloração da dentina por acumulação de hemoglobina e seus derivados, devido por um aumento da pressão intravascular a nível facial, originando hemorragias a nível da polpa dentária sem afetar o esmalte. Por este motivo, no diagnóstico diferencial excluíram-se outros tipos de fenómenos cromáticos *antemortem*, como manchas rosadas de Mummery, que afetam parte da coroa do dente. Também os aspetos hemorrágicos relatados na autópsia, sugeriram estase sanguínea na zona facial.

O cadáver nestas condições de submersão, tende a adotar uma posição de decúbito ventral, com um efeito posicional da cabeça abaixo do tronco, que permite a infiltração do sangue passivamente na cabeça, bem como a privação de oxigénio que aumenta a atividade fibrinolítica e as catecolaminas no sangue (que causam um aumento significativo da pressão arterial por stress), favorecendo o aparecimento da coloração rosada dos dentes. Nestas faixas etárias, as cavidades pulpares dos dentes são maiores e mais vascularizadas, o que promove o aparecimento da cor rosada por maior e mais rápida acumulação de protoporfirina, o derivado de hemoglobina responsável pela pigmentação.

Não foi possível determinar a causa de morte com o fenómeno *postmortem* dos dentes cor-de-rosa na dentição de um cadáver encontrado na água isoladamente, pois outros fatores podem ter tido influência na causa da morte (18).

No entanto, há evidência que a presença deste fenómeno é mais frequente em casos de prolongada permanência do cadáver em ambiente húmido. Sendo assim, o fenómeno pode ser indicativo de que hão decorrido alguns dias desde a morte, pois os processos de hemólise e degeneração da hemoglobina, seguido da infiltração dos seus produtos na dentina, necessitam de algum tempo para ocorrer e o fenómeno se tornar visível.

4. Discussão

Os dentes fornecem informações valiosas no domínio das ciências forenses (3). A resistência dos dentes às condições ambientais extremas, e sua capacidade de preservar informações biológicas reforçam o papel da Odontologia Forense na rotina pericial. O registo detalhado dos registos dentários *antemortem* e a comparação com os achados *postmortem* são cruciais para a individualização de vítimas, especialmente em cenários de desastres em massa (5).

O fenómeno dos dentes cor-de-rosa é uma alteração *postmortem* em cadáveres, geralmente, em decomposição avançada, caracterizado por uma coloração rosada dos dentes, principalmente visível na dentina, que pode ser observada através do esmalte. Este fenómeno é geralmente o resultado da infiltração de hemoglobina proveniente da rutura dos vasos sanguíneos para o interior dos túbulos dentários após a morte. Ocorre em situações de estase sanguínea, asfixia ou em cadáveres submersos, mas também pode ser observada em casos de mortes associadas a traumatismos cranianos, não sendo um achado específico nem comum. Embora não seja um achado de autópsia comum, a presença de dentes-cor-de-rosa pode fornecer informações sobre as condições que ocorreram após a morte (1, 2).

5. Conclusão

Em suma, o fenómeno dos dentes cor-de-rosa é um fenómeno inespecífico, a sua aplicação na identificação da causa da morte é limitada, mas fornece informações valiosas sobre os processos de decomposição do corpo humano, o intervalo *postmortem* e na análise das causas da morte. A causa exata da coloração rosa surgir na denteição de algumas vítimas em detrimento de outras com as circunstâncias semelhantes no momento da morte, ainda não é completamente compreendida, são necessários mais avanços na investigação e interpretação dos dentes cor-de-rosa.

Author Contributions: Conceptualization, C.F.; methodology, C.F.; formal analysis, C.C.; investigation, C.F.; writing—original draft preparation, C.F.; writing—review and editing, C.C.; supervision, C.C.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work reported.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: N/A

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

6. Referências:

1. Ferreira RPPV. Fenómeno do dente cor-de-rosa postmortem: uma revisão sistemática [Internet]. Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto; 2021. Available from: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/137302/2/512150.pdf>
2. Franco A, de Oliveira MN, Gomes-Lima LK, Pereira-de-Oliveira VHF, Franco RPAV, Blumenberg C, et al. Case-specific characteristics of pink teeth in dental autopsies – A systematic review. J Forensic Leg Med [Internet]. 2019;68(June):101869. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2019.101869>
3. Hartomo BT, Adianto AWD, Auerkari EI. Pink teeth as post mortem indicator: A literature review. AIP Conf Proc [Internet]. 2019;2092:1–5. Available from: <https://pubs.aip.org/aip/acp/article-abstract/2092/1/040021/846288/Pink-teeth-as-post-mortem-indicator-A-literature?redirectedFrom=fulltext>
4. Granger MO. A identificação e a importância do Cirurgião-Dentista na detecção de mortes violentas : Relato de caso. Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2022.
5. Menon LML, Fernandes MM, Paranhos LR, Silva RHA. Tanatologia Forense e Odontologia

- Legal: Interface e Importância na Rotina Pericial. *Odonto*. 2011;19(37):15–23.
6. Borrman H, Du Chesne A, Brinkmann B. Medico-legal aspects of postmortem pink teeth. *Int J Legal Med*. 1994;106(5):225–31.
 7. Gowda BC, Sivapathasundharam B, Chatterji A, Chatterji B. Histological appearance of post-mortem pink teeth: Report of two cases. *J Forensic Dent Sci*. 2015;7(2):168.
 8. van Wyk CW. Postmortem pink teeth: in vitro production. *J Oral Pathol Med*. 1988;17(9–10):568–72.
 9. Montenegro JB, Queiroz EGAL de, Moreno BLG, Souza EHA de, Carvalho MVD De, Soriano EP. Dentes rosados observados quatro meses após a morte. 2013;1–7.
 10. Braga S, Caldas IM, Dinis-Oliveira RJ. Forensic significance of postmortem pink teeth: A narrative review. *Arch Oral Biol*. 2025;169(September 2024).
 11. Sakuma A, Saitoh H, Ishii N, Iwase H. The Effects of Racemization Rate for Age Estimation of Pink Teeth. *J Forensic Sci*. 2015;60(2):450–2.
 12. Schmidt JDN, Rodrigues NSG. Dente Róseo de Mummery: Relato de Caso Clínico. Faculdade Morgana Potrich; 2022.
 13. Nagaveni N. Pink Tooth of Mummery or Odontoclastoma in Pediatric Patients : A Case Series. *Dent Sci Innov Res*. 2023;1–2.
 14. Bugelli V, Campobasso C Pietro, Angelino A, Gualco B, Pinchi V, Focardi M. Postmortem otorrhagia in positional asphyxia. *Am J Forensic Med Pathol*. 2020;41(3):217–9.
 15. Kirkham W, Andrews E, Snow C, Grape P, Snyder L. Postmortem Pink Teeth. *J Forensic Sci* [Internet]. 1977 Jan 1;22(1):119–31. Available from: <https://asmedigitalcollection.asme.org/forensicsciences/article/22/1/119/1180699/Postmortem-Pink-Teeth>
 16. Sumi N, Minegishi S, Ohta J, Utsuno H, Sakurada K. Study on the Mechanism of the Pink Tooth Phenomenon Using Bovine Teeth: A Pilot Study. *Diagnostics* [Internet]. 2023 Aug 17;13(16). Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4418/13/16/2699>
 17. Minegishi S, Saitoh H, Utsuno H, Ohta J, Namiki S, Toya M, et al. Association of Cadaveric Factors with the Degree and Region of Discoloration on Pink Teeth: An Approach to Serial Cases. *Appl Sci*. 2022;12(9).
 18. León KV, Chaves JMF. Fenómeno de diente rosado en asfixia por sumersión. *Med Leg Costa Rica* [Internet]. 2016;33(2):133–7. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152016000200133&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Artigo Original

Identificação de genes de resistência aos carbapenemos, em amostras de urocultura na ULS Algarve – Hospital de Faro

Inês Gago-Rodrigues^{1,2}, Cristiana Gomes¹, Maria Cachadinha¹, Rita Domingos¹, Maria Pereira³, Helena Estorninho³, João Furtado^{1,2}, Rui Plácido Raposo^{1,2 *}

¹ Universidade do Algarve – Escola Superior de Saúde da Universidade do Algarve; Campus Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal;

² Centro de Estudos em Saúde da Universidade do Algarve (CESUALg), Faro, Portugal;

³ Unidade Local de Saúde do Algarve (ULSA) – Serviço de Patologia Clínica;

* Autor correspondente: raposo@ualg.pt

Abstract:

A resistência bacteriana constitui, atualmente, uma grave ameaça à saúde pública, comprometendo a eficácia terapêutica dos antibióticos, com consequências ao nível do aumento da propagação bacteriana e da disseminação de infeções. A classe de antibióticos mais amplamente utilizada na prática clínica são os antibióticos beta-lactâmicos, onde se incluem os antibióticos carbapenemos. O mecanismo de resistência bacteriano mais comum contra os antibióticos carbapenemos é o enzimático, através da produção de enzimas carbapenemases, sendo os principais genes responsáveis os genes KPC, NDM, VIM e OXA-48.

Este estudo teve como objetivo a identificação da prevalência dos genes responsáveis pela resistência aos antibióticos ertapenem e meropenem. Foram recolhidos dados referentes ao padrão de resistência bacteriana aos antibióticos ertapenem e meropenem em amostras de urocultura, provenientes de pacientes internados, com idades entre 18 e 65 anos, entre 2020 e 2023, das quais foram analisadas 7436 amostras.

Os microorganismos gram-negativos mais frequentemente detetados foram a *E. coli* (900 casos; 50,62%) e a *K. pneumoniae* (390 casos; 21,93 %). Relativamente à resistência bacteriana verificou-se que 6% das amostras positivas apresentaram resistência ao antibiótico ertapenem (89 casos) e 2% apresentaram resistência ao antibiótico meropenem (37 casos). O gene de resistência mais prevalente foi o gene KPC com 53% (16 casos). Comparativamente, avaliada a resistência bacteriana ao ertapenem e ao meropenem, verificou-se uma maior resistência ao antibiótico ertapenem. Em termos de prevalência, o gene de resistência mais frequentemente detetado foi o KPC, sendo que as bactérias *E. coli* e *K. pneumoniae* foram as mais comumente identificadas, com *K. pneumoniae* a registar um maior número de casos de resistência aos antibióticos. O conhecimento e caracterização da resistência bacteriana é essencial para a prevenção e controlo das infeções bacterianas, principalmente em ambiente hospitalar, onde a aquisição de resistência por parte das bactérias representa uma ameaça importante à saúde das populações.

Palavras-chave: Resistência a antibióticos, Carbapenemos, Ertapenem, Meropenem, Carbapenemases.

1. Introdução

Os antibióticos desempenham um papel crucial no combate às infeções bacterianas, representando um marco na história da medicina devido à sua notável eficácia clínica. Contudo, o uso crescente e inadequado desses medicamentos tem impulsionado o surgimento de resistências bacterianas, um dos desafios mais graves da saúde pública atual (1). A resistência bacteriana compromete a eficácia do tratamento de doenças infecciosas de origem bacteriana, representando uma ameaça significativa à sustentabilidade dos sistemas de saúde. A resistência aos antibióticos refere-se à capacidade das bactérias de sobreviverem e proliferarem mesmo na presença destes medicamentos (2, 3).

Este fenómeno está intimamente ligado ao uso inadequado dos antibióticos, incluindo prescrição excessiva, dosagem incorreta, ou interrupção precoce do tratamento. Como consequência, há uma redução na eficácia dos tratamentos, prolongamento das doenças, aumento das

Citation: Gago-Rodrigues, I.; Gomes, C.; Cachadinha, M.; Domingos, R.; Pereira, M.; Estorninho, H.; Furtado, João.; Plácido Raposo, R. Identificação de genes de resistência aos carbapenemos, em amostras de urocultura na ULS Algarve – Hospital de Faro. Trends in Biomedical Laboratory Sciences. 2025 Mar 9; 3(1): 55- 62.

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: February 20205

Accepted: February 20205

Published: March 2025

Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences

hospitalizações e maior taxa de mortalidade (4, 5). A descoberta de novos antibióticos te, revelado capacidade para colmatar as resistências aos antibióticos já existentes, ou acompanhar o surgimento de novas resistências bacterianas, o que torna imprescindível a implementação de estratégias eficazes para prevenir uma crise global na saúde pública (6).

Os antibióticos beta-lactâmicos são uma classe de medicamentos amplamente usados (majoritariamente contra bactérias Gram-negativas), sobretudo devido à sua eficácia terapêutica e baixa toxicidade. Estes medicamentos atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana e incluem subgrupos como penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactâmicos. Contudo, a eficácia dos beta-lactâmicos tem sido comprometida pela aquisição de mecanismos de resistência pelas bactérias (7,8).

A resistência aos antibióticos é desenvolvida, por parte das bactérias, através de diferentes mecanismos: produção de enzimas que inativam os antibióticos (como as beta-lactamases), alteração da permeabilidade da membrana celular, modificação do sítio-alvo do antibiótico e através de bombas de efluxo, que expulsam o medicamento da célula. O mecanismo de resistência mais frequente é o enzimático, que consiste no desenvolvimento de enzimas que inativam ou modificam a estrutura química do antibiótico, tornando-o ineficaz. Estas enzimas têm a capacidade de hidrolisar o anel beta-lactâmico, essencial na ação do medicamento, e denominam-se de beta-lactamases (9, 10).

Os carbapenemos são antibióticos que pertencem à subclasse dos beta-lactâmicos. Sendo antibióticos de amplo espectro, são também considerados de primeira linha de tratamento para infeções provocadas por bactérias multirresistentes, apresentando como uma das vantagens a sua alta eficácia contra diversas bactérias produtoras da enzima beta-lactamase. O seu uso indiscriminado tem vindo a aumentar a resistência bacteriana, especialmente através do desenvolvimento de enzimas que inativam esses antibióticos, denominadas carbapenemases. (9,11).

As beta-lactamases são frequentemente agrupadas através da classificação de Ambler, estando divididas em quatro classes (A, B, C e D). As beta-lactamases da classe A são: as beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e a enzima codificada pelo gene *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (enzima KPC). À classe B pertencem os genes New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM) e Verona Impenemase (VIM). Por fim, na classe D está inserido o gene Oxacilinase (OXA) sendo que neste estudo o de interesse é a OXA-48 (12, 13).

As bactérias Gram-negativas constituem-se como os microrganismos de principal interesse, sobretudo considerando o contexto hospitalar, tendo em conta a sua elevada resistência a antibióticos, com a utilização predominante de mecanismos enzimáticos para resistir aos tratamentos, sendo igualmente as mais frequentemente associadas a infeções urinárias (4,14).

Este estudo tem como objetivo principal identificar os genes responsáveis pela resistência a antibióticos carbapenemos (ertapenem e meropenem), em amostras para urocultura, de pacientes internados, com idades compreendidas entre 18 e 65 anos. A investigação foca-se na análise dos microrganismos mais frequentemente detetados e na avaliação dos casos positivos e negativos para resistência aos carbapenemos, na ULS Algarve – Faro. Compreender os mecanismos genéticos da resistência bacteriana é essencial para desenvolver estratégias mais eficazes no combate a este problema crescente, garantindo a sustentabilidade dos tratamentos antimicrobianos no futuro.

2. Materiais e Métodos

Foi desenvolvido um estudo observacional retrospectivo. Os dados foram recolhidos por conveniência, no Serviço de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde do Algarve - Unidade de Faro (ULSAlgarve-Faro). Foram incluídos no estudo dados referentes a todas as amostras de urocultura processadas, de pacientes internados nos serviços da ULSAlgarve-Faro, no período entre 2020 e 2023. Os critérios de inclusão foram: todos os pacientes internados, com idades compreendidas entre 18 e 65 anos, com pedido de colheita de urina assética, para análise de urocultura. Os critérios de exclusão foram: pacientes da consulta externa, amostras conspurcadas, menores de 18 anos e maiores de 65 anos.

Foram recolhidos dados referentes a 7974 amostras de urocultura, dos quais foram excluídos 538, correspondentes a amostras de urina conspurcada. Foram, então, considerados para o estudo um total de 7436 dados para análise.

As variáveis estudadas foram: a data de colheita (1); número de casos positivos e negativos para infeção do trato urinário (ITU) (2); o sexo e a idade (3); os tipos de microrganismos

identificados (4); os microrganismos Gram-negativos (5); sensibilidade e resistência ao ertapenem (SE e RE, respetivamente) e ao meropenem (SM e RM, respetivamente) (6); os mecanismos de resistência identificados (7); os genes de resistência identificados (8); os casos de sensibilidade e resistência por microrganismo ao E e ao M (9).

As variáveis 1 e 2 foram analisadas com a totalidade dos dados recolhidos (n=7436). Em seguida, o foco foi nos casos positivos para ITU (n=2118), dos quais se analisou a distribuição das variáveis 3 e 4, com o intuito de perceber em que sexo e faixa etária existem maior número de casos de ITU. Por fim, o principal foco foi nos casos positivos para bactérias Gram-negativas (5), dos quais se analisou a distribuição das variáveis 6, 7, 8 e 9.

Recorreu-se ao IBM SPSS® v29 e Microsoft Excel® para o tratamento dos dados obtidos, sendo posteriormente analisados através de estatística descritiva.

3. Resultados

Os resultados obtidos provêm da análise dos dados recolhidos do serviço de Patologia Clínica da ULSalgarve-Faro, referentes a amostras de urocultura, provenientes de pacientes internados, no período entre 2020 e 2023. Foram recolhidos um total de 7974 amostras, das quais foram analisadas 7436 (n=7436).

3.1. Caracterização da amostra de uroculturas

Em relação ao ano da colheita, verificou-se que a distribuição do número de amostras por ano é semelhante, sendo o ano de 2021, o que apresentou um maior número de amostras, com 26,9% (n=1997), seguindo-se os anos de 2023 e 2020, com 24,7% (n=1840) e 24,5% (n=1824), respetivamente. O ano de 2022 foi o que apresentou um menor número de amostras, com cerca de 23,9% (n=1775).

Tendo em a prevalência de ITU na amostra analisada, observamos que 28,5% das amostras (n=2118) eram positivas, sendo que a maioria das amostras em estudo, 71,5% não apresentou ITU (n=5318). Das amostras positivas para ITU, verificou-se que a maioria pertencia a utentes internados do sexo feminino (58%), sendo o intervalo de idades entre os [58-65[o mais frequentemente associada às ITU (Figura 1a).

Ainda dentro das amostras positivas para ITU, o tipo de microrganismo mais frequentemente identificado foram Gram-negativos, representando um 84% das amostras (Figura 1b).

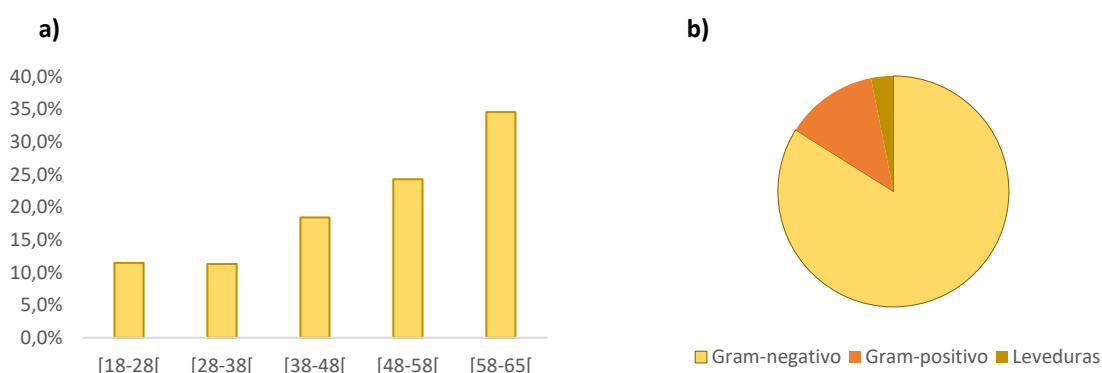


Figura 1. a) Distribuição das amostras positivas para ITU pelas faixas etárias: [18-28[- 11,5%; [28-38[- 11,3%; [38-48[- 18,4%; [48-58[- 24,3 %; [58-65[- 34,6%. **b)** Distribuição dos tipos de microrganismos nas amostras positivas para ITU: Gram-negativo 84% (n=1778); Gram-positivo 13% (n=274); leveduras 3% (n=66).

3.2. Microrganismos Gram-negativos

Tal como mencionado anteriormente os microrganismos Gram-negativos são aqueles que mais frequentemente causam ITUs e representam uma parte importante da amostra analisada (84%). Nos casos positivos para as bactérias Gram-negativas (n=1778), o microrganismo mais

prevalente identificados foram a *Escherichia coli* representando um 50,62% (n=900), seguindo-se da *Klebsiella pneumoniae* a qual representou 21,93% (n=390) (Tabela 1).

Tabela 1: Identificação dos microrganismos nas amostras positivas para ITU

GRAM-NEGATIVOS	PERCENTAGEM	FREQUÊNCIA
<i>A. baumannii</i>	0,11%	2
<i>Citrobacter spp</i>	1,57%	28
<i>E. cloacae</i>	4,56%	41
<i>E. coli</i>	50,62%	900
<i>E. aerogenes/K. aerogenes</i>	1,57%	28
<i>K. oxytoca/K. ozaenae</i>	1,74%	31
<i>K. pneumoniae</i>	21,93%	390
<i>M. morganii</i>	0,62%	11
<i>P. mirabilis</i>	7,59%	135
<i>P. pennerii</i>	0,11%	2
<i>P. vulgaris</i>	0,17%	3
<i>P. rettgeri</i>	0,17%	3
<i>P. stuartii</i>	0,06%	1
<i>P. aeruginosa</i>	10,29%	183
<i>S. ficaria</i>	0,06%	1
<i>S. marcescens</i>	1,07%	19
TOTAL	100%	1778

Em relação à presença de sensibilidade ou resistência ao ertapenem, dentro dos casos positivos para ITU por bactérias Gram-negativas, constatou-se que 94% das amostras (n=1488) apresentou SE e apenas 6% (n=89) demonstrou resistência.

No que diz respeito à sensibilidade ou resistência ao meropenem, dentro dos casos positivos para ITU por bactérias Gram-negativas, observou-se que 97% das amostras (n=1702) apresentou sensibilidade, 2% (n=37) apresentou resistência e 1% (n=24) apresentou um nível intermédio de resistência ao meropenem.

Das amostras positivas para ITU (por Gram-negativos) em que se verificou resistência aos antibióticos em estudo, o mecanismo mais de resistência bacteriana mais frequentemente identificados foi o ESBL (beta-lactamases de espectro estendido) com 42%, seguindo-se de mecanismos identificados por carbapenemases, com 34% (Figura 2). Tendo em conta o mecanismo por carbapenemases, o gene de resistência mais frequentemente identificado foi o KPC, representado 53% (Figura 3)

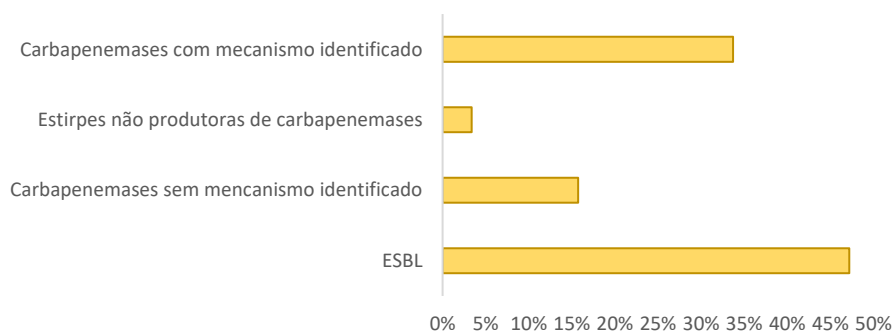


Figura 2. Distribuição dos mecanismos de resistência bacteriana identificados nas amostras positivas para ITU por Gram-negativos: Carbapenemases com mecanismo identificado 34% (n=30); Estirpes não produtoras de carbapenemases 3% (n=3); Carbapenemases sem mecanismo identificado 16% (n=14); ESBL 47% (n=42).



Figura 3. Distribuição dos genes identificados relativos ao mecanismo de resistência por carbapenases, nas amostras positivas para ITU por Gram-negativos: KPC: 53% (n=16); NDM: 17% (n=5); OXA-48: 27% (n=8); VIM: 3% (n=1).

3.2. Sensibilidade e Resistência aos antibióticos Ertapenem e Meropenem

Relativamente à análise da presença de sensibilidade e resistência bacteriana aos antibióticos ertapenem e meropenem, por parte dos microrganismos identificados em amostras positivas para ITU, por bactérias Gram-negativas, os microrganismos que apresentam mais casos de sensibilidade a ambos os antibióticos foram a *Escherichia coli* e a *Klebsiella pneumoniae*. O microrganismo que apresentou mais casos de resistência, a ambos os antibióticos, foi a *Klebsiella pneumoniae* (Tabela 2 e 3).

Tabela 2: Identificação dos microrganismos sensíveis e resistentes ao antibiótico ertapenem

MICROORGANISMO	SENSÍVEL % (n)	RESISTENTE % (n)
<i>Citrobacter spp</i>	1,8% (27)	1,12% (1)
<i>E. aerogenes</i>	1,7% (26)	1,12% (1)
<i>E. cloacae</i>	2% (31)	9% (8)
<i>E. coli</i>	60,2% (896)	0% (0)
<i>K. oxytoca/K. ozaenae</i>	1,9% (29)	1,12% (1)
<i>K. pneumoniae</i>	20,6% (307)	86,5% (77)
<i>M. morganii</i>	0,74% (11)	0% (0)
<i>P. mirabilis</i>	9,1% (135)	1,12% (1)
<i>P. pennerii</i>	0,07% (1)	0% (0)
<i>P. rettgeri</i>	0,2% (3)	0% (0)
<i>P. stuartii</i>	0,07% (1)	0% (0)
<i>P. vulgaris</i>	0,13% (2)	0% (0)
<i>S. ficaria</i>	0,07% (1)	0% (0)
<i>S. marcescens</i>	1,2% (18)	0% (0)
TOTAL	100% (1488)	100% (89)

Tabela 3: Identificação dos microrganismos sensíveis e resistentes ao antibiótico meropenem

MICROORGANISMO	SENSÍVEL % (n)	RESISTENTE % (n)
<i>A. baumannii</i>	0,12% (2)	0% (0)
<i>Citrobacter spp</i>	1,6% (27)	2,7% (1)
<i>E. aerogenes</i>	1,6% (27)	0% (0)
<i>E. cloacae</i>	2,23% (38)	2,7% (1)
<i>E. coli</i>	52,6% (896)	2,7% (1)
<i>K. oxytoca/K. ozaenae</i>	1,7% (29)	2,7% (1)
<i>K. pneumoniae</i>	20,9% (355)	75,7% (28)
<i>M. morganii</i>	0,6% (11)	0% (0)
<i>P. aeruginosa</i>	9,2% (156)	8,1% (3)
<i>P. mirabilis</i>	7,9% (135)	2,7% (1)
<i>P. pennerii</i>	0,06% (1)	0% (0)
<i>P. rettgeri</i>	0,18% (3)	0% (0)
<i>P. stuartii</i>	0,06% (1)	0% (0)
<i>P. vulgaris</i>	0,12% (2)	0% (0)
<i>S. ficaria</i>	0,06% (1)	0% (0)
<i>S. marcescens</i>	1,1% (18)	2,7% (1)
TOTAL	100% (1702)	100% (37)

4. Discussão

Neste estudo, foram analisados dados relativos a 7436 amostras de urocultura provenientes do serviço de Patologia Clínica da ULS Algarve-Faro, referentes ao período entre 2020 e 2023.

Verificou-se que 58% das uroculturas positivas para ITU, correspondiam a pacientes do sexo feminino. Segundo a literatura, as mulheres estão mais propensas ao surgimento de infeções urinárias devido às características fisiológicas e estruturais da uretra feminina (cuja extensão é mais curta na mulher) e devido à maior proximidade da região perianal com a uretra. Desta forma, justifica-se o facto de haver um maior número de uroculturas positivas nas mulheres comparativamente com os homens (15, 16).

Relativamente à faixa etária, verificou-se que os pacientes com idades compreendidas entre [58-65] anos estão mais predispostos às ITU's, contemplando 34,6% de uroculturas positivas. Estudos anteriores indicam que o declínio da função renal e diminuição das defesas urinárias, favorecem uma elevada prevalência de infeções urinárias nesta faixa etária, tal como se verificou nos dados obtidos (15). Desta forma, sugere-se a realização de estudos que contemplem como critério de inclusão as faixas etárias superiores a 65 anos, com um foco especial em pacientes do sexo feminino, uma vez que estes pacientes se apresentam como mais suscetíveis às ITU's e sujeitos a internamento. Após a análise da distribuição dos dados por tipo de microrganismo identificado, constatou-se que 1778 casos (84%) correspondiam a microrganismos Gram-negativos e 274 casos (13%) correspondiam a microrganismos Gram-positivos. Segundo a literatura, os principais causadores das ITU's são maioritariamente as bactérias Gram-negativas, o que permite corroborar os resultados desta variável (17, 18). Dentro dos microrganismos Gram-negativos, a *E. coli* (50,62%) e a *K. pneumoniae* (21,93%), foram mais frequentemente detetados. Estes achados estão em conformidade com a literatura existente, que identifica a *E. coli* como o principal agente das ITU's, tanto na comunidade, quanto em hospitais, seguida pela *K. pneumoniae*, também prevalente em infeções nosocomiais (15, 19 e 20). Tendo em conta a presença de resistência bacteriana e sensibilidade aos antibióticos ertapenem e meropenem, de acordo com estudos prévios, os microrganismos detetados em amostras de urina geralmente apresentam maior sensibilidade ao ertapenem do que resistência, uma tendência semelhante à observada com o meropenem (4, 20). No presente estudo, constatou-se que 1488 dos microrganismos isolados apresentavam-se como sensíveis ao ertapenem, enquanto apenas 89 demonstraram resistência a este antibiótico. Em relação ao meropenem, 1702 dos microrganismos detetados mostraram-se sensíveis e 37 resistentes. Através da análise da resistência a ambos os antibióticos em estudo, é possível inferir que o número de casos de resistência é superior no antibiótico ertapenem. Esses resultados são corroborados pela literatura existente. Apesar dos níveis de resistência serem baixos, é fundamental que continuem a ser implementadas medidas de controlo de infeção e prevenção, como a sensibilização para o uso adequado dos antibióticos carbapenemos, o isolamento de pacientes infetados por bactérias resistentes e uma boa higienização das mãos, de forma a minimizar o surgimento de resistências futuras, assegurando a eficácia contínua dos carbapenemos no tratamento de infeções urinárias (4, 21, 22, 23). O mecanismo de resistência aos carbapenemos com maior frequência neste foi o ESBL, com 42 casos (47%), estudos anteriores indicam que a eficácia do antibiótico ertapenem é instável na presença de estirpes produtoras de ESBL. Neste estudo apenas se realizou a distribuição dos mecanismos de resistência para os antibióticos ertapenem e meropenem em conjunto (Figura 2), pelo que se sugere a realização futura da análise individual destes antibióticos, de forma a verificar se as bactérias produtoras de ESBL demonstram efetivamente maior resistência ao ertapenem do que ao meropenem (24, 25). Em relação aos genes de resistência analisados, pode-se aferir que o gene de resistência mais comumente identificado foi o KPC (53% – 16 casos). A análise literária de outros estudos corrobora este resultado, identificando o KPC como o gene mais prevalente a nível mundial dado à sua facilidade de disseminação entre diferentes espécies bacterianas (26 – 28). Tendo em conta a análise da sensibilidade e resistência por microrganismo identificado (Gram-negativos) em amostras positivas para ITU, o microrganismo que apresentou um maior número de casos de sensibilidade ao ertapenem foi a *E. coli* com 896 casos, seguindo-se a *K. pneumoniae* (307 casos). Este resultado está de acordo com a literatura, a qual indica altas taxas de sensibilidade por parte desta bactéria ao antibiótico ertapenem (29). Relativamente aos casos de resistência, a *K. pneumoniae* é a que maior número apresenta (77 casos) em comparação com as restantes bactérias Gram-negativas identificadas. Este resultado obtido não vai de encontro a estudos anteriores, dado que estes apenas afirmam que há resistência por parte deste microrganismo ao ertapenem, sem especificar a sua predominância relativamente a outros microrganismos (30).

Os microrganismos mais frequentemente sensíveis ao meropenem foram a *E. coli* (896 casos) e a *K. pneumoniae* (355 casos). Estudos anteriores também comprovam que a sensibilidade destes microrganismos ao meropenem é bastante elevada, corroborando os resultados obtidos (31). No entanto, de acordo com a análise dos casos de resistência, verificou-se que a *K. pneumoniae* é o microrganismo com mais casos de resistência ao meropenem (28 casos). Estudos anteriores apenas afirmam que há resistência por parte deste microrganismo ao meropenem, sem especificar a sua predominância relativamente a outros microrganismos (30).

5. Conclusões

A resistência aos antibióticos carbapenemos é um tema com uma importância crescente em saúde pública, dado que compromete a eficácia do tratamento antimicrobiano. Além disso, tem várias outras implicações nomeadamente o aumento dos gastos em saúde, devido ao prolongamento dos internamentos e o aumento da mortalidade.

Tendo em conta o presente estudo, este permitiu avaliar o somatório do número de casos de resistência correspondente a cada um dos antibióticos carbapenemos, e tirar conclusões acerca da sua eficácia. Efetivamente o número de casos de resistência, este não demonstrou ser muito elevado (89 casos para resistência a ertapenem e 37 casos de resistência a meropenem), mas é suficientemente significativo para alertar os serviços hospitalares de que medidas preventivas devem continuar a ser adotadas. Relativamente aos antibióticos em estudo, concluiu-se que o ertapenem apresentou um número de casos de resistência superior à demonstrada pelo meropenem, o que permitiu aferir que este último poderá ser a opção mais segura para antibioterapia. Relativamente aos mecanismos de resistência, o que demonstrou ser mais prevalente foi o ESBL (42 casos). Como já mencionado, segundo a literatura, o antibiótico ertapenem demonstra-se instável na presença de bactérias produtoras de ESBL. Esta inferência, reforça a possibilidade de que o antibiótico ertapenem seja uma opção terapêutica menos segura em comparação com o meropenem, no entanto deverão existir mais estudos para suportar esta hipótese.

Dos genes de resistência identificados, o que demonstrou maior prevalência em amostras de urina foi o KPC (16 casos). Como já referido, este gene é transferido facilmente para outras espécies de bactérias, sendo importante monitorizar e isolar os pacientes infetados por bactérias portadoras deste gene. Este estudo aborda um tema de grande importância na atualidade, dado o aumento contínuo dos casos de resistência e à escassez de opções terapêuticas para estirpes multirresistentes. Os resultados que derivam deste estudo, assim como a sua divulgação, revelam-se como mais-valias no redirecionamento de terapêuticas mais adequadas tendo em conta os casos de resistência aos antibióticos carbapenemos. Além disso, podem contribuir para a diminuição dos internamentos hospitalares e custos associados aos mesmos. Para colmatar os níveis de resistência presentes na ULISalgarve – Faro devem continuar a ser aplicadas medidas preventivas e além disso deverão ser realizados estudos anuais de forma a verificar e controlar os casos de resistência aos antibióticos carbapenemos.

