

28 a 30
de outubro
2016
Bragança
Portugal



I Congresso Nacional

Ciências Biomédicas Laboratoriais

I Encontro Nacional
de Estudantes

Livro de Atas



Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior de Saúde
Dr. Lopes Dias



UAlg ESS
UNIVERSIDADE DO ALGARVE
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE



CESPU
INSTITUTO POLITÉCNICO
DE SAÚDE DO NORTE
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DO VALE DO SOUSA
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DO VALE DO RIBE



ESTeSC
COIMBRA
HEALTH SCHOOL



**ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA**
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

P. PORTO

ESCOLA SUPERIOR
DE TECNOLOGIA DA SAÚDE



IPB INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA
Escola Superior de Saúde

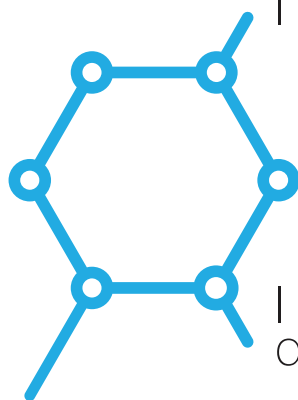
COM O ALTO PATROCÍNIO DE SUA EXCELÊNCIA



O Presidente da República



28 a 30
de outubro
2016
Bragança
Portugal



I Congresso Nacional

Ciências Biomédicas Laboratoriais

I Encontro Nacional
de Estudantes

Título I Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais: Livro de Atas
Editores Josiana Vaz
Amadeu Ferro
Clárisse Pais
Helena Pimentel
Sara Ricardo
Design e paginação Atilano Suarez
Serviços de Imagem do Instituto Politécnico de Bragança
Editor Instituto Politécnico de Bragança
ISBN 978-972-745-219-4
Handle <http://hdl.handle.net/10198/14893>

Revisores Ana Lúcia Ramos, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias
António Gabriel, Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Coimbra
Cristiana Carneiro, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa
Fernando Bellém, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa
Francisco Rodrigues, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias
Josiana Vaz, Escola Superior de Saúde de Bragança
Manuela Amorim, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto
Paulo Teixeira, Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Coimbra
Regina Silva, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto
Rui Plácido, Escola Superior de Saúde da Universidade do Algarve
Sara Ricardo, IPATIMUP – Instituto de Patologia e Imunologia
da Universidade do Porto
Susana Vicente, Escola Superior de Saúde da Universidade do Algarve

Apoio





Índice

Competências profissionais, parâmetros curriculares e áreas de formação mais relevantes para a empregabilidade dos Técnicos de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica em Portugal.....	5
Palavras-chave: Empregabilidade; Competências; Técnicos de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica	
Prevalência de Portadoras de <i>Streptococcus agalactiae</i> e sua suscetibilidade numa População de Grávidas do Centro Hospitalar do Porto (CHP)	15
Palavras-chave: <i>Streptococcus agalactiae</i> , gravidez, rastreio laboratorial, prevalência, profilaxia, suscetibilidade	
A Prevalência de Micobactérias atípicas em doentes do Centro Hospitalar do Porto	23
Palavras-chave: Micobactérias atípicas, prevalência, <i>Mycobacterium gordonae</i> , <i>Mycobacterium avium complex</i> .	
Estudo da alteração das características da voz feminina durante o período pré-menstrual	33
Palavras-chave: Voz, disfonia, pré-menstrual	
Dietary compounds that modify Bilirubin levels	37
Key words: bilirubin levels, hyperbilirubinemia, oxidative stress prevention, dietary compounds.	
Caracterização dos fatores de risco cardiovascular numa população envelhecida	47
Palavras-chave: envelhecimento; risco cardiovascular; perfil bioquímico; doenças cardiovasculares; dieta	
Qualidade do Sono e Marcadores Endócrinos e Bioquímicos	59
Palavras-chave: Qualidade Sono, Marcadores Endócrinos e Bioquímicos	
Atividade enzimática da glutatona como antioxidante em idosos sujeitos a exercício	65
Palavras-chave: Stress oxidativo; Envelhecimento; Glutaciona redutase e peroxidase; Antioxidantes.	
Superoxide dismutase activity in elderly subjected to exercise	71
Key words: Oxidative stress; SOD; Exercise; Aging.	
Capacidade Funcional e Adesão ao Regime Terapêutico: A realidade de uma população idosa	77
Palavras Chave: Pessoa idosa; Capacidade funcional; Adesão terapêutica.	
Conhecimentos dos adolescentes acerca do HPV	83
Palavras Chave: Vírus do Papiloma Humano; conhecimentos; adolescentes	
Forssman antigen expression in tumor tissue- What is the relevance?	89
Key-words: Forssman; antigen; antibody, cancer; Immunohistochemistry	
A acreditação de laboratórios. Um exemplo em Genética Forense.	97
Palavras Chave: Acreditação, NP EN ISO/IEC 17025:2005, SGBF-N.	
Metaloproteínases da Matriz-2 e -9 e o seu Inibidor Tecidual 1 na Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1	101
Palavras-chave: Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1	
Conteúdo de hemoglobina dos reticulócitos vs ferritina sérica, na avaliação da deficiência de ferro em doentes oncológicos	111
Palavras-chave: Conteúdo de Hemoglobina dos Reticulócitos, Ferritina, Deficiência de ferro, Diagnóstico	
Atividade Física e Impacto em Marcadores Bioquímicos em Diabéticos: Revisão Sistemática da Literatura	117
Palavras-chave: Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2; Controlo glicémico; Dislipidemia; Treino Físico.; Keywords: Type 2 diabetes <i>mellitus</i> ; Glycemic control; Dyslipidemia; Physical training.	
Boas Práticas de Liderança em Ciências Biomédicas Laboratoriais.....	125
Palavras-Chave: Liderança; Estilos de Liderança de Kurt Lewin.	