Contribuição dos autores: Inês Gago-Rodrigues e Rui Plácido Raposo (autor principal e autor para correspondência, respetivamente): Conceção e delineamento do estudo, análise e interpretação dos dados. Redação e revisão crítica do artigo no que respeita a conteúdo intelectualmente importante. Revisão da versão final do manuscrito. Cristiana Gomes, Maria Cachadinha, Rita Domingos: Recolha e análise dos dados. Pesquisa bibliográfica e redação. Maria Pereira, Helena Estorninho e João Furtado: Contribuições para a conceção e delineamento, análise e interpretação dos dados. Participação na revisão crítica do artigo. Revisão da versão final do manuscrito

Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Os autores declaram não ter recebido qualquer financiamento para a realização do estudo.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não possuir qualquer tipo de conflitos de interesse

6. Referências

- (1) Gralha, R. E. F. (2011). Métodos De Pesquisa De Beta-Lactamases Em Amostras clínicas: Estudo De revisão. PQDT-Global.
- (2) WHO (2015). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance.
- (3) WHO. (2014). WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health

- (4) Loureiro, R. J., Roque, F., Rodrigues, A. T., Herdeiro, M. T., & Ramalheira, E. (2016). O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista portuguesa de saúde pública*, 34(1), 77-84.
- (5) Tacconelli et al. (n.d.) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.
- (6) Sousa, P. S. T. D. (2016). *Sistemas de vigilância das resistências aos antibióticos* (Doctoral dissertation).
- (7) Lima, L. M., da Silva, B. N. M., Barbosa, G., & Barreiro, E. J. (2020). β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European journal of medicinal chemistry*, 208, 112829.
- (8) CDC (2013). Antibiotic Resistance Threats in the United States.
- (9) de Arruda et al. (2019). Revisão bibliográfica de antibióticos beta-lactâmicos. *Rev. Saúde em Foco*, 982-995.
- (10) Kaderabkova, N., Bharathwaj, M., Furniss, R. C. D., Gonzalez, D., Palmer, T., & Mavridou, D. A. (2022). The biogenesis of β -lactamase enzymes. *Microbiology*, 168(8), 001217.
- (11) Zhanel, G. G., Wiebe, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D. J., ... & Karlowsky, J. A. (2007). Comparative review of the carbapenems. *Drugs*, 67, 1027-1052.
- (12) Araújo, L. D. L. C. & Azevedo, F. H. C. (2020). Estudo da enzima beta-lactamase e sua relação com a resistência aos antibióticos. *Research, Society and Development*, 9(7).
- (13) Mentasti, M., Prime, K., Sands, K., Khan, S., & Wootton, M. (2019). Rapid detection of IMP, NDM, VIM, KPC and OXA-48-like carbapenemases from Enterobacterales and Gram-negative non-fermenter bacteria by real-time PCR and melt-curve analysis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38, 2029-2036.
- (14) Masson, L. C., Martins, L. V., Gomes, C.M., & Cardoso, A. M. (2020). Diagnóstico laboratorial das infecções urinárias: relação entre a urocultura e o EAS. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 52(1).
- (15)
- (16) Ribeiro, A. R. J., Chaves, C. M. C. B., & do Sacramento Costa, A. M. S. (2024). Prevalência de infecções urinárias em pessoas institucionalizadas em instituições particulares de solidariedade social. *Revista de Enfermagem Referência*, 1-7.
- (17) Huang, L., Huang, C., Yan, Y., Sun, L., & Li, H. (2022). Urinary tract infection etiological profiles and antibiotic resistance patterns varied among different age categories: a retrospective study from a tertiary general hospital during a 12-year period. *Frontiers in microbiology*, 12, 813145.
- (18) Malinowski, E., Leslye, A., & Estorillo, A. (n.d.). Bactérias mais frequentes em infecções do trato urinário. *Revista Saúde e Meio Ambiente-RESMA*, 1, 121-134
- (19) Seifu, W. D., & Gebissa, A. D. (2018). Prevalence and antibiotic susceptibility of Uropathogens from cases of urinary tract infections (UTI) in Shashemene referral hospital, Ethiopia. *BMC infectious diseases*, 18, 1-9.
- (20) Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., Marra, M., Zummo, S., & Biondo, C. (2023). Urinary tract infections: the current scenario and future prospects. *Pathogens*, 12(4), 623.
- (21) WHO (2022). Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022
- (22) Luo, H., Xu, L., & Chen, Y. (2023). Drug resistance and susceptibility of amikacin in children with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacterales: a systematic review with meta-analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 106(4), 115956.
- (23) Gonçalves, S. (2012). *Prevenção e Controlo de Infecção na Prática dos Enfermeiros: Contributos da Formação* (Doctoral dissertation, Dissertação de Mestrado apresentada à Escola Superior de Enfermagem de Coimbra para obtenção do grau de Mestre em Enfermagem Médico-Cirúrgica)
- (24) PPCIRA. (2017). *Recomendação: Prevenção da transmissão de enterobactérias resistentes aos carbapenems em hospitais de cuidados de agudos*.
- (25) Elshamy, A. A., & Aboshanab, K. M. (2020). A Review on Bacterial Resistance to Carbapenems: epidemiology, Detection and Treatment Options. *Future Science OA*, 6(3). Consultado no URL: <https://doi.org/10.2144/fsoa-2019-0098>
- (26) Gomes, J. R. A. (2017). *Carbapenemases em bacilos de Gram negativo: diversidade e impacto clínico* (Master's thesis, Universidade Fernando Pessoa (Portugal)).
- (27) Ferreira, I. M. N. (2021). Epidemiology of β -lactamases producing strains: ESBL, KPC and OXA-48. Consultado no URL: <http://hdl.handle.net/10773/30963>
- (28) Nobre Oliveira, C. (2019). *Genes de Resistência Bacteriana- O estado da arte*
- (29) Margarida, A., & Bernardo, P. (2020). Fatores de Risco para Colonização/Infecção por *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenems.
- (30) Ferreira Souza, R. D., Mamede Bezerra, D. (2008). Prevalência e suscetibilidade bacterianas das infecções do trato urinário em pacientes internados no Hospital Universitário João de Barros Barreto- período de janeiro de 2006 a dezembro de 2007.
- (31) Matovina, M., Abram, M., Repac-Antić, D., Knežević, S., & Bubonja-Šonje, M. (2021). An outbreak of ertapenem-resistant, carbapenemase-negative and porin-deficient ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* complex. *Germs*, 11(2), 199.
- (32) Hussain, T., Moqadasi, M., Malik, S., Zahid, A. S., Nazary, K., Khosa, S. M., ... & Khan, A. R. (2021). Uropathogens antimicrobial sensitivity and resistance pattern from outpatients in Balochistan, Pakistan. *Cureus*, 13(8).

Caraterização da Prevalência da Hemoglobina S nas dádivas sanguíneas da região do Algarve

Rui Plácido Raposo ^{1,2}, Anaël Munsh ¹, José Simões ¹, Michele Tavares ¹, Fábía Encarnação ³, Vera Maria ³, Isa Oliveira ³, Eugénia Vasconcelos ⁴, Selene Nunes ⁴, João Furtado ^{1,2} e Inês Gago-Rodrigues ^{1,2*}

¹ Universidade do Algarve – Escola Superior de Saúde (ESSUALg);

² Centro de Estudos em Saúde da Universidade do Algarve (CESUALg), Faro, Portugal;

³ Laboratório Regional de Saúde Pública Dra. Laura Ayres-IPST (LLA/IPST) – Serviço de Imunohemoterapia;

⁴ Unidade Local de Saúde do Algarve (ULSA) – Serviço de Imunohemoterapia;

⁵ Centro de Sangue e Transplantação de Lisboa (CSTL) – IPST;

* Autor correspondente: igrodrigues@ualg.pt (Inês Gago-Rodrigues); Escola Superior de Saúde da Universidade do Algarve; Campus Gambelas – Edifício 1– Piso 2, 8005-139 Faro, Portugal.; Tel.: +351 919876356

Resumo

A hemoglobina S (HbS) é uma hemoglobina mutante, em que os portadores são geralmente assintomáticos, tendo um risco elevado de tromboembolismo e de doença renal crónica. A presença de HbS em pessoas dadoras é um desafio para qualquer serviço de sangue, pois no processamento da dádiva sanguínea, a HbS pode levar à falciformação dos eritrócitos, resultando na obstrução dos filtros, durante a leucorredução.

Este estudo tem como objetivo a caracterização da prevalência da HbS nas pessoas dadoras de sangue do Algarve, através da análise de dados referentes a dádivas, com filtração interrompida, entre janeiro de 2018 e abril de 2024. As variáveis estudadas foram: diagnóstico de HbS; data da dádiva; lote do saco de colheita; grupo sanguíneo; sexo; naturalidade; concelho de residência; idade; data da deteção de HbS; número de dádivas efetuadas e valor de hemoglobina.

Foram analisadas 138 dádivas, efetuadas por 98 pessoas dadoras. Observou-se que 57,2% dessas dádivas foram HbS positivas (HbS+). Das pessoas dadoras HbS+: 52,1% eram homens e 47,9% mulheres; os grupos sanguíneos mais prevalentes foram o O (50%) e o A (33,4%). Cerca de 50% eram naturais do Brasil, Angola e Cabo Verde. No geral, entre janeiro de 2018 e abril de 2024, a prevalência da HbS nas dádivas de sangue no Algarve foi cerca de 0,12%.

Recomenda-se a pesquisa de HbS em pessoas dadoras, que apresentem índices hematimétricos suspeitos bem como a adoção de medidas preventivas para problemas na leucorredução, beneficiando assim a gestão de recursos dos serviços visados.

Citation: Plácido-Raposo, Rui.; Munsh, Anaël.; Simões, José.; Tavares, Michele.; Encarnação, Fábía.; Maria, Vera.; Oliveira, Isa.; Vasconcelos, Eugénia.; Nunes, Selene.; Furtado, João.; Gago-Rodrigues, Inês. Caracterização da prevalência de hemoglobina S nas dádivas sanguíneas da região do Algarve. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2025 Mar 9; 3(1): 63-72.

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: February 2025

Accepted: February 2025

Published: March 2025

Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences

Palavras-chave: Hemoglobina S, Hemoglobinopatia, dádiva sanguínea

1. Introdução

A anemia falciforme, ou drepanocitose, é uma doença autossómica recessiva, causada por uma mutação pontual no gene codificante da cadeia β da hemoglobina (Hb). Ocorre a substituição do ácido glutâmico por valina, originando uma hemoglobina anormal denominada hemoglobina S (HbS) ao invés da hemoglobina A (HbA) (1). Em condições de baixa concentração de oxigénio, a HbS polimeriza-se e o eritrócito adquire uma forma de foice sendo rígido e com vida útil curta (2, 3).

A forma mais grave desta doença ocorre em indivíduos homozigóticos denominando-se por drepanocitose ou anemia falciforme. Podem surgir diversas complicações tais como disfunção do endotélio vascular, alterações na produção de óxido nítrico, inflamação, stress oxidativo, hipercoagulabilidade e ativação recorrente de células imunes (4). Em certos casos, a anemia falciforme pode ser fatal, ao provocar acidente vascular cerebral (5). No entanto, alguns indivíduos exibem a forma heterozigótica, sendo denominados portadores do traço falciforme. Neste último caso, o indivíduo não costuma apresentar sintomas. Contudo, está bem estabelecido que o traço falciforme está associado a um elevado risco de tromboembolismo (pulmonar em particular) e de doença renal crónica (6, 7).

O traço falciforme pode ser detetado através do rastreio neonatal, que tem em vista a detecção assim como o planeamento e aconselhamento das famílias afetadas. Outra forma de identificar os portadores de HbS é no processamento do Sangue Total (ST) ou do Concentrado de Eritrócitos (CE), nas dádivas sanguíneas, mais especificamente aquando da leucorredução (8, 2, 3).

A dádiva de sangue representa uma parte fulcral dos cuidados de saúde ao nível mundial, estando intimamente relacionada com a transfusão de sangue e com a obtenção dos componentes sanguíneos. Os doentes que necessitam de uma transfusão estão, assim, dependentes das dádivas efetuadas pelas pessoas dadoras. Verifica-se uma necessidade contínua destas dádivas, uma vez que existem sempre doentes a necessitar de transfusão, e os componentes sanguíneos têm prazos de validade limitados (9). Em Portugal, em 2022, foram realizadas 306 796 dádivas sanguíneas, correspondendo a 206 287 pessoas dadoras de sangue (10).

A pessoa dadora é aquela que, após triagem clínica, apresenta valores mínimos de Hb de 12,5 g/dL (mulheres) ou 13,5 g/dL (homens), doa benevolamente e de forma voluntária parte do seu sangue para fins terapêuticos (11, 12).

A obtenção dos componentes sanguíneos inclui várias etapas, nomeadamente: a triagem das pessoas dadoras, a colheita de ST e o seu processamento. Esta última etapa tem como objetivo maximizar a utilidade e segurança dos componentes sanguíneos, num procedimento que compreende diversos passos como: a separação dos componentes sanguíneos, a leucorredução e a validação das unidades de sangue, entre outros (13).

A leucorredução constitui um passo fundamental no processamento da dádiva de sangue, que visa uma redução bastante significativa do número de leucócitos presentes nos componentes sanguíneos, sendo estes potenciais causadores de efeitos adversos na pessoa recetora (14). Pode efetuar-se através de diversas metodologias, sendo uma das mais utilizadas a filtração deste componente sanguíneo, retendo os leucócitos, mas permitindo a passagem dos eritrócitos e das plaquetas (8, 2, 3).

Os diferentes fatores que podem dificultar ou até levar à interrupção da leucorredução estão relacionados com defeitos na qualidade dos filtros; condições de transporte; acondicionamento e processamento dos componentes sanguíneos; presença de fibrina ou coágulos, para além da referida presença de HbS. Durante a leucorredução podem-se verificar condições que favorecem a falciformação dos eritrócitos, o que pode impedir a sua passagem, levando à obstrução do filtro. As unidades de sangue onde surge este problema são enviadas para pesquisa de HbS (15, 16).

Existem, no entanto, portadores de traço falciforme cujos eritrócitos não ficam retidos no filtro, dando-se a leucorredução normalmente (8, 2, 3). Assim, para a realização de uma transfusão sanguínea segura, é necessário ter em conta a situação clínica da pessoa recetora, uma vez que a transfusão de CE com HbS, pode ser prejudicial para as pessoas recetoras que apresentem hemoglobinopatias, acidose severa ou em recém-nascidos (17). Considerando este facto, nestes casos, uma amostra do CE a transfundir deve ser analisada por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), como forma de despiste para a presença de HbS, sendo esta outra potencial forma de deteção de pessoas dadoras portadoras de HbS, mesmo quando não surgem problemas durante a leucorredução (18).

Em Portugal, o primeiro estudo a nível nacional sobre a prevalência da HbS foi feito entre 1983 e 1985. Com este estudo verificou-se que a prevalência de portadores de HbS era de 0,32%, com uma prevalência superior nas regiões do sul do país, como é o caso do Algarve que apresentava uma prevalência de 0,68% (19). Segundo o rastreio orientado de portadores de hemoglobinopatias feito entre 1987 e 1993 no âmbito do Programa Nacional de Controlo das Hemoglobinopatias (PNCH) coordenado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), efetuado nos distritos com maior prevalência de HbS (Beja, Évora, Faro, Leiria, Lisboa, Santarém e Setúbal) verificou-se uma prevalência de 8,9% de portadores de β -talassémia e HbS (5).

Os últimos dados publicados sobre a prevalência da HbS em Portugal datam a 2013 e foram retirados da casuística de hemoglobinopatias realizada pelo laboratório do Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis (DPSPDNT) do INSA. Segundo esta casuística, as hemoglobinopatias eram mais prevalentes nas regiões do Algarve, Alentejo e Lisboa e Vale do Tejo, sendo as mais frequentes a HbS e a β -talassémia. No primeiro semestre de 2013, foram identificados 271 casos de hemoglobinopatias dentro dos quais, 8,9% eram HbS positivas (2).

O presente estudo tem como objetivo geral a análise da prevalência da HbS nas pessoas dadoras de sangue do Algarve. Especificamente, realizou-se a caracterização da população de pessoas dadoras no Algarve, detetadas como portadores de traço falciforme. Além disso, foram estudadas as dádivas envolvidas em problemas na leucorredução quanto à data de colheita, lote

do saco de colheita, quantificando o número de dádivas cuja causa para o problema na leucorredução foi a presença de HbS.

2. Materiais e Métodos

Efetuuou-se um estudo retrospectivo e observacional através da análise de dados, referentes ao período entre 1 de janeiro de 2018 e 7 de abril de 2024, relativos a dádivas com filtração interrompida durante a leucorredução do CE. Esses dados foram obtidos por conveniência e recolhidos no Laboratório Regional de Saúde Pública do Algarve, Dra. Laura Ayres (LLA) – Instituto Português do Sangue e da Transplantação, I.P. (IPST), através da Aplicação Sistema de Informação a Serviços de Sangue (ASIS). A população em estudo englobou todas as pessoas dadoras que efetuaram dádiva de sangue na Unidade Local de Saúde do Algarve, E.P.E. (ULSA), sendo estas posteriormente processadas no LLA-IPST.

A partir dos relatórios de Atividade Transfusional e Sistema Português de Hemovigilância do IPST e dos dados fornecidos pelo LLA-IPST, obteve-se o número total de dádivas efetuadas no período abrangido pelo estudo, sendo consideradas para o estudo e analisadas as dádivas cuja leucorredução foi interrompida.

Os dados foram recolhidos no ASIS em duas etapas. Primeiramente, foram considerados os dados tendo em conta a data de colheita, lote do saco de colheita, grupo sanguíneo e número de dador a partir de listagens dos CE inutilizados por motivo de filtração interrompida, no LLA-IPST. Seguidamente, a partir do número de dador, foram recolhidos dados referentes às restantes variáveis analisadas para cada pessoa dadora, no ASIS: sexo, naturalidade, nacionalidade, etnia, conselho de residência, data de nascimento, estatuto quanto à HbS (HbS positivas (HbS+) ou HbS negativas (HbS-)), número de dádivas efetuadas, valor de Hb referente à dádiva e a outras dádivas. Verificando-se que esses dados se encontravam incompletos, ou em falta, excluíram-se as seguintes variáveis: lote do saco de colheita; etnia; valores de Hb das outras dádivas.

Para uma caracterização adequada da população de pessoas dadoras HbS+, foram excluídas as múltiplas dádivas efetuadas por estas, de forma que cada pessoa dadora HbS+ fosse contabilizada apenas uma vez.

A data da colheita e a data da deteção da HbS foram agrupadas por ano. A idade das pessoas dadoras foi agrupada em classes de 10 em 10 anos. O número de dádivas efetuadas foi organizado em intervalos de 10 em 10 dádivas.

Os dados foram tratados no Microsoft Excel e analisados no programa *Software Package for Social Sciences* (SPSS), Versão 29.0. Recorreu-se a análise de estatística descritiva e inferencial, através do teste qui-quadrado, com nível de significância $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Prevalência de HbS nas dádivas sanguíneas do Algarve, entre 2018 e 2024.

A partir dos dados dos relatórios de Atividade Transfusional e Sistema Português de Hemovigilância do IPST e dos dados obtidos através deste estudo no LLA foi possível estimar a prevalência da HbS nas dádivas sanguíneas, na região do Algarve, sendo esta de 0,12% em 2018; 0,17% em 2019; 0,11% em 2020; 0,09 % em 2021; 0,14% em 2022; 0,09% em 2023. No geral, entre janeiro de 2018 e abril de 2024, a prevalência da HbS na dádiva de sangue no Algarve foi cerca de 0,12% (Tabela 1).

Foram realizadas 66 614 dádivas entre 1 de janeiro de 2018 e 7 de abril de 2024, das quais 138 apresentaram problemas na leucorredução. Verificou-se que, aproximadamente, 57% (n=79) das dádivas em estudo eram provenientes de indivíduos HbS+, 38% (n=52) de indivíduos HbS- e 5% (n=7) não tinham o estatuto HbS definido (Figura 1a).

Tabela 1: Prevalência da HbS, a partir das dádvas HbS positivas cuja leucorredução foi interrompida.

Ano	Nº total de dádvas homólogas na região do Algarve	Nº dádvas HbS+	Prevalência HbS (%)
2018	10 766	13	0,12
2019	10 036	17	0,17
2020	10 451	12	0,11
2021	11 439	10	0,09
2022	10 449	15	0,14
2023	10 179	9	0,09
2024	3294	3	0,09
Total	66 614	79	0,12

^a Fonte: Relatórios de Atividade Transfusional e Sistema Português de Hemovigilância-IPST 2018–2022

^b Fonte: LLA-IPST

^c Número de dádvas HbS positivas até abril de 2024

As 138 dádvas com problemas na leucorredução foram efetuadas por 98 pessoas dadoras, das quais 49% (48) eram HbS+ (Tabela 2).

Tabela 2: Número total de pessoas dadoras cujas dádvas originaram problemas na leucorredução, entre janeiro 2018 e abril 2024.

	N	%
Pessoas dadoras		
Pessoas dadoras HbS+	48	49,0
Pessoas dadoras HbS-	43	43,9
Pessoas com estatuto HbS desconhecido	7	7,1
Total	98	100,0

Relativamente à data de colheita, os anos em que se verificou um maior número de dádvas com problemas na leucorredução foram os anos de 2018 e de 2019 (18,8% e 18,1%, respetivamente). Até abril de 2024 surgiram 9 dádvas (6,5%) com problemas na leucorredução (Figura 1b).

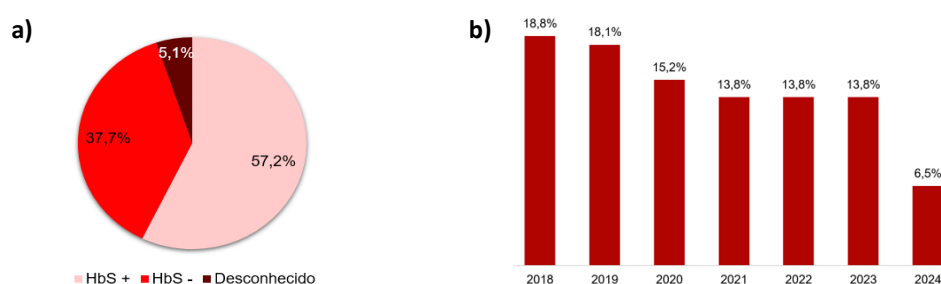


Figura 1: a) Percentagens das dádvas cuja leucorredução foi interrompida (n=138): HbS-: 37,7%; HbS+: 57,2%; Desconhecido: 5,1%. b) Data das colheitas das amostras em estudo (n=138): 2018: 18,8%; 2019: 18,1%; 2020: 15,2%; 2021: 13,8%; 2022: 13,8%; 2023: 13,8%; 2024: 6,5%.

3.2. Caracterização das pessoas dadoras com HbS+

3.2.1. Grupo sanguíneo, sexo e faixa etária

O grupo sanguíneo mais prevalente nas pessoas dadoras com HbS+ (n=48) foi o grupo O (50%), seguido do grupo A (33,4%) e do grupo B (12,5%).

Relativamente ao sexo das 48 pessoas dadoras com HbS+, verificou-se que 52,1% (n=25) eram do sexo masculino e 47,9% (n=23) do sexo feminino (Figura 2a). Em relação à faixa etária observou-se que a maioria das pessoas com HbS+ tinha entre 28 e 47 anos (28-37 anos: 25%

(n=12), 38-48 anos: 23% (n=11)). A classe dos 18-27 anos foi a que obteve a menor quantidade de pessoas portadoras do traço falciforme (14,6% (n=7)) (Figura 2b).

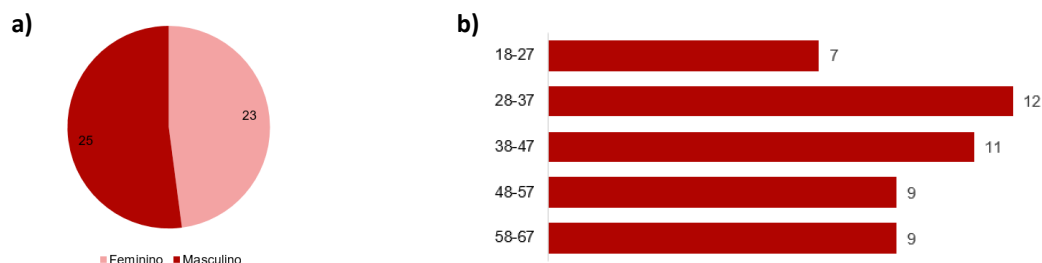


Figura 2: a) Frequências das pessoas dadoras HbS+ por sexo (n=48). Feminino: 23; Masculino: 25. b) Frequências das pessoas dadoras HbS+ por faixas etárias (n=48). 18-27 anos: 7 pessoas dadoras, 28-37 anos: 12 pessoas dadoras, 38-47 anos: 11 pessoas dadoras, 48-57 anos: 9 pessoas dadoras, 58-67 anos: 9 pessoas dadoras.

3.2.2. Nacionalidade, naturalidade e área de residência

No que diz respeito a nacionalidade das pessoas dadoras HbS+, verificou-se que 28 são portuguesas (58,3%), 18 são brasileiras (37,5%), 1 angolana (2,1%) e 1 moçambicana (2,1%) (Figura 3a). Tendo em conta a naturalidade das pessoas dadoras HbS+, verificou-se que metade dos indivíduos HbS+ eram naturais de Portugal (50% (n=24)), dos quais 75% (n=18) provinham das regiões do Algarve e Alentejo. A outra metade das pessoas dadoras HbS+, nasceram no estrangeiro, sendo a sua maioria natural do Brasil (37,5% (n=18)), Angola (10% (n=5)) e Cabo Verde (2,1% (n=1)) (Figura 3a).

A maioria das pessoas dadoras HbS+ (73%) residiam nos concelhos Algarvios de Faro (29,2% (n=14)), Loulé (18,8% (n=9)), Portimão (14,6% (n=7)) e Silves (10,4% (n=5)).

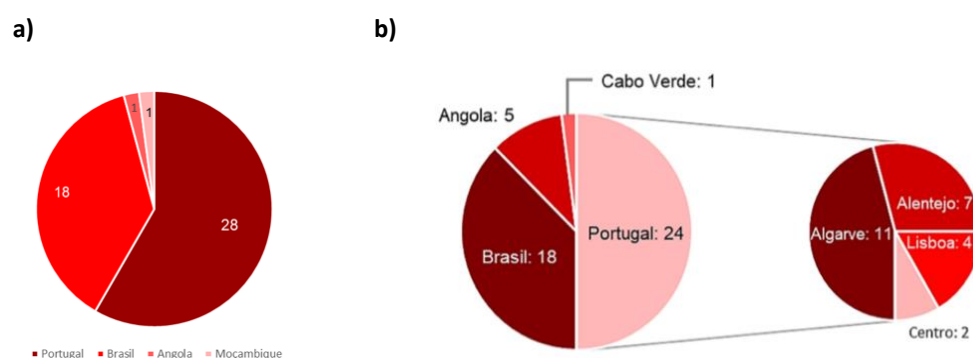


Figura 3: a) Frequências das pessoas dadoras HbS+ por nacionalidade (n=48). Portugal: 28 pessoas, Brasil: 18 pessoas, Angola: 1 pessoa, Moçambique: 1 pessoa. b) Frequências das pessoas dadoras HbS+ por naturalidade (n=48). Portugal: 24 pessoas (Algarve 11 pessoas, Alentejo: 7 pessoas, Lisboa: 4 pessoas, Centro: 2 pessoas), Brasil: 18 pessoas, Angola: 5 pessoas, Cabo Verde: 1 pessoa.

3.3. Relação entre presença/ausência HbS nas pessoas dadoras/dádivas sanguíneas

Foi avaliada a relação entre a presença/ausência de HbS nas pessoas dadoras, a sua naturalidade e nacionalidade, onde se observaram relações estatisticamente significativas ($p=0,017$ e $p<0,001$, respetivamente). Em ambas, observou-se uma maior predominância de dádivas HbS+ provenientes de pessoas de naturalidade e nacionalidade portuguesa, seguido da naturalidade e

nacionalidade brasileira. É de destacar que a maioria das dádivas, em que ocorreram problemas na leucorredução, provenientes de indivíduos brasileiros e angolanos, são HbS+ (Figura 4a e 4b).

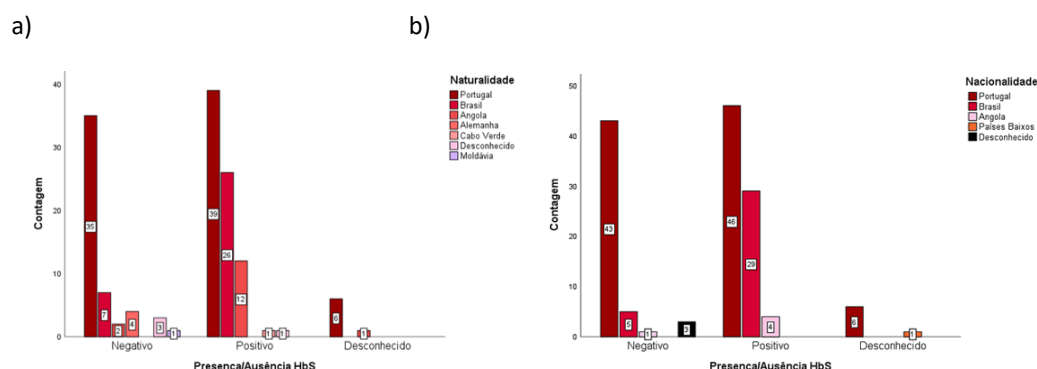


Figura 4: a) Relação entre a nacionalidade e o estatuto quanto à HbS das dádivas (n=138). HbS Negativo: (35 Portugal, 7 Brasil, 2 Angola, 4 Alemanha, 3 Desconhecido, 1 Moldávia), HbS Positiva: (39 Portugal, 26 Brasil, 12 Angola, 1 Cabo Verde, 1 Desconhecido), Estatuto HbS Desconhecido: (6 Portugal, 1 Angola). **b)** Relação entre a nacionalidade e o estatuto quanto à HbS das dádivas (n=138). HbS Negativo: (43 Portugal, 5 Brasil, 1 Angola, 3 Desconhecido), HbS Positiva: (46 Portugal, 29 Brasil, 4 Angola), Estatuto HbS Desconhecido: (6 Portugal, 1 Países Baixos)

4. Discussão

Neste estudo observacional foram analisadas 138 dádivas que apresentaram problemas na leucorredução, efetuadas por 98 pessoas dadoras, onde se verificou que 57% destas dádivas apresentaram um estudo positivo para a HbS. Este resultado sugere que a interrupção da leucorredução por obstrução dos filtros não ocorre apenas devido à presença de HbS, sendo concordante com os resultados de Duque J Florez *et al.* (2024) e Schuetz *et al.* (2004), que apresentam outros fatores de influência no processo de leucorredução. A otimização deste processo permite uma redução das dádivas inutilizadas e do gasto desnecessário de recursos, associada a uma melhor eficácia da leucorredução, resultando na obtenção de componentes sanguíneos de maior qualidade, com menor probabilidade de provocarem efeitos adversos no recetor (15, 16).

No que diz respeito à data da colheita das dádivas em que ocorreram problemas na leucorredução, observa-se uma diminuição a partir de 2020 e nos anos seguintes. Perante este resultado analisou-se o número de dádivas neste período, através da consulta do Relatório de Atividade Transfusional e Sistema Português de Hemovigilância 2020 e verificou-se que a diminuição dos problemas de leucorredução a partir de 2020 não é acompanhada por uma diminuição no número de dádivas homólogas na região do Algarve. Assim, poderão ter sido implementados outros procedimentos que possibilitaram a diminuição do número de dádivas com problemas na leucorredução (20).

Relativamente à idade das pessoas dadoras em estudo, constatou-se que a faixa etária entre os 28 e 47 anos de idade é aquela onde se verifica um maior número de pessoas dadoras HbS+, algo que é concordante com os relatórios de hemovigilância de 2018 a 2022. Além disso, verificou-se um menor número de dádivas com problemas na leucorredução efetuadas por pessoas dadoras jovens (18-27 anos), facto este que pode, eventualmente, relacionar-se com o envelhecimento da população de pessoas dadoras evidenciada no relatório de hemovigilância de 2022. É assim de salientar a importância da população jovem na dádiva de sangue e da fidelização das pessoas dadoras, de todas as faixas etárias, essenciais para a supressão das necessidades de componentes sanguíneos que se verificam nos hospitais. As gerações mais jovens são responsáveis por substituir as pessoas dadoras que deixam de doar sangue devido à sua idade, sendo por isso, fundamentais para a renovação da população de pessoas dadoras. As pessoas dadoras regulares também são bastante importantes visto que representam uma fonte significativa e constante de dádivas de sangue.

A prevalência dos diferentes grupos sanguíneos nas pessoas dadoras HbS+, é semelhante à que se verifica nas pessoas dadoras do Algarve, onde se constata que 44,38% das pessoas dadoras são do grupo O, 43,33% são do grupo A, 8,60% são do grupo B e 3,68% são do grupo AB. Nas pessoas dadoras HbS+ também se constata que os grupos sanguíneos predominantes são o O e o A (10, 20).

Em relação à naturalidade das pessoas dadoras, são de salientar dois aspetos: cerca de metade das pessoas dadoras HbS+ são naturais do Brasil (18), Angola (5) e Cabo Verde (1), ainda que a maioria da população de pessoas dadoras apresente naturalidade portuguesa. Além disso, as dádivas em que ocorreram problemas na leucorredução, provenientes de pessoas dadoras brasileiras ou angolanas são maioritariamente HbS+. Isto estará relacionado com o facto de que a HbS confere proteção perante o *P. falciparum*, e nestes países, verifica-se uma prevalência superior deste parasita. Como consequência de processos de seleção natural, esta característica é preservada levando, a uma maior prevalência de HbS em indivíduos naturais destes países. Assim, tendo em conta estes resultados, poder-se-á concluir que a prevalência da HbS nas pessoas dadoras naturais do Brasil e Angola é superior à prevalência da HbS nas pessoas dadoras de naturalidade portuguesa, algo que poderá ser transponível para a população destes mesmos indivíduos (21).

Os achados observados ao nível da naturalidade também se refletem ao nível da nacionalidade. A naturalidade poderá ser uma variável que reflète melhor a relação existente entre a prevalência da HbS e do *P. falciparum*, em diferentes regiões, uma vez que a transmissão da HbS à descendência se dá principalmente em indivíduos que apresentam uma *pool* genética característica da região endémica, ou seja, naturais ou descendentes de naturais dessa região.

Um outro aspeto a salientar é a distribuição geográfica que a HbS apresenta em Portugal, constatando-se que 75% das pessoas dadoras HbS+ naturais de Portugal, que doam sangue no Algarve, são naturais do Algarve e do Alentejo. Esta predominância tão marcada poderá estar relacionada com a maior prevalência de HbS que se observou em estudos anteriores nas regiões do Algarve e Alentejo (5, 2).

Relativamente ao concelho de residência das pessoas dadoras HbS+, a predominância de indivíduos HbS+ nos concelhos de Faro, Portimão e Loulé poderá estar relacionada com a maior densidade populacional que se verifica nesses concelhos, havendo, como tal, um maior número de pessoas dadoras e também de imigrantes que tendem a habitar em cidades de maiores dimensões, como estas.