Competências profissionais, parâmetros curriculares e áreas de formação mais relevantes para a empregabilidade dos Técnicos de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica em Portugal

Amadeu Borges Ferro; Ana Rodrigues; Liliana Horta

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa; amadeuferro@gmail.com

Resumo

A empregabilidade é a capacidade de o indivíduo adquirir/manter um emprego, mudar de funções numa organização ou obter um novo emprego, de modo a atingir plena satisfação profissional. Esta capacidade implica que o trabalhador desenvolva ativamente um leque de competências que o tornem atrativo para o mercado globalizado de trabalho, tornando-se importante conhecer a preparação mais adequada para o satisfazer.

É objetivo deste trabalho descrever competências profissionais, parâmetros curriculares e áreas de formação mais relevantes para a admissão de Técnicos de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica (TAPCT) nas instituições empregadoras.

Numa abordagem quantitativa recorreu-se a um questionário em formato *on-line*, tendo-se inquirido 99 empregadores. Os resultados foram tratados com estatística descritiva simples.

Resultados: verificou-se que 71% dos inquiridos trabalhavam em instituições públicas e 80% na área da saúde. As principais formas de primeiro contacto profissional são: realização de estágios (19%) e conhecimentos pessoais (12%). As competências pessoais mais valorizadas foram responsabilidade (86%) e capacidade de trabalho em equipa (81%). Os parâmetros curriculares mais apreciados foram: habilitações técnico-científicas (90%) e experiência profissional (78%) e formação pós-graduada (56%). As áreas de formação consideradas prioritárias são: Macroscopia (66%) e Patologia Molecular (62%).

Empregadores de diferentes áreas valorizam um conjunto de competências comum: trabalho em equipa e responsabilidade. As competências técnico-científicas, a experiência profissional e a formação pós-graduada são os parâmetros curriculares mais valorizados, sendo que, relativamente a esta última, as áreas de Macroscopia e Patologia Molecular são as principais. Estes dados são importantes para a gestão profissional dos TAPCT.

Palavras-chave: Empregabilidade; Competências; Técnicos de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica

Introdução

Atualmente, entende-se que empregabilidade designa a capacidade de um indivíduo adquirir e manter um emprego, mudar de funções dentro de uma organização e, se necessário, obter um novo emprego, de modo a atingir satisfação profissional (1–3). Esta capacidade implica que o trabalhador desenvolva ativamente um leque de competências que lhe permitam superar a concorrência e adaptar-se aos novos cenários que lhe são colocados (4). Num sentido lato, aplica-se tanto a empregos por conta de outrem como por conta própria, pelo que está diretamente associada também ao empreendedorismo ou à vocação para a criação de oportunidades de emprego (5).

O conceito de empregabilidade remonta aos anos 50 do século passado, mas apenas a partir dos anos 90 a sua utilização se generalizou associada ao advento das novas tecnologias, globalização do mercado de trabalho e declínio da produção industrial ocidental (3–5).

Durante a maior parte do século passado considerava-se o emprego como sendo para a vida e que a evolução da carreira surgia dos anos de dedicação e de trabalho leal à mesma organização (4). Por volta dos anos 70, a empregabilidade era vista como um problema apenas dos desfavorecidos ou desinstruídos (4). Cada vez mais, este conceito revela-se ultrapassado. O contexto político, económico e social que tem vindo a suceder-se nos países ocidentais têm conduzido a uma crescente instabilidade no mercado de trabalho, especialmente nas economias com menor capacidade de criar emprego (4,5). Verifica-se cada vez mais que a constante reestruturação das organizações

é necessária ao seu sucesso e sobrevivência, especialmente devido à globalização e evolução tecnológica (4), que se traduz na incapacidade de manter o mesmo número de trabalhadores e, conseqüentemente, aumento do desemprego (1), o que coloca também desafios em termos de empregabilidade empresarial. Esta insegurança laboral obriga os profissionais, a possuírem vantagens competitivas que os diferenciem positivamente do resto da concorrência, quer estejam ou não em situação de desemprego, pois, mais do que iniciar uma relação laboral, efetuar a sua manutenção afigura-se ainda mais complexo (6).

A empregabilidade está diretamente associada ao desenvolvimento, pois é do interesse tanto dos empregados como das suas organizações (7):

- Para os empregados, visa satisfazer os seus desejos e projetos de vida futuros, mantendo-os motivados por longo prazo;
- Para as organizações, na medida em que otimiza a substituição quantitativa e qualitativa dos seus quadros mais importantes, garantindo-lhes a continuidade e a evolução.

Empregabilidade em Portugal

O mercado de trabalho em Portugal caracterizou-se por uma reduzida taxa de desemprego nas décadas de 80 e 90 do século passado (8). No entanto, sensivelmente desde o ano 2001 que esta realidade se tem alterado: verificou-se um aumento progressivo da taxa de desemprego, consequência da redução do emprego num quadro de estagnação do produto e da produtividade (8). Nos anos mais recentes assiste-se a uma diminuição da taxa de desemprego, não atingindo ainda, no entanto, os valores do século passado. Por níveis de escolaridade, a maior taxa registou-se nos que não detém nenhum nível de escolaridade, verificando-se ainda que a escolaridade superior possui a taxa de desemprego mais baixa.

Apesar desta tendência, estima-se que 20% dos portugueses com grau académico superior tenha emigrado, fenómeno vulgarmente denominado por fuga de cérebros (9). A maioria são jovens diplomados que aproveitam o programa Erasmus noutros países para ficarem em empresas locais através de estágios profissionais (9). Apenas uma pequena fração deverá regressar ao país de origem (9). Esta tendência contrasta com a tipologia de emigração portuguesa dos anos 60, constituída maioritariamente por mão-de-obra pouco qualificada (9).

Competências Pessoais

A empregabilidade é indissociável das competências pessoais. Certos autores advogam mesmo que é necessário desenvolver uma série de competências transversais à atual sociedade do conhecimento (7). Tornam-se assim relevantes novas áreas que implicam desenvolver as capacidades necessárias para a gestão da diversidade e da incerteza, permitindo aos graduados, a todos os níveis, manterem-se ativos, competitivos e enquadrados nos objetivos dos empregadores que os procuram (10). As ferramentas dos graduados não se devem centrar somente nos conteúdos diretos e associados a uma determinada profissão ou atividade, que facilmente se esgotam com a atual volatilidade tecnológica associada à sociedade moderna (11). Neste contexto, surgem, com cada vez maior destaque, as designadas competências pessoais transversais (a que os anglo-saxónicos chamam *soft skills*): liderança, resiliência, assertividade, aprendizagem contínua, adaptação à mudança, trabalho em equipa e compromisso ético, entre outras (12). Assim, num ambiente cada vez mais competitivo, por vezes até tóxico, as competências transversais nunca foram tão valorizadas e importantes para a saúde organizacional, principalmente com o advento de estudos realizados no campo da psicologia e das neurociências que permitiram identificar elementos tão complexos como a “inteligência emocional” (13–15). Esta descrição mais abstrata pode ser observada segundo o conceito de qualificação real, que designa o conjunto de competências posto em ação em situações concretas de trabalho, através da articulação dos diversos saberes oriundos das várias esferas (formais, informais, teóricos, práticos, tácitos). As características desta qualificação real reportam à capacidade de resolução de problemas e de enfrentar situações de imprevisibilidade, ou seja, à mobilização da inteligência para fazer face a todos os desafios em ambiente de trabalho (7).

No entanto, importa saber quais as competências pessoais mais relevantes para os empregadores de Técnicos de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica (TAPCT), no sentido de orientar a autogestão do percurso profissional, garantindo o estabelecimento de objetivos de carreira e o seu planeamento em função do nível de autonomia e independência em que o indivíduo se encontra (16).

Parâmetros Curriculares

O principal instrumento de síntese e apresentação dos dados e características pessoais do profissional é o



seu Curriculum Vitae. Este documento deverá estar organizado de forma inteligível e acessível de modo a garantir ao empregador um rápido e simples contacto com os dados relevantes para o posto de trabalho em apreço (17).

Os modelos de preparação do Curriculum Vitae possuem certos elementos gerais comuns a todos eles, tais como: dados pessoais, habilitações académicas ou experiência profissional. Como informação adicional, o Curriculum Vitae pode incluir informações sobre atividades extracurriculares, idiomas ou literacia informática, para além de poder apresentar cartas de recomendação em anexo (17).

Atualmente é altamente recomendado que o Curriculum Vitae possua ligações diretas para a página pessoal do candidato ou para as redes sociais (e.g. LinkedIn, Twitter, Facebook) e outros recursos da web onde os recrutadores possam expandir as informações sobre o seu perfil profissional (18). Também é importante destacar a prática profissional adquirida durante a formação graduada (estágio curricular), uma vez que é considerada frequentemente como um tipo de experiência de trabalho valorizada pelos responsáveis de Recursos Humanos. Paralelamente as atividades extracurriculares (e.g. trabalho voluntário, participação em associações de estudantes) surgem também como elementos muito valorizados em determinados recrutamentos profissionais (18).

O Curriculum Vitae pode terminar com uma seção que colija cartas de recomendação relevantes para a empresa ou que ajudem a definir a personalidade do candidato (17). Nos países anglo-saxónicos esta é uma seção essencial em qualquer currículo e no nosso país tornou-se num hábito cada vez mais generalizado.

Desta forma, é fundamental enriquecer o currículo nos parâmetros que os empregadores mais valorizam de modo a aumentar a sua competitividade para a empregabilidade.

Formação Complementar

Um dos objetivos primordiais do ensino superior consiste no acréscimo ou melhoria das condições para a empregabilidade, formando profissionais qualificados e bem preparados para enfrentar os desafios do mercado de trabalho, reforçando sempre que os estudantes são corresponsáveis na sua própria formação (19).

O curso superior prepara o futuro licenciado com um leque de ferramentas intelectuais que o capacitam para o desempenho de diversas funções em várias áreas de intervenção, mas não é suficiente apenas ter um diploma de licenciatura. É necessário ter presente que as competências adquiridas pelos diplomados só estarão plenamente desenvolvidas após concretização da sua aprendizagem através da aplicação em meio laboral (5).

A emergência de oportunidades de evolução profissional realça a importância da formação pós-graduada. O número de profissionais conscientes dessa situação cresce a cada dia, criando a necessidade de procurar novos recursos para estar melhor preparado para o mercado de trabalho. Dentro desses recursos existem os cursos de pós-graduação ou os mestrados que podem ter cariz teórico ou prático e visam atualizar, aperfeiçoar e reforçar conhecimentos e competências numa área científica. Desta forma, torna-se fundamental identificar as áreas carentes de evolução, com o intuito de evitar perda da qualidade dos profissionais e queda na produtividade da organização. Assim, os TAPCT podem adequar-se às novas realidades, atualizando os seus conhecimentos teóricos e práticos para que possam garantir o seu espaço no mercado de trabalho (20).

Objetivos

A escolha do tema deste trabalho prende-se com a exigência crescente de um mercado de trabalho cada vez mais competitivo, que faz com que os profissionais necessitem de um elevado nível de competências e de preparação para poderem desempenhar com sucesso as suas funções nas organizações. Pretende-se assim criar conhecimento que possa contribuir para uma maior adequação ao mundo real do trabalho considerando o ponto de vista de empregadores.

Delinearam-se os seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar genericamente as instituições que empregam TAPCT.
- Descrever a forma de primeiro contacto mais frequente entre a instituição empregadora e os TAPCT.
- Descrever competências pessoais, parâmetros curriculares e áreas de formação mais relevantes para a admissão de TAPCT nas instituições empregadoras.

Metodologia

Esta investigação assenta no paradigma positivista, segundo o qual a verdade é absoluta e os factos e princípios existem independentemente do contexto histórico ou social (21, 22). O modelo privilegiado para a realização deste estudo foi o quantitativo, que se caracteriza pela medição das variáveis e pela obtenção de resultados numéricos suscetíveis de eventual generalização (22). Quanto à generalização, trata-se de um estudo nomotético, ou seja, com ênfase nos aspetos gerais do fenómeno e com preocupações generalizadoras (22). O estudo realizado é um levantamento não experimental, pelo que não haverá uma manipulação direta do investigador nas variáveis a analisar (21).