Neste estudo, verificou-se uma prevalência da HbS de 0,12% nas dádivas efetuadas no Algarve entre 2018 e abril de 2024. Esta prevalência varia bastante relativamente à observada em estudos anteriormente mencionados, efetuados em Portugal: no rastreio efetuado por Martins *et al.*, observou-se uma prevalência de HbS no Algarve de 0,68%; no rastreio direcionado a grávidas e a indivíduos com história familiar positiva de HbS, coordenado pelo Instituto Nacional de Saúde Pública Dr. Ricardo Jorge (INSA), constatou-se uma frequência conjunta de portadores de β -talassémias e HbS de 8,9%; no rastreio nacional, efetuado pelo INSA, principalmente em mulheres grávidas, verificou-se uma prevalência da HbS de: 6,5% em 2010, 7,0% em 2011, 9,4% em 2012 e 8,9% no primeiro semestre de 2013 (19, 22).

É de salientar que neste estudo foi analisada a prevalência da HbS nas pessoas dadoras, numa região de Portugal, sendo algo pioneiro em Portugal. No entanto, apenas foram incluídas pessoas dadoras, pelo que os valores de indivíduos HbS+ na região encontram-se subestimados. Adicionalmente, as dádivas de indivíduos HbS+ podem ser submetidas ao processo de leucorredução sem que ocorram quaisquer complicações, existindo por isso pessoas dadoras de sangue no Algarve que serão HbS+ e não foram identificadas como tal.

Outros estudos homólogos a este foram efetuados noutros países nomeadamente no Brasil, Nigéria, entre outros países. No estudo efetuado por Pinto *et al.* (2022), no Brasil, verificou-se uma prevalência de HbS de cerca de 2,2% nas pessoas dadoras do estado de Minas Gerais no Brasil. Já no estudo de Lidani *et al.*, (2015), também no Brasil, constatou-se uma prevalência de cerca de 0,9% de HbS nas pessoas dadoras do estado do Paraná. Tal como era esperado, ambas as regiões apresentam uma prevalência superior de HbS nas pessoas dadoras em relação ao presente estudo, referente à região do Algarve. Estes resultados demonstram a maior prevalência de HbS que se observa em regiões endémicas de *P. falciparum*, mas também a variabilidade que se verifica entre estas mesmas regiões (23, 21).

Apesar dos indivíduos HbS+ serem geralmente assintomáticos e não apresentarem evidências claras que sejam indicativas da presença de HbS, existem certos achados observados no hemograma que podem levar à suspeita da presença de HbS, tais como a Hemoglobina Globular Média inferior a 27 pg ou o Volume Globular Médio inferior a 80 fl. Como tal, poderia ser benéfico, no caso de se observarem estes achados, efetuar a determinação da HbS. Esta forma de rastreio da HbS permite uma pesquisa célere e pouco dispendiosa, a qual pode ser direcionada a pessoas dadoras com valores dos índices hematimétricos considerados suspeitos, de acordo com as características acima mencionadas, potenciando a deteção precoce de um maior número de indivíduos HbS+. Este rastreio traria vantagens para o indivíduo ao nível do planeamento familiar, uma

vez que um indivíduo portador do traço falciforme pode transmitir a HbS à sua descendência sob a forma de traço falciforme ou até, caso o outro progenitor também seja portador de HbS, sob a forma de hemoglobinopatia grave, ou seja, anemia falciforme (24).

Associada a este rastreio, poderia ser adotada uma outra medida: a exclusão de pessoas dadoras HbS+ cujas dâdivas origemem, repetidamente, problemas na leucorredução.

Como alternativa, tendo em conta a escassez de dâdivas que se verifica atualmente, poder-se-ia recorrer ao armazenamento do CE de pessoas dadoras conhecidas como HbS+ a 4°C antes deste ser submetido à leucorredução. De acordo com Amar K.O. *et al.*, este procedimento reduz a probabilidade da mesma ser interrompida, preservando a viabilidade da dâdiva (3).

Como tal, é fundamental otimizar a leucorredução e os processos associados, algo que poderá ser alcançando através da adoção das medidas anteriormente mencionadas, tendo em vista a redução das dâdivas inutilizadas e ao gasto desnecessário de recursos, associada a uma melhor eficácia da leucorredução, resultando na obtenção de componentes sanguíneos de maior qualidade, com menor probabilidade de provocarem efeitos adversos no recetor.

5. Conclusão

A prevalência da HbS nas dâdivas de sangue efetuadas no Algarve entre 2018 e abril de 2024 foi de 0,12%, proveniente de 48 pessoas dadoras HbS+, predominantemente do sexo masculino, entre os 28 e 47 anos de idade, dos grupos sanguíneos O e A. Estas pessoas dadoras apresentam maioritariamente naturalidade e nacionalidade portuguesas e brasileiras, residindo principalmente nos concelhos de Faro, Portimão e Loulé, tendo sido estabelecida uma relação estatisticamente significativa entre a naturalidade destas pessoas dadoras. Das 138 dâdivas analisadas em que ocorreram problemas na leucorredução, cerca de 57% eram HbS+ e 38% eram HbS-.

Este estudo tal como os estudos semelhantes, previamente mencionados, possibilitam uma melhor perceção acerca do contexto desta patologia, promovendo no futuro, a criação de medidas interventivas para a tomada de decisões mais informada, face a esta problemática na dâdiva sanguínea.

Desta forma é recomendada a realização de estudos homólogos, replicados noutras regiões ou mesmo a nível nacional, de modo a analisar a evolução do contexto da HbS no país e atualizando o conhecimento acerca desta hemoglobinopatia.

Contribuição dos autores: Rui Plácido Raposo e Inês Gago-Rodrigues (autor principal e autor para correspondência): Conceção e delineamento do estudo, análise e interpretação dos dados. Redação e revisão crítica do artigo no que respeita a conteúdo intelectualmente importante. Revisão da versão final do manuscrito. Anaél Munsh, José Simões, Michele Tavares, Fábria Encarnação, Vera Maria, Isa Oliveira e João Furtado: Contribuições para a conceção e delineamento, análise e interpretação dos dados. Participação na revisão crítica do artigo. Revisão da versão final do manuscrito Eugénia Vasconcelos e Selene Nunes: Recolha de dados e organização do estudo. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Os autores declaram não ter recebido qualquer financiamento para a realização do estudo.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não possuir qualquer tipo de conflitos de interesse.

6. Referências

(1) Sundd, P., Gladwin, M. T., & Novelli, E. M. (2019). Pathophysiology of Sick Cell Disease. Annual review of pathology, 14, 263–292. Acedido a 22 de outubro de 2023, no URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30332562/>

(2) Miranda, *et al.*, (2013). Estudo bioquímico de portadores de hemoglobinopatias. Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não transmissíveis, INSA. Boletim Epidemiológico, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Acedido a 27 de outubro de 2023, no URL: https://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/1745/1/observacoesN62013_artigo6.pdf

- (3) Amar K.O., et al., (2014). Assessment of leucoreduction of sickle cell trait blood: quality of the filtered product, *Blood Transfusion*, Vol. 12 (Suppl 1), 193-198. Acedido a 10 de novembro de 2023 no URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3934245/>
- (4) Aboderin, F. I., Oduola, T., Davison, G. M., & Oguntibeju, O. O. (2023). A Review of the Relationship between the Immune Response, Inflammation, Oxidative Stress, and the Pathogenesis of Sickle Cell Anaemia. *Biomedicine*, 11(9), 2413. Acedido a 22 de outubro de 2023, no URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37760854/>
- (5) Costa S., Madeira S., Sobral M., Gonçalo Delgadinho G (2016). Hemoglobinopatias em Portugal e a intervenção do médico de fmilia. Acedido a 22 de outubro 2023 no URL: [Visualização de Hemoglobinopatias em Portugal e a intervenção do médico de fmilia \(rpmg.pt\)](http://www.rpmg.pt)
- (6) Nova, B.M.P.V., (2022). Diagnóstico e tratamento da drepanocitose: novas metodologias. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Algarve, Faro. Acedido a 17 de novembro de 2023 no URL: <https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/19072/1/Diagn%3b3stico%20e%20tratamento%20da%20drepanocitose-%20novas%20metodologias%20-%20Bruno%20Vila%20Nova.pdf>
- (7) Wilson, S., Ellsworth, P., & Key, N. S. (2020). Pregnancy in sickle cell trait: what we do and don't know. *British journal of haematology*, 190 (3), 328–335. Acedido a 17 de novembro de 2023 no URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/bjh.16518>
- (8) Peres M.J. et al., (1996). Rastreio Neonatal de Hemoglobinopatias numa população residente em Portugal, *Acta Médica Portuguesa* 1996, 9: 135-139. Acedido a 10 de novembro de 2023 no URL: <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/2569/1982>
- (9) World Health Organization TEAM, (2022). Blood products: Blood donation. Acedido a 23 de outubro de 2023 no URL: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/blood-products-why-should-i-donate-blood>
- (10) Escoval et al. Comissão Coordenadora do SPHV (2022). Relatório de Atividade Transfusional e Sistema Português de Hemovigilância 2022. Acedido a 23 de outubro de 2023 no URL: https://www.hemovigilancia.net/files/RA_2022.pdf
- (11) Decreto-Lei 165/2012 do 27 de agosto. Lei n37/2012. Diário da República Série I. Lisboa.: Assembleia da República. Acedido a 17 de julho 2024 no URL: <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/lei/37-2012-174551>
- (12) Cabedal M., (2019), Hemoterapia e Hemovigilância, Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Lisboa. Acedido a 17 de julho 2024 no URL: https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/43329/1/MICF_Mariana_Cabedal.pdf
- (13) European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe, (2023). Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Recommendation NR (95) 15, 21th Edition, Council of Europe, Strasbourg, France.
- (14) Decreto-Lei 185/2015 do 2 de setembro. Dirio da República n171- 1a Série. Lisboa: Ministério da Saúde.
- (15) Duque J Florez et al., (2024). Blood donors with a result of positive sickle cell test at a blood bank in Medellín, Colombia. *Vox Sanguinis*, Issue Information., 119: 1-6. Acedido a 23 de junho de 2024 no URL: <https://doi.org/10.1111/vox.13650>
- (16) Schuetz A. et al., (2004). Leukoreduction Filtration of Blood With Sickle Cell Trait. *Transfusion Medicine Reviews*, Vol. 18, Issue 3, p.168-176. Acedido a 26 de junho de 2024 no URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887796304000185?via%3Dihub>
- (17) Kroger, F. L., et al., (2021). Hemoglobin S identification in blood donors: A cross section of prevalence. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 44(3), 336-340. Acedido a 19 de outubro de 2023, no URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33839080/>
- (18) Arishi, W. A., Alhadrami, H. A., & Zourob, M. (2021). Techniques for the Detection of Sickle Cell Disease: A Review. *Micromachines*, 12(5), 519. Acedido a 10 de novembro de 2023 no URL: <https://doi.org/10.3390/mi12050519>

- (19) Martins, et al., (1993). Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control, *J Med Genet*, 1993, 30: 235-239
- (20) Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP (IPST). Relatórios de Atividade Transfusional e Sistema Português de Hemovigilância, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022.
- (21) Lidani, et al., (2015). Relationship between the prevalence of hemoglobin S and the ethnic background of blood donors in Paraná state, *J. Bras Patol Med Lab*, Vol. 51, nº4, p.212-217. Acedido a 18 de outubro de 2023 no URL: <https://www.scielo.br/j/jbpml/a/w38tG8FY4jBtQBfK9wVv6GS/abstract/?lang=en&format=html&stop=previous>
- (22) Martins, et al., (2005). Avaliação da frequência de hemoglobina a1s nos candidatos à doação de sangue no hemocentro regional de Uberaba, no período de 1996 a 2000 - estudo retrospectivo, *Revista médica de Minas Gerais*, Vol 15 (1), p. 34-37. Acedido a 17 de outubro de 2023 no URL: <https://rmmg.org/artigo/detalhes/1455>
- (23) Pinto, et al., (2022). Prevalência de traço falciforme em doadores de sangue da região Centro-Oeste do Estado de Minas Gerais, *Revista Médica de Minas Gerais*, Vol. 32. Acedido a 16 de outubro de 2023 no URL: <https://rmmg.org/artigo/detalhes/3875>
- (24) Ghosh K, et al., (2014). Guidelines for screening, diagnosis and management of hemoglobinopathies. *Indian J Hum Genet*. 2014 Apr;20(2):101-19. doi: 10.4103/0971-6866.142841. PMID: 25400338; PMCID: PMC4228561. Acedido a 27 de junho de 2024 no URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4228561/>

Artigo Original

Caracterização dos Tumores do Sistema Nervoso Central na População que recorre à Unidade Local de Saúde do Algarve

João Furtado ^{1,2,3*}, Luana Caleffi ¹, Katherine Soares ¹, Camille Takano ¹, Ana Rita Possante ^{1,2}, Rui Plácido Raposo ^{1,2} e Inês Gago-Rodrigues ^{1,2}

¹ Escola Superior de Saúde da Universidade do Algarve (ESSUALg)

² Centro de Estudos em Saúde da Universidade do Algarve (CESUALg), Faro, Portugal

³ Algarve Biomedical Center Research Institute (ABCRI)

* Autor correspondente: jffurtado@ualg.pt (João Furtado); Escola Superior de Saúde da Universidade do Algarve; Campus Gambelas – Edifício 1 – Piso 2, 8005-139 Faro, Portugal.

Resumo: Os tumores do sistema nervoso central representam 14% da mortalidade oncológica global, com uma taxa de incidência de 4,2% em Portugal. Estudos epidemiológicos prévios evidenciam disparidades regionais, etárias e entre sexos na distribuição desta patologia. O presente estudo tem como objetivo avaliar a prevalência de tumores encefálicos e proceder à sua caracterização sociodemográfica e clínica, bem como investigar possíveis correlações em pacientes diagnosticados com esta patologia e acompanhados na Unidade Local de Saúde do Algarve (ULSAL). Realizou-se um estudo observacional retrospectivo baseado na análise de processos clínicos (n=278) extraídos da base de dados ULSAL, abrangendo o período de 2017 a 2020. O estudo revelou uma maior prevalência de tumores encefálicos primários (246 casos) em comparação com os metastáticos (32 casos), com predominância no sexo feminino (54,3%) e na faixa etária dos 51 aos 70 anos (45,6%). Entre os tumores primários, os mais prevalentes foram os gliomas (39,8%), seguidos pelos meningiomas (36,2%) e adenomas hipofisários (6,5%). No grupo dos gliomas, observou-se uma preponderância de tumores malignos, com os glioblastomas a representarem 73,5% dos casos. Quanto aos meningiomas, predominaram os de natureza benigna, com 40,3% classificados como transicionais. A taxa de mortalidade apresentou-se mais elevada no sexo masculino (51,9%), bem como nos casos de glioblastoma e na população idosa. As metástases mais frequentes são provenientes do cancro do pulmão. O índice Ki-67 destaca-se como o principal biomarcador, juntamente com a co-deleção 1p19q e a mutação IDH1/2. Em consonância com os dados mundiais e europeus, observou-se uma maior prevalência de gliomas, meningiomas e adenomas hipofisários.

Palavras-chave: Tumores encefálicos, metastáticos, glioblastoma, meningioma, prevalência.

Citation: Furtado, João.; Caleffi, Luana.; Soares, Katherine.; Takano, Camille.; Possante, Ana Rita.; Plácido Raposo, Rui.; Gago-Rodrigues, Inês. Caracterização dos Tumores do Sistema Nervoso Central na População que recorre à Unidade Local de Saúde do Algarve Trends in Biomedical Laboratory Sciences. 2025 Mar 9; 3(1): 73-88.

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: February 20205

Accepted: February 20205

Published: March 2025

Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences

1. Introdução

Atualmente o cancro é responsável por mais de 7 milhões de mortes no mundo a cada ano (1), sendo os tumores do sistema nervoso central (SNC) responsáveis por 14% da mortalidade de todos os cancros. Em 2020, os tumores do SNC corresponderam a 1,6% da taxa de incidência de cancro mundial e a 2,3% da incidência padronizada por idade em Portugal, com uma taxa de 261,8 por 100.000 pessoas-ano (2). Os tumores do encéfalo correspondem a 90% dos tumores do SNC, o qual abrange um grupo complexo e diverso de neoplasias benignos e malignos provenientes do parênquima encefálico e das suas estruturas de suporte, ou metastáticos (3). Podem ser classificados de diversas formas: (i) quanto à histopatologia: de baixo a alto grau (I, II, III, IV); (ii) ao comportamento: benigno ao agressivo; e (iii) ao local de origem: primários ou secundários (metastáticos). Dentro dos primários podem ser subclassificados de acordo com a estrutura encefálica de que originam, isto é: parênquima encefálico, glândula pituitária, meninges e/ou base da caixa craniana (4). Inclusive, a classificação atualmente mais adequada e utilizada no diagnóstico dos casos de incidência de tumores encefálicos é dada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a qual define critérios histopatológicos, imunohistoquímicos, grau de malignidade definido pela combinação da característica histológica e padrão de crescimento, e perfil molecular (5,6).

A etiologia dos tumores encefálicos primários é algo incerta, tendo como fatores de risco: a genética, radiação iónica, uso de telemóveis, exposições industriais, agentes infecciosos, traumas cerebrais, tabaco e álcool (7–9). Apesar de serem considerados raros, estes são mais frequentes em crianças do que em adultos, por outras palavras, são o segundo maior responsável de mortalidade por cancro em jovens abaixo de 19 anos (10). Destes, os gliomas são os mais frequentes (45%), seguindo-se do meningioma (27%) e do tumor da glândula pituitária (1). Entre os gliomas, o glioblastoma, de grau histopatológico IV, é responsável por 45% dos casos (11).

Os tumores metastáticos são derivados de processos carcinogénicos com origem fora do encéfalo responsáveis pela maior parte das taxas de morbilidade e mortalidade decorrente dos tumores encefálicos. As metástases intracraniais mais comuns localizam-se no parênquima cerebral e geralmente ocorrem em conjunto com metástases em outros locais do SNC como crânio, dura mãe e a leptomeninge, tendo como origem, mais recorrente, dos cancros pulmonares, melanomas e mamários (12,13). Estudos realizados nos Estados Unidos da América demonstraram que, embora os cancros do pulmão e melanomas continuem a ser as fontes mais frequentes, o cancro renal surge como a terceira origem mais comum de metástases no encéfalo. No entanto, é de realçar que dos 2% dos casos de cancro, apenas 12,1% desenvolveram metástase encefálica (14). A incidências destas metástases varia entre 9 a 17% em comparação com outras localizações metastáticas, apresentando uma distribuição equitativa entre sexos e uma maior incidência na população adulta (15).

Os estudos epidemiológicos revelam disparidades significativas na incidência de cancro encefálico entre regiões e géneros. Nos países desenvolvidos, a taxa de incidência é superior (5,8 e 4,1 por 100.000 pessoas-ano para homens e mulheres, respetivamente) comparativamente aos países em desenvolvimento (3,0 e 2,1 por 100.000 pessoas-ano) (16).

Em Portugal, excluindo a Região Autónoma dos Açores, registou-se em 2018 uma incidência de tumores do encéfalo e SNC de 6,4 e 4,0 por 100.000 pessoas-ano para homens e mulheres, respetivamente. Na região do Algarve, os valores foram significativamente superiores, com 20 novos casos em homens e 17 em mulheres por 100.000 pessoas-ano (17). Comparativamente a 2020, observou-se um aumento de 1,6 na taxa masculina e 0,4 na feminina (2), corroborando a tendência, já evidenciada em estudos anteriores, de maior risco de desenvolvimento destes cancros nos homens (18–20). A distribuição etária da incidência apresenta picos distintos: adultos com mais de 60 anos (21,3 casos por 100.000 pessoas-ano), crianças dos 0 aos 4 anos (3,2 casos) e adolescentes dos 10 aos 19 anos (2,3 casos) (2).

Em 2020, os tumores do SNC foram responsáveis por 4,2% da mortalidade oncológica em Portugal, correspondendo a uma taxa de 103,8 óbitos por 100.000 pessoas-ano. Observou-se uma disparidade significativa entre géneros, com uma taxa de mortalidade superior no sexo masculino (5,7 por 100.000) comparativamente ao sexo feminino (3,2 por 100.000) (2).

Considerando a relevância epidemiológica dos tumores encefálicos, é fundamental analisar não apenas a sua prevalência, mas também as características clínicas e sociodemográficas dos pacientes. Neste contexto, o presente estudo visa avaliar a prevalência de tumores encefálicos e proceder à sua caracterização clínica e sociodemográfica, bem como analisar possíveis correlações em pacientes diagnosticados e acompanhados na Unidade Local de Saúde do Algarve (ULSAL). Este estudo proporcionará uma análise mais abrangente do perfil epidemiológico dos tumores encefálicos na região do Algarve, potencialmente contribuindo para o aperfeiçoamento das estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento destas neoplasias

2. Materiais e Métodos

O presente estudo consiste numa análise observacional retrospectiva de 967 casos de tumores encefálicos. Os dados foram recolhidos no Serviço de Anatomia Patológica da ULSA, utilizando a base de dados SNOMED. A população em estudo abrange residentes do Algarve tratados pelo serviço de neurocirurgia, incluindo todas as faixas etárias, agrupadas em intervalos de 10 anos, no período de 2017 a 2020.

A metodologia envolveu a obtenção de uma lista de utentes no período especificado, seguida da caracterização do diagnóstico e informações complementares através do acesso ao Processo Clínico de cada utente no programa SClínico. Os critérios de exclusão foram: (i) utentes não diagnosticados com tumores (ii) utentes diagnosticados com tumores do SNC não encefálicos, (iii) utentes não residentes do Algarve, e (iv) tumores recidivantes. As variáveis em estudo foram divididas em 2 grupos: características sociodemográficas (idade, sexo, concelho de residência) e características clínicas (local de origem, grau histopatológico e de malignidade definido pela

combinação da característica histológica e padrão de crescimento; perfil imunohistoquímico e molecular tumoral, taxa de sobrevivência).

A análise estatística foi realizada utilizando o programa IBM SPSS Statistics versão 28 e Microsoft Excel®. Foram aplicadas técnicas de estatística descritiva para avaliar a distribuição das variáveis e inferencial para testar relações de dependência estatisticamente significativas. Utilizaram-se tabelas de frequências e o teste qui-quadrado para avaliar a relação entre variáveis qualitativas nominais e ordinais, com um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3. Resultados

Os resultados seguidamente apresentados derivam da análise de dados provenientes dos serviços de Anatomia Patológica e Neurocirurgia da ULSAL, referentes a utentes residentes no Algarve, com idades compreendidas entre os 0 e os 90 anos, no período de 2017 a 2020. De um total de 967 amostras analisadas, 278 foram incluídas no estudo de acordo com os critérios previamente estabelecidos ($n=278$), das quais 127 correspondiam a indivíduos do sexo masculino e 151 do sexo feminino. Nos tumores do SNC, foram identificados 20 tipos de tumores primários e 9 origens distintas de tumores metastáticos, com variações na prevalência relativamente ao sexo e à idade, abrangendo indivíduos dos 8 aos 88 anos.

3.1. Prevalência dos tumores por local de origem e tipo histológico

Da análise dos 278 casos incluídos no estudo, constatou-se que 246 correspondiam a tumores primários e 32 a tumores metastáticos. No que respeita aos tumores de origem primária, identificou-se um total de 98 gliomas (39,8%), 89 meningiomas (36,2%), 16 adenomas hipofisários (6,5%), 11 schwannomas (4,4%) e 11 hemangiomas cavernosos (4,1%), entre outros tipos tumorais (9%) (dados não apresentados).

Sendo os gliomas os tumores mais prevalentes, foram identificados nove tipos histológicos distintos, em conformidade com a classificação proposta pela OMS). Constatou-se que os tumores de grau IV são os mais prevalentes, sendo o glioblastoma responsável por 73.5% dos casos, que juntamente com os gliomas difusos (5,1%) totalizam 78,6% dos gliomas encontrados. Quanto aos demais graus histopatológicos, seguem-se os de grau III com 14,2%, grau II e I ambos com 3,1%. Quanto aos meningiomas, segundo tipo de tumor mais incidente, verifica-se o contrário, sendo os tumores de grau I predominantes (74,2%), seguido do grau II (18%) em que apenas o tumor atípico foi identificado, e por fim o grau III (4,5%) que inclui os tumores anaplásicos e rabdoide (Tabela 3 e Figura 1).

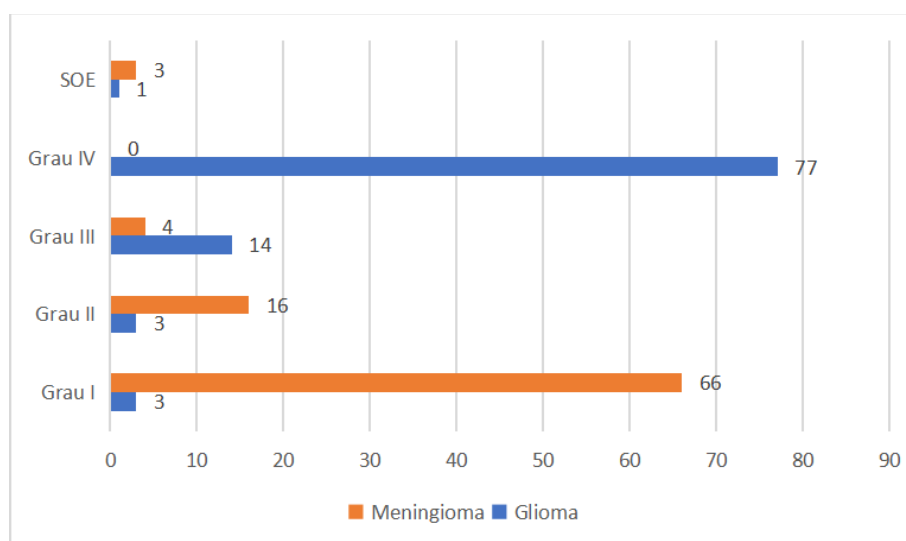


Figura 1. Frequências e percentagens da prevalência de tumores gliomas e meningiomas por grau tumoral. Gliomas segundo grau: IV - glioblastomas (73.5%) mais gliomas difusos (5,1%) totalizam 78,6% ($n=77$); III - astrocitoma anaplásico (7,1%), oligodendroglioma anaplásico (6,1%) e o xantastrocitoma anaplásico (1,0%) totalizam 14,2% ($n=14$); II - astrocitoma difuso, xantastrocitoma pleomórfico e oligodendroglioma totalizam 3,1% ($n=3$); I astrocitoma pilocítico 3,1% ($n=3$); e sem outra especificação (SOE) 1% ($n=1$). Meningiomas segundo o grau: IV – 0% ($n=0$); III – tumores anaplásicos e rabdoide 4,5% ($n=4$); II – tumor atípico

18% (n=16); I - incluem os meningiomas angiomatoso, fibroso, meningotelial, psamomatoso, secretor e transicional totalizam 74,2% (n=66); e SOE 3,4% (n=3).

No que concerne à localização anatómica, os casos analisados apresentam a seguinte distribuição: parênquima encefálico (43,1%), glândula hipofisária (6,5%), meninges (37,4%), ossos do crânio (0,8%), nervos e vasos cranianos (6,5%) e demais estruturas de suporte e anexas 0,8%). É de salientar que em 12 casos não foi possível determinar a localização específica devido à ausência de registo (dados não apresentados).

Os gliomas constituem os tumores de maior prevalência no parênquima encefálico, representando 83,9% dos casos. De acordo com a Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (CID-10), estes podem ser categorizados consoante a sua localização específica no parênquima encefálico (21). A distribuição topográfica dos gliomas apresenta a seguinte configuração: lobo temporal (C71.2) 27%, seguido de 25,8% no lobo frontal (C71.1) e 15,7% no lobo parietal (C71.3). As restantes localizações incluem: no cérebro – exceto lobos e ventrículos (C70.0), lobo occipital (C71.4), ventrículo cerebral (C71.5), cerebelo (C71.6), tronco cerebral (C71.7), lesão invasiva de dois ou mais dos locais supracitados contíguos (C71.8) e não especificado (C71.9) (Figura 2).

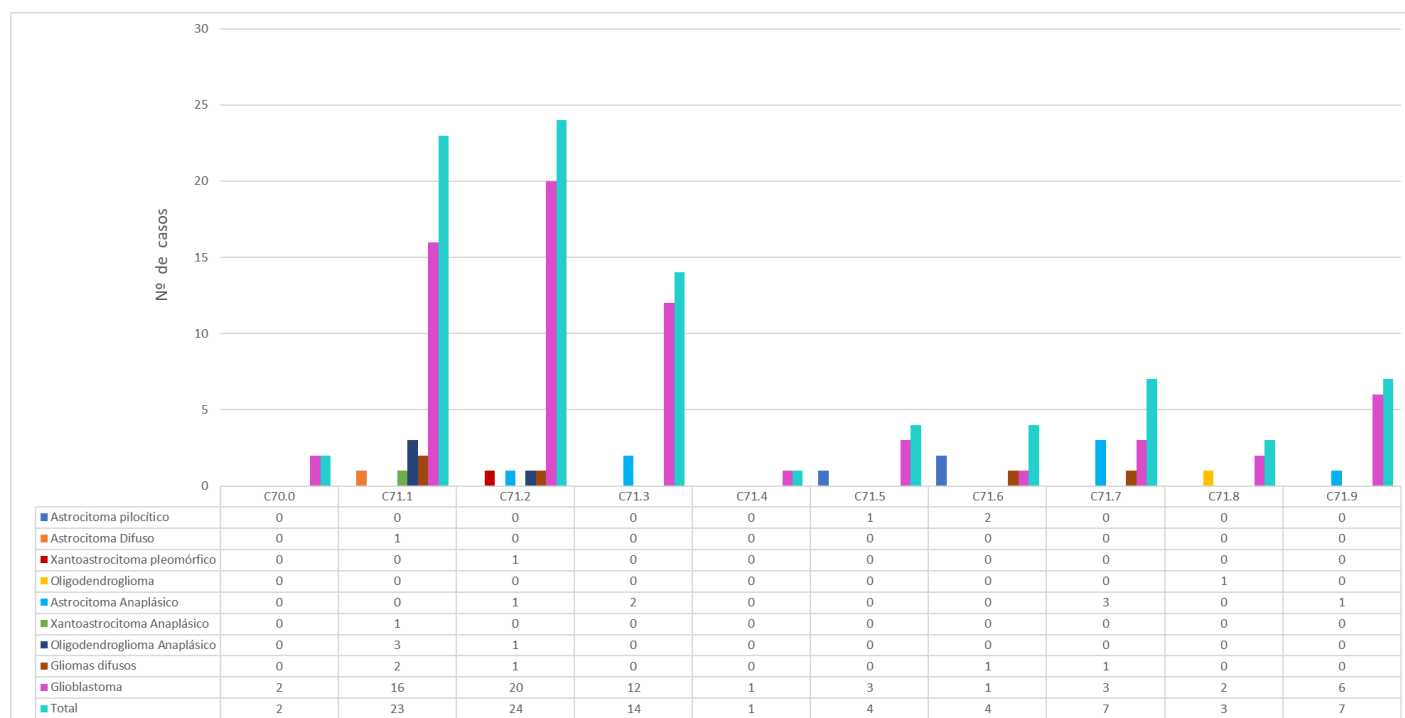


Figura 2. Frequência dos gliomas no parênquima encefálico segundo o estabelecido pela CID-10 da OMS, em: cérebro – exceto: lobos e ventrículos (C70.0), lobo frontal (C71.1), lobo temporal (C71.2), lobo parietal (C71.3), lobo occipital (C71.4), ventrículo cerebral (C71.5), cerebelo (C71.6), tronco cerebral (C71.7), lesão invasiva de dois ou mais dos locais supracitados contíguos (C71.8) e não especificado (C71.9), e entre os subtipos histopatológicos.

3.2. Prevalência por sexo nos tumores primários, metastáticos e grau tumoral

A análise dos casos apresentados revela uma distribuição assimétrica dos tumores encefálicos entre os sexos, com uma prevalência geral superior nas mulheres (54,3%) comparativamente aos homens (45,7%). No sexo feminino, observa-se uma predominância de meningiomas (43,5%), seguido dos gliomas (32%). Em contraste, no sexo masculino, os gliomas constituem a maioria dos diagnósticos (50%), seguido dos meningiomas (26,9%) (Figura 3a).

Relativamente às metástases cerebrais, estas são mais prevalentes no sexo masculino (59,4%), sendo o tumor primário de origem pulmonar responsável por 47,4% dos casos. No sexo feminino, o carcinoma mamário surge como a origem mais frequente das metástases cerebrais, correspondendo a 46,2% dos casos (Figura 3b).

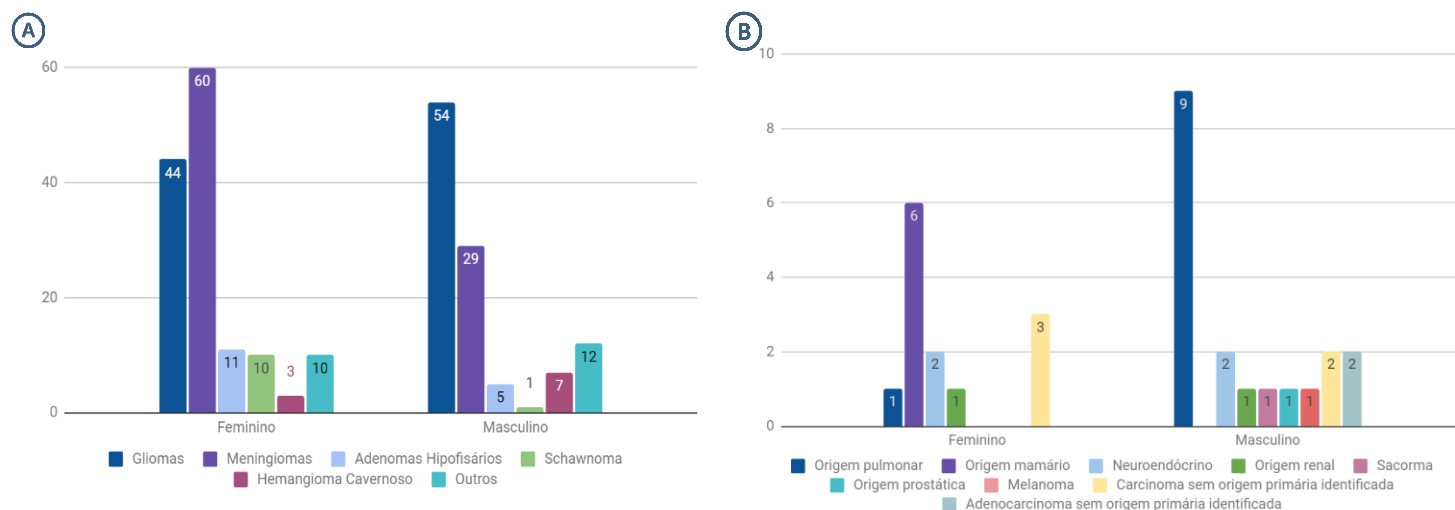


Figura 3. Frequência e percentagem dos principais tumores encefálicos primários (A) e metastáticos (B) entre os sexos feminino e masculino. A) sexo feminino: meningiomas 43,5% (n=60), gliomas 32% (n=44), adenomas hipofisários 8% (n=11), schwannoma 7,2% e outros 7,2% (n=10, respetivamente) e hemangioma cavernoso 2,1% (n=3); sexo masculino: gliomas 50% (n=54), meningiomas 26,9% (n=29), outros 11,1% (n=12), hemangioma cavernoso 6,5% (n=7), adenomas hipofisários 4,6% (n=5) e schwannoma 0,9% (n=1). B) sexo feminino: origem mamária 46,2% (n=6), carcinoma sem origem primária identificada 23,1% (n=3), seguido de neuroendócrino 15,4% (n=2); sexo masculino: origem pulmonar 59,4% (n=9), seguido de neuroendócrino, carcinoma e adenocarcinoma sem origem primária identificada, 10,5% para cada (n=2, para cada).