Constituição da População e amostra

A população define-se como o conjunto de elementos (indivíduos, espécies, processos) que têm características comuns e sobre o qual assenta a investigação (21–23). Dada a necessidade de recolher contributos sobre a empregabilidade na perspetiva do empregador, considerou-se como população-alvo todos os profissionais com poder de decisão nos processos de admissão de TAPCT, em Portugal.

Como o nome indica, a população acessível é constituída pela porção da população alvo a que se consegue aceder (21). Neste estudo, a população acessível foi constituída pelo grupo de profissionais com poder de decisão nos processos de admissão cujos contactos eram conhecidos pelos investigadores.

Uma amostra é a fração da população sobre a qual se faz o estudo, devendo ser o mais representativa possível (21). Neste caso constitui-se como amostra a fração da população que respondeu ao questionário. Esta amostra pode ser classificada como acidental, uma vez que o investigador não selecionou a sua amostra por método estatístico (21). No entanto, tendo em conta que foram obtidas 99 respostas em 105 questionários (Taxa de resposta=94,2%), a amostra pode considerar-se de representatividade elevada relativamente à população acessível.

Instrumento de Recolha de Dados

O instrumento de recolha de dados para este estudo efetuou-se através de inquérito na forma de questionário que permite obter informação factual sobre a população em estudo, nomeadamente sobre as suas perceções, num intervalo de tempo curto e de forma sistemática e ordenada (21,22).

O questionário era do tipo misto, constituído por perguntas do tipo semiaberto e fechado, com predominância para o este último. As perguntas do tipo fechado permitem realizar uma análise mais célere e uniforme das respostas (21). Foram colocadas os seguintes subtipos de perguntas fechadas (22):

- i. Questões de resposta única, tal como o sexo ou a idade.
- ii. Questões de escolha múltipla, constituídas por um conjunto de respostas pré-definido.
- iii. Questões dicotómicas, com respostas de carácter bipolar tais como sim ou não.

Em virtude de o questionário ser de preenchimento não-presencial, foi dada especial atenção à correta formulação e sequenciação das perguntas e das hipóteses de respostas de modo a suscitar o mínimo de dúvidas no preenchimento. Pretendeu-se efetuar perguntas claras e concisas, tendo o questionário sido sujeito a pré-teste (21).

Variáveis

As variáveis são as unidades de base da investigação. São conceitos, qualidades, propriedades ou características de pessoas, objetos de situações suscetíveis de se alterarem no tempo (22). As variáveis podem tomar diferentes valores passíveis de medição, controlo ou manipulação (21). Neste questionário identificaram-se as variáveis:

- i. Atributo - Idade; Sexo; Tipo de Instituição; Atividade da Instituição.
- ii. Investigacionais - Quantidade atual de TAPCT na instituição; Modo de primeiro contacto com os TAPCT; Competências pessoais mais valorizadas; Parâmetros curriculares mais valorizados; Áreas prioritárias para a oferta formativa.

Recolha de dados

A colocação dos questionários aos inquiridos efetuou-se através da plataforma eletrónica *LimeSurvey*TM (24). Esta plataforma aberta e amplamente difundida permite obter as respostas de forma automática e segura, com a garantia da privacidade e validade das respostas inseridas (24).

A etapa seguinte foi o envio do *email* de convite de preenchimento do questionário a todos os elementos da população acessível. O *email*, incluía o propósito do estudo, o prazo e o *link* para preenchimento *on-line*.

Tratamento Estatístico dos Dados

A análise das respostas seguiu o mesmo encadeamento e organização dos questionários. Os gráficos apresentados neste estudo foram obtidos diretamente da plataforma LimeSurvey™ (48). Desta plataforma extraíram-se também listagens com todas as respostas registadas no inquérito, tendo sido exportadas para MSEXcel™. A partir desta aplicação, efetuou-se alguma estatística descritiva como a frequência relativa.

Considerações éticas e legais

As perguntas redigidas pretenderam ser minimamente invasivas. Os questionários incluíram uma descrição do seu propósito, tendo sido referida a garantia de confidencialidade (44, 49).

Resultados

Caracterização dos sujeitos

A idade mínima referida pelos inquiridos foi de 26 anos e a máxima de 65. A média das idades dos participantes situa-se nos 41,01 anos, sendo que a maioria (70%) é do sexo feminino e menos de um terço é do sexo masculino, apenas 30%.

Caracterização da instituição

A maioria dos inquiridos (71%) trabalha em instituições públicas. As instituições privadas surgem representadas por 27% da população inquirida e 2% não respondeu.

No que diz respeito ao tipo de atividade em que se inserem os empregadores, a da saúde surge como a mais significativa, aglomerando 80% dos respondentes. De seguida, surgem as instituições relacionadas com a vertente comercial, representando 8%, seguidas pelas que se dedicam à investigação – 5%. Foram ainda mencionados outros tipos de atividade, como o ensino e a justiça.

No que diz respeito ao número de TAPCT que desempenham funções na instituição, 57% dos inquiridos refere que é suficiente. Pelo contrário, 34% considera que esse número é insuficiente e apenas 9% considera que tem técnicos de AP em excesso (Gráfico 1).

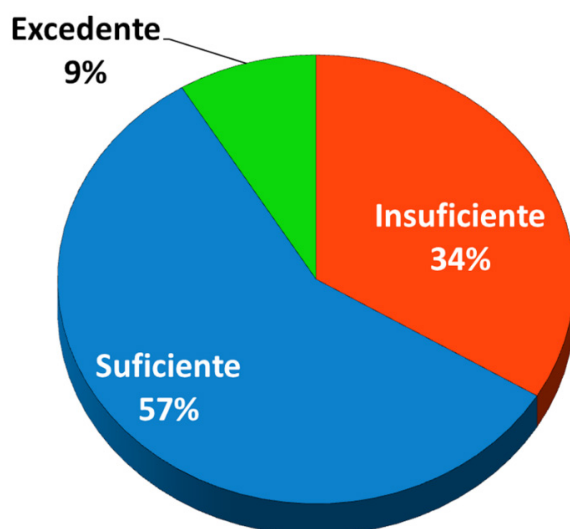


Gráfico 1 – Distribuição dos empregadores em função da opinião sobre o número de licenciados de APCT

Forma de primeiro contacto com os TAPCT que ingressaram na instituição

O primeiro contacto entre os empregadores e os licenciados foi efetuado principalmente através da realização de estágios nas suas instituições (19%). De seguida foram referidos conhecimentos pessoais (12%) e candidaturas espontâneas (10%) (Gráfico 2).

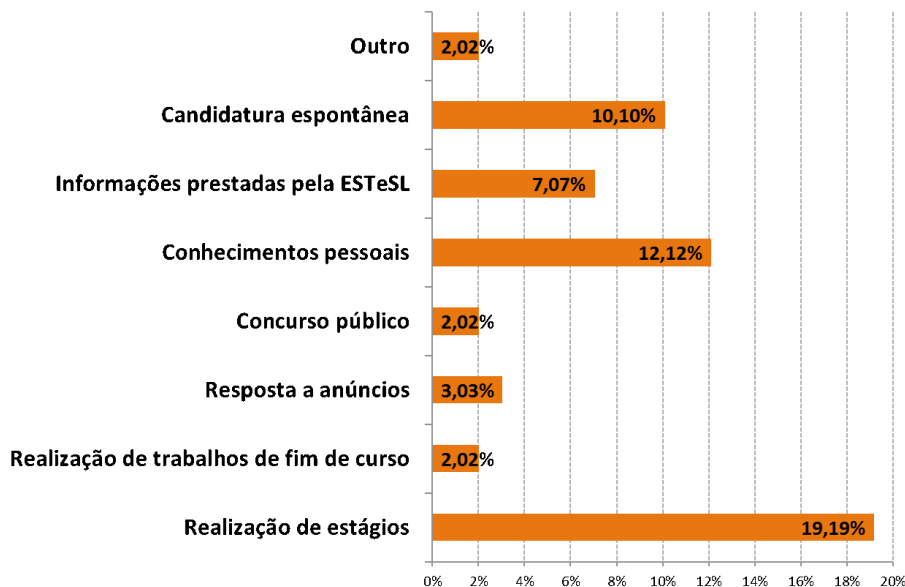


Gráfico 2 – Meios de contacto dos licenciados que ingressaram na instituição dos empregadores

Competências pessoais mais valorizadas

As cinco competências pessoais mais valorizadas pelos empregadores para fins de recrutamento foram a responsabilidade (86%), a capacidade de trabalhar em equipa (81%), a capacidade de organização (64%), a motivação (55%) e a autonomia (44%) (Gráfico 3).

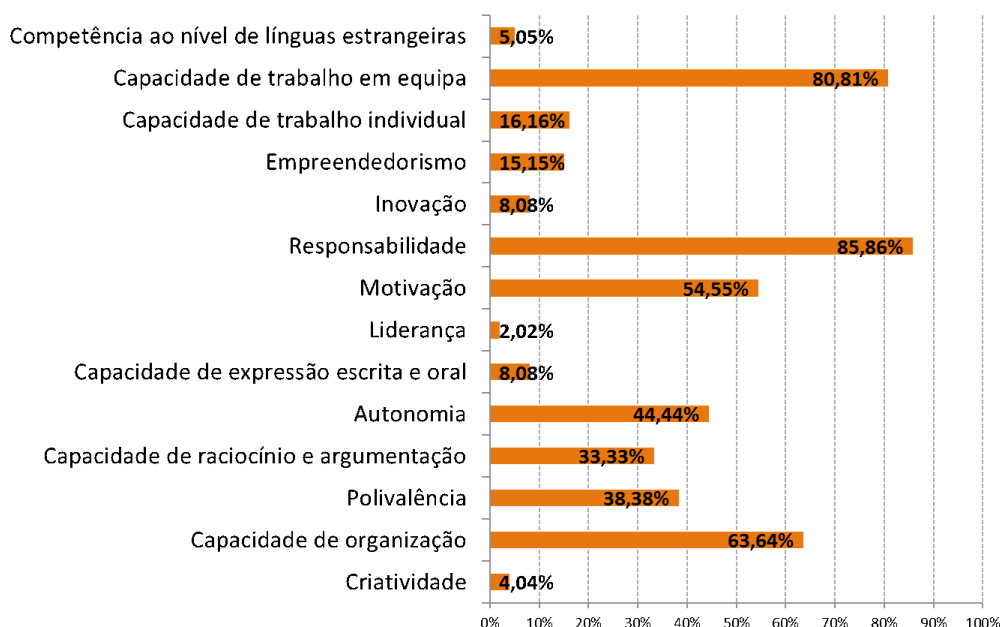


Gráfico 3 – Competências pessoais mais valorizadas para admissão numa instituição, segundo opinião dos empregadores

Parâmetros curriculares/pessoais mais valorizados

Os três parâmetros curriculares/pessoais mais valorizados pelos empregadores são: as competências técnico-científicas (90%), a experiência profissional (78%) e formações pós-graduadas (56%). É ainda de notar a importância das cartas de recomendação (23%) e que houve ainda casos em que a idade e o sexo do candidato foram referidos como aspetos a considerar (Gráfico 4).