Uma análise mais aprofundada dos meningiomas revela uma prevalência superior de meningiomas de grau I no sexo feminino, correspondendo a 86,7%, seguida de 11,7% no grau II, sem ocorrências de grau IV. Por outro lado, no sexo masculino, observa-se uma distribuição mais equilibrada, com 49,3% no grau I, 31% no grau II e 10,4% nos graus III e IV. No que concerne aos gliomas, ambos os sexos apresentam uma predominância de tumores de grau IV. Contudo, é de salientar que no sexo feminino o grau IV representa 70,5% dos casos, seguido de 25% no grau III, enquanto no sexo masculino o grau IV é preponderante, correspondendo a 85,2% dos casos (Figura 4).

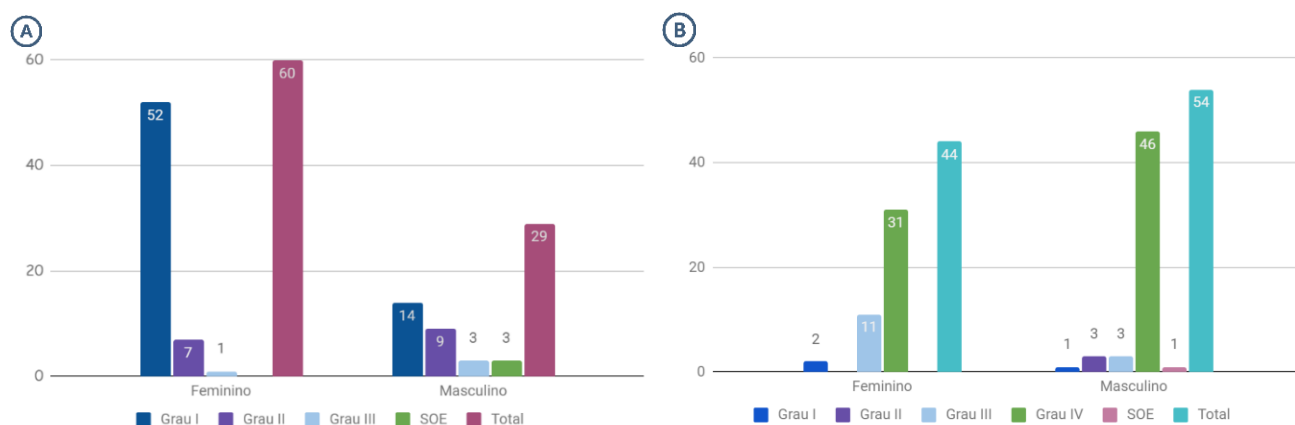


Figura 4. Frequência dos meningiomas (A) e gliomas (B) entre os sexos e de acordo com o grau tumoral. A) sexo feminino: grau I 86,7% (n=52), grau II 11,7% (n=7), grau III 1,7% (n=1) e grau IV 0% (n=0); sexo masculino: grau I 49,3% (n=14), grau II 31% (n=9), grau III e IV 10,4% em cada (n=3, respetivamente). B) sexo feminino: grau I 4,5% (n=2), grau II 0% (n=0), grau III 25% (n=11) e grau IV 70,5% (n=31); sexo masculino: grau I 1,9% (n=1), grau II e III 5,5% em cada (n=3, respetivamente), grau IV 85,2% (n=46) e SOE 1,9% (n=1).

3.3. Prevalência por faixa etária nos tumores primários, metastáticos e grau histopatológico

Foram observados tumores primários principalmente entre os 51 e os 70 anos, com 24,7% dos indivíduos positivos entre os 51 e os 60 anos e 26,8% entre os 61 e os 70 anos. Relativamente à distribuição dos indivíduos por faixa etária entre os sexos, verifica-se que há uma maior prevalência entre as mulheres na faixa dos 51 aos 60 anos (30,4%), enquanto nos homens a prevalência é maior entre os 61 e os 70 anos (32,4%) (dados não apresentados).

Relativamente aos tipos histopatológicos identificados nas diferentes faixas etárias, observou-se que os gliomas são mais prevalentes entre os 61 e os 70 anos (13%; n=32), seguidos pela faixa dos 51 aos 60 anos (10%; n=25). Por outro lado, os meningiomas apresentam uma maior frequência nas faixas etárias de 51 a 60 anos e de 71 a 80 anos, com uma prevalência de 10% em cada (n=25 em cada) (Figura 5).

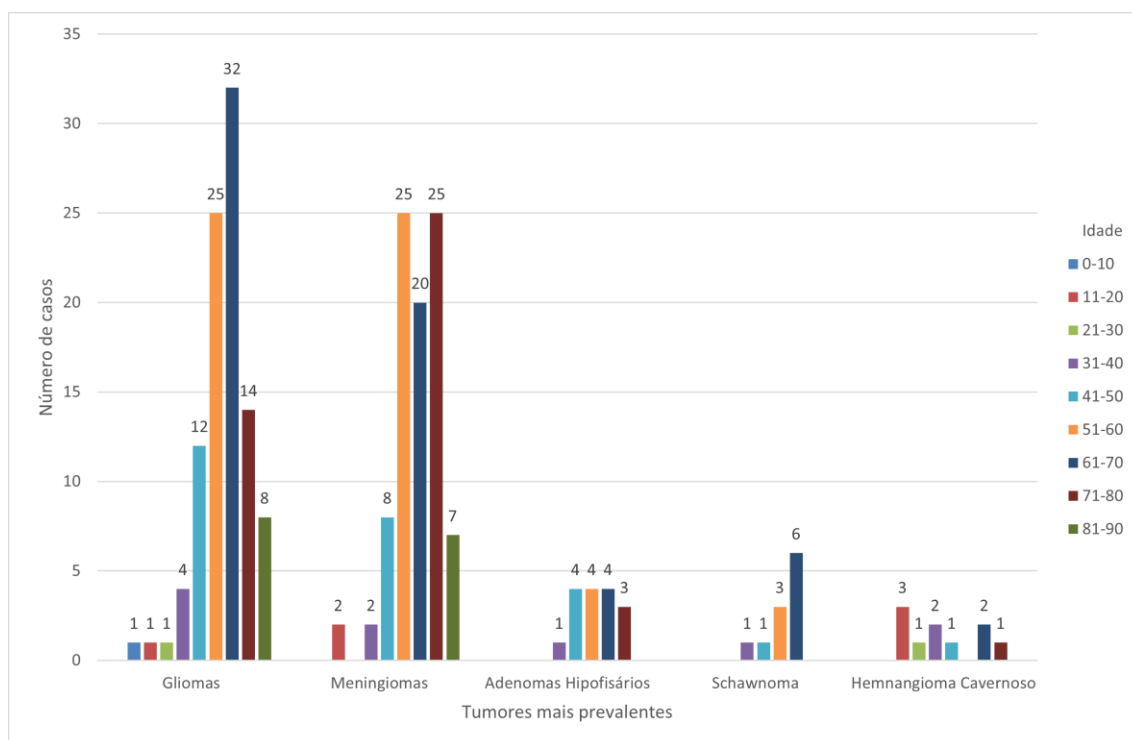


Figura 5. Distribuição em função da faixa etária e dos cinco tumores primários mais prevalentes: glioma, meningioma, adenoma hipofisário, schwannoma e hemangioma cavernoso. Nos gliomas e schwannomas, a faixa etária mais prevalente é a dos 61-70 anos (n=32 e n=6, respetivamente). Nos meningiomas, as faixas etárias de 51-60 anos e de 71-80 anos apresentam uma distribuição igualitária (n=25 em cada). Os adenomas distribuem-se uniformemente entre as faixas etárias de 41-70 anos (n=4 em cada). Já nos hemangiomas cavernosos, a faixa etária mais prevalente é a dos 11-20 anos (n=3).

Quanto às metástases cerebrais, estas são mais frequentes nas faixas etárias dos 51-60 anos (31,3%), seguidas dos 71-80 anos (21,9%). Não foram registados casos antes dos 20 anos ou após os 81 anos. Destaca-se que os tumores de origem pulmonar, os mais prevalentes, estão distribuídos principalmente nas faixas etárias dos 71-80 anos (n=4; 40%) e dos 41-50 anos (n=3; 30%). No que respeita ao segundo tumor mais frequente, de origem mamária, este encontra-se distribuído principalmente entre as faixas etárias dos 31-40 anos e dos 51-60 anos (33,3% cada; n=2 cada) (Figura 6).

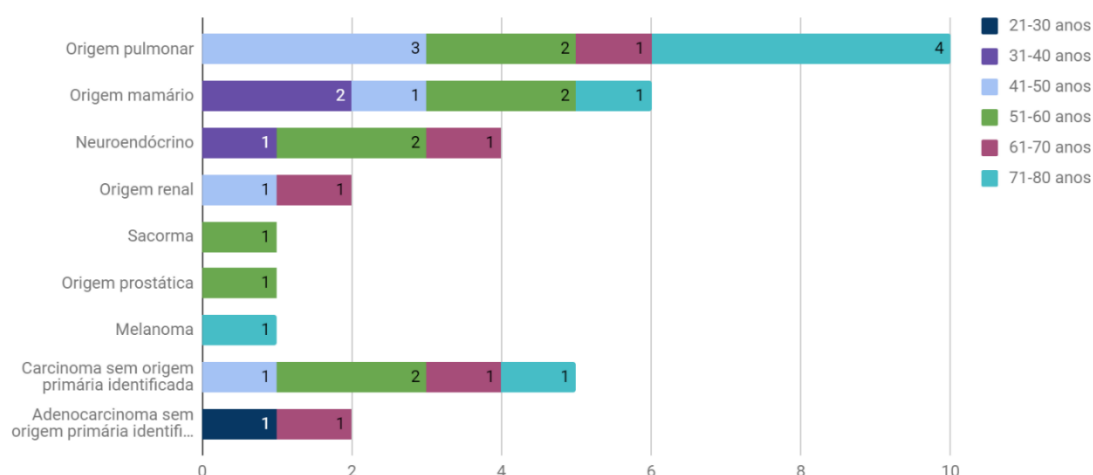


Figura 6. A distribuição dos casos metastáticos, agrupados por faixas etárias de 10 em 10 anos (n=32), revela as seguintes prevalências: 71-80 anos (21,9%, n=7); 61-70 anos (15,6%, n=5); 51-60 anos (31,3%, n=10); 41-50 anos (18,75%, n=6); 31-40 anos (9,4%, n=3); e 21-30 anos (3,1%, n=1). Não foram observados casos de metástases antes dos 20 anos ou após os 81 anos.

3.4. Taxa de sobrevivência e mortalidade

Com base nos dados recolhidos dos relatórios clínicos, constatou-se que, ao longo dos quatro anos de acompanhamento, 122 dos 278 indivíduos validados não sobreviveram (43,9%). As causas de morte foram atribuídas a tumores primários em 90 casos, a tumores metastáticos em 21 casos e a outras causas em 11 casos. Consequentemente, observou-se uma taxa de sobrevivência de 56,1% entre os diagnosticados com cancro encefálico. No entanto, nota-se que os tumores metastáticos apresentam uma taxa de mortalidade significativamente mais elevada em comparação com os tumores primários, com uma taxa de mortalidade de 65,6% para os indivíduos com metástases identificadas e de 36,6% para os tumores primários.

Relativamente à relação entre a sobrevivência e os tumores primários mais incidentes, observou-se que nos gliomas a taxa de sobrevivência foi de apenas 28% (excluindo cinco óbitos por outras causas), sendo o glioblastoma de grau IV responsável pela maior taxa de mortalidade, representando 85% de todos os gliomas (n=57). Por outro lado, os meningiomas apresentaram uma taxa de sobrevivência significativamente mais elevada, com 83,7% dos casos (excluindo três óbitos resultantes de outras causas), sendo o meningioma atípico identificado como tendo a maior taxa de mortalidade, correspondendo a 5,8% de todos os meningiomas e 31,3% dos casos de meningiomas atípicos. Quanto aos demais tumores mais prevalentes, verificou-se que os hemangiomas cavernosos apresentaram 100% de sobrevivência entre os casos diagnosticados, os schwannomas com 81,8% e os adenomas hipofisários com 81,3% (Figura 7).

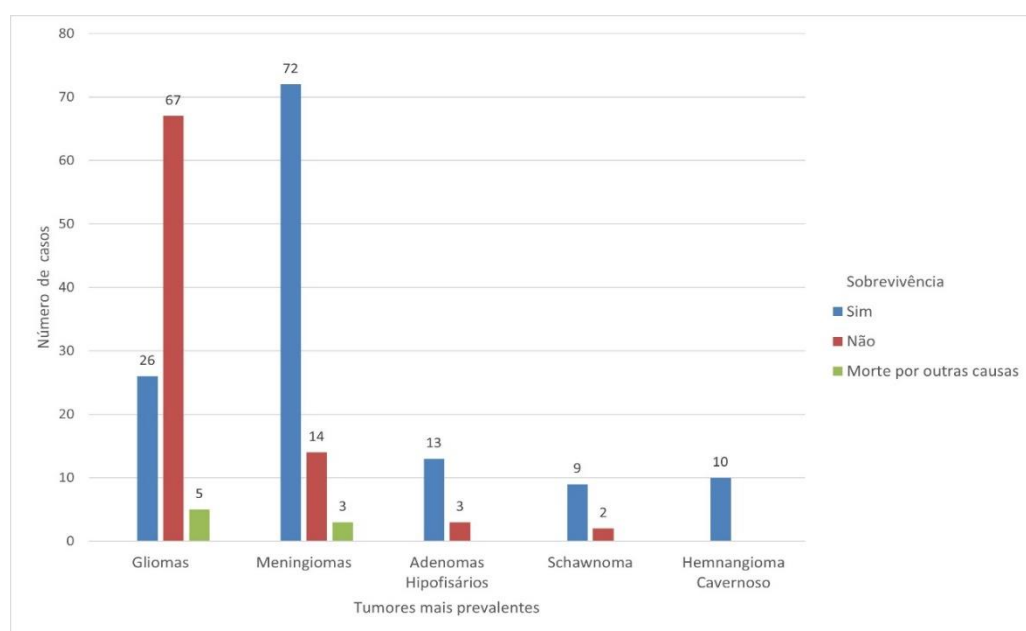


Figura 7. Taxa de Mortalidade dos 5 tumores primários mais prevalentes. Gliomas 72% (n=67); meningiomas 16,3% (n=14); adenomas hipofisários 18,8% (n=3); schwannoma 18,2% (n=2) e hemangioma cavernoso 0% (n=0).

Quanto ao período de sobrevivência médio entre os casos de óbito em indivíduos diagnosticados com gliomas, observou-se uma maior incidência no período inferior a 1 ano (n=47; 66,2%), seguido de 1 ano (n=19; 26,8%). É de salientar que apenas 5,6% dos pacientes sobreviveram 2 anos após o diagnóstico e 1,4% atingiram os 3 anos de sobrevivência. No que concerne aos meningiomas, constatou-se que a esperança de vida após o diagnóstico foi igualmente inferior a 1 ano (n=8; 47,1%). Contudo, quando se analisa a expectativa de sobrevivência de 3 anos, os meningiomas apresentam uma taxa de 23,6% (n=4) dos casos de óbito observados (tabela 1).

Tabela 1. Distribuição do tempo médio de sobrevivência dos gliomas e meningiomas.

		Tempo de Sobrevivência			
		< 1 ano	1 ano	2 anos	3 anos
Gliomas	Astrocitoma Pilocítico	1	0	0	0
	Astrocitoma Anaplásico	6	0	0	0
	Oligodendroglioma Anaplásico	1	1	0	0
	Glioblastoma	39	18	4	1
Meningiomas	Angiomatoso	0	0	1	0
	Fibroso	2	0	0	0
	Meningotelial	1	0	1	0
	Secretor	0	1	0	0
	Transicional	2	0	0	2
	Atípico	2	1	1	1
	Anaplásico	0	0	0	1
	Rabdóide	1	0	0	0
Total		55	21	7	5

A taxa de mortalidade mais elevada provém das metástases (65,6%; n=21), sendo os tumores de origem pulmonar responsáveis por 38,1% (n=8) dos casos de óbito por metástases. Em contrapartida, a metástase mamária apresenta uma taxa de sobrevivência significativa (83,3%). No que concerne ao período de sobrevivência, 6 dos 10 casos de óbito por metástase pulmonar

ocorreram em menos de 1 ano após o diagnóstico e 2 no prazo de 1 ano. O mesmo padrão observa-se nos carcinomas, em que 4 óbitos ocorreram em menos de 1 ano após o diagnóstico (dados não demonstrados).

No que diz respeito à taxa de sobrevivência e à distribuição por sexo, verificou-se que as mulheres apresentaram uma taxa de sobrevivência superior, com 65% das 151 mulheres incluídas no estudo, em comparação com 48,1% dos 129 homens observados. Relativamente ao tempo de sobrevivência, a maioria dos óbitos ocorreu num período inferior a um ano, correspondendo a 54% (n=34) das mortes nos homens e 62,5% (n=30) nas mulheres. Contudo, a percentagem total de casos de morte com duração igual ou inferior a um ano é mais elevada nos homens, atingindo 92,1%, em contraste com 83,3% nas mulheres (Figura 8a). Adicionalmente, na análise do tempo de sobrevivência entre as faixas etárias incluídas no estudo, constatou-se a ocorrência de óbitos devido à doença a partir dos 21 anos, sendo significativamente elevada na faixa dos 61-70 anos, com 35 mortes (taxa de mortalidade de 31,5%). Entre todos os casos de óbito, o tempo de sobrevivência mais frequente é inferior a um ano (57,7%; n=64), sendo particularmente evidente na faixa etária dos 61-70 anos, correspondendo a 71,4% das mortes registadas, tanto por tumores encefálicos primários como por metastáticos (Figura 8b).

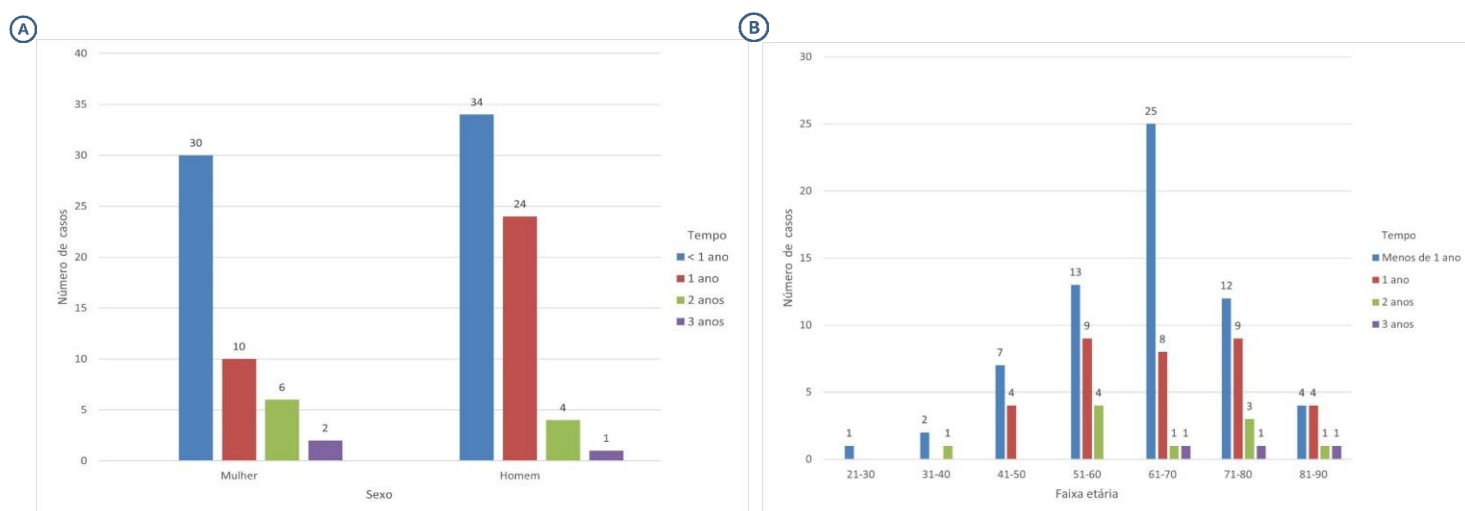


Figura 8. Frequência e percentagem do tempo de sobrevivência segundo o sexo (A) e a faixa etária (B). A) sexo feminino: < 1 ano 62,5% (n=30), 1 ano 20,8% (n=10), 2 anos 12,5% (n=6) e 3 anos 4,2% (n=2); sexo masculino: < 1 ano 54% (n=34), 1 ano 38,1% (n=24), 2 anos 6,3% (n=4) e 3 anos 1,6% (n=1). B) faixa etária 21-30: < 1 ano 0,9% (n=1); 31-40: < 1 ano 1,8% (n=2) e 2 anos 0,9% (n=1); 41-50: < 1 ano 6,3% (n=7) e 1 ano 3,6% (n=4); 51-60: < 1 ano 11,7% (n=13), 1 ano 8,1% (n=9) e 2 anos 3,6% (n=4); 61-70: < 1 ano 22,5% (n=25), 1 ano 7,2% (n=8), 2 anos e 3 anos 0,9% cada (n=1 cada); 71-80: < 1 ano 10,8% (n=12), 1 ano 8,1% (n=9), 2 anos 2,7% (n=3) e 3 anos 0,9% (n=1); 81-90: < 1 ano e 1 ano 3,6% cada (n=4 cada), 2 anos e 3 anos 0,9% cada (n=1 cada).

3.5. Marcadores moleculares

No âmbito dos marcadores moleculares, observou-se uma elevada heterogeneidade, particularmente nos gliomas, meningiomas e adenomas hipofisários, sendo estes os mais prevalentes e, consequentemente, analisados com maior detalhe.

Nos gliomas, os marcadores moleculares investigados foram: Ki-67, p53, GFAP, IDH1, ATRX e co-deleção 1p19q. No que concerne ao marcador Ki-67, verificou-se que 27% (n=24) dos casos apresentavam um índice de marcação elevado, sendo maioritariamente glioblastomas (83,3%; n=20). Quanto aos restantes marcadores, observou-se que a mutação no gene p53 estava presente em 48,3% (n=42), o GFAP em 97,5% (n=77), o IDH1 em 12,2% (n=9), o ATRX em 93,8% (n=45) e a co-deleção 1p19q em 60% (n=3) dos casos analisados. É de salientar que, relativamente aos marcadores GFAP e ATRX, a maioria dos casos positivos foram identificados em glioblastomas, correspondendo a 57 (74%) e 32 (71%) casos, respetivamente (tabela 2).

No que diz respeito aos meningiomas, os marcadores moleculares analisados foram: Ki-67, recetor de progesterona (PR) e o marcador de células endoteliais CD34. Relativamente ao marcador Ki-67, constatou-se que 100% (n=62) dos casos apresentavam um índice de marcação reduzido. Quanto aos restantes marcadores, 94,7% (n=18) expressavam PR, enquanto apenas 12,5% (n=1) expressavam o CD34 (Tabela 2).

No que concerne aos adenomas hipofisários, os marcadores moleculares avaliados foram: Ki-67, que apresentou 100% (n=16) de índice de marcação reduzido; prolactina positiva em 7% (n=1); hormona estimulante da tiroide (TSH) e hormona luteinizante (LH) positivas em 13,3% cada (n=2 cada); hormona folículo-estimulante (FSH) positiva em 26,7% (n=4); hormona de crescimento (GH) positiva em 18,8% (n=3); hormona adrenocorticotrófico (ACTH) positiva em 6,3% (n=1); e recetores de estrogénio (RE) positivos em 75% (n=3). É importante salientar que a análise dos RE foi realizada apenas em 4 casos (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos marcadores moleculares nos gliomas, meningiomas e adenomas hipofisários.
*para o Ki-67 positivo refere índice marcação elevado (>30%) e negativo a índice marcação baixo (<30%)

Marcadores avaliados		Positivo (n;%)	Negativo (n;%)	Total (n)
Gliomas	Ki-67	24 (27%)*	65 (73%)*	89
	p53	42 (48,3%)	45 (51,3%)	87
	GFAP	77 (97,5%)	2 (2,5%)	79
	IDH1	9 (12,2%)	65 (87,8%)	74
	ATRX	45 (93,8%)	3 (6,2%)	48
	co-deleção 1p19q	3 (60%)	2 (40%)	5
Meningiomas	Ki-67	0 (0%)*	62 (100%)*	62
	PR	18 (94,7%)	1 (5,3%)	19
	CD34	1 (12,5%)	7 (87,5%)	8
Adenomas hipofisários	Ki-67	0 (0%)*	16 (100%)*	16
	Prolactina	1 (7%)	13 (97%)	14
	TSH	2 (13,3%)	13 (86,7%)	15
	LH	2 (13,3%)	13 (86,7%)	15
	FSH	4 (26,7%)	11 (73,3%)	15
	GH	3 (18,8%)	13 (81,2%)	16
	ACTH	1 (6,3%)	15 (93,7%)	16
	RE	3 (75%)	1 (25%)	4

4. Discussão

No presente estudo, em consonância com investigações similares, os tumores mais prevalentes foram os gliomas (39,8%), seguidos pelos meningiomas (36,2%) e adenomas hipofisários (6,5%). Estes dados sugerem que a prevalência destes tumores primários se mantém constante ao longo dos anos, não só em Portugal, mas também noutros países europeus (22,23), na América do Norte e do Sul (24,25), e na Ásia (26,27). Adicionalmente, todas as investigações comparativas corroboram as observações relativas aos glioblastomas, indicando que este é o subtipo mais prevalente entre os gliomas e, isoladamente, o terceiro tumor primário mais comum, sendo superado apenas pelos meningiomas e adenomas (1,2,11,22). A elevada prevalência dos gliomas pode ser atribuída à sua origem nas células gliais, que constituem aproximadamente metade da massa encefálica total. Assim como, a alta taxa mitótica destas células que aumenta a probabilidade de desenvolvimento carcinogénico, na qual a não reparação de mutações genéticas culmina num processo neoplásico descontrolado (28,29).

Dos tumores encefálicos primários identificados, constatou-se que a maioria dos casos (43,1%) se localizava no parênquima encefálico, seguido das meninges (37,4%) e da glândula hipofisária (6,5%). Do mesmo modo, a distribuição topográfica observada é consistente com os resultados de outros estudos relacionados, em que pode ser explicada pela correspondência entre a localização tumoral e a origem carcinogénica dos tipos mais prevalentes: os gliomas desenvolvem-se predominantemente no parênquima cerebral, os meningiomas têm origem nas meninges, e os adenomas hipofisários surgem na glândula hipófise. Esta correlação anatómica-patológica reforça a importância da compreensão da histogénese tumoral na abordagem diagnóstica e terapêutica das neoplasias do SNC (11,27).

Quanto aos tumores no parênquima encefálico identificados, verificou-se que 26,9% localizavam-se no lobo temporal, 24,0% no frontal e 14,4% no parietal, seguindo-se a distribuição para

os tumores malignos. No que concerne aos gliomas, verifica-se uma predominância significativa de tumores localizados no parênquima cerebral, representando 83,9% dos casos. A distribuição topográfica destes tumores apresenta um padrão consistente, com 27% dos casos identificados no lobo temporal, 25,8% no lobo frontal e 15,7% no lobo parietal. É de salientar que, entre os tumores malignos observados, os glioblastomas constituem uma proporção substancial, correspondendo a 83,3% dos casos. Embora outros estudos também identifiquem os gliomas como os tumores mais prevalentes do parênquima cerebral, observam-se diferenças significativas na sua distribuição topográfica (11,26,27). No presente estudo, a diferença de prevalência entre os tumores no lobo temporal e frontal é de apenas 2,9%, contrastando com discrepâncias mais acentuadas reportadas noutras investigações (23,25,27). Esta observação suscita a hipótese de que uma amostra populacional mais ampla poderia evidenciar uma maior prevalência no lobo frontal, dada a sua maior extensão anatómica (28). É igualmente relevante notar que, tanto no presente estudo como nos demais analisados, o lobo occipital apresenta consistentemente a menor prevalência de tumores encefálicos o que pode ser correlacionado com o fato de ser o menor lobo cerebral (11,26,27). Estas observações sublinham a importância de considerar não apenas a prevalência global dos tumores, mas também a sua distribuição específica nos diferentes lobos cerebrais.

Em contraste com os dados nacionais apresentados pelo Globocan e com as observações realizadas em 2018 para a região do Algarve, o presente estudo revela uma prevalência superior de tumores primários no sexo feminino. Esta discrepância é significativa, com um aumento de aproximadamente 10% nos diagnósticos em mulheres (2). Esta tendência alinha-se com os estudos observados na Europa (22,23) e Ásia (26,27), divergindo, contudo, dos dados apresentados na América, onde se verifica uma maior prevalência masculina (30). Diversos fatores podem contribuir para esta disparidade, como aspetos culturais relacionados com o género, como a maior propensão das mulheres para procurar cuidados de saúde, a exposição mais frequente a tratamentos hormonais e a campos eletromagnéticos, frequentemente associados aos programas de rastreio do cancro da mama (23). É importante salientar que, apesar destas variações, a taxa ajustada mundial em 2020 ainda indica uma maior incidência de diagnósticos de tumores do SNC no sexo masculino (2).

No que concerne à distribuição dos tumores primários mais prevalentes entre os sexos, observa-se uma concordância com outros estudos na área. Verifica-se uma predominância de meningiomas no sexo feminino (43,5%), enquanto no sexo masculino os gliomas são mais frequentes (50%) (22-27). Do mesmo modo, nota-se que tumores primários benignos prevalecem nas mulheres, uma vez que os meningiomas mais incidentes são do tipo meningioma transicional (benigno), enquanto os tumores malignos prevalecem nos homens, sendo o glioblastoma o principal com 80% dos casos. Essa distribuição, poderá estar associada a alguns fatores de risco observados recentemente na área de neurooncologia, sugerindo que os meningiomas estão relacionados com a estimulação hormonal de estrogénios, progesterona e androgénios, pelos quais também levam a acreditar numa correlação dos meningiomas com cânceros de mama (31,32). Entre os marcadores moleculares que serão abordados posteriormente, destacam-se os recetores de estrogénio como indicadores de prognóstico e alvos terapêuticos. A relevância destes recetores é corroborada pela remissão observada em casos de meningiomas múltiplos após a administração de antagonistas do estrogénio. Inclusive, é possível verificar que a diferença no rácio mulher:homem para os meningiomas deixa de ser significativa e, talvez até inverta-se, no período pré-puberdade, embora os meningiomas nessa idade sejam muito raros (33,34). Quanto aos gliomas serem mais incidentes em homens, pondera-se relacionar com o fato de esses tumores terem sua oncogénese diretamente associada a mecanismos de mutação genética, principalmente o glioblastoma, e estas serem mais prevalentes em homens do que em mulheres, com herança familiar epigenética associada (35).

Segundo dados da Globocan em 2020 e consoante o presente estudo, os tumores encefálicos são mais prevalentes em adultos acima dos 60 anos, sendo 26,8% dos casos entre os 61 e 70 anos, no qual somando-se à faixa dos 51 a 60 anos totalizam 51,5% dos casos (2). Este resultado é comum ao estudo realizado na Espanha (22); na França (23), e nos EUA (11,18). Entretanto, nos estudos asiáticos, o pico de incidência é abaixo dos 50 anos (26,27). Tais diferenças tendem a ser explicadas pela pirâmide etária invertida, observada principalmente na Europa, sendo Portugal um dos países com maior população idosa, enquanto na Ásia prevalece a população jovem. Como exemplo, no Qatar em 2019 a distribuição etária contava com apenas 1,1% da população acima dos 65 anos, enquanto nos EUA contava com 16,21%, assim como em Portugal, com 22,15% da população acima dos 65 anos (6,30). Adicionalmente, é de salientar o crescente enfoque no bem-

estar da população geriátrica (65+) e os avanços significativos nas tecnologias médicas de imagem e molecular complementares para o diagnóstico dos tumores encefálicos na Europa e América, permitiram aumentar o número de consultas, rastreios e sensibilidade de diagnóstico nessa faixa etária (6,23), aumentando o número de diagnosticados. Entre essas faixas etárias, tanto os meningiomas como os glioblastomas aumentam a sua frequência com o avançar da idade, sendo que os meningiomas apresentam uma prevalência mais elevada a partir dos 65 anos, enquanto os glioblastomas evidenciam um pico de incidência em indivíduos com idade superior a 75 anos (22–27). Do mesmo modo, o presente estudo verificou que os gliomas foram mais prevalentes acima dos 61 anos, sendo o glioblastoma responsável por 32% dos tumores diagnosticados, enquanto os meningiomas se distribuíram igualmente entre os 51-60 e 71-80 anos. Dessa forma, além da distribuição territorial por faixa etária populacional, observa-se que a oncogénese é predominantemente um processo lento e de diagnóstico tardio quando se trata de tumores encefálicos. Isso pode ser atribuído à dificuldade de deteção, especialmente nos casos de glioblastomas que apresentam uma histologia complexa com infiltração tecidual adjacente (37). Adicionalmente, em idades mais avançadas, a resposta imunológica torna-se menos eficiente, resultando em menor controlo de falhas na replicação celular e, consequentemente, favorecendo a oncogénese. Algumas mutações hereditárias associadas à predisposição para o cancro, como as detetadas nos genes IDH1 e IDH2 em pacientes com glioblastomas, estão relacionadas a uma idade de diagnóstico significativamente mais jovem (44 anos), enquanto aqueles sem estas mutações têm uma média de 62 anos. Adicionalmente, certas síndromes hereditárias foram identificadas como fatores de risco para o desenvolvimento destes tumores; contudo, apenas cerca de 1% dos pacientes com tumores encefálicos primários apresentam alguma destas síndromes (6,16,30,36).

No que concerne à taxa de mortalidade dos tumores encefálicos, o presente estudo corrobora a elevada taxa de mortalidade associada a estas neoplasias, sendo responsáveis por 2,4% de todas as mortes por cancro em Portugal (2). No conjunto de casos identificados neste estudo, a taxa de mortalidade global foi de 43,9%, destacando-se as metástases cerebrais com 65,6% dos casos. Em relação a taxa de mortalidade associada aos tumores primários (36,6%), identifica-se uma maior taxa relacionada com os gliomas (72%), especificamente os glioblastomas (85%), enquanto os meningiomas apresentam a menor taxa de mortalidade com apenas 16,3%, dado a maioria ter sido identificado como benigno. Estes resultados obtidos estão em consonância com investigações realizadas noutros países europeus e na América, pois demonstram que aproximadamente 90% dos casos de meningiomas, predominantemente benignos, apresentam uma taxa de sobrevivência superior a 5 anos após o diagnóstico. Em contrapartida, menos de 15% dos pacientes diagnosticados com glioblastomas sobrevivem além dos 5 anos subsequentes ao diagnóstico (24,25,38).