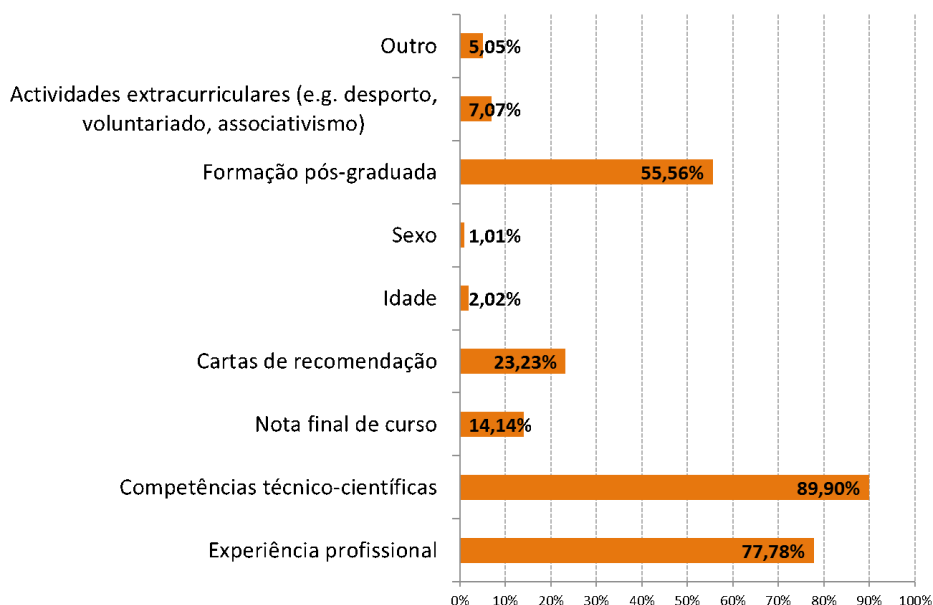


Gráfico 4 – Parâmetros curriculares/pessoais mais valorizadas para admissão numa instituição, segundo opinião dos empregadores

Áreas prioritárias para a oferta formativa pós-graduada

Na opinião dos empregadores a Macroscopia (66%) é a área que se destaca nas prioridades para a oferta formativa, seguindo-se a Patologia Molecular (62%). A menos referida foi a Histotecnologia/Histopatologia (23%). Há ainda um pequeno grupo de inquiridos que considera não ser necessária formação em nenhuma área (Gráfico 5).

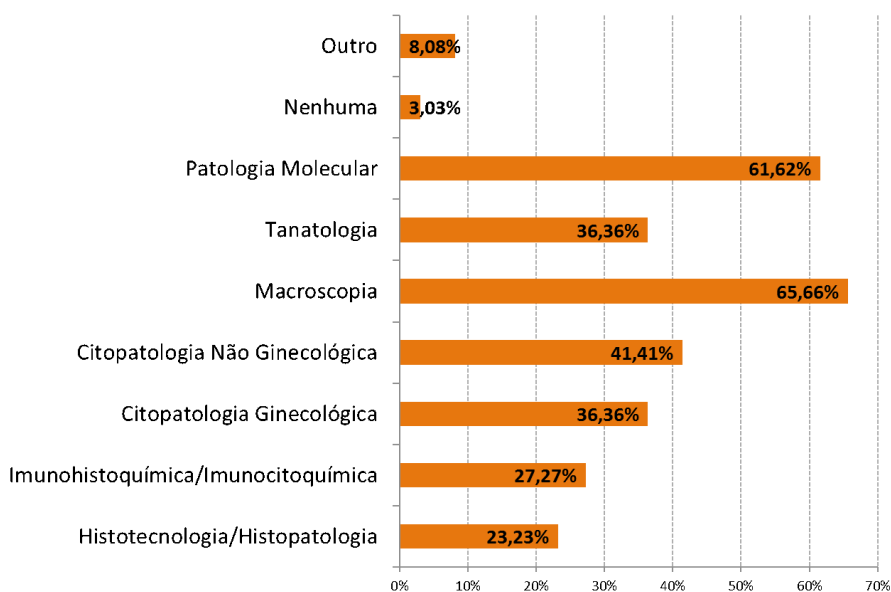


Gráfico 5 – Áreas prioritárias para a oferta formativa de APCT, segundo opinião dos empregadores

Considerações Finais

A idade média dos empregadores inquiridos situa-se nos 41 anos, havendo uma maior representação da população feminina em relação à masculina. Relativamente ao tipo de instituição empregadora verificou-se que as instituições públicas assumem um papel de destaque na empregabilidade. Quanto ao tipo de atividade a que se dedicam as instituições empregadoras, a mais relevante é a área da saúde, de seguida surgem as áreas comerciais e de investigação.

Quanto à forma como os empregadores conheceram os licenciados que ingressaram nas suas instituições, verifica-se a importância da realização de estágios, de conhecimentos pessoais e candidaturas espontâneas. Esta situação mostra que, a realização de estágios poderá ser essencial para o ingresso no mercado de trabalho, muito provavelmente devido ao facto de os empregadores terem oportunidade de observar o desempenho do licenciado na realidade laboral e do próprio licenciado ter a possibilidade de adquirir experiência profissional.

Relativamente às principais competências pessoais mais valorizadas aquando da admissão por parte das entidades empregadoras, encontraram-se responsabilidade, capacidade de trabalho em equipa, autonomia, motivação e polivalência. Observou-se que, em áreas diferentes se evidenciam preferências distintas, por exemplo a autonomia é somente mencionada pelos empregadores da área da saúde, demonstrando que esta competência é bastante relevante num contexto de trabalho hospitalar. Por sua vez, é apenas nas áreas da investigação e nas áreas do ensino e da justiça, definidas através do campo “outros”, que a polivalência se evidencia, bem como a capacidade de raciocínio e argumentação que é referenciada por estes dois grupos profissionais e ainda na área comercial, atestando que nestas áreas as competências comunicacionais são consideradas essenciais para um bom desempenho profissional. Ainda neste âmbito, destacou-se um conjunto de competências pessoais comum a todas as áreas: capacidade de trabalho em equipa, responsabilidade, motivação e capacidade de organização.

Quanto aos parâmetros curriculares mais valorizados, a experiência profissional, as competências técnico-científicas e a formação pós-graduada foram os três parâmetros curriculares/pessoais mais referenciados em todos os inquiridos.

As áreas consideradas prioritárias para a oferta formativa são a macroscopia e a patologia molecular. Estas são áreas de intervenção relativamente recente no universo do TAPCT, constituindo uma oportunidade de aprendizagem com bastante potencial, o que se traduz numa alternativa de diferenciação e saída profissional.

De facto, a ligação dos Cursos ao mercado profissional é uma simbiose indispensável para o desenvolvimento favorável de ambas as partes. Não só as organizações beneficiam de profissionais competentes, fruto de uma formação superior devidamente orientada para as necessidades profissionais futuras, como também é essencial que o meio académico receba, das entidades empregadoras, feedback sobre as valências mais valorizadas nos TAPCT de modo a que possam ser melhorados os conteúdos e os métodos de ensino nos Cursos. A conjugação destes fatores, associado a uma atitude proactiva dos TAPCT, permitirá incrementar o seu leque de competências técnico-científicas, o que aumentará a sua competitividade no mercado de trabalho e, em última instância, poderá melhorar a sua empregabilidade.

Uma das limitações deste estudo que se pode identificar logo à partida, está relacionada com o facto de não ser possível controlar as condições em que o questionário é respondido. O autopreenchimento, não presencial dos questionários não permitiu garantir se existiu ou não alguma interferência externa no preenchimento dos mesmos.

Sugere-se realizar este tipo de estudo com intervalos de tempo regulares, por exemplo de quatro em quatro anos, procurando, nomeadamente, estudar este fenómeno no contexto da nova Licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais.

Lista Bibliográfica

1. Stefano FDD, Matos MCP, Gravi F, Ferreira T. Identification of factors that influence employability and career management: Focus on professionals on maritime shipping agents at Port of Santos/SP. *Unisantia Law Soc Sci.* 2012 Dec 18;1(1):26–9.
2. Ferro AB, Adriano A, Palma J, Quintino M, Sousa M. Satisfação profissional dos técnicos de Anatomia Patológica Citológica e Tanatológica dos Hospitais Públicos e de Gestão, S.A. da Sub-Região de Saúde de Lisboa. *Micron - Rev Téc Anat Patológica.* 2007;(14):6–14.

3. McGrath S. What Is Employability [Internet]. UNESCO Centre for Comparative Education Research, School of Education, University of Nottingham.; 2009. Available from: https://www.researchgate.net/publication/266456393_What_is_Employability
4. Fraga S. Adaptabilidade e empregabilidade numa perspectiva construtivista: estudo com desempregados em contexto de formação [Internet] [Dissertação de Doutoramento]. [Lisboa]: Faculdade de Psicologia da Universidade de Lisboa; 2012. Available from: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/7701/1/ulsd064596_td_Sandra_Fraga.pdf
5. Cardoso JL, Varanda MP, Madruga P, Escária V, Ferreira VS. Empregabilidade e Ensino Superior em Portugal [Internet]. ICS / CIRIUS / ISEG; 2012 [cited 2017 Apr 20] p. 1–144. Available from: <http://repositorio.ul.pt/handle/10451/7353>
6. Sanches L. Empregabilidade: uma exigência profissional [Internet]. MeuArtigo Brasil Escola. [cited 2017 Apr 20]. Available from: <http://meuartigo.brasilecola.uol.com.br/atualidades/empregabilidade-uma-exigencia-profissional.htm>
7. Silva P. Nível de Empregabilidade dos Diplomados da UniPiaget de Cabo Verde Provenientes do Interior de Santiago [Internet]. [Cabo Verde]: Universidade Jean Piaget; 2011. Available from: <http://hdl.handle.net/10961/4374>
8. S.A. A Evolução Recente do Desemprego [Internet]. Lisboa: Ministério das Finanças, Ministério da Economia, Ministério da Solidariedade e Segurança Social; 2012. Available from: http://www.portugal.gov.pt/media/630155/20120619_relatorio_emprego.pdf
9. Licenciados emigram cada vez mais. Mas não é só para fugir à crise [Internet]. ionline. [cited 2017 May 9]. Available from: <http://ionline.sapo.pt/462695>
10. Ceitil M. Gestão de Recursos Humanos para o Século XXI. Lisboa: Edições Sílabo; 2006.
11. Mão de Ferro A. Na rota da pedagogia. Lisboa: Edições Colibri; 1999.
12. Cabral-Cardoso C, Estêvão C, Silva P. As Competências Transversais dos Diplomados do Ensino Superior – Perspectiva dos Empregadores e dos Diplomados. Guimarães: TecMinho/Gabinete de Formação Contínua; 2006.
13. Goleman D. Emotional intelligence. 10th anniversary trade pbk. ed. New York: Bantam Books; 2005. 358 p.
14. Goleman D, Boyatzis R, McKee A. Primal Leadership: The Hidden Driver of Great Performance. Harvard Business Review. 2001 Dec;42–51.
15. Kamin M. Soft skills revolution: a guide to connecting with compassion for trainers, teams, and leaders. San Francisco, CA: John Wiley & Sons, Inc; 2013. 235 p.
16. Peres J. Gestão de carreira: uma questão de autoconhecimento. VIII CONVIBRA - Congr Virtual Bras Adm [Internet]. 2011; Available from: http://www.convibra.com.br/upload/paper/adm/adm_2621.pdf
17. Jackson AL, Geckeis CK. How to prepare your curriculum vitae. Rev. ed. Chicago: VGM Career; 2003. 182 p.
18. Collamer N. 8 Critical Ways To Improve Your Resume [Internet]. Forbes. [cited 2017 May 23]. Available from: <http://www.forbes.com/sites/nextavenue/2016/02/09/8-critical-ways-to-improve-your-resume/>
19. Universidade Técnica de Lisboa. Empregabilidade dos Diplomados da UTL - 2006 a 2008 [Internet]. Lisboa, Portugal; 2010. (Estudos UTL). Available from: https://www.utl-old.reitoria.utl.pt/admin/docs/2849_1055_empregabilidade_site.pdf
20. Araújo L. Gestão de pessoas. São Paulo: Atlas; 2006.
21. Fortin M-F. Fundamentos e Etapas no Processo de Investigação. Loures: Lusodidactica; 2009.
22. Rosental C, Frémontier-Murphy C, Godinho JL. Introdução aos métodos quantitativos em ciências humanas e sociais. Lisboa: Instituto Piaget; 2002.
23. Fortin M-F. O Processo de Investigação - da concepção à realização. 3rd ed. Lisboa: Lusodidacta; 2003.
24. The LimeSurvey project. LimeSurvey - the free and open source survey software tool! [Internet]. 2011 [cited 2013 Feb 16]. Available from: <http://www.limesurvey.org/pt/>