No que concerne à taxa de sobrevivência entre sexo, constata-se que os indivíduos do sexo feminino apresentam uma maior esperança de vida após o diagnóstico de neoplasias encefálicas, comparativamente aos do sexo masculino, corroborando observações prévias neste âmbito (24,25,38,39). O que pode ser correlacionado com o fato de os meningiomas serem mais prevalentes nas mulheres e esses, maioria benignos, terem maior taxa de sobrevivência, para além da prevalência de graus tumorais mais baixos associados, ao contrário dos homens em que prevalece o glioblastoma, de maior grau e maligno. Independente disso, as mulheres comprovam ter maior sobrevivência mesmo quando comparado com homens no diagnóstico de tumores primários malignos, podendo-se atribuir à menor prevalência de comorbidades, maior aceitação da doença e procura à tratamentos, assim como, maior resistência à doença (40).

As neoplasias metastáticas, em contraposição às neoplasias primárias, apresentaram uma incidência reduzida no presente estudo, compreendendo apenas 32 casos (11,5%), o que limita a obtenção de significância estatística na sua análise. Não obstante, na amostra obtida, constata-se que, em consonância com investigações anteriores, os indivíduos com cancro do pulmão evidenciam uma maior prevalência de metástases encefálicas diagnosticadas. Esta constatação poderá ser atribuída ao facto de a maioria dos doentes com neoplasia pulmonar ser habitualmente submetida a rastreio de metástases encefálicas, contrariamente ao que se verifica com outras neoplasias primárias (42–44).

No âmbito dos marcadores moleculares, verifica-se que, num contexto generalista, mais de 90% dos casos de neoplasias estudados por imunohistoquímica apresentam a determinação da expressão do gene Ki-67 como importante marcador nuclear relacionado com a proliferação de células tumorais. A sua expressão revelou-se inversamente proporcional ao prognóstico dos doentes, sendo que quanto maior o índice de marcação (>30%), mais avançado se encontra o processo neoplásico e metastático, traduzindo-se num prognóstico mais desfavorável (45). No

presente estudo, corrobora-se esta observação, constatando-se que 20 dos 24 glioblastomas avaliados apresentavam um índice de marcação Ki-67 alto. Em contrapartida, ao analisar-se a expressão nos adenomas e meningiomas, observa-se um índice de marcação Ki-67 baixo, um resultado expectável, dado que estas neoplasias estão geralmente associadas a um comportamento benigno, correlacionando-se com uma taxa de sobrevivência mais elevada (37).

No que concerne aos gliomas, a literatura científica atual destaca como marcadores moleculares mais validados no âmbito da neurooncologia, especificamente para os tumores cerebrais primários: 1) a mutação do gene GFAP; 2) a co-deleção 1p/19q; 3) as mutações IDH1/2; e 4) a identificação de mutações associadas a vias de sinalização específicas (29,47). A sobreexpressão do GFAP foi observada maioritariamente nos glioblastomas, podendo ser correlacionado à sua maior proliferação celular, assim como do envolvimento de mais células gliais. No entanto, também foi nos glioblastomas onde tiveram resultados negativos, o que pode ser explicado pela heterogeneidade tumoral, nem sempre de células gliais, mas com origem em diferentes células encefálicas com diferentes estágios de diferenciação (29,37,46).

A co-deleção 1p/19q é identificada em aproximadamente 80% dos oligodendrogliomas, frequentemente associada à mutação IDH1/2 (50-52). Nos casos em que esta marcação é positiva, considera-se um indicador de prognóstico favorável em termos de sobrevivência, sendo a mutação IDH1 co-presente em 65% dos casos e a IDH2 em 3% (48,49). No presente estudo, devido à dimensão reduzida da amostra, não foi possível corroborar estatisticamente estas observações. Não obstante, verifica-se que 50% dos casos IDH1/2 positivos concentram-se nos oligodendrogliomas, assim como 67% dos casos com co-deleção 1p/19q identificada.

No que concerne ao ATRX, trata-se de uma mutação epigenética que altera a remodelação da cromatina para a expressão génica, sendo predominantemente identificada em glioblastomas secundários, resultante de uma série de mutações não reparadas (53). Esta alteração foi observada na maioria dos tumores diagnosticados, com uma prevalência de 71,1% nos glioblastomas, sugerindo uma preponderância de casos secundários. Relativamente à mutação p53, embora frequentemente positiva nos casos diagnosticados, particularmente nos glioblastomas (associada diretamente a uma maior agressividade tumoral), não é possível estabelecer um padrão consistente na sua pesquisa. Esta dificuldade deve-se à variabilidade na origem da mutação, bem como à possibilidade de alterações não diretamente no gene e proteína TP53, mas nas vias de sinalização associadas (54).

Relativamente aos adenomas hipofisários, não obstante a glândula hipófise ser uma estrutura endócrina que tecnicamente não integra o encéfalo, atualmente considera-se que os tumores dela originários são encefálicos, representando aproximadamente 10% dos tumores cerebrais primários (55), em consonância com o verificado no presente estudo. A literatura científica indica que, de entre os adenomas hipofisários, 30% são gonadotróficos, maioritariamente não funcionantes, e apenas 1% são tirotróficos, sendo estes predominantemente funcionantes (55,56). Apesar da limitação da amostra para obtenção de significância estatística, constatou-se que 31,3% dos adenomas foram classificados como gonadotróficos, sendo que cinco destes foram categorizados apenas como não funcionantes, sem especificação adicional.

Os meningiomas não apresentam um marcador específico, podendo expressar uma série de recetores potencialmente promotores de crescimento, incluindo PR, GH e VEGF. Estes e outros recetores constituem alvos potenciais para quimioterapia. Consequentemente, as terapias anti-progesterona e antiangiogénicas são atualmente as mais utilizadas, direcionadas a pacientes com meningioma que expressam PR e CD34 positivos, justificando assim a pesquisa imunohistoquímica observada (57). A expressão de um ou ambos os marcadores poderá estar relacionada com um prognóstico mais favorável, pelo qual no presente estudo observou-se que a positividade destes marcadores era predominante em meningiomas de baixo grau, sendo a negatividade associada ao meningioma anaplásico, já considerado maligno. Contudo, devido à limitação da amostra, não foi possível estabelecer uma significância estatística para esta associação.

5. Conclusões

O presente estudo, abrangendo 278 amostras, permitiu concluir que, em consonância com os dados mundiais e europeus, na região do Algarve, especificamente entre os utentes diagnosticados na ULSAL entre 2017 e 2020, os tumores mais prevalentes foram os gliomas, meningiomas e adenomas hipofisários. No que diz respeito aos gliomas, predominaram os tumores malignos de grau mais elevado, sendo o glioblastoma responsável por 73,5% dos casos. Por outro lado, nos

meningiomas, prevaleceram os tumores benignos de menor grau, destacando-se o meningioma transicional, que representou 40,4% dos casos.

Contrariamente aos estudos realizados em 2018 no Algarve e em 2020 pelo Globocan, a presente análise revelou uma maior prevalência de casos femininos. No entanto, observou-se uma semelhança no que diz respeito à faixa etária predominante, com maior incidência em indivíduos idosos (acima dos 60 anos). A taxa de mortalidade, conforme previsto, apresenta-se mais elevada em homens, particularmente naqueles diagnosticados com glioblastoma e em idade avançada, com uma expectativa de vida estimada de até um ano após o diagnóstico clínico confirmado.

No que concerne ao padrão de pesquisa de marcadores moleculares e imunohistoquímicos, constatou-se que o Ki-67 é o mais reconhecido e frequentemente utilizado em todos os tumores encefálicos, para além dos marcadores hormonais nos adenomas hipofisários. Relativamente aos gliomas e meningiomas, dada a recente inclusão deste exame complementar no diagnóstico (2016), verifica-se uma heterogeneidade na investigação, sem um protocolo ainda estabelecido, embora a sua importância clínica já seja evidente para a tomada de decisões terapêuticas e prognósticas. Não obstante, a codeleção 1p/19q e a mutação IDH1/2 são atualmente as mais reconhecidas no âmbito da biologia molecular neurooncológica para os oligodendrogliomas. Paralelamente, o GFAP mantém-se como um marcador fundamental para o diagnóstico geral de gliomas. É de salientar que o GFAP sérico tem demonstrado potencial como biomarcador diagnóstico para o glioblastoma multiforme, apresentando uma sensibilidade de 76% e uma especificidade de 100% para um valor de corte superior a 0,05 µg/L (58).

Em última análise, os tumores metastáticos cerebrais mantêm a prevalência de origem pulmonar, sendo estes responsáveis pela taxa de mortalidade mais elevada entre os tumores encefálicos identificados. Esta constatação está em conformidade com a literatura científica atual, que indica que as metástases cerebrais de origem pulmonar representam aproximadamente 40-50% de todos os casos de metástases cerebrais, seguidas pelas de origem mamária (15-25%) e melanoma (5-20%). A elevada taxa de mortalidade associada a estas metástases reflete não só a agressividade do tumor primário, mas também os desafios terapêuticos inerentes ao tratamento de lesões secundárias no SNC.

Contribuição dos autores:

João Furtado (autor principal e correspondência): Contribuições substanciais para a conceção e delineamento, recolha de dados, análise e interpretação dos dados. Participação na redação e revisão crítica do artigo no que respeita a conteúdo intelectualmente importante. Revisão da versão final do manuscrito.

Inês Rodrigues, Rui Raposo e Ana Rita Possante: Contribuições para o delineamento, análise e interpretação dos dados. Participação na revisão crítica do artigo no que respeita a conteúdo intelectualmente importante. Revisão da versão final do manuscrito.

Luana Caleffi, Katherine Soares, Camille Takano: Participação na investigação da temática e na obtenção de recursos. Contribuições na validação, análise e interpretação dos dados, e revisão crítica do artigo no que respeita ao conteúdo intelectualmente importante.

Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Os autores declaram não ter recebido qualquer financiamento para a realização do estudo.

Agradecimentos: Gostaríamos de expressar o nosso ao Serviço de Anatomia Patológica da ULSAL, especificamente ao Dr. José Luís Morera e Dr^a Susana Vicente por continuamente promoverem e apoiarem a investigação científica desenvolvida em colaboração com a UAlgESS.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não possuir qualquer tipo de conflitos de interesse.

6. Referências

1. Cassidy J, Bissett D, J Spence OBE RA, Payne M, Morris-Stiff G. Oxford Handbook of Oncology.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. GLOBOCAN: Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. [Internet]. Vol. 71, CA: a cancer journal for clinicians. 2021 [cited 2021 Dec 5]. Available from: doi: 10.3322/caac.21660.
3. Alnaami I, Sarhan L, Alqahtani A, Alghamdi A, Alkhashrami S, Mostafa O. Does brain tumor epidemiology differ from place to another? . Saudi Single Tertiary Care Center Experience. 2018;29(14):2982–7.

4. Abrey LE, Mason WP. Facts: Brain tumours. 2nd ed. Karger: Health Press in S; 2011.
5. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol.* 2014 Oct;16 Suppl 4:iv1-63.
6. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Vol. 131, *Acta Neuropathologica*. Springer Verlag; 2016. p. 803–20.
7. Strong MJ, Garces J, Vera JC, Mathkour M, Emerson N, Ware ML. Brain Tumors: Epidemiology and Current Trends in Treatment. *Journal of Brain Tumors & Neurooncology.* 2015;01(01).
8. Efird JT. Epidemiology of glioma. In: *Glioma: exploring its biology and practical relevance.* 2011. 1–22 p.
9. GBD 2016 Brain and Other CNS Cancer Collaborators. Global, regional, and national burden of brain and other CNS cancer, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019;18(4):376–93.
10. Pouchieu C, Gruber A, Berteaud E, Ménégon P, Monteil P, Huchet A, et al. Increasing incidence of central nervous system (CNS) tumors (2000–2012): findings from a population based registry in Gironde (France). *BMC Cancer.* 2018 Dec 14;18(1):653.
11. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS statistical Report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncology.* 2015 Oct 1;17:iv1–62.
12. Kromer C, Xu J, Ostrom QT, Gittleman H, Kruchko C, Sawaya R, et al. Estimating the annual frequency of synchronous brain metastasis in the United States 2010–2013: a population-based study. *Journal of Neuro-Oncology.* 2017 Aug 31;134(1):55–64.
13. Johnson JD, Young B. Demographics of brain metastasis. *Neurosurg Clin N Am.* 1996 Jul;7(3):337–44.
14. Cagney DN, Martin AM, Catalano PJ, Redig AJ, Lin NU, Lee EQ, et al. Incidence and prognosis of patients with brain metastases at diagnosis of systemic malignancy: A population-based study. *Neuro-Oncology.* 2017 Nov 1;19(11):1511–21.
15. Schouten LJ, Rutten J, Huveneers HAM, Twijnstra A. Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma. *Cancer.* 2002 May 15;94(10):2698–705.
16. Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, Il'yasova D, et al. Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. Vol. 113, *Cancer.* 2008. p. 1953–68.
17. Miranda A da C, Mayer-da-Silva A, Glória L, Brito C. Registo Oncológico Nacional de Todos os Tumores na População Residente em Portugal, em 2018. 2018.
18. Surawicz TS, McCarthy BJ, Kupelian V, Jukich PJ, Bruner JM, Davis FG. Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994. *Neuro Oncol* [Internet]. 1999 [cited 2021 Dec 5];1(1):14–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11554386/>
19. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurologic Clinics.* 2007 Nov 1;25(4):867–90.
20. Darefsky AS, Dubrow R. International variation in the incidence of adult primary malignant neoplasms of the brain and central nervous system. *Cancer Causes & Control.* 2009 Nov 9;20(9):1593–604.
21. World Health Organization. International statistical classification of diseases and related health problems.
22. Fuentes-Raspall R, Solans M, Roca-Barceló A, Vilardell L, Puigdemont M, del Barco S, et al. Descriptive epidemiology of primary malignant and non-malignant central nervous tumors in Spain: Results from the Girona Cancer Registry (1994–2013). *Cancer Epidemiology.* 2017 Oct 1;50:1–8.
23. Baldi I, Gruber A, Alioum A, Berteaud E, Lebaillly P, Huchet A, et al. Descriptive epidemiology of CNS tumors in France: results from the Gironde Registry for the period 2000-2007. *Neuro-Oncology.* 2011 Oct 6;13:1370–8.
24. Piñeros M, Sierra MS, Izarzugaza MI, Forman D. Descriptive epidemiology of brain and central nervous system cancers in Central and South America. *Cancer Epidemiology.* 2016 Sep 1;44:S141–9.
25. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro-Oncology.* 2020 Oct 1;22(Supplement_1):IV1–96.
26. K AS, G AS, AR A, R S, I AB. Epidemiology of Brain Tumors in Qatar. *Journal of Epidemiology and Public Health Reviews.* 2020;5(2).
27. Ardhini R, Tugasworo D. Epidemiology of primary brain tumors in dr. Kariadi Hospital Semarang in 2015-2018; Epidemiology of primary brain tumors in dr. Kariadi Hospital Semarang in 2015-2018. Available from: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/201>
28. Seeley ST. *Anatomia e Fisiologia*. 8th ed.
29. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* 2006;9(3):157–73.
30. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. Vol. 19, *Clinical Cancer Research.* 2013. p. 764–72.
31. Claus EB, Black PM, Bondy ML, Calvoceressi L, Schildkraut JM, Wiemels JL, et al. Exogenous hormone use and meningioma risk: What do we tell our patients? Vol. 110, *Cancer.* 2007. p. 471–6.

32. Vadivelu S, Sharer L, Schulder M. Regression of multiple intracranial meningiomas after cessation of long-term progesterone agonist therapy. *J Neurosurg*. 2010;112:920–4.
33. Li X, Zhao J. Intracranial meningiomas of childhood and adolescence: report of 34 cases with follow-up. *Childs Nerv Syst*. 2009;25:1411–7.
34. Menon G, Nair S, Sudhir J, Rao BR, Mathew A, Bahuleyan B. Childhood and adolescent meningiomas: a report of 38 cases and review of literature. *Acta Neurochir. Acta Neurochir (Wien)*. 2009;151:239–44.
35. Mendes AP, Firmo C, Pires J, José M, Ferreira P, Pereira P, et al. «Oligodendroglioma-O Diagnóstico». 2013 Jul.
36. Ellor S v., Pagano-Young TA, Avgeropoulos NG. Glioblastoma: Background, Standard Treatment Paradigms, and Supportive Care Considerations. *Journal of Law, Medicine & Ethics*. 2014 Jan 1;42(2):171–82.
37. Goffart N, Kroonen J, Rogister B. Glioblastoma-initiating cells: Relationship with neural stem cells and the micro-environment. Vol. 5, *Cancers*. 2013. p. 1049–71.
38. Sant M, Minicozzi P, Lagorio S, Børge Johannesen T, Marcos-Gragera R, Francisci S, et al. Survival of European patients with central nervous system tumors. *International Journal of Cancer*. 2012 Jul 1;131(1):173–85.
39. Visser O, Ardanaz E, Botta L, Sant M, Tavilla A, Minicozzi P. Survival of adults with primary malignant brain tumours in Europe; Results of the EUROCARE-5 study. *European Journal of Cancer*. 2015 Oct 1;51(15):2231–41.
40. Cook MB, Dawsey SM, Freedman ND, Inskip PD, Wichner SM, Quraishi SM, et al. Sex disparities in cancer incidence by period and age. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2009 Apr;18(4):1174–82.
41. Deorah S, Lynch CF, Sibenaller ZA, Ryken TC. Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001. *Neurosurgical Focus*. 2006 Apr;20(4):E1.
42. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Small cell lung cancer. Version 1.2017. [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: www.nccn.org.
43. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Melanoma. Version 3.2016 [online]. Accessed October 1.
44. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Non-small cell lung cancer. Version 4.2016. [Internet]. [cited 2022 Aug 9]. Available from: www.nccn.org.
45. Khouja MH, Baekelandt M, Nesland JM, Holm R. The Clinical Importance of Ki-67, p16, p14, and p57 Expression in Patients With Advanced Ovarian Carcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2007 Oct;26(4):418–25.
46. Nakagawachi T, Soejima H, Urano T, Zhao W, Higashimoto K, Satoh Y, et al. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene*. 2003 Dec 4;22(55):8835–44.
47. Gupta K, Salunke P. Molecular markers of glioma: an update on recent progress and perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(12):1971–81.
48. Yan H, Williams D, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. Vol. 360, *N Engl J Med*. 2009.
49. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathologica*. 2008 Dec 5;116(6):597–602.
50. Riemenschneider MJ, Jeuken JWM, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: State of the art. *Acta Neuropathologica*. 2010 Nov;120(5):567–84.
51. Horbinski C, Nikiforova MN, Hagenkord JM, Hamilton RL, Pollack IF. Interplay among BRAF, p16, p53, and MIB1 in pediatric low-grade gliomas. Available from: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/14/6/777/1285647>
52. Ichimura K, Pearson DM, Kocalkowski S, Bäcklund LM, Chan R, Jones DTW, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro-Oncology*. 2009;11:341–7.
53. Kondo Y, Katsushima K, Ohka F, Natsume A, Shinjo K. Epigenetic dysregulation in glioma. *Cancer Science*. 2014;105(4):363–9.
54. Karsy M, Neil JA, Guan J, Mark MA, Colman H, Jensen RL. A practical review of prognostic correlations of molecular biomarkers in glioblastoma. *Neurosurgical Focus*. 2015;38(3).
55. Ntali G, Capatina C, Fazal-Sanderson V, Byrne J v, Cudlip S, Grossman AB, et al. Mortality in patients with non-functioning pituitary adenoma is increased: systematic analysis of 546 cases with long follow-up. *European Journal of Endocrinology*. 2016 Feb;174(2):137–45.
56. Abucham J, Vieira TC. Adenomas Hipofisários Produtores de Glicoproteínas: Patogênese, Diagnóstico e Tratamento. *Arq Bras Endocrinol Meta*. 2005 Oct;49(5).
57. Baxter DS, Orrego A, Rosenfeld J v., Mathiesen T. An audit of immunohistochemical marker patterns in meningioma. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2014 Mar;21(3):421–6.
58. Tichy J, Spechtmeyer S, Mittelbronn M, et al. Prospective evaluation of serum glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a diagnostic marker for glioblastoma. *J Neurooncol*. 2016 Jan;126(2):361–9. doi: 10.1007/s11060-015-1978-8. Epub 2015 Oct 30. PMID: 26518540.

Systematic Review

Playground contamination by Potentially Pathogenic Bacteria: A Systematic Review

Catarina Reis ^{1†}, Henrique Antunes ^{1†}, Tomás Matos ^{1†} and Edna Ribeiro ^{2*}¹ Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal;² H&TRC—Health & Technology Research Center, ESTeSL—Escola Superior de Tecnologia e Saúde, Instituto Politécnico de Lisboa, 1990-096 Lisboa, Portugal;*Corresponding author: edna.ribeiro@estesl.ipl.pt

† Authors contributed equally to the work

Abstract: Playgrounds are public spaces that offer recreational opportunities for hundreds of people, including children, young people, adults, and the elderly. Numerous pathogenic bacteria have been described in the literature as etiologic agents of several infections, with distinct manifestations and clinical outcomes, particularly affecting children's health. This systematic review aims to perform a scoping review of the state of the art regarding playgrounds contamination by potentially pathogenic bacteria and associated public health concerns. An extensive search was conducted in PubMed and Web of Science, applying predefined inclusion and exclusion criteria and described in a flow diagram of the methodology according to PRISMA 2020 Checklist standards. After quality assessment, 4 scientific articles were included and data extracted. Two studies from USA and Poland focused on the identification of bacteria in sandboxes, one study from Hungary accessed playground surfaces, and in a study from Mexico authors analyzed bacteria prevalence on children's hands and toys in playgrounds. Data analysis demonstrated the presence of potentially pathogenic bacteria in playgrounds in different sampling areas, highlighting a public health issue and raising awareness about the hygiene conditions of the infrastructures and the importance of hand hygiene for those who frequent them. Further research, in a global scale, is crucial in order to properly assess overall pathogenicity levels in these locations, particularly on surface areas where there is still limited information in the literature and to perform an accurate risk assessment.

Citation: Reis, C.; Antunes, H.; Silva, T. Ribeiro, E. Playground contamination by Potentially Pathogenic Bacteria: A Systematic Review. Trends in Biomedical Laboratory Sciences. 2025 Mar 9; 3(1): 89-97.

Keywords: Pathogenic bacteria; Playgrounds; Children; Public Health

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: February 2025

Accepted: February 2025

Published: March 2025

Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences

1. Introduction

Playgrounds are public spaces that provide recreational activities for people of all ages, including children, teenagers, adults, and the elderly. Additionally, several animals such as dogs, cats, and birds, among others, often share these areas, potentially defecating and contributing to the presence of potentially pathogenic bacteria and other microorganisms. [1] Given the diversified age groups and high number of users, these spaces require special care regarding cleaning and infrastructure maintenance. [2]

It is acknowledged that children, while playing in these spaces, are mostly unaware of many risks and dangers from its surroundings. These include not only accidents and injuries but also infections caused by potentially pathogenic agents present in the environment. [3] Young children do not control the reflex of putting their hands in their mouths, thus it is crucial to monitor the levels of potentially pathogenic bacteria found on playground surfaces and sand, ensuring their quality to prevent infections outbreaks. [4] In fact, the combination of inefficient sanitation programs and the presence of potentially pathogenic bacteria on playground equipment and toys may put children at risk. [5,6,7]

The World Health Organization (WHO) has stated that children who spend a considerable amount of time playing in outdoor areas or with playground equipment and toys, are predisposed to respiratory infections. [8] Furthermore, the WHO also estimates that children aged 0 to 14 years are prone to gastrointestinal diseases, including diarrhea, due to contact and infection from hands contaminated by toys. [8] Children tend to be more susceptible to infections than adults [9], leading to greater concern about contact with potentially pathogenic fecal bacteria. Epidemiological data analysis in beachgoers in the U.S. reported an

association between gastrointestinal diseases and exposure to sand contaminated with fecal indicator bacteria, finding the highest incidence of the disease and diarrhea in children under 5 years old. [10]

Relevantly, numerous playgrounds still use sandboxes for children, despite the fact that this sand matrix is recognized by the WHO as a vector of infection. [11] In Europe, studies conducted on sandboxes revealed contamination by a range of high-risk bacteria, including enteric bacteria from the *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and antibiotic-resistant *Escherichia coli* (*E. coli*). [10] Salmonellosis is a severe disease caused by contact with contaminated sand from *Salmonella* spp. [12,13]

In 2024, the World Health Organization published a new and updated list of priority pathogens, categorized as medium, high, and critical risk. This list includes antibiotic-resistant bacteria such as *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and *S. Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), all considered high risk. It is estimated that in 2019, 1.27 million deaths were attributed to infections caused by antibiotic-resistant bacteria, while around 5 million were associated with these microorganisms. [14]

This study aims to perform a scoping review of the state of the art regarding playgrounds contamination by potentially pathogenic bacteria in order to assess potential associated health risks, particularly for children, and overall public health.

2. Materials and Methods

2.1. Research Strategy, Inclusion and Exclusion Criteria

In the present study, the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) 2020 Checklist methodology [15] was adopted. This tool was developed to assist authors of systematic reviews in reporting the methods used clearly and consistently.

The utilized search terms were "bacteria" and "playground" ("bacteria AND playground"), with English as the chosen language. The databases elected were PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) and Web of Science (WoS) (www.webofscience.com). Articles that did not meet defined inclusion criteria were excluded from the review. Inclusion and exclusion criteria defined are summarized in Table 1.

Table 1 – Inclusion and exclusion criteria from the selected articles.

Inclusion criteria	Exclusion criteria
Articles published between 1 st January 2014 and 30 th may 2024;	Articles published before 1 st January 2014;
Articles published in English;	Articles published in other languages than English;
Free full-text articles;	Studies that were not made in playgrounds;
Original articles on the theme.	Studies not focused on pathogenic bacteria;
	Systematic reviews and field notes.

2.2. Article Selection

After the aforementioned search terms were used, several articles were obtained as a result. The articles were selected using the Rayyan—Intelligent Systematic Review tool, a website that employs artificial intelligence to automatically detect duplicate articles across multiple databases. It also features an intuitive interface, accelerating the process of the initial article selection. [16]

Abstracts were screened, and articles unrelated to the topic were removed. Articles selection was performed in three rounds: 1st: titles were screened in order to remove duplicated files or studies unrelated to the topic. The selected papers were screen in Rayyan for additional scrutiny; 2nd: All abstracts were screened. 3rd: included papers were analyzed based in the predefined inclusion and exclusion criteria. Existent differences were discussed by three investigators (R.C., A.H and S.T). Data extraction was then performed by three investigators (R.C., A.H and S.T). Four articles were selected for full analysis and subsequent inclusion in this review, with data extraction and result analysis performed. [17]

2.3. Quality Assessment

Quality assessment of the included articles was performed by three investigators (R.C., A.H and S.T) using Joanna Briggs Checklist, in order to reduce the risk of bias and discrepancies. This checklist consists of "Yes," "No," "Uncertain," or "Not Applicable" responses to 10 tabulated questions. A positive percentage of 10% was applied to each parameter, with the 10 "Yes" responses assigned a score of 100%. Responses marked as "Not Applicable" were not counted. Studies with a score of 80% or higher are considered high quality, studies with a score between 50% and 79% (inclusive) are of moderate quality, and studies with a score below 49%

are considered low quality. One of the articles was classified by the authors of the systematic review as high quality, while the remaining three were evaluated as having moderate quality. [18]

3. Results

The workflow illustrated in Figure 1 was used for selecting studies, accordingly to PRISMA guidelines for flow diagram methodology in systematic reviews.

The performed research, through PubMed and WoS databases, resulted in a total of 56 scientific articles, of which 22 were rejected for being duplicates, leaving 34 articles for screening. A total of 28 articles were rejected for not meeting the inclusion and exclusion criteria, primarily due to lacking information on the topic of bacterial contamination in playgrounds. Thus, 4 articles were included in the selection process.

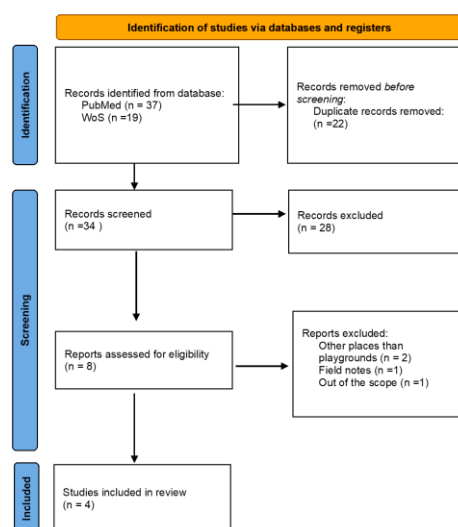


Figure 1. - PRISMA methodology of selection of papers.

3.1. Extracted data

Included studies were based on the detection of bacteria in playgrounds, with diverse sample collection sites and associated methodologies. For data extraction was considered: the title of the article, the year of publication, the country of origin, the type of bacteria studied, the applied methodologies, the season or temperature, the total number of samples, the research locations from which samples were collected and main conclusions. Data extraction is summarized in Table 2.

Table2- Data extracted from the included papers.

Title	Year and article origin	Relevant bacteria	Analysis technique	tech-	Season/tempera-	Number of samples	of	Sample locations	Key observations	Ref.
Detection of pathogenic micro-organisms on children's hands and toys during play	2014, Culiacán, Sinaloa, México.	Fecal coliforms, <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>Shigella spp.</i>	Selective culture mediaCHROMagar ECC; Mannitol Salt Agar; McConkey; Blood Agar; Xylose Lysine Deoxycholate Agar	Membrane filtration	August and September (pilot study) and a control study, between March and April.	60 pilot + 37 controls		Children's Hands and toys on playgrounds	Presence of pathogenic bacteria in children's hands and toys	[19]
Vertical stratification and seasonality of fecal indicator bacteria in	2024, New York.	<i>Enterococcus</i> and <i>E. coli</i>	The most probable numbers (MPN) of enterococci and <i>E.</i>		Summer and winter starting with warm-weather sampling in the spring and	42 samples, 3 by each playground.		Playground sandboxes.	Presence of <i>Enterococci</i> and <i>E. coli</i> in the both layers of the	[10]

New York City playground sand-boxes			coli, Enterolert and Colilert.	summer months of 2022, followed by cold-weather sampling in January 2023 and ending with warm-weather sampling in the spring and summer months of 2023			sand (surface and basal). Basal layers had less concentration of both bacteria's then the surface layers.	
Effectiveness of the sandpits security system against microorganisms and intestinal parasites sand contamination	2015, Poland	Coliform bacteria, <i>E. Coli</i> .	Methodology legislated in the Polish Norm PrPN-Z-19000-2 Soil quality, not specified	April/May and September	288	Playground sandpits	Presence of coliform bacteria and <i>E. coli</i>	[2]
High clonal diversity of <i>S. aureus</i> isolates from children's playgrounds in Hungary	2024, Hungary	<i>S. aureus</i>	Inoculation onto Columbia blood agar plates and onto Chromagar <i>S. aureus</i> . Catalase and latex agglutination test	All samples have been collected in fair weather conditions (15–25 °C temperature, dry weather). Between September 2018 and September 2019.	355 samples were collected from 24 public outdoor playgrounds in 16 cities of Hungary	Sampled surfaces were chosen as the most hand touched areas at the sites.	<i>S. aureus</i> isolates were found in 10 samples. Seven were recovered from plastic surfaces, three from metal surfaces. No positive samples from the wood surfaces on the playground equipment.	[20]

3.2. Bacterial Contamination on Children Hands and Toys

In the analyzed study regarding bacterial contamination of children hands and toys performed by T. Martinez-Bastidas et coworkers [19], authors aimed to assess whether the recreational activities practiced by the enrolled children had an impact on the presence of pathogens, such as bacteria, viruses, and parasites, on their hands and toys. Regarding bacteria assessment, it focused on fecal coliforms, *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella* spp., *Serratia* spp., and *Shigella* spp.

In the pilot study, conducted between August and September 2009, in the urban area of Culiacán, Mexico, authors assessed hands and toys contamination of 12 children, aged 2 to 12 years, who played in playgrounds and pedestrian walkways for one hour, over 5 consecutive weeks, using the same toys and children, with a total of 60 samples collected. The control study was conducted between March and April 2010, collecting samples from toys and the hands of 20 boys and 20 girls, also aged 2 to 12 years, weekly over a period of two months. Both studies used the same sample collection and transportation procedures.

For samples analysis, both classical and molecular biology methods were used, namely seeding in specific culture media for presumptive identification, and confirmation with PCR.

Fecal coliforms were detected in all the samples collected from the children's hands in the pilot study, as well as all the potentially pathogenic bacteria (except *Shigella*) at concentrations up to 1×10^7 CFU. *Streptococcus* spp. was only detected in one of the samples from public walkways. In the samples from the toys, fecal coliforms were identified in all of them. Similar results were obtained for the samples from the hands, with no *Shigella* and *Streptococcus* detected.

In the control study, fecal coliforms were identified in 12.5% of the samples from the hands of children playing in playgrounds, while no positivity for these microorganisms was detected in samples from pedestrian walkways. *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Serratia* spp. were detected in 5% of the samples collected from the children's hands in both study locations. Regarding the findings in the toys, fecal coliforms and potentially pathogenic bacteria (except *S. aureus*) were also identified, with a less pronounced presence of these microorganisms in samples from pedestrian walkways.

5.3. *S. aureus* Contamination on Playground Surfaces

S. aureus is a key microorganism in human colonization, infection and environmental contamination. The study conducted by Horváth, A. et al. [20] assessed the prevalence, antibiotic susceptibility, virulence pattern, and clonal origin of *S. aureus* isolated from public outdoor playgrounds from 16 cities in Hungary. Samples were collected from various playground surfaces, particularly surfaces frequently touched by children, such as slides, swings, and other playground equipment.

Twenty-four public playgrounds were selected, and 355 samples were collected in an environment temperature between 15–25°C on dry days.

Samples were collected using sterilized cotton swabs pre-moistened with sterile 0.9% sodium chloride solution and inoculated onto Columbia blood agar plates and Chromagar Staph aureus, incubating at 37°C for 24 hours. Presumptive *S. aureus* colonies were performed by catalase tests and latex agglutination. Molecular typing was performed with PCR methods to detect specific genes and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to determine clonal diversity. Antibiotic susceptibility testing was carried out using the Mueller–Hinton agar dilution method, as well as the cefoxitin susceptibility test by disk diffusion.

Data analysis revealed a general prevalence of *S. aureus* in 2.81% of the samples (10 out of the 355) and an elevated clonal diversity. No MRSA (Methicillin-resistant *S. aureus*) was detected, but resistance to commonly used antibiotics such as penicillin, erythromycin, clindamycin, and ciprofloxacin was. Interestingly, 7 of the positive samples were from plastic surfaces, 3 were from metal, and no positive results were obtained from wood.

5.4. Bacterial Contamination in Sandbox Areas

In the present review, we identified two articles (Alessandra C. Leri et al. [10] and Magdalena Błaszak et al. [2]) that analyzed bacterial contamination in sandboxes.

Alessandra C. Leri et coworkers performed a total of 42 samples collection from 13 playgrounds in the New York metropolitan area, from the sandboxes within the studied parks and were separated based on their stratification level within the sandbox itself. This collection initially occurred in the summer, followed by January, and was repeated in the summer. The samples were processed and diluted to obtain a representative supernatant of the sample.

Bacterial analysis was performed using enzymatic techniques with fluorescence indicators (Enterolert and Colilert). The authors counted positive colonies for *E. coli* as a subset of total coliforms. The Most Probable Number (MPN) was reported per gram of dry sand.

The results demonstrated full positivity for *enterococci* in the surface samples, while this was not observed for *E. coli*. In the basal samples, although there was a higher contamination of enterococci compared to *E. coli*, a notable decline in MPN per gram of dry sand for both bacteria types were observed.

Regarding the study published by Magdalena Błaszak et al. [2], samples were collected in 2012 and 2013 from sandboxes in the Polish city of Szczecin, between April and May, and in September, of both years. A total of 8 sandboxes were selected, 4 of which were described as fenced and the others as unfenced. A total of 9 samples were collected from each sandbox, resulting in 288 samples (n=288). It is further specified that, in each sandbox, 3 collection sites were identified: a central location and two approximately 20 cm from the edges, with 3 samples collected from each location, spaced about 5 cm apart. The samples were taken from the surface layer, estimated to be 1-10 cm deep.

Authors reported a noticeable difference in bacterial growth levels between fenced and unfenced sandboxes, with faster and exponential growth observed in the latter. No significant differences were found between the spring and autumn samples from the fenced sandboxes. However, in unfenced sandboxes, a marked increase in bacterial growth was observed in the autumn samples compared to the spring samples. These results led the authors to associate the presence of fences as an important protective method for sandboxes, with minimal growth linked to contamination brought in by the children themselves. Authors have also identified coliform bacteria in a total of 234 samples, as well as the presence of *E. coli* in 171 samples.

Thus, there is consistency in the results of both studies in the sandboxes, with coliform bacteria and *E. coli* being identified, representing a public health risk.

4. Discussion

In our daily lives, we are exposed to a wide variety of threats that are not visible to us. Due to their rapid evolution and the development of resistances, bacteria are one of the main concerns in this category. Children, due to their characteristic innocence and fragility, are more susceptible to exposure to these pathogenic agents. [21] Playgrounds, which are popular spots for children's recreation, can be points of bacterial agent dissemination. [22] This potential for exposure, coupled with poor sanitation and maintenance, makes it urgent to assess the presence of potentially pathogenic bacteria in order to ensure public health.

The order *Enterobacterales*, frequently mentioned in the list of potentially pathogenic bacteria prioritized by the WHO in 2024, includes bacteria such as *E. coli*, a species that now has various strains resistant to carbapenems and cephalosporins. [23][24] Of the four articles analyzed in this systematic review, three presented positive results for the presence of fecal coliforms, with *E. coli* species being detected. [2][10][19] It is important to note that the article where these results were not obtained was focused solely on investigating *S. aureus*. The presence of fecal coliforms like *E. coli* is well-known as an indicator of fecal contamination, suggesting poor hygiene conditions and representing a public health risk. [25]

The bacterium *S. aureus*, a major cause of various infections such as osteoarticular, skin, pulmonary infections, and endocarditis, continues to be considered high risk. The presence of resistant strains, particularly to methicillin, is the main concern. [26][27][28] In the study by Andrea Horváth et al., which focuses on evaluating the presence of this species in playgrounds and assessing its clonal diversity, no methicillin-resistant strains were identified, but antibiotic-resistant colonies were found, including resistance to common antibiotics such as penicillin, erythromycin, clindamycin, and ciprofloxacin, indicating a problem for antibiotic therapy. In the study by T. Martínez-Bastidas et al., *S. aureus* colonies were also found, although resistance was not evaluated. [19][20]

In addition to these bacteria, other clinically relevant bacteria are also highlighted in the studies reviewed. Although strain identification was not carried out in the study by T. Martínez-Bastidas et al., *Salmonella spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia spp.*, and *Shigella spp.* colonies were found, which are also present in the new WHO list. [20][24]

Nevertheless, it is important to notice that the presence of colony-forming units *per se* may not be significant for contagion. For infection to occur, there must be contact with a quantity higher than the infection dose, meaning more than the number of pathogenic agents needed to infect a host. [29] In the study conducted in Mexico, it was noted that the bacterial concentrations found are similar to the infection doses of some of the bacteria analyzed. Due to their innocence and inability to control the hand-to-mouth reflex, children become more susceptible to contact with higher bacterial concentrations. According to Alessandra C. Leri et al., ingesting 1g of sand can transmit up to 2400 *E. coli* bacteria. [19][10] Also, the evaluation of contamination in playgrounds by antibiotic-resistant strains of potentially pathogenic bacteria is of high interest in determining the risk of infection in these locations, however the literature reviewed did not provide enough evidence to support any argument. [27][28]

Moreover, in a study conducted in Greece, referenced by Andrea Horváth et al., the importance of the season in the presence of potentially pathogenic bacteria is highlighted, showing different results in warm and cold seasons. In the studies by Alessandra C. Leri et al. and Magdalena Błaszak et al., although changes in bacterial growth based on the season were observed, they were not substantial enough to support arguments. Therefore, a future evaluation of the impact of weather conditions on bacterial development in playgrounds is of interest. [2][10][22]

It would also be relevant to evaluate bacterial behavior on different surfaces in playgrounds to select materials that hinder bacterial spread and facilitate cleaning. In Andrea Horváth et al.'s study, distinct results were obtained across various types of materials, with plastic surfaces showing significant bacterial growth. [20] In Kusumaningrum H. et al.'s article, bacterial viability was preserved on stainless steel surfaces. [30]

One of the limitations of this study is that two of the studies were conducted in Eastern Europe, one in the United States, and one in Mexico, which may not be representative of the reality in other locations, especially when assessing contamination by *S. aureus*, which, in Europe, has only been studied in Hungary. [20] Therefore, these results highlight the need for continued research on these bacteria to obtain more comprehensive conclusions on a global level.

Conducting more studies in playgrounds with different characteristics, such as their location (rural or urban) and proximity to schools, will also be important parameters for future research.

Furthermore, sandboxes are frequently used by animals as a defecation site, potentially harboring a wide variety of pathogenic agents. The absence or failure to enforce laws regarding pet waste collection, as highlighted by T. Martínez-Bastidas et al., can be considered an aggravating factor. [19][31]. Thus, the establishment of legislation and its conscious enforcement can be a way to reduce bacterial contamination.

Overall, the clear contamination of playgrounds by potentially pathogenic agents, demonstrated that it is extremely important to implement measures such as proper maintenance of sandboxes, regular disinfection of playgrounds, and the practice of hand hygiene, reducing the risk of bacterial infection and ensuring public health. [10][32]

5. Conclusions

Overall, this scope review sustains the urge to provide robust science for implementation of proper measures regarding sandboxes maintenance, regular disinfection of play-grounds, and the practice of hand hygiene and the institution of legislation to protect public health, particularly in critical developmental stages. The presence of coliform bacteria in playgrounds and other bacteria considered potentially pathogenic, including *S. aureus* is clear, which indicates that there is contamination by potentially pathogenic bacteria in playgrounds.

Overall, data analysis may serve as a public health alert, not only for direct infection potential of susceptible individuals (children, sick, elderly) but also for environmental dispersion of these microorganisms. Further studies will provide crucial data to policy makers and stakeholders.

Author Contributions: Conceptualization, R.E.; methodology, E.R, R.C., A.H and S.T.; validation, E.R., R.C., A.H and S.T.; formal analysis, R.C., A.H and S.T.; investigation, R.C., A.H and S.T.; resources, R.E.; data curation, R.E., R.C., A.H and S.T.; writing—original draft preparation, R.C., A.H and S.T.; writing—review and editing, R.E; visualization, R.E.; supervision, R.E.; project administration, R.E.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: No applicable

Acknowledgments: Authors gratefully acknowledge the FCT/MCTES national support through the UIDB/05608/2020; UIDP/05608/2020.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

6. References

1. Gyorkos TW, E Kokoskin-Nelson, Maclean JD, Soto JC. Parasite Contamination of Sand and Soil from Daycare Sandboxes and Play Areas. The Canadian journal of infectious diseases. 1994 Jan 1;5(1):17–20. PMID: [22346476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22346476/)
2. Błaszak, M., Zatoń, K. (2015). EFFECTIVENESS OF THE SANDPITS SECURITY SYSTEM AGAINST MICROORGANISMS AND INTESTINAL PARASITES SAND CONTAMINATION. Journal of Ecological Engineering, 16(4), 215–223. <https://doi.org/10.12911/22998993/59376>
3. Gauci C, Borg D. Are children attending child play areas at risk of infectious diseases? What can be done? Journal of The Royal Society for The Promotion of Health. 2007 Jan 1;127(1):22–8. <https://doi.org/10.1177/1466424007073203>
4. Medgyesi D, Brogan J, Sewell D, Creve-Coeur J, Kwong L, Baker K. Where Children Play: Young Child Exposure to Environmental Hazards during Play in Public Areas in a Transitioning Internally Displaced Persons Community in Haiti. International Journal of Environmental Research and Public Health [Internet]. 2018 Aug 3;15(8):1646. <https://doi.org/10.3390/ijerph15081646>
5. Toledo, C., de Armas, F., del Castillo, A., Arevalo, P., Pinero, J. and Valladares, B. (1994). "Parasitic contamination of parks and gardens as a public health problem. Data from Tenerife Island." Rev San Hig Pub 68, 617–622. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7618040/>
6. Davies, M., Mehr, S., Garland, S. and Morley, C. (2000). "Bacterial colonization of toys in neonatal intensive care units." Pediatrics 106, 1–5. <https://doi.org/10.1542/peds.106.2.e18>
7. Merriman, E., Corwin, P. and Ikram, R. (2002). "Toys are a potential source of cross-infection in general practitioner's waiting rooms." Br J Gen Pract 52, 138–140. PMID: 11885823; PMCID: PMC1314220.

8. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Preventing disease through healthy environments: a global assessment of the burden of disease from environmental risks / Annette Prüss-Üstün ... [et al]. (2006) ISBN 9789241565196
9. Nwachuku, N., Gerba, C.P., 2004. Microbial risk assessment: don't forget the children. *Curr. Opin. Microbiol* 7, 206–209. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.011>
10. Heaney, C.D., et al., 2012. Fecal indicators in sand, sand contact, and risk of enteric illness among beachgoers. *Epidemiology* 23, 95–106.) ou (Leri, A. C., Fassihi, G. E., Lundquist, M. J., Khan, M., & Arguin, M. L. (2024). Vertical stratification and seasonality of fecal indicator bacteria in New York City playground sandboxes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 273, 116152. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116152>)
11. PEREIRA, E.; FIGUEIRA, C.; AGUIAR, N.; VASCONCELOS, R.; VASCONCELOS, S.; CALADO, G.; BRANDÃO, J.; PRADA, S. (2013) Microbiological and mycological beach sand quality in a volcanic environment: Madeira archipelago, Portugal. *Science of the Total Environment*, v. 461–462, p. 469-479.) <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.025>
12. Borecka A. 2005. Nicienie z rodzaju *Toxocara* – niebezpieczne dla ludzi pasożyty odzwierzęce. *KOSMOS*. 54(1) 266, 105–108.) <https://kosmos.ptpk.org/index.php/Kosmos/article/view/793?utm>
13. Staff M, Musto J, Hogg G, Janssen M, Rose K. Salmonellosis Outbreak Traced to Playground Sand, Australia, 2007–2009. *Emerging infectious diseases* [Internet]. 2012 Jun 13 [cited 2025 Feb 19];18(7):1159–62. PMID: 22709539
14. World Health Organization. (2024, May 17). WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Retrieved from <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
15. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. *British Medical Journal*. 2021 Mar 29;372(71) <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
16. Ouzzani, M., Hammady, H., Fedorowicz, Z. et al. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev* 5, 210 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>
17. Donato H, Donato M. Stages for undertaking a systematic review. *Acta Med Port* [Internet]. 2019 Mar 29 [cited 2025 Feb 19];32(3):227-35. Available from: <https://doi.org/10.20344/amp.11923>
18. Whiting P, Rutjes AWS, Reitsma JB, Bossuyt PM, Kleijnen J. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. *BMC Med Res Methodol* 3, 25 (2003). <https://doi.org/10.1186/1471-2288-3-25>
19. Martínez-Bastidas T, Castro-del Campo N, Mena KD, Castro-del Campo N, León-Félix J, Gerba CP, et al. Detection of pathogenic micro-organisms on children's hands and toys during play. *Journal of Applied Microbiology*. 2014 Mar 20;116(6):1668–75. <https://doi.org/10.1111/jam.12473>
20. Horváth, A., Tormási, Á., Hajósi-Kalcakosz, S. et al. High clonal diversity of *S. aureus* isolates from children's playgrounds in Hungary. *Sci Rep* 14, 10021 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60481-0>
21. Ygberg S, Nilsson A. The developing immune system - from foetus to toddler. *Acta Paediatrica*. 2011 Nov 10;101(2):120–7. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2011.02494.x>
22. Chatziprodromidou, I.P., Chatziantoniou, S., Vantarakis, G. and Vantarakis, A. (2022), Risk Factor Analysis of Children's Exposure to Microbial Pathogens in Playgrounds. *Risk Analysis*, 42: 334-343. <https://doi.org/10.1111/risa.13752>
23. Ventola CL. The Antibiotic Resistance crisis. *P & T : a peer-reviewed Journal for Formulary Management* [Internet]. 2015 Apr;40(4):277–83. PMID: 25859123 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>
24. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance [Internet]. [www.who.int](https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461). Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
25. Holcomb DA, Stewart JR. Microbial Indicators of Fecal Pollution: Recent Progress and Challenges in Assessing Water Quality. *Current Environmental Health Reports*. 2020 Jun 15;7(3):311–24. <https://doi.org/10.1007/s40572-020-00278-1>
26. Kalu IC, Kao CM, Fritz SA. Management and Prevention of *S. aureus* Infections in Children. *Infectious Disease Clinics of North America* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2022 Sep 19];36(1):73–100. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.11.006>
27. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *S. aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015 May 27;28(3):603–61. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
28. Coughenour C, Stevens V, Stetzenbach LD. An Evaluation of Methicillin Resistant *S. aureus* Survival on Five Environmental Surfaces. *Microbial Drug Resistance*. 2011 Aug;17(3):457–61. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0007>
29. Leggett HC, Cornwallis CK, West SA. Mechanisms of Pathogenesis, Infective Dose and Virulence in Human Parasites. Antia R, editor. *PLoS Pathogens*. 2012 Feb 16;8(2):e1002512. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002512>

30. Kusumaningrum H. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2003 Aug 25;85(3):227–36. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00540-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00540-8)
31. Toledo Seco CI, de Armas Hernández F, del Castillo Remiro A, Arévalo Morales P, Piñero Barroso JE, Valadares Hernández B. [Parasite contamination of parks and gardens as a public health problem. Data of the island of Tenerife]. *Revista De Sanidad E Higiene Publica* [Internet]. 1994;68(5-6):617–22. PMID: [7618040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7618040/).
32. Pittet D, Allegranzi B, Storr J, Nejad SB, Dziekan G, Leotsakos A, et al. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. *Journal of Hospital Infection*. 2008 Apr;68(4):285–92 <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2007.12.013>

Original Paper

Implementation of risk matrices in Blood Bank Services: The perspective of Biomedical Laboratory Scientists

Tiago Plácido¹, Sílvia Martins^{1,2,3*}¹ Instituto Politécnico de Castelo Branco, ESALD-Dr. Lopes Dias Health School, Ciências Biomédicas Laboratoriais, Castelo Branco, Portugal² Department of Clinical Pathology, Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, Quinta Do Alvito, 6200-251, Covilhã, Portugal.³ University of Coimbra, Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR), Faculty of Medicine, Coimbra, Portugal.* Correspondence: silviamartins@ipcb.pt

Abstract: Blood Banks are indispensable in medical-surgical hospital practice. They are specialized transfusion departments with established protocols and standards of good practice. Over the last two decades, the Blood Banks have defined their internal working procedures and quality guidelines, thereby establishing their quality management systems (QMS). Understanding the guiding standards for the creation and implementation of QMS is essential. These standards vary depending on the objective of achieving a certified or accredited organization.

A QMS serves many purposes, one of which is to use preventive measures to protect against non-conformities, thereby fostering risk-based thinking. Risk management can be defined as a process that identifies, monitors, and manages events that could potentially impact the performance of an organization's activities. Given the significant risks associated with transfusion processes, it is crucial to implement a QMS and create risk matrices within that system. Risk matrices not only make it possible to identify the risks inherent in organizations but also to classify them and assess their cause, effect, probability of occurrence, and impact. The risk matrix also makes it possible to define appropriate mitigating actions and responsibilities within organizations, making it a powerful strategy for analysing and preventing errors and near misses.

This study sought to investigate the implementation of this new regulatory requirement in Portuguese Blood Banks by administering a questionnaire to Biomedical Laboratory Scientists (BLS) with degrees in Clinical Analyses and Public Health, or Biomedical Laboratory Sciences who are employed in these institutions.

Keywords: Risk management, Quality management systems, Accreditation, Certification, Blood Bank

Citation: Plácido, T.; Martins, S.; Implementation of risk matrices in Blood Bank Services: The perspective of Biomedical Laboratory Scientists. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2025 Mar 9; 3(1): 98- 106.

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: February 2025

Accepted: February 2025

Published: March 2025

Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences

1. Introduction

Blood Banks are required to establish their operational procedures, define their quality guiding documents, and develop their own Quality Management Systems (QMS). The control of documentation and quality management in these services primarily follows the requirements of the NP EN ISO 9001:2015 QMS standard, in addition to laboratory certification. In the latest normative updates, the NP EN ISO 9001:2015 QMS Standard, NP EN ISO/IEC 17025:2018 for the Accreditation of Testing Laboratories, and NP EN ISO 15189:2024 for the Accreditation of Clinical Testing Laboratories have introduced new requirements. Risk management has become a key focus in these updates, as well as in accreditation models such as the ACSA and the Joint Commission International (JCI), which are applied to healthcare systems. [1].

Blood banks provide vital services, but they carry several risks during the different stages of the transfusion process. The risks may be biological, immunological, or related to the laboratory and transfusion procedures themselves. Therefore, establishing preventive measures to protect patients from these risks is extremely important. [2]. Risk management is interpreted as a process that seeks to identify, monitor, and manage events that could potentially affect the performance

of a service or company's activities. It makes it possible to ensure the organization's objectives and achievements at different management levels and even its relationship with its employees and investors [3]. It employs various techniques and tools to ensure effective and economical service management, all while adhering to legally mandated precautions. [3].

This management approach allows for the monitoring and control of potential adverse events for patients, even those that are unlikely or unpredictable. By utilizing risk matrices, appropriate responses and identification of the resources needed to prevent or reduce harm to the patient can be established. Risk management is hence an important tool applied to QMS within Blood Banks. Risk matrices not only identify risks but also allow for their classification. This involves evaluating each risk's cause, effect, probability, and impact, determining appropriate mitigation actions, and assigning responsibilities. Consequently, they become a powerful strategy for analysing and preventing errors and near misses. [4,5,6].

Considering that Blood Banks are fundamental hospital departments that complement emergency and medical-surgical services and given the significant consequences that errors in transfusion medicine can have on human lives, it is crucial to evaluate how risk assessment matrices are utilized in these services. In this sense, this study aimed to study the implementation of this new requirement in Portuguese Blood Banks by carrying out a questionnaire among the Biomedical Laboratory Scientists (BLS) with degrees in Clinical Analyses and Public Health, or Biomedical Laboratory Sciences who are employed in these institutions.

2. Materials and Methods

This work was a prospective, cross-sectional study.

A questionnaire was distributed to BLS professionals working in Blood Banks throughout Portugal. The form was completed using the Google Forms platform and subsequently published on social networks that met the inclusion criteria.

The inclusion criteria were as follows: Participants must possess a degree in Clinical Analyses and Public Health or Biomedical Laboratory Sciences. They should work in the blood banks of public or private hospitals or clinics. Furthermore, participants must have access to social networks. The criteria for excluding respondents from the questionnaire included: BLS from areas outside of the Clinical Analyses and Public Health or Biomedical Laboratory Sciences courses, BLS who exclusively worked in Clinical Pathology Laboratories, and BLS who did not have access to the specified social networks. The data and statistics were analysed using Excel, based on the received responses.

3. Results

By publishing the questionnaire on social media, a total of 18 anonymous responses were collected from BLS. The questionnaire can be found in Supplementary Document 1.

3.1. Knowledge of certification and accreditation standards by Biomedical Laboratory Scientists

Regarding the knowledge of the NP EN ISO 9001:2015 certification standard by the BLS who work in the Blood Banks Services, 17 individuals answered affirmatively, corresponding to 94.4%. Only 1 respondent answered negatively, corresponding to 5.6% of the total sample (Figure 1a).



Figure 1. Graphics representing the answers to the questions: **a)** “Are you familiar with the NP EN ISO 9001:2015 certification standard?”; **b)** “Are you familiar with the NP EN ISO 17025:2018 accreditation standard?”; **c)** “Are you familiar with the ACSA certification model?”; and **d)** “Are you familiar with the Joint Commission International accreditation model?”. “Yes” answers in blue and “No” answers in orange.

As for the NP EN ISO 17025:2018 standard, only 50% (9) of the BLS are aware of this standard for accrediting testing laboratories (Figure 1b). However, this percentage is higher (66.7%, corresponding to 12 BLS) for both ACSA certification model (Figure 1c) and the JCI accreditation model (Figure 1d).

3.2. Implementation of a quality management system and risk management in Blood Bank services

Based on the responses gathered, all Blood Banks, where the BLS operates, have implemented a QMS (Figure 2a). However, 33.3% (6 members) report that they have not received any training in quality management (Figure 2b) or do not understand the regulatory requirements related to risk assessment (Figure 2c). Interestingly, only 11.1% (2 BLS members) are unfamiliar with what a risk matrix is (Figure 2d).

Regarding the construction of risk matrices in Blood Banks, 12 participants (66.7%) reported having developed them in their Blood Banks (Figure 3a). From this point in the questionnaire, only 12 participants answered the following questions regarding the implementation of a risk matrix in blood banks. Consequently, the same percentage of respondents (66.7%), which corresponds to only 8 BLS, indicated that they did not participate in either the design of the matrix or the definition of mitigating actions (Figure 3b).

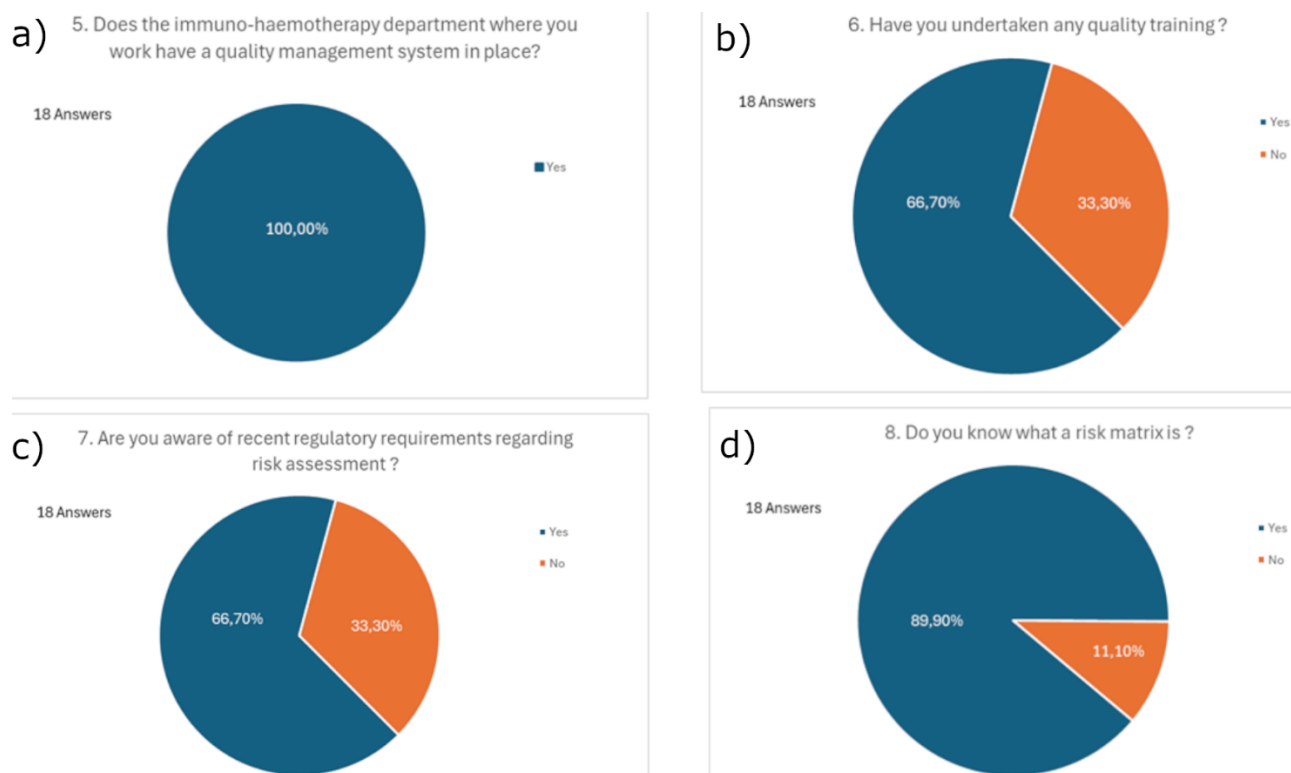


Figure 2. Graphics representing the answers to the questions: **a)** “Does the immuno-haemotherapy department where you work have a quality management system in place?”; **b)** “Have you undertaken any quality training?”; **c)** “Are you aware of recent regulatory requirements regarding risk assessment?”; and **d)** “Do you know what a risk matrix is?”. “Yes” answers in blue and “No” answers in orange.

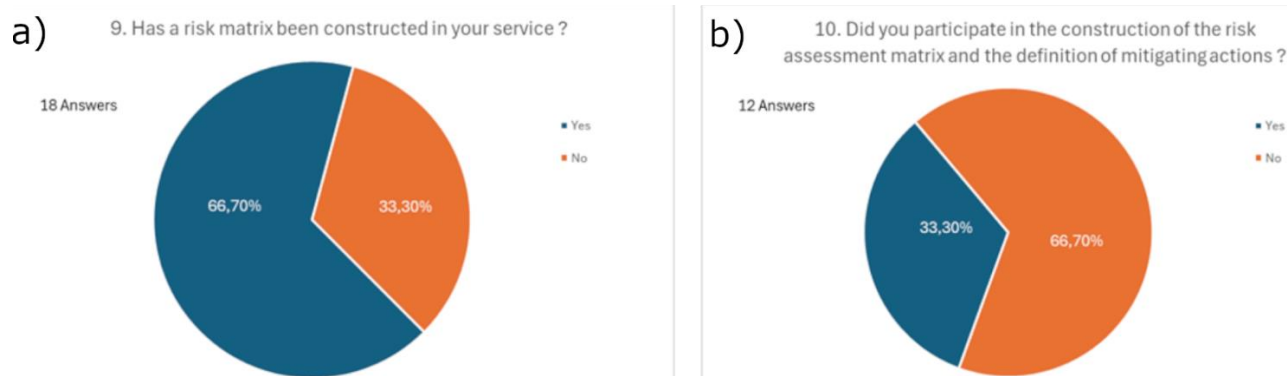


Figure 3. Graphics representing the answers to the questions: **a)** “Has a risk matrix been constructed in your service?”; and **b)** “Did you participate in the construction of the risk assessment matrix and the definition of mitigating actions?”. “Yes” answers in blue and “No” answers in orange.

3.2. Use of risk matrices in Blood Bank Services

A majority of participants (58.3%) supported the dynamic application of the risk matrix in blood banks (Figure 4a). However, the same percentage expressed a negative opinion regarding the participation of BLS (in service delivery and technical teams) in updating the risk matrix (Figure 4b). Despite this, 11 out of the 12 participants (91.7%) agreed that the construction of the risk matrix significantly facilitated the implementation of actions to prevent errors or near misses in blood banks. Only one participant believed that creating a risk matrix does not aid in the implementation of preventive actions (Figure 4c). Additionally, 83.3% (10 participants) of the BLS felt that utilizing the risk matrix has improved the efficiency and effectiveness of the service (Figure 4d). They also indicated that the blood banks have become more organized with the implementation of the QMS (Figure 5c).

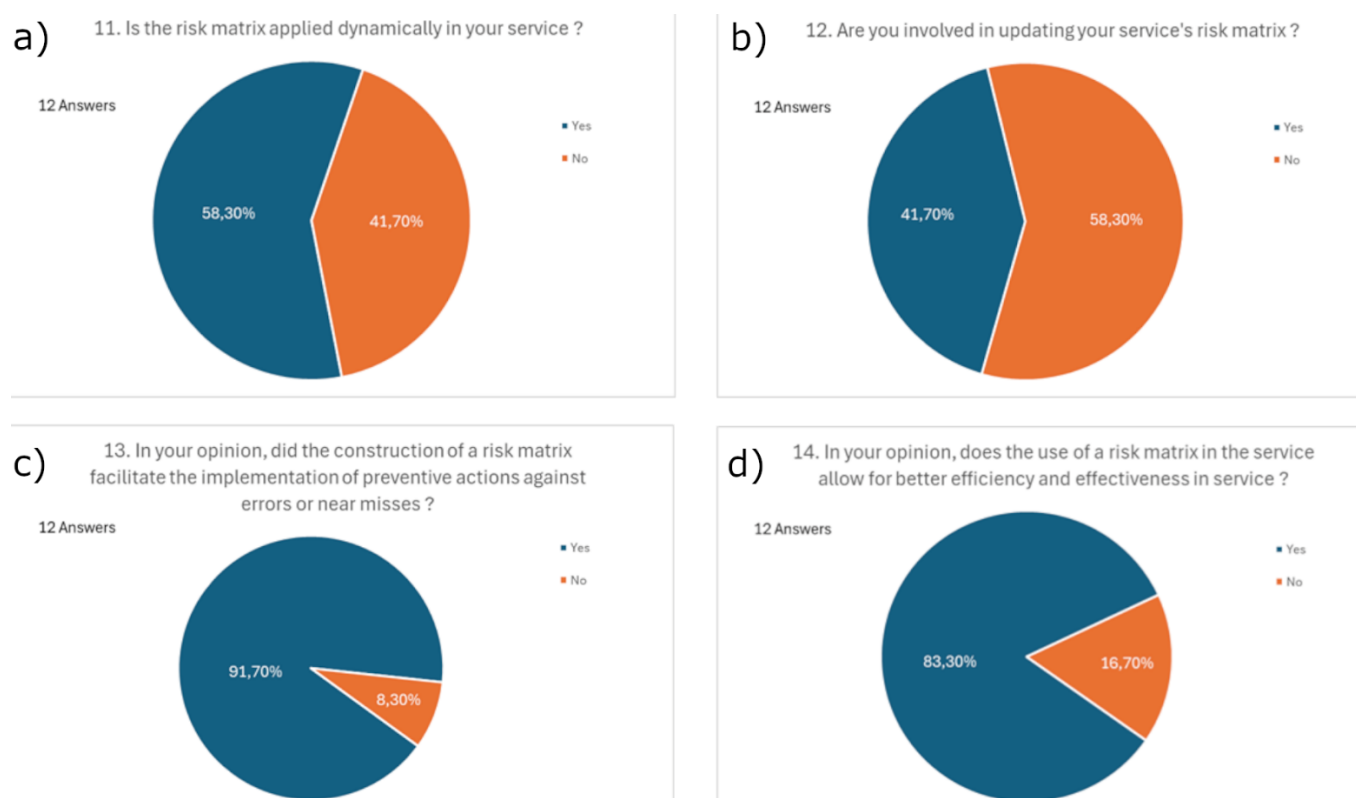


Figure 4. Graphics representing the answers to the questions: **a)** “Is the risk matrix applied dynamically in your service?”; **b)** “Are you involved in updating your service's risk matrix?”; **c)** “In your opinion, did the construction of a risk matrix facilitate the implementation of preventive actions against errors or near misses?”; and **d)** “In your opinion, does the use of a risk matrix in the service allow for better efficiency and effectiveness in service?”. “Yes” answers in blue and “No” answers in orange.

When asked about the assessment of the risk itself, and the simultaneous creation of opportunities, 8 participants (66.7%) indicated that defining these concepts was not easy (Figure 5a). However, 11 BLS's (91.7%) believe that their participation in the QMS and in developing the risk matrix is important (Figure 5b).

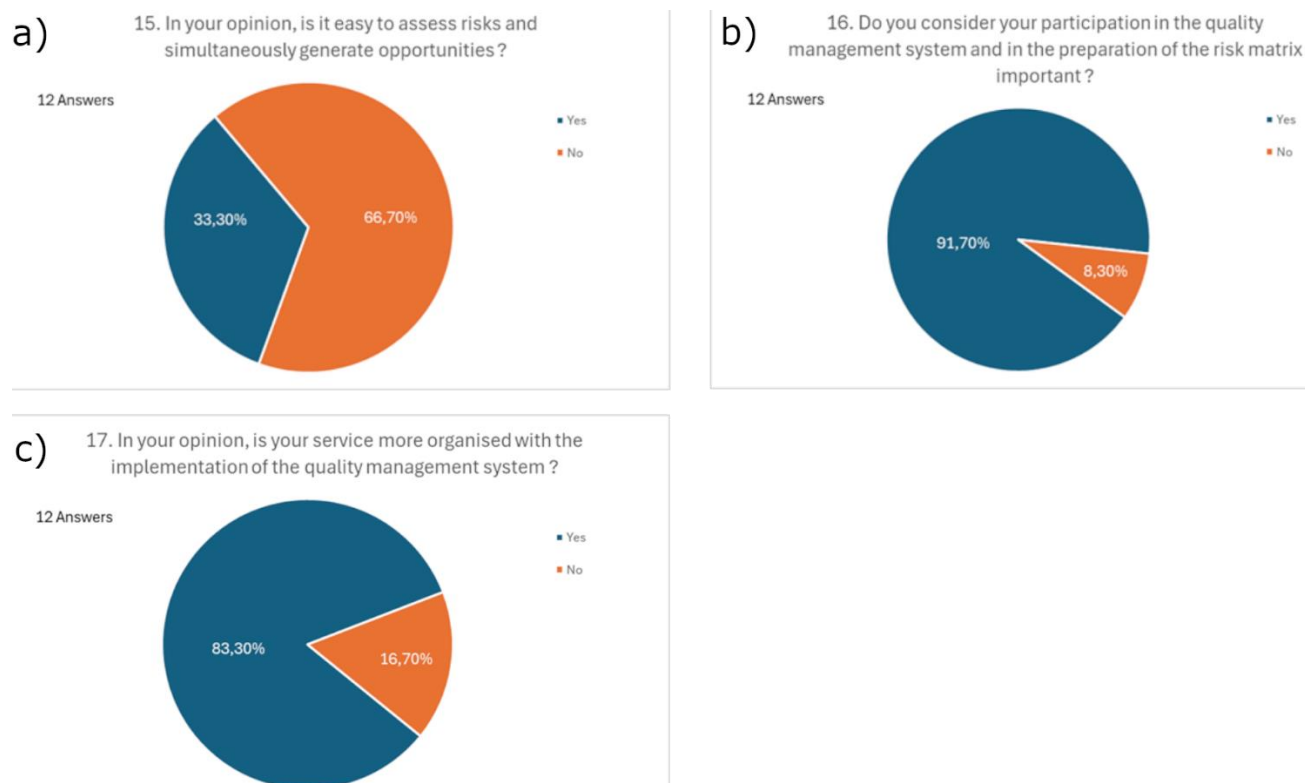


Figure 5. Graphics representing the answers to the questions: **a)** “In your opinion, is it easy to assess risks and simultaneously generate opportunities?”; **b)** “Do you consider your participation in the quality management system and in the preparation of the risk matrix important?”; and **c)** “In your opinion, is your service more organized with the implementation of the quality management system?”. “Yes” answers in blue and “No” answers in orange.

3.3. The risk in Blood Bank Services

When directly asked about the risk in blood banks, 58.3% (7 BLSs) perceived their service as low risk, 16.7% (2) as moderate risk, and 25% (3) as high risk (Figure 6a).

Regarding the awareness of other health professionals about the risks associated with transfusion practices, 7 participants (58.3%) affirmed that this awareness is present in hospital settings, while 5 participants (41.7%) disagreed (Figure 6b). Nevertheless, a significant majority of the BLS respondents (91.7%, or 11 participants) reported the existence of multidisciplinary teams that are responsible for risk management (Figure 6c).

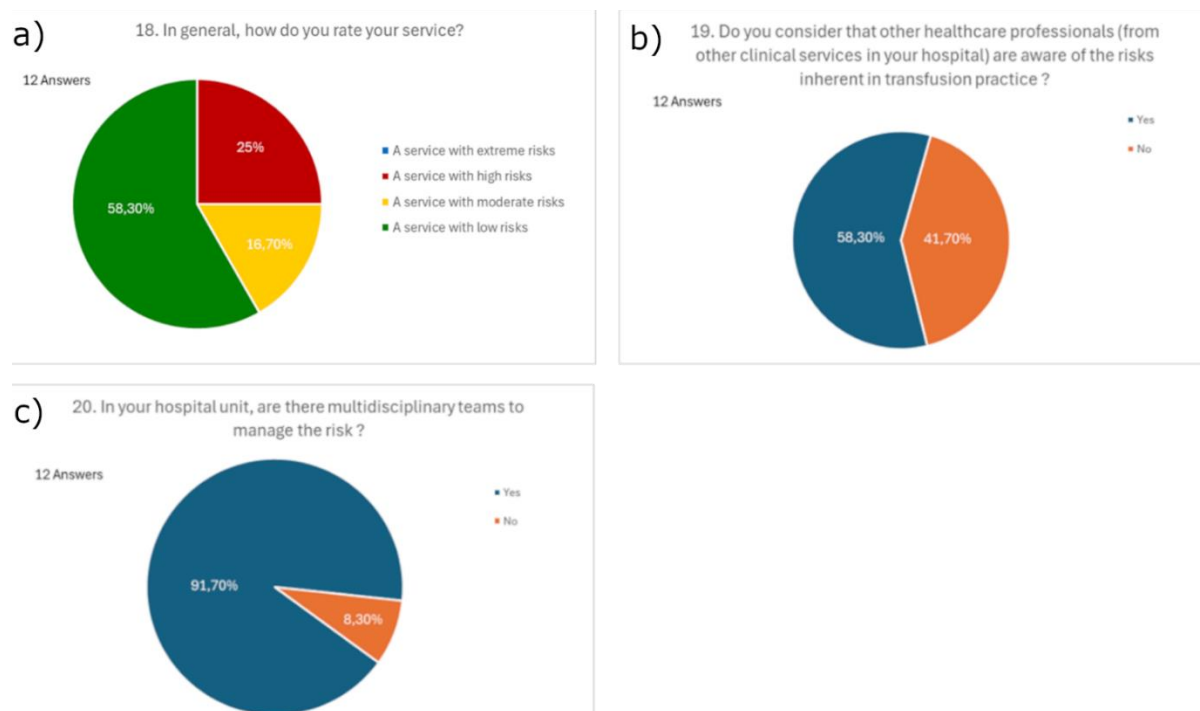


Figure 6. Graphics representing the answers to the questions: **a)** “In general, how do you consider your service (a service with extreme risks, in “green”; a service with moderate risks, in “yellow”; a service with high risks in “red”; and a service with extreme risks in “blue”; **b)** “Do you consider that other healthcare professionals (from other clinical services in your hospital) are aware of the risks inherent in transfusion practice?”; and **c)** “In your hospital unit, are there multidisciplinary teams to manage the risk?”. “Yes” answers in blue and “No” answers in orange.

4. Discussion

The questionnaire presented here allowed for a general and indirect study of the implementation of QMS and risk matrices in various blood banks across the country. It also facilitated an understanding of the involvement of stakeholders in their implementation.

In the initial stage of analysis, it is evident that BLS are more familiar with the NP EN ISO 9001:2015 certification standard (which outlines the requirements for a QMS) [7], than with the NP EN ISO 17025:2018 accreditation standard for testing laboratories.[8] Knowledge of the ACSA certification model and the JCI accreditation model falls in between these two levels of familiarity. These conclusions can be attributed to the fact that most institutions or companies are certified by the NP EN ISO 9001:2015 standard, while the ACSA and JCI models are more applied in hospital environments.

In the context of implementing QMS and risk matrices in blood banks, all service delivery team members (BLS) work in departments where a QMS is established. This indicates a commitment to quality practices within these departments and the health institutions themselves. However, there are notable gaps in the quality training that BLS have received, as well as in their understanding of regulatory requirements related to risk assessment. These findings demonstrate the necessity for blood banks to provide and promote quality training for their employees and to integrate this training into the QMS framework. Despite the lack of repeated training, only 11.1% of respondents did not recognize a risk matrix. This suggests that even without specific quality training, BLS understand the importance of implementing risk matrices in blood banks. This awareness may result from the numerous risks involved in blood transfusion processes and the significant impact that those risks can have on patients' lives. [9]

According to the obtained answers, it is also clear that most Blood Banks have built a risk matrix. The answer to the aforementioned question shows the growing interest in continuous improvement within the services and the effort to enhance efficiency through risk-based thinking. Nonetheless, it is important to note that the BLS are not involved in the development of the risk assessment matrix or in defining mitigating actions. This could be attributed to a lack of training for BLS on this topic or their potential exclusion by managers of Blood Banks or Hospital's quality teams. Moreover, in terms of how the risk matrix is applied and updated in blood banks, over half of the BLSs reported that the risk matrix is applied dynamically. However, the same percentage indicated that they do not participate in updating the matrix. Additionally, while the BLS acknowledge the importance of implementing the risk matrix, they do not influence its revision. Even though, the majority of the BLS stated that the implementation of the risk matrix has made it easier to identify preventive actions, resulting in a more effective and efficient service. This approach demonstrates that using risk matrices, enhances risk-based thinking [10], even within hospital organizations. Additionally, the BLS believes that the matrix helps to prevent errors and near misses.

When asked about their ability to assess risks while also identifying opportunities for improvement, 66.7% of the BLS found it challenging to do so. However, 91.7% of these technicians believe that it is important for them to be involved in implementing the QMS and the risk matrix. Analysis of these results reveals that while the BLS faces difficulties in developing preventive measures and strategies, it shows great interest in participating in their creation. When asked about the risks associated with their services, 58.3% of respondents indicated that their blood banks posed low risks. This result may reflect the effective application of risk matrices and QMS, as well as the efficiency and effectiveness of the implemented risk mitigation strategies. Additionally, the presence of specialized teams with clinical and laboratory experience (common in blood banks) can enhance confidence in the operations. However, it is important to consider that there may be a lack of awareness among staff regarding the significant risks involved, as blood banks are one of the services known to carry high risks that can greatly impact patients during the transfusion process.

On the other hand, 25% of the BLS reported that their services present high risks. This indicates a heightened awareness of risk within blood banks, regardless of how it is defined and described in risk matrices. The questionnaire also revealed that other clinical services in the hospital units recognize the inherent risks associated with transfusion practices. This is a very positive finding, as it suggests that healthcare professionals are conscious of the high risks involved in transfusions and are likely more attentive in detecting errors or near misses. Additionally, approximately 92% of BLS indicated that their hospital units have multidisciplinary risk management teams in place.

This study is limited by the small number of responses received. Although the topic is quite specific, we were unable to collect a higher volume of responses. Further research is essential to understand the reality of blood banks in Portugal and the role of BLS in quality and risk management. Nonetheless, this study allowed for the first conclusions about BLS perception of the implementation of risk matrices in Blood Bank Services in Portugal, and to the best of our knowledge, this is the first study to assess this subject.

5. Conclusions

In conclusion, most of BLS have knowledge about certification and accreditation standards. However, a lack of specialized training in quality management and the absence of specialized personnel in the development of risk matrices has led to challenges in defining preventive measures.

When establishing a QMS and risk management, particularly with the proper development of risk matrices, it is advisable to involve a multidisciplinary team. This study highlighted the limited involvement of specialized personnel in creating and updating risk matrices in blood banks. Therefore, it is essential to encourage these health professionals to engage in risk management and to raise awareness among hospital managers about the importance of their expertise in quality management.

Supplementary Materials: Questionnaire, given to Biomedical Laboratory Scientists.

Author Contributions: “Conceptualization, Sílvia Martins; methodology, Sílvia Martins; software, Tiago Plácido; validation, Sílvia Martins; formal analysis, Tiago Plácido.; investigation, Tiago Plácido.; resources, Tiago Plácido.; data curation, Tiago Plácido; writing—original draft preparation, Tiago Plácido; writing—review and editing, Sílvia Martins; visualization, Tiago Plácido and Sílvia Martins; supervision, Sílvia Martins; project administration, Sílvia Martins.

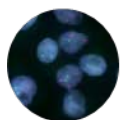
All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

6. References

- [1] Lestari, F., Kadir, A., Miswary, T., Maharani, C. F., Bowolaksono, A., & Paramitasari, D. (2021). Implementation of bio-risk management system in a national clinical and medical referral centre laboratories. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(5), 2308.
- [2] Bolcato, M., Russo, M., Trentino, K., Isbister, J., Rodriguez, D., & Aprile, A. (2020). Patient blood management: The best approach to transfusion medicine risk management. *Transfusion and apheresis science*, 59(4), 102779.
- [3] Guerra, F., Guzzo, A. S., La Rosa, P., Miatto, I., Vergati, D., Miredi, F., Ottolenghi, L. (2021). Risk management and Healthcare responsibility. How to guarantee legal protection in Medicine. *La Clinica Terapeutica*, 172(1), 63-66.
- [4] AlShammari, W., Alhussain, H., & Rizk, N. M. (2021). Risk management assessments and recommendations among students, staff, and health care workers in educational biomedical laboratories. *Risk Management and Healthcare Policy*, 185-198.
- [5] Gay, S., Pope, B., Badrick T., Whiley, M. (2021) Review of current incidents and risk calculations used in the Royal College of Australasian Pathologists Key Incident Management and Monitoring Systems - a system that could be used by all Australasian medical laboratories, and easily adapted to worldwide use. *Biochemia Medica*. Dec 15;32(1):010702.
- [6] Arnold, J. L. (2005). Risk and risk assessment in health emergency management. *Prehospital and Disaster Medicine*, 20(3), 143-154.
- [7] Portuguese Quality Institute. (2015). NP EN ISO 9001:2015. Quality Management Systems - Requirements.
- [8] Portuguese Quality Institute. (2018). NP EN ISO/IEC 17025:2018. General competency requirements for testing and calibration laboratories.
- [9] Teles, A. (2014) Patient Safety in Transfusion Medicine. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*. (11) 2: 173-178
- [10] Jensen, R. C., Bird, R. L., & Nichols, B. W. (2022). Risk assessment matrices for workplace hazards: Design for usability. *International journal of environmental research and public health*, 19(5), 2763.



Artigo Original

Avaliação da higienização das mãos e dos telemóveis de estudantes de ensino superior

Diogo Lira ^{1✉}, José Sousa ¹, Juliana Vieira ¹, António Nogueira^{1,2}, Cristina Teixeira¹, Andrea Afonso^{1,3*}

¹ Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Bragança, Avenida D. Afonso V, 5300-121 Bragança, Portugal;

² Live Well, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal;

³ Laboratório de Saúde Pública, Unidade Local de Saúde do Nordeste, Rua Engenheiro Adelino Amaro da Costa, 5300-146 Bragança, Portugal;

✉ Os autores tiveram a mesma contribuição no trabalho

* Autor correspondente: andrea@ipb.pt

Resumo

Atualmente, o manuseamento do telemóvel é uma necessidade, e com o uso excessivo, este torna-se suscetível à transferência e propagação de microrganismos se não for higienizado. O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, frequentemente encontrada na pele e mucosas humanas, podendo causar infeções graves quando, a partir de ambientes propícios, como as superfícies dos telemóveis. É importante monitorizar o nível de contaminação dos dispositivos e os hábitos de higiene dos seus utilizadores. Foi aplicado um questionário a 56 estudantes do curso de Ciências Biomédicas Laboratoriais. Foi avaliada a higienização dos telemóveis e das mãos do seu manipulador em amostras de 50 destes participantes, obtidas através da passagem de zaragatoas, na superfície das mãos e dos respetivos telemóveis. Foi avaliada a presença de estafilococos produtores de coagulase nas mãos dos estudantes e a presença de microrganismos mesófilos contaminantes na superfície dos seus dispositivos móveis. Os resultados do estudo mostraram que o comportamento da higienização dos telemóveis não foi efetuado por 26,8% da população em estudo, sendo que 18% dos dispositivos eletrónicos se encontravam com níveis superiores a 100 UFC de microrganismos mesófilos. A colonização por *S. aureus* foi encontrada em 12% das mãos dos participantes. O nosso estudo não mostrou uma relação direta entre a presença de microrganismos mesófilos aeróbios na superfície dos telemóveis e a presença de estafilococos produtores de coagulase nas mãos dos utilizadores. No entanto, demonstra que estes dispositivos eletrónicos albergam uma grande variedade de microrganismos, sugerindo que possam estar associados à sua manipulação, e que podem estar contaminados com microrganismos patogénicos, como é o caso do *S. aureus*.

Palavras Chave: Higienização; Telemóveis; Mãos; *Staphylococcus aureus*; Microrganismos mesófilos

Citation: Lira, D.; Sousa, J.; Vieira, J.
Avaliação da Higienização dos telemóveis dos estudantes do curso de Ciências Biomédicas Laboratoriais. Trends in Biomedical Laboratory Sciences. 2025 Mar 9; 3(1): 107- 113.

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: February 2025

Accepted: February 2025

Published: March 2025

Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences

1. Introdução

Nos tempos atuais, verifica-se que as pessoas têm uma maior necessidade de ter em sua posse um dispositivo móvel, cujo uso excessivo contribui para uma interação constante entre as mãos humanas e os telemóveis. Uma das preocupações relacionadas com a saúde pública está na avaliação da sua limpeza, e na garantia de que sejam utilizados sem risco de transmissão de agentes patogénicos, pois a combinação de fatores como temperatura, humidade e o material da tela criam um ambiente favorável para a proliferação de microrganismos (1). Está documentado que a higienização frequente destes dispositivos móveis permite prevenir a transmissão de infeções, nomeadamente do vírus da gripe, Sars-Cov-2 e bactérias, como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* e *Proteus* (2).

Há mais de 150 anos que a higiene das mãos é reconhecida como a principal medida para evitar a transmissão de agentes infecciosos (3). De forma geral, as populações têm um conhecimento limitado sobre a forma de propagação de microrganismos (4), sendo por isso importante a transmissão de conhecimento e a literacia em saúde, como forma de minimizar o risco de exposição a agentes patogénicos através da utilização de dispositivos móveis (4). A capacidade de adesão de determinadas bactérias a superfícies abióticas, tem implicações importantes, pois estes

organismos podem sobreviver por longos períodos, através da formação de biofilmes. Exemplos de microrganismos mesófilos que podem formar biofilmes em ambientes abióticos incluem várias espécies de bactérias como *Staphylococcus spp.*, *E. coli* e *Pseudomonas spp.* (5).

A superfície dos telemóveis e a sua manipulação, contribuem para abrigar uma variedade de microrganismos, as condições de temperatura do telemóvel, a falta de higiene e a humidade das mãos podem criar boas condições para o desenvolvimento de agentes patogénicos (1), que podem passar, com alguma facilidade, para a face, olhos, mãos e boca do utilizador.

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, produtora de coagulase, frequentemente encontrada na pele e mucosas humanas, podendo ser inofensiva em situações normais, mas também pode causar infeções graves quando introduzida em cortes ou feridas (6). Além disso, o *S. aureus* desenvolveu resistência a múltiplos antibióticos, tornando-se uma preocupação significativa na saúde pública (7). Este microrganismo coloniza as regiões rugosas das mãos, o que torna a sua remoção e desinfeção bastante difícil (8). Estas bactérias podem advir de ambientes propícios ao seu desenvolvimento, como as superfícies dos telemóveis realçando a importância de avaliar a contaminação destes dispositivos.

Este estudo tem como objetivo conhecer o comportamento de estudantes do curso de Ciências Biomédicas Laboratoriais (CBL) sobre a higienização dos seus telemóveis, bem como avaliar a contaminação das suas mãos por estafilococos produtores de coagulase e avaliar a presença de microrganismos mesófilos nos seus dispositivos eletrónicos.

2. Material e Métodos

Este é um estudo descritivo quantitativo, que pretende avaliar a higienização dos telemóveis e das mãos dos seus manipuladores. A amostra de conveniência é constituída por 56 estudantes do curso de licenciatura em CBL, que responderam a um questionário e para 50 destes estudantes foram recolhidas amostras para avaliação laboratorial microbiológica.

A pesquisa de microrganismos mesófilos aeróbios foi realizada em amostras recolhidas da superfície dos telemóveis, com base no protocolo de avaliação da higienização de superfícies em contacto com alimentos (9), com uma adaptação aos telemóveis.

De uma forma genérica a colheita das amostras na superfície dos telemóveis, foi realizada da seguinte forma: humedeceu-se cada zaragatoa (PVL, Portugal, Odivelas) nos respetivos tubos de solução *Maximum Recovery Diluent* (Biogerm, Portugal, Porto) e recolheram-se as amostras por passagem das zaragatoas sobre cada superfície a analisar em várias direções, introduzindo-se nos respetivos tubos, que de seguida foram agitados no vórtex (VWR, Portugal, Oeiras), durante 30 segundos (solução mãe). 1 ml de cada amostra solução mãe foi pipetada para duas placas de Petri (JMGS, Portugal, Odivelas). Efetuaram-se duas diluições, a 1/10 e 1/100 e pipetou-se, a partir destas, 1 ml para duas placas de Petri. Utilizou-se a técnica de incorporação, adicionando às amostras nas placas de Petri, meio de *Plate Count Agar* (Biogerm, Portugal, Porto) fundido e arrefecido a 44°C. Misturou-se suavemente, deixou-se arrefecer e incubou-se a 30°±1°C durante 72h. No final do tempo de incubação, procedeu-se à contagem de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) de microrganismos mesófilos aeróbios. os parâmetros microbiológicos de interesse foram o número de UFC de microrganismos mesófilos aeróbios (amostra positiva que significa igual ou superior a 1 UFC).

Procedemos a uma categorização do nível de higienização dos dispositivos móveis, tendo em conta o número de UFC de microrganismos mesófilos. Assim, as amostras foram classificadas em 3 grupos (<100, 100-300, ≥300 UFC). O estado de higiene dos telemóveis foi classificado como “satisfatório” nos casos em que foram contados um número de UFC inferior a 100 (UFC<100); como “insatisfatório” nos casos com um número de UFC entre 100 a 300 (100-300 UFC); e como “mau” nos casos com contagens de UFC superiores a 300 (UFC>300).

A pesquisa de estafilococos produtores de coagulase positiva nas mãos tem como base a recolha de amostras da superfície das mãos dos utilizadores dos telemóveis por passagem de zaragatoas, transferidas para tubos de solução salina *Maximum Recovery Diluent*. Os tubos que continham as zaragatoas, foram agitados no vórtex durante 30 segundos. Semeou-se por técnica de espalhamento 0,1 ml no meio de *Manitol Salt Agar* (MSA) (Frilabo, Portugal, Porto), que incubou a 37°C/48h, fazendo em paralelo um pré-enriquecimento em meio Chapman (Frilabo, Portugal, Porto). Nos casos em que se observaram colónias no meio MSA, repicaram-se para tubos de caldo *Brain-Heart* (Frilabo, Portugal, Porto), que foi incubar a 37°C/24h. Fez-se um esfregaço que se corou pela técnica de Gram, e no caso de se observarem cocos Gram-positivos, efetuou-se a prova

da coagulase, que consiste em colocar 0,3 ml de plasma de coelho (Biomérieux, Portugal, Oeiras), juntamente com 0,1ml de caldo de Brain-Heart com crescimento bacteriano. Incubou-se a 37°C e fez-se a interpretação após 4h. Consideraram-se positivas para *S. aureus*, as amostras em que se observaram cocos Gram-positivos e cuja prova da coagulase foi positiva (9).

O questionário aplicado neste estudo sobre a higienização dos telemóveis, baseou-se num questionário validado pelo Ministério da Educação sobre a higienização pessoal, que foi adaptada ao nosso estudo (10). Foi questionada a frequência de higienização dos telemóveis (“todos os dias”, “2 a 3 vezes por semana”, “1 vez por semana” e “raramente”) e também das mãos dos seus utilizadores (“Muitas vezes”, “Algumas vezes”, “Raramente” e “Nunca”), para além disso, foi questionado sobre o conhecimento de microrganismos e o risco de saúde associados à falta de higienização dos dispositivos móveis (“sim” e “não”) (Anexo 1).

No que se refere ao tratamento de dados, utilizamos a plataforma Microsoft Excel versão 2404 (Microsoft, Estados Unidos da América, Washington). Foram realizadas frequências absolutas, relativas e o teste exato de Fisher para avaliar a associação entre a presença de microrganismos mesófilos aeróbios, com a existência de microrganismos produtores de coagulase, aplicando um nível de significância de 0,05.

A apreciação ética do estudo teve um parecer favorável após avaliação da comissão de ética do Instituto Politécnico de Bragança (IPB), cujo o código do processo é P518287 e o nº de requerimento: R629458.

3. Resultados

No que diz respeito às amostras recolhidas na superfície dos telemóveis (n=50), os resultados obtidos relativamente à pesquisa de microrganismos mesófilos aeróbios na superfície dos telemóveis encontram-se na Tabela 1.

Das 50 amostras analisadas, verificou-se que 5 ultrapassaram 300 UFC (10%) nas placas de Petri das soluções mãe, sendo necessário recorrer às diluições efetuadas para contagem do número definitivo de UFC. Quando tivemos de recorrer às placas com diluições de 1/100, essas amostras correspondiam àquelas que apresentavam um número mais elevado de microrganismos mesófilos aeróbios, o que é expectável pelo fato de que nas placas de solução mãe e de diluição 1/10 se terem obtido contagens superiores a 300 UFC.

Tabela 1 – Pesquisa de microrganismo mesófilos aeróbios na superfície dos telemóveis

Amostras	UFC	Amostras	UFC	Amostras	UFC
1	156	18	0	35	5
2	40	19	262	36	2200
3	19	20	10	37	41
4	9	21	0	38	20
5	33	22	14	39	3
6	4	23	3	40	15
7	15	24	0	41	34
8	17	25	2	42	2
9	3	26	15	43	21
10	0	27	2	44	60000
11	0	28	3	45	243
12	5	29	32	46	60000
13	2	30	6	47	12
14	3	31	9	48	200
15	2	32	58	49	3

16	3	33	45400	50	57
17	1	34	55000		

Tendo em conta a categorização de acordo com o nível de higienização dos dispositivos móveis, 82% (n=41) das amostras refletem higienização satisfatória do dispositivo (<100 UFC), enquanto que 8% (n=4) e 10% (n=5) apresentam nível de higienização insatisfatória (100 a 300 UFC) e má (>300 UFC), respetivamente.

Verificou-se que em 6 amostras (12%) recolhidas nas mãos (5, 7, 45, 47, 48, 49) apresentavam um teste positivo na prova da coagulase, o que significa que existe possibilidade de presença de *S. aureus*. Tal como se observa na **Tabela 2**, neste grupo há menor proporção de amostras refletindo higienização satisfatória do telemóvel em comparação com o grupo de amostras coagulase negativa (66,7% vs 84%), embora esta diferença não seja estatisticamente significativa (p=0,293).

Tabela 2- Relação entre a presença de estafilococos produtores de coagulase nas mãos e o estado higiénico dos telemóveis

Estado higiénico dos telemóveis	presença de estafilococos produtores de coagulase nas mãos				Valor-p*
	Coagulase – n=44		Coagulase + n=6		
	n	%	n	%	
Satisfatório (<100 UFC)	37	84,0	4	66,7	0,293
Insatisfatório (100-300 UFC)	2	4,6	2	33,3	
Mau (>300 UFC)	5	11,4	0	0	

* teste exato de Fisher comparando Satisfatório com Insatisfatório/Mau

Os resultados das respostas ao questionário apresentam-se na **Tabela 3**. Dos 56 participantes que responderam ao questionário, 62,5% (n=35) lavam as mãos com alguma frequência e ninguém respondeu que nunca ou raramente lava as mãos. No entanto, à questão “Com que frequência higienizas o teu telemóvel?”, um em cada quatro participantes (26,8%; n=15) responderam “Nunca” e cerca de metade (51,8%; n=29) reportaram fazê-lo apenas “uma vez por semana”. Um em cada cinco participantes (23,2%; n=13) não conhece os riscos associados à não higienização dos dispositivos e metade dos participantes não tem conhecimento sobre algum microrganismo associado à falta de higienização dos telemóveis.

Tabela 3 – Respostas aos inquéritos sobre a higienização dos estudantes de CBL

	n	%
Com que frequência lavas as mãos, por dia?	Nunca ou raramente	0
	Algumas vezes	35
	Muitas vezes	21
Com que frequência higienizas o telemóvel?	Nunca	15

	1 vez por semana	29	51,8
	2 a 3 vezes por semana	9	16,0
	Todos os dias	3	5,4
Estás ciente dos riscos de saúde associados à falta de higienização do telemóvel?	Sim	43	76,8
	Não	13	23,2
Tens conhecimento de algum microrganismo associado à falta de higienização do telemóvel?	Sim	28	50,0
	Não	28	50,0

4. Discussão

No nosso estudo, 18% dos estudantes de CBL participantes possuem telemóveis com baixo nível de higienização, ou seja, apresentam valores de microrganismos mesófilos superiores a 100 UFC (10% com classificação “mau” e 8% com classificação “insatisfatório”). Estes dispositivos móveis são objetos capazes de abrigar microrganismos, tornando-se uma possível forma de transmissão de infeções (2). Outros autores observaram uma taxa de crescimento de agentes patogénicos de 40-100% na superfície de telemóveis, sendo a maioria bactérias potencialmente nosocomiais, causando infeções relacionadas com os cuidados de saúde (IACS) (11). Os nossos resultados permitem documentar a falta de higienização dos dispositivos móveis dos estudantes, ainda que com taxas de contaminação inferiores a outros estudos (11).

Resultados diferentes foram observados em estudos semelhantes realizados noutros países. Uma pesquisa que avaliou a higienização dos telemóveis de estudantes e profissionais de saúde no Brasil, mostrou que 100% destes dispositivos estavam contaminados com microrganismos, sendo que 51,1% continham *S. aureus* (2). Num outro estudo realizado na Arábia Saudita, em estudantes de medicina, a contaminação bacteriana dos telemóveis foi de 96,2%. Neste trabalho, as amostras recolhidas nos telemóveis continham *S. aureus*, o que representa elevada percentagem de contaminação com este microrganismo patogénico (12). A sua transferência para estes dispositivos móveis advém, muito provavelmente das mãos dos seus utilizadores. Estas evidências da presença de *S. aureus*, quer nas mãos quer nos telemóveis, mostram a importância da sua monitorização principalmente, porque este agente patogénico desenvolveu resistência a múltiplos antibióticos, tornando-se uma preocupação significativa na saúde pública (7). Estes aspetos reforçam a importância da adoção de medidas de controlo para prevenir a ocorrência de IACS (2).

De acordo com os nossos resultados, 12% das amostras recolhidas nas mãos dos utilizadores destes dispositivos móveis, estavam contaminadas com estafilococos produtores de coagulase, o que vai ao encontro de outros estudos que consideram que cerca de 10-20% da população pode ser portadora assintomática de *S. aureus* (6,13). Os nossos resultados parecem estar de acordo com outra pesquisa realizada em profissionais de saúde num hospital de Portugal, que relata que 8,9% dos indivíduos eram portadores de *S. aureus* nas mãos (14).

Apesar dos resultados do nosso estudo mostrarem níveis de contaminação dos telemóveis e nas mãos dos seus utilizadores, inferiores aos encontrados noutros estudos (2, 11, 12), os cuidados com a higienização por parte dos estudantes universitários deveriam ser redobrados, de forma a prevenir e controlar a ocorrência de IACS. Além disso, apesar da maioria dos universitários inquiridos desinfetarem os seus telemóveis com frequência (51,8% responderam 1 vez por semana), uma elevada percentagem (26,8%) diz nunca adotar procedimentos de higiene, o que parece estar associado à presença de microrganismos mesófilos >300 UFC em 10% das amostras recolhidas nos telemóveis e à presença de *S. aureus* nas mãos dos seus manipuladores (12% das amostras). Podemos também associar os níveis de contaminação referidos com as respostas à questão “O que utilizas para fazer a higienização do telemóvel?”, pois cerca de 30% utilizam métodos que não permitem uma remoção eficaz de microrganismos, como um pano ou papel que não têm impregnado qualquer desinfetante.

No entanto, é de referir que 62,5% dos estudantes referem lavar as mãos com alguma frequência e 37,5% dizem fazê-lo muitas vezes. Apesar de não ter sido efetuada a avaliação de outros agentes patogénicos, os nossos resultados mostram que não houve presença do microrganismo patogénico *S. aureus* nas mãos dos manipuladores em 88% das amostras e que 82% das amostras dos telemóveis apresentavam um estado higiénico satisfatório (UFC<100).

As amostras que tiveram um resultado positivo para *S. aureus* nas mãos, não correspondiam aos telemóveis, cujas superfícies apresentaram maior número de UFC de microrganismos

mesófilos. No entanto convém salientar que as amostras das mãos com prova coagulase positiva correspondem a dispositivos com menor percentagem de higienização satisfatória. Não se observou significância estatística para esta diferença, mas é de salientar que a dimensão amostral é pequena. No entanto, podemos concluir que a má higiene dos telemóveis afetará o crescimento da colonização bacteriana nas mãos, que ocorre devido ao contato com os telemóveis e vice-versa, situação documentada noutras investigações (11). Seria por isso interessante, em estudos posteriores, avaliar outros parâmetros microbiológicos numa maior amostra de telemóveis e das mãos dos seus manipuladores, por forma a perceber se há relação com o estado de higienização desses dispositivos e determinar a magnitude de uma possível contaminação e transmissão de doença.

5. Conclusões

Os telemóveis e as mãos dos seus utilizadores podem atuar como um portador de agentes infecciosos sugerindo a necessidade de uma higiene adequada não só das mãos, mas também da superfície destes dispositivos.

Os resultados do nosso estudo demonstram que estes dispositivos eletrónicos e as nossas mãos albergam uma variedade de organismos patogénicos, mesmo não existindo sintomas de doença. Os resultados não mostram uma relação direta entre a presença de microrganismos mesófilos aeróbios na superfície dos telemóveis com a presença de estafilococos produtores de coagulase nas mãos. No entanto, os dados apontam para uma tendência de colonização bacteriana dos dispositivos móveis e das mãos dos seus utilizadores, que pode estar associada a uma inadequada higienização dos mesmos, bem como à falta de conhecimento de procedimentos de limpeza e desinfecção, que evitam a transmissão de infeções.

Sendo os estudantes, incluídos no estudo, futuros profissionais de saúde, os valores obtidos reforçam a importância da adoção de medidas de higiene e a prevenção da transmissão de infeções associadas aos cuidados de saúde.

Consideramos assim que são necessários estudos adicionais, seja com uma amostragem maior, análise de outros índices higiénicos, nomeadamente microrganismos indicadores de contaminação ou até mesmo relacionar com outros fatores, como por exemplo fatores sazonais.

Contribuição dos autores: Conceptualização, D.L., J.S., J.V.; Metodologia, D.L., J.S., J.V.; Investigação, D.L., J.S., J.V.; Curadoria de dados, C.T.; Preparação do rascunho original, D.L., J.S., J.V.; Revisão e edição do rascunho, A. A., A.N.; Supervisão, A.A.;

Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Agradecimentos: Agradecemos à Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Bragança pela cedência do espaço laboratorial para a execução do nosso estudo.

Conflitos de Interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

6. Referências

1. Gonzalez, J. M., & Aranda, B. (2023). Microbial Growth under Limiting Conditions-Future Perspectives. In *Microorganisms* (Vol. 11, Issue 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071641>
2. Moreira, B. M., Carvalho, K. L. P., Santos, D. D. S., & Pinto, L. C. (2022). Análise bacteriológica de aparelhos celulares em um serviço público de saúde em Belém, estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 13(0). <https://doi.org/10.5123/s2176-6223202200894>
3. Sroka, S., Gastmeier, P., & Meyer, E. (2010). Impact of alcohol hand-rub use on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an analysis of the literature. In *Journal of Hospital Infection* (Vol. 74, Issue 3, pp. 204–211). <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.08.023>
4. Martina, P. F., Martinez, M., Centeno, C. K., Von Specht, M., & Ferreras, J. (2019). Dangerous passengers: Multidrug-resistant bacteria on hands and mobile phones. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 60(4), E293–E299. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2019.60.4.1283>
5. Costa, G. A., Rossatto, F. C. P., Medeiros, A. W., Correa, A. P. F., Brandelli, A., Frazzon, A. P. G., & Da Motta, A. de S. (2018). Evaluation antibacterial and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P34 against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 90(1), 73–84. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820160131>

6. Tallent S., Hait J., Bennett R. W., Lancette G. A. (2016). Food and Drug Administration (FDA). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 12: *Staphylococcus aureus* (March 2016 Edition). <https://www.fda.gov/media/183067/download?attachment>.
7. Adams, C. E., & Dancer, S. J. (2020). Dynamic transmission of *Staphylococcus aureus* in the intensive care unit. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph17062109>
8. Brady, R. R., Fraser, S. F., Dunlop, M. G., Paterson-Brown, S., & Gibb, A. P. (2007). Bacterial contamination of mobile communication devices in the operative environment. In *Journal of Hospital Infection* (Vol. 66, Issue 4, pp. 397–398). <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2007.04.015>
9. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). (n.d.). Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar Valores-guia. https://www.insa.min-saude.pt/wp-content/uploads/2019/12/INSA_Valores-guia.pdf
10. Hand Hygiene Self-Assessment Framework: Introduction and user instructions, World Health Organization 2010. [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/integrated-health-services-\(ihs\)/hand-hygiene/tools/hug/hhsa-framework-2011-portuguese.pdf?sfvrsn=6c5d5c68_2](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/integrated-health-services-(ihs)/hand-hygiene/tools/hug/hhsa-framework-2011-portuguese.pdf?sfvrsn=6c5d5c68_2)
11. Afridayani, M., Prastiwi, Y. I., Aulawi, K., Rahmat, I., Nirwati, H., & Haryani. (2021). Relationship between hand hygiene behavior and *Staphylococcus aureus* colonization on cell phones of nurses in the intensive care unit. *Belitung Nursing Journal*, 7(1), 24–30. <https://doi.org/10.33546/bnj.1223>
12. Zakai, S., Mashat, A., Abumohssin, A., Samarkandi, A., Almaghrabi, B., Barradah, H., & Jiman-Fatani, A. (2016). Bacterial contamination of cell phones of medical students at King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 4(3), 143. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2015.12.004>.
13. Etter, D., Corti, S., Spirig, S., Cernela, N., Stephan, R., & Johler, S. (2020). *Staphylococcus aureus* Population Structure and Genomic Profiles in Asymptomatic Carriers in Switzerland. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01289>
14. Castro, A., Komora, N., Ferreira, V., Lira, A., Mota, M., Silva, J., & Teixeira, P. (2016). Prevalence of *Staphylococcus aureus* from nares and hands on health care professionals in a Portuguese Hospital. *Journal of Applied Microbiology*, 121(3), 831–839. <https://doi.org/10.1111/jam.13186>
15. Al Momani, W., Khatatbeh, M., & Altaany, Z. (2019). Antibiotic susceptibility of bacterial pathogens recovered from the hand and mobile phones of university students. www.germs.ro
16. Alves, A., Viveiros, C., Lopes, J., Nogueira, A., Pires, B., & Afonso, A. F. (n.d.). Microbiological Contamination in Different Food Service Units 2 Associated with Food Handling. *Appl. Sci*, 2021. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>
17. Franklin D. Lowy, M.D.(1998).*Staphylococcus Aureus* Infections.New England Journal of Medicine, Volume 339, Number 8, August 20, 1998 <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199808203390806>
18. Velázquez-Guadarrama, N., Olivares-Cervantes, A. L., Salinas, E., Martínez, L., Escorcia, M., Oropeza, R., & Rosas, I. (2017). Presence of environmental coagulase-positive staphylococci, their clonal relationship, resistance factors and ability to form biofilm. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(1), 15–23. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2016.08.006>
19. Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* Infections. *New England Journal of Medicine*, 339(8), 520–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>
20. Lupión, C., López-Cortés, L. E., & Rodríguez-Baño, J. (2014). Preventive measures for avoiding transmission of microorganisms between hospitalised patients. *Hand hygiene. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(9), 603–609. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2014.02.003>
21. Sobrequés, J., Espuñes, J., & Bañeres, J. (2014). Estrategia para mejorar la práctica de higiene de manos en Catalunya. *Medicina Clínica*, 143(SUPPL. 1), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2014.07.009>
22. Silva, J. E. B. da, Cabral, A. M. T., Alves, R. R., Silva, L. B. da, Silva, A. da C., & Silva, M. L. R. B. da. (2021). Contaminação Bacteriológica dos Aparelhos Celulares de Acadêmicos de Saúde de um Centro Universitário do Recife – PE. *Research, Society and Development*, 10(9), e26210918064. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i9.18064>
23. Barbosa Souza, L. L., & Ferreira, L. C. (2018). Contaminação microbiológica em Smartphones. *Revista Vértices*, 20(2), 207–212. <https://doi.org/10.19180/1809-2667.V20N22018P207-212>
24. Figueiredo, F. S., & Costa, P. F. P. da. (2021). Revisão bibliográfica: Presença de Microrganismos em Aparelhos Eletrônicos. *Research, Society and Development*, 10(14), e359101422204. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i14.22204>
25. Hassoun, A., Linden, P. K., & Friedman, B. (2017). Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. In *Critical care (London, England)* (Vol. 21, Issue 1, p. 211). <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1801-3>

Review Article

Transfusion strategies to reduce the risk of alloimmunization in patients with sickle cell anaemia

Mariana Anacleto ¹, Silvia Martins ^{1,2,3}¹ Instituto Politécnico de Castelo Branco, ESALD-Dr. Lopes Dias Health School, Ciências Biomédicas Laboratoriais, Castelo Branco, Portugal² Department of Clinical Pathology, Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, Quinta Do Alvito, 6200-251, Covilhã, Portugal.³ University of Coimbra, Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR), Faculty of Medicine, Coimbra, Portugal.* Correspondence: silviamartins@ipcb.pt

Abstract: Transfusion therapy with packed red blood cells (RBC) is frequently used in sickle cell anaemia (SCA) patients. Although SCA is common among African populations, current migratory dynamics and genetic variability across different groups present challenges in transfusion practices, particularly regarding the risk of alloimmunization. This study aimed to review the topic of RBC transfusion in patients with SCA and to describe the importance of implementing new strategies and best practices in transfusion medicine to prevent or reduce alloimmunization in these patients.

A literature review was carried out on the websites PubMed, Google Scholar, and ELSEVIER using the keywords: transfusion, SCA, and alloimmunization.

The literature reports that alloantibody development is directly proportional to the number of RBC units administered. The frequency of the C, E, K, Jkb, Fya, Fyb, Lea and S antigens are of low frequency in African individuals compared to those of European descent. RH system allo-antibodies, mainly C, E, and K represent more than two-thirds of detected antibodies. Also, variants D, C, and E are common in African individuals thus contributing to allo-immunization. Furthermore, autoantibodies are frequently found in previously immunized patients or developed concomitantly in SCA patients.

Solutions to overcome the limitations of serological tests and detect antigen variants include donor selection, access to transfusion history, extending antigenic and phenotypic compatibility between donor and patient, and molecular typing, mainly in the detection of RH system variants.

Keywords: Sickle cell anaemia, genotyping methods, red blood cells transfusion, alloimmunization, hemoglobin

Citation: Anacleto, M.; Martins, S.
Transfusion strategies to reduce the risk of alloimmunization in patients with sickle cell anaemia. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2025 Mar 9; 3(1): 114-123.

ISSN 2976-0127

Academic Editor: Diana Martins

Received: November 2024

Accepted: February 2025

Published: March 2025

Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Trends of Biomedical Laboratory Sciences

1. Introduction

Sickle cell anaemia (SCA) is an inherited disorder that causes abnormal shapes in red blood cells. [1-3] The aetiology involves a mutation in a single gene of the haemoglobin β chains, which transforms normal haemoglobin into a pathological form. This mutation alters the structure of erythrocytes, changing them from a rounded, biconcave disc shape to a sickle shape. [1-4]

The first scientific reference to sickle cells was made in 1910 by James Bryan Herrick. In 1949, Pauling *et al.* described a point mutation in the gene encoding the β chain of haemoglobin on

chromosome 11, where an adenine is replaced by a thymine. This change results in the substitution of an amino acid: glutamic acid is replaced by valine at the sixth position of the β chain. [2,3]

The structural modification reflects significant changes in the physicochemical properties of the haemoglobin molecule. One of these changes involves the polymerization process, whereby the β chain of haemoglobin S (HbS) has an unusual tendency to bind to different β chains of HbS when in a deoxygenated state. The resulting simple structural unit is a twisted, rope-like shape composed of entire chains of haemoglobin molecules with interlinked β chains. The result is a series of rigid polymerized haemoglobin molecules, decreasing erythrocytes' flexibility. [1-3]

Polymerization is a continuous process in SCA that depends on several factors. These factors include the rate and extent of deoxygenation as polymerization proceeds, with a decrease in oxygen saturation within haemoglobin; the concentration of HbS within the cells, where higher concentrations lead to faster polymerization; the composition of intracellular haemoglobin, as various haemoglobin variants can create a dilution effect, reducing the interactions between HbS molecules; the percentage of fetal haemoglobin (HbF), where a greater quantity results in lowered polymerization; and finally, the pH level, as a decrease in pH reduces haemoglobin's affinity for oxygen, thereby enhancing the polymerization process. [2,3] Polymerization causes an increase in the permeability of the erythrocyte membrane to cations (sodium, potassium, magnesium, and calcium). These ions cross the erythrocyte membrane, reducing the concentration gradient, activating various membrane transport systems, and promoting water release, which causes dehydration of the erythrocytes. Dehydration increases the concentration of HbS within the cells, leading to increased polymerization. As a result of these episodes of polymerization and dehydration, dense and irreversibly sickled cells form. These rigid and fragile cells are prone to premature destruction, resulting in anemia. [2,3] In addition, erythrocytes in SCA tend to express a higher affinity for vascular endothelium. This affinity and the increased concentrations of some plasma proteins such as cytokines (in times of stress) contribute to greater adhesion of erythrocytes to the endothelium, leading to vascular obstruction. [2,3]

The presence of sickle-shaped erythrocytes in the bloodstream can hinder blood flow due to vascular obstruction, leading to ischemia and vaso-occlusive crises. Hence, it can also cause premature destruction of erythrocytes, leading to a haemolytic anaemia. [1-4]

It is currently estimated that over 52,000 people suffer from SCA in Europe, primarily among individuals of African, Mediterranean, and Asian descent. [4] Its spread across Europe and the world can be attributed to increased migration. The most common treatment for patients with SCA, especially during hemolytic crises, is transfusion of red blood cell (RBC) concentrates. However, given the risks associated with blood transfusions, such as allo-immunization and the antigenic differences between populations – specifically the antigens C, E, K, Jkb, Fya, Fyb, Lea, and S – it is crucial to study, prevent, and manage cases of allo-immunization to promote safer transfusions.

This study aims to review the risks of RBC transfusion in patients with SCA and to describe new strategies, techniques, and best practices in transfusion medicine that can reduce allo-immunization in these patients.

2. Materials and Methods

To conduct this work, a literature review was performed on the websites PubMed, Google Scholar, and ELSEVIER, resulting in 29 scientific articles selected and published between the years 2000 and 2024. The following keyword combinations were utilized during the search: transfusion, sickle cell anemia, and allo-immunization. The selected articles focused on the application of transfusion therapy in patients with SCA and the associated risks of RBC transfusion in these patients. Articles on SCA and other haemoglobinopathies, transfusion practices in SCA, the risks of alloimmunization, and blood system considerations were included. The exclusion criteria encompassed cases involving other types of anaemia due to deficiencies in erythrocyte production, other hemolytic causes, enzyme deficiencies, membrane alterations, excessive blood loss, and other transfusion-related risks such as biological hazards or errors in the transfusion process.

3. Blood transfusion as treatment for SCA

Blood transfusion therapy is essential for monitoring patients with SCA. The objectives of blood transfusion include reducing the percentage of HbS in erythrocytes, suppressing its synthesis, improving tissue oxygenation, and correcting anaemia. [3,5-8]

There are indications and criteria for RBC transfusions, depending on the patient's clinical condition. [3,9] Some indications are described in Table 1.

Depending on the patient's clinical condition, the transfusion technique applied may also be different. RBC administration can be by simple transfusion or by exchange transfusion. Simple transfusion consists of infusing donor blood without removing blood from the patient. [5,7,8,10] However, this technique can increase blood viscosity, worsening vaso-occlusion and causing iron overload over time, requiring treatment with iron chelators or changing the transfusion modality. [5,7,10] Is normally indicated in splenic sequestration crises, in which the spleen increases in size due to increased erythrocyte haemolysis, which results in a sudden drop in haemoglobin levels, or hepatic and acute chest syndrome. [10]

Exchange transfusion involves removing blood from the patient during or before the infusion of donor blood. This removal may be partial or total and may be performed by phlebotomy (manual) or apheresis. Partial exchange by phlebotomy and its replacement by sequential infusion of donor blood allows greater changes in the proportion of HbS to HbA when compared with the simple transfusion technique. Apheresis exchange is useful in clinical situations which require a rapid and drastic reduction of HbS. [8] In this technique, iron overload is also less frequent than with simple transfusion. [5]

Table 1. Indications for transfusion in patients with sickle cell anaemia. Adapted from Chou ST, *et al.* 2016 [9]

Indications for transfusion in patients with sickle cell anaemia	
Stroke	Because of SCA, neurological complications such as strokes may occur. Stroke is usually ischemic, resulting from the obstruction of cerebral arteries by sickle cells.
Acute chest syndrome	This syndrome is described as an acute lung disease and is the second leading cause of hospital admission. The cause is not yet fully known, but it is suspected to be caused by infectious processes and vaso-occlusion of the pulmonary vasculature.
Acute vasocclusive episodes	Due to the presence of sickle-shaped erythrocytes in the bloodstream, it can impede blood flow leading to vascular obstruction. Being the main cause for hospital admissions.
Organ failure	It is the result of microvascular occlusion that may develop after several crises of vasocclusive episodes.
Acute liver damage	Consequence of vascular occlusion of the hepatic sinusoids.
Acute splenomegaly	Because of severe hemolysis, the spleen becomes more functional to eliminate sickle-shaped erythrocytes. As a result, the spleen enlarges rapidly.

Abbreviations List: SCA: Sickle cell anaemia

3.1. Risks associated with transfusion of red blood cell concentrates

3.1.1. Alloimmunization

Alloimmunization is the process of producing antibodies (anti-) against non-self antigens. It occurs when an individual is exposed to these antigens, such as through an RBC transfusion.

Alloimmunization is one of the most common complications of RBC transfusion. Its main cause is phenotypic incompatibility between donor and receiver, since differences in antigen expression are greater between ethnicities. [7,9-15] SCA patients face a higher risk of exposure to new antigens due to the frequency of transfusion episodes. In addition, most donors are of European descent, while SCA patients are primarily of African descent. [12]

Some of the red cell antigens present in European individuals are not common to those of African descent. The frequency of antigens C, E, K, Jkb, Fya, Fyb, Lea and S are low in African individuals compared with those of European descent. [12] Allo-antibodies of the RH system, mainly C, E, and K, account for more than two-thirds of the antibodies detected. [9,12-16]

Alloimmunization may also be related to the limitations of serological tests in detecting antigen variants. [9,12,14,16] These variants are mainly located in the *RHD* and *RHCE* genes that encode the proteins that express the D, C, c, E, and e antigens. Variants D, C, and E are frequently found in individuals of African descent, who may develop alloimmune antibodies when exposed to antigenic epitopes that they do not possess. [9,12,14]

The *RHD* gene encodes the D antigen, the *RHCE* gene encodes the C, E, and E antigens with different combinations (Figure 1). [14,17,18] Individuals who have an alteration in the *RHD* gene, for example, could encode partial D, characterized by the absence of one or more epitopes of the normal D antigen. When these individuals are exposed to normal D antigen, they are at risk of forming anti-D. In contrast, individuals with the altered *RHD* gene encoding weak D, whose expression of D antigen is reduced, but which possesses all of the respective epitopes, normally do not form anti-D (Figure 2). [14,17,18]

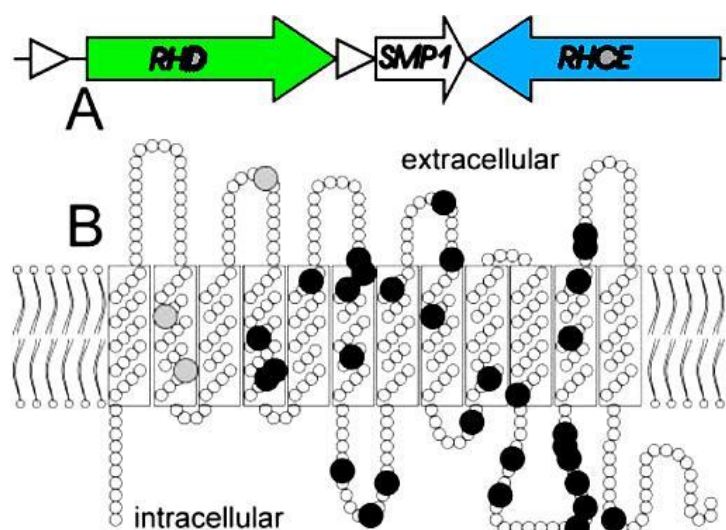


Figure 1. Structure of the *RH* gene locus and RH protein. (A) The two *RHD* genes and *RHCE* have opposite orientation and faces from each other. A third gene, *SMP1*, is located between *RHD* and *RHCE*. The *RHD* gene is flanked by two highly homologous and of identical orientation. (B) Represents the RH protein. The amino acids that differ between *RHD* and *RHCE* are dispersed throughout the protein represented by the black and grey circles. The RH protein forms twelve transmembrane helices and six extracellular loops. Adapted from Flegel, *et al.* [18]

The risk of alloimmunization is also linked to the total number of blood units administered. According to Eckman *et al.* [10], the prevalence of allo-antibody formation is directly proportional to the number of units administered. These studies demonstrated that between 50 and 99 RBC transfusions there is 25% alloimmunization; between 100 and 199 transfusions alloimmunization increases to 46%; and with 200 more transfusions the allo-immunization percentage rises to 57%. In summary, administering a higher number of units increases the risk of exposure to unfamiliar antigens. Reducing the number of transfused units may help lower the incidence of alloimmunization. [10]

Additionally, patients with SCA may face further risks after transfusions, such as hyperviscosity. RBC transfusions elevate blood viscosity without reducing the number of sickle-shaped cells. Patients with relatively higher haemoglobin levels, at both beginning and end of the transfusion, are at a greater risk of developing hyperviscosity syndrome. [15]

Additionally, patients with SCA often develop autoantibodies [11,12,15]. While there is limited data on the formation of these autoantibodies, they are commonly observed in SCA patients who have been previously immunized or who develop them concurrently. [7,11,12] Clinically,

these autoantibodies can potentiate moderate or severe haemolytic crises. [7,11,12] They are usually warm antibodies, characterized as panagglutinins, with no apparent specificity. [7,11,12] The greatest implication of the presence of autoantibodies in transfusion practice is the possibility that they camouflage the detection of alloantibodies. [7] Given the link between auto- and allo-antibodies, it is crucial to implement alternative techniques and solutions to decrease the production rates of these antibodies in patients with SCA.

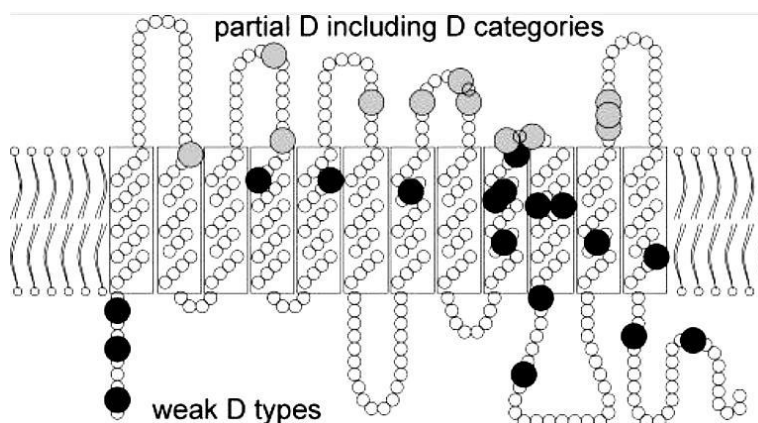


Figure 2. Differences between weak D and partial D. The amino acid positions affected in weak D are shown by black circles; those affected in the D partials are shown by the grey circles. Adapted from Flegel, *et al.* [18]

4. Transfusion strategies to reduce alloimmunization in patients with SCA

4.1 Donor selection

Enhancing communication with the African community to improve donor recruitment targeted at the SCA community enables blood banks to provide safer blood units for patients. [9,12,13,15]

4.2 Extended phenotyping

The extent of antigenic/phenotypic compatibility, between donor and receiver, significantly reduces alloimmunization. [9,10,12,13,15]

Multiple studies show that routinely assessing antigenic and phenotypic compatibility in patients with SCA decreases the rate of alloimmunization. [9,10,12,15]

In the study developed by Tahhan *et al.* [19] for example, none of the 40 patients who received RBC units with previous and coincident phenotypic extension developed allo-antibodies. Antigenic and phenotypic compatibility should be assessed in all patients with SCA proposed for RBC transfusion. This includes testing not only for ABO, Rh and Kell groups, but also for the Duffy, Kidd, and MNS systems, as antibodies to these systems present clinical significance. [9,10,12,13,15] However, limited compatibility to the C, E, and K antigens can considerably reduce alloimmunization, since antibodies of the Rh (C, D, E) and Kell systems are the most commonly developed by patients with SCA. [9,10,12,13,15,16] In fact, studies developed by several researchers reveal that the prevalence of alloimmunization in patients with SCA varies between 27% and 75% with only ABO-D compatibility, between 5% and 14% with limited compatibility of C, E, and K, and between 0% and 7% with extended antigen compatibility. [9,15]

Thus, broad phenotyping of patients with SCA and RBC units can reduce or minimize alloimmunization.

4.3 Molecular typing

RH variants have contributed to high rates of alloimmunization despite serological compatibility for antigens C, E and K. [9,12,20,21]

Alloimmunization occurs in patients whose erythrocytes are positive (by serological tests) or negative for the antigen. This is due to the complexity of RH epitopes in erythrocyte membranes and the reactivity between the RHD and RHCE alleles that encode these RH epitopes. [9,12,17,20,21]

Alloantibody formation against partial antigens poses significant challenges in transfusion practice. [12,14,16,20] Therefore, molecular typing techniques are seen as a beneficial solution to the limitations of serological tests in identifying antigenic variants. [21,22]

In the investigation conducted by Putzulu, R. *et al.* [22], a small number of patients with hemoglobinopathies, such as thalassemia and SCA, who were regularly transfused, were studied using a genotyping technique. This study demonstrated that genotyping was effective in confirming and amplifying the phenotypes of blood groups obtained through serological methods. Additionally, it facilitated the accurate selection of compatible RBC units and reduced the risk of alloimmunization.

In another study performed by Chou S *et al.* [20], they examined the relationship between RH genotypes and the production of irregular antibodies. Patients with SCA who were immunized with blood from African-American donors experienced reactions, despite previously established serological compatibility among RH (D, C, E) and Kell antigens. In these cases, the genotyping technique was performed in an attempt to explain the occurrence of these unexpected antibodies. Genotyping revealed that 87% of patients had RH variant alleles, which potentially encoded altered or partial RH antigens and 26 antibodies were explained by homozygosity of the RH variant alleles. [20] However, the inheritance of RH variants did not justify the existence of another 65 antibodies, concluding that there is high complexity in RH antigens and their variants. [14,22]

Another advantage of this technique is the ability to detect the mutation that causes the Fy(a- b-) phenotype of the Duffy system. This mutation prevents the expression of the Fyb antigen on the erythrocyte membrane but allows its expression on non-erythroid cells. Thus, individuals with this phenotype will be able to receive units positive for the Fyb antigen without the risk of alloimmunization. [14,22]

Therefore, the genotyping technique is recommended in patients with SCA to select the most compatible RBC units and minimize RH alloimmunization. [16,21,22] It is also important to consider that red cell antigens result from single nucleotide polymorphisms (SNPs), which differ from individual to individual. A limited number of alleles or SNPs determines the molecular knowledge and prediction for most phenotypes. [16,21]

The molecular basis of the 35 blood systems is known, including their antigens and respective phenotypes. [16,21] There are many methods and techniques for performing genotyping, but the majority of them are based on DNA and its amplification through the Polymerase Chain Reaction (PCR) [16,21].

Hybridization techniques with oligonucleotide probes specific for erythrocyte antigen alleles are also used. [16,21] This technique aims to detect specific DNA sequences of the blood group antigen alleles and perform their sequencing.

For the detection of RH variants, prototype RHD and RHCE platforms have been developed, each with known variant alleles. [16] More than 200 RHD alleles responsible for encoding partial and weak D antigens and at least 100 RHCE alleles encoding altered antigens have been described. [16] However, the *RH* genes and the *RHCE* gene share 97% homology in nucleotide sequences. This nucleotide proximity can result in many variants and hybrid alleles involving both loci. [16,17] DNA detection of the RH system thus remains a challenge due to the large number of variants and their genetic complexity. Furthermore, these techniques are restricted to DNA sequences of already known variants, which limits the detection of new mutations in the alleles of blood group genes, particularly the RH system. [16] New studies are needed to identify new genetic variants that predispose to alloimmunization and to determine their clinical significance to ensure greater compatibility between donor and receiver. [14,16,17]

In conclusion, regardless of the limitations of the technique and the high costs, the introduction of genotyping into transfusion practice in patients with SCA would help confirm serological tests and choose RBC units to be transfused. The main objective is to obtain an extensively compatible transfusion to reduce the risks of alloimmunization [16,21] and the morbidity and mortality linked to transfusional reactions. [16]

5. Duffy system in sickle cell anaemia: another problem in transfusional practice

5.1 Duffy system

The Duffy system antigens are the Fya and Fyb antigens, both encoded in the *FY* gene located on chromosome 1 by the *FYA* and *FYB* alleles. [22-24] The differences between the Fya and Fyb antigens are explained by a simple base substitution in one nucleotide. In the allele for the Fya antigen, the nucleotide base is guanine and in the allele for the Fyb antigen, it is adenine. [23-26]

Fya and Fyb antibodies are frequently found in patients after immunization by RBC transfusion. Both can cause immediate or delayed haemolytic transfusion reactions and also perinatal haemolytic disease, [24] and are therefore considered antibodies with clinical significance. Anti-Fya is, however, most often produced from sensitization by blood transfusion or pregnancy. Anti-Fyb is about twenty times less common than anti-Fya and is usually associated with other antibodies. [24] The genetic variation gives rise to several phenotypes of the Duffy system Fy(a+b-), Fy(a+b+), Fy(a-b+) and Fy(a-b-) [24-26], as described in Table 2.

Anti-Fy3 was described in 1971 by Albrey *et al* [27], who discovered the antibody in a European woman pregnant with her third child. This antibody has also been described in several studies performed in individuals of African ethnicity during investigations of delayed hemolytic transfusion reactions, considering this antibody clinically significant.

The Fy4 and Fy5 antigens were reported in 1973. [24] Anti-Fy4 was only described in a study by Behazad *et al.* [28], in a 12-year-old patient with SCA. However, some doubts arise about the detection of this antibody associated with inconsistent results between laboratories and also with sample instability during storage and transport. [24,26] In the same year (1973), anti-Fy5 was described by Colledge *et al.* [29], in a child of only 11 years old also with SCA. This antibody is frequently associated with delayed haemolytic transfusion reactions in patients with SCA.

Table 2. Duffy system antigens. Adapted from Meny GM. *et al.* 2019 [26]

Antigens	Symbol ISBT	ISBT N ^o
Fy ^a	FY1	008001
Fy ^b	FY2	008002
Fy ³	FY3	008003
Fy ⁴	FY4	008004
Fy ⁵	FY5	008005
Fy ⁶	FY6	008006

ISBT - International Society of Blood Transfusion.

5.2 Fy(a-b-) phenotype

This phenotype is predominant in African individuals, although it can also be detected (although very rarely) in Europeans (Table 3). [24] It is characterized by the absence of the Fyb antigen in erythrocytes, however, it is present in other cells of the body. This characteristic is explained by a point mutation in the promoter region of the *FYB* gene, called GATA-box, leading to a suspension of the expression of the Fyb antigen in erythrocytes, but not altering its expression in other tissues. [24-26,30] For this reason, individuals with this phenotype when exposed to Duffy antigens (Fya and Fyb) during a transfusion may develop anti-Fya, and eventually not develop anti-Fyb. [24]

Went R *et al.* [31] also described a clinical case of a hospitalization episode of a 49-year-old female patient, previously diagnosed with SCA, with clinical symptoms of fever, shortness of breath and abdominal pain. The patient already had a history of several admissions and multiple RBC transfusions over several years, which resulted in the formation of the following allo-antibodies: Anti-K, Anti-S, Anti-M, Anti-Fya, Anti-Lea, Anti-Leb, and Anti-Lua. Once again, in this episode, RBC units were requested from the National Blood Service (NBS). The patient's blood group was O Rh(D) Negative and she received, on that occasion, six units of AB0-Rh(D) RBC compatible and

negative for the Kell, M, S and Fya antigens. The NBS later informed the hospital's admissions department that the patient had developed another allo-antibody – an anti-Fy3. [31] Again, anti-Fy3 emerged after several transfusion episodes in patients previously sensitized with anti-Fya. [31] As a consequence, it becomes difficult to choose compatible RBC units, since the presence of an anti-Fy3 restricts compatibility with the African ethnic group where the donor population is not very representative and, on the other hand, as in the example of this patient, other antibodies must be considered, such as anti-K, anti-M and anti-Fya. [31] In a second admission of the patient with a transfusion request, only RBC units positive for the M antigen were available at that NBS, but given the history, their use would have a significant risk. NBS contacted the US blood donor service, which has a significant pool of donors from the African community and found that over 150 individuals matched the Fy(a-b-) phenotype. However, the problem is the logistical time required to obtain the units in an emergency situation. [31] One solution for cases like this would be to regularly perform antibody testing on stable patients between crises, facilitating the detection of new antibodies outside of haemolytic crises, and allowing time to be saved in searching for and acquiring compatible units. [31] Another solution would be to simultaneously perform the genotyping technique to improve the selection of RBC units for these chronically transfused patients. [31]

Table 3 - Types of phenotypes in the Duffy system. Adapted from Meny GM. *et al.* 2019 [26]

Erythrocyte phenotype	Prevalence %		Alleles
	Caucasians	Blacks	
Fy(a+b-)	20 [†]	10 [†]	FY*01/FY*01 ou FY*A/FY*A
Fy(a-b+)	32	20	FY*02/FY*02 ou FY*B/FY*B
Fy(a+b+)	48	3	FY*A/FY*B
Fy(a-b-)	Very rare	67	FY*/N.01-05, FY*/N.01-02*‡

† Present in 70-90% of the Asian population. ‡ Nomenclature pending approval by ISBT.

6. Conclusions

SCA is a hereditary haemolytic anaemia characterized by the sickle shape of erythrocytes due to the production of abnormal haemoglobin (HbS) causing several clinical complications. This haemoglobinopathy is prevalent in the African population.

The spread of this disease through the migration of the African population to other continents constitutes a problem in transfusion practice for several reasons, such as: divergences in phenotypes and genotypes between the African population and the European population and the presence of multiple variants of antigens in the RH system. These situations contribute to the occurrence of alloimmunization in patients with SCA, becoming one of the most common post-transfusion complications.

To reduce alloimmunization rates in patients with SCA, it is necessary to reformulate routine practices in transfusion therapy. Extending phenotypic/antigenic matching between donors and receivers with targeted donor selection and recruitment from the SCA community may provide safer blood units for these patients. The application of molecular typing in the detection of RH system variants, complementary to serological tests, can also reduce the risk of alloimmunization.

In Portugal and Europe, it is necessary to perform further studies on this topic to adopt new practices in Blood Bank Services. To effectively weigh the benefits and costs of the techniques mentioned, as well as the risks associated with not implementing them, it is crucial to standardize strategies and best practices in transfusion medicine, to reduce alloimmunization in patients with SCA.

Author Contributions: “Conceptualization, Sílvia Martins; methodology, Sílvia Martins; software, Mariana Anacleto; validation, Sílvia Martins; formal analysis, Mariana Anacleto.; investigation, Mariana Anacleto.; resources, Mariana Anacleto; writing—original draft preparation Mariana Anacleto; writing—review and editing, Sílvia Martins; visualization, Mariana Anacleto and Sílvia Martins; supervision, Sílvia Martins; project administration, Sílvia Martins.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

7. Bibliography

1. Cansian B, Faria JCP, Sarni ROS. Transfusion of packed red blood cells in adults with sickle cell anemia treated at an emergency hospital. *Revista da Associacao Medica Brasileira*. 2024;70: e20230816.
2. Lonergan GJ, Cline DB, Abbondanzo SL. Sickle cell anemia. *Radiographics*. 2001;21: 971-994.
3. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *The Lancet*. 2010;376: 2018-2031.
4. Elendu C, Amaechi DC, Alakwe-Ojimba CE, Elendu TC, Elendu RC, Ayabazu CP, Aina TO, Aborisade O, Adenikinju JS. Understanding sickle cell disease: causes, symptoms, and treatment options. *Medicine*. 2023;102: e35237.
5. Han H, Hensch L, Tubman VN. Indications for transfusion in the management of sickle cell disease. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*. 2021;2021: 696-703.
6. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, Smith WR, Panepinto JA, Weatherall DJ, Costa FF. Sickle cell disease. *Nature reviews Disease primers*. 2018;4: 1-22.
7. Linder GE, Chou ST. Red cell transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. *Haematologica*. 2021;106: 1805.
8. Wallace LR, Thibodeaux SR. Transfusion support for patients with sickle cell disease. *Transfusion and Apheresis Science*. 2022;61: 103556.
9. Chou ST, Fasano RM. Management of patients with sickle cell disease using transfusion therapy: guidelines and complications. *Hematology/Oncology Clinics*. 2016;30: 591-608.
10. Eckman JR, editor *Techniques for blood administration in sickle cell patients*. *Seminars in Hematology*; 2001: Elsevier.
11. Aygun B, Padmanabhan S, Paley C, Chandrasekaran V. Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions. *Transfusion*. 2002;42: 37-43.
12. Chou ST, Liem RI, Thompson AA. Challenges of alloimmunization in patients with haemoglobinopathies. *British Journal of Haematology*. 2012;159: 394-404.
13. Hudson KE, Fasano RM, Karafin MS, Hendrickson JE, Francis RO. Mechanisms of alloimmunization in sickle cell disease. *Current Opinion in Hematology*. 2019;26: 434-441.

14. Matteocci A, Pierelli L. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease and in thalassaemia: current status, future perspectives and potential role of molecular typing. *Vox Sanguinis*. 2014;106: 197-208.
15. Vichinsky EP, editor Current issues with blood transfusions in sickle cell disease. *Seminars in Hematology*; 2001: Elsevier.
16. Fasano RM, Chou ST. Red blood cell antigen genotyping for sickle cell disease, thalassemia, and other transfusion complications. *Transfusion Medicine Reviews*. 2016;30: 197-201.
17. Denomme G, Westhoff C. The Rh system. *Technical Manual* 18th ed Bethesda, Maryland: AABB. 2014; 317-336.
18. Flegel WA, Wagner FF. Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. *Clinical laboratory*. 2002;48: 53-60.
19. Tahhan H, Holbrook C, Braddy L, Brewer L, Christie J. Antigen-matched donor blood in the transfusion management of patients with sickle cell disease. *Transfusion*. 1994;34: 562-569.
20. Chou ST, Jackson T, Vege S, Smith-Whitley K, Friedman DF, Westhoff CM. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013;122: 1062-1071.
21. Westhoff CM. Blood group genotyping. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2019;133: 1814-1820.
22. Putzulu R, Piccirillo N, Orlando N, Massini G, Maresca M, Scavone F, Ricerca BM, Zini G. The role of molecular typing and perfect match transfusion in sickle cell disease and thalassaemia: An innovative transfusion strategy. *Transfusion and Apheresis Science*. 2017;56: 234-237.
23. Claesen K, Heyrman B, De Schouwer P, Mahieu S. Complex Transfusion Management in a Sickle Cell Patient With Anti-Fy3 Alloimmunization: A Case Report. *Cureus*. 2024;16:
24. Meny G. The Duffy blood group system: a review. *Immunohematology*. 2010;26: 51-56.
25. Maheshwari A, Killeen RB. Duffy blood group system. 2022;
26. Meny GM. An update on the Duffy blood group system. *Immunohematology*. 2019;35: 11-12.
27. Albrey J, Vincent E, Hutchinson J, Marsh W, Allen Jr F, Gavin J, Sanger R. A new antibody, anti-Fy3, in the Duffy blood group system. *Wiley Online Library*; 1971. p. 29-35.
28. Behzad O, Lee C, Gavin J, Marsh W. A new anti-erythrocyte antibody in the Duffy system: anti-Fy4. *Vox Sanguinis*. 1973;24: 337-342.
29. Colledge KI, Pezzulic M, Marsh W. Anti-Fy5, an antibody disclosing a probable association between the Rhesus and Duffy blood group genes. *Vox Sanguinis*. 1973;24: 193-199.
30. Höher G, Fiegenbaum M, Almeida S. Molecular basis of the Duffy blood group system. *Blood Transfusion*. 2017;16: 93.
31. Went R, Wright J, Webster R, Stamps R. Anti-Fy3 in sickle cell disease: a difficult transfusion problem. *British Journal of Haematology*. 2009;144: 621-622.