Prevalência de Portadoras de *Streptococcus agalactiae* e sua suscetibilidade numa População de Grávidas do Centro Hospitalar do Porto (CHP)

Ana Rita Moura Ribeiro

Escola Superior de Saúde – Email: ritjiharibeiro@gmail.com

Teresa Paula dos Santos Marques

Técnica Principal de Análises Clínicas e Saúde Pública do Serviço de Microbiologia do Centro Hospitalar do Porto – Email: tpsm.2007@gmail.com

Maria Helena Ramos

Diretora do Serviço de Microbiologia do Centro Hospitalar do Porto

Resumo

Introdução: O *Streptococcus agalactiae* (GBS) tem sido o principal agente responsável pelas infeções neonatais. De modo a preveni-las é recomendável a realização de um rastreio retovaginal entre as 35 e as 37 semanas de gestação, bem como a administração de profilaxia intrapartum às grávidas portadoras. **Objetivo:** Verificar a prevalência de portadoras de GBS no CHP a partir de amostras retovaginais, bem como determinar o perfil de sensibilidade da bactéria aos antibióticos. **Materiais e Métodos:** Foram incluídas no estudo as amostras retovaginais de 7375 grávidas com idades entre os 14 e os 53 anos, no período de Janeiro de 2013 a Dezembro de 2015. As amostras foram inoculadas em meio de Todd-Hewitt, sendo efetuada a subcultura deste em meio Gelose Sangue. Se identificação positiva efetuou-se o teste de sensibilidade aos antibióticos. **Resultados:** Em 2013, a prevalência de portadoras foi de 9,69%, tendo decrescido em 2014 para 5,19% e aumentado em 2015 para 9,78%, não sendo possível retirar conclusões, uma vez que não existe uma tendência linear. No entanto, os resultados obtidos encontram-se abaixo da prevalência mundial (10-30%). **Conclusões:** A alta prevalência do número de deteções desta bactéria enfatiza a importância de permanecer com o programa pré-natal de rastreio laboratorial de portadoras por GBS, fazendo com que os riscos para o recém-nascido sejam menores.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*, gravidez, rastreio laboratorial, prevalência, profilaxia, suscetibilidade

Introdução

Nas últimas décadas, o *Streptococcus agalactiae*, também referido como GBS (*Streptococcus Grupo B*), segundo a classificação de Lancefield, tornou-se o principal agente bacteriano responsável pelas infeções perinatais e pela elevada morbimortalidade neonatal. Assim, esta problemática desencadeou novos desafios clínicos e microbiológicos com a finalidade de rastrear e tratar as grávidas portadoras de GBS (1–3). O *Streptococcus* é um género que é caracterizado por bactérias Gram positivas, catalase negativas. Individualmente são esféricos ou ovóides, com menos de 2µm de diâmetro, associando-se em pares ou cadeias formando “rosários. O comprimento da cadeia de cocos é dependente das condições de cultura, tipo de meios usados. Apresentam uma cápsula de ác. hialurónico, a qual constitui um importante fator de virulência (4–7).

Colonização da grávida por *Streptococcus agalactiae* (GBS)

Este microrganismo tem o seu reservatório natural no trato gastrointestinal e apresenta uma grande capacidade de colonizar o genitourinário, local a partir do qual se desencadeia a colonização retovaginal (5,7). Apesar de esta bactéria possuir uma boa capacidade de adesão a diversos tecidos humanos, a sua adesão à mucosa vaginal, e consequentemente a colonização deste local (9–12). As taxas de colonização do intróito vaginal e perianal por GBS variam entre 15% a 40%, segundo a região geográfica, a raça e a idade (6,21,22). A colonização na grávida reveste-se da máxima importância em virtude do número elevado de manifestações clínicas como: corioamniotite, endometrite, osteomielite e, raramente, meningite, para além do risco elevado de ter um aborto espontâneo, rotura prematura das

membranas, febre intraparto ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) e parto prematuro, podendo ser considerados fatores de risco para o recém-nascido (RN) (14,15). O GBS pode ainda desencadear esterilidade materna (10,11,13).

Doença neonatal de início precoce

A doença neonatal de início precoce (DNP) ocorre geralmente, por transmissão vertical do GBS, podendo ocorrer um pouco antes ou durante o parto. A DNP é adquirida por aspiração de líquido amniótico infetado ou durante a passagem do feto pelo canal vaginal no momento do parto. Uma vez, na cavidade amniótica, para além de colonizar a pele e as mucosas do feto, também atinge os pulmões. Após o parto, a bactéria adere-se ao epitélio da árvore respiratória, invadindo de seguida a corrente sanguínea podendo causar septicemia, pneumonia e, raramente, meningite (10,12,14–16). Esta fase da doença desenvolve-se na primeira semana de vida RN, embora os sintomas surjam, geralmente, nas primeiras seis a oito horas após o parto (15). A probabilidade do RN desenvolver DNP como consequência desta patologia, é tanto maior quanto menor for o tempo de gestação. O risco de colonização e doença grave no RN está diretamente relacionado com a quantidade de GBS presentes no canal vaginal no momento do parto, tempo ocorrido após rotura de membranas e ausência de anticorpos contra o polissacarídeo capsular do GBS. Estes anticorpos específicos são transferidos pela mãe nas últimas dez semanas de gestação e têm por função proteger o bebé contra a infeção. Deste modo, o RN de uma mulher colonizada tem uma probabilidade, dez a quinze vezes maior, de desenvolver DNP (8,10,17).

Doença neonatal de início tardio

A doença neonatal de início tardio (DNT) ocorre por transmissão horizontal, nosocomial e através da amamentação, desenvolvendo-se entre a 1^a e a 12^a semana de vida do RN (15,17,18). A prematuridade é o principal fator de risco para a ocorrência de DNT, que se manifesta principalmente com bacteriemia e meningite, podendo ocorrer também infeções osteoarticulares. Ao contrário do que acontece na DNP, as complicações pulmonares são sintomas menos frequentes nesta fase da doença (6,8,10). Mais de 20% dos RN que sobrevivem à meningite, provocada pelo GBS, desenvolvem problemas neurológicos permanentes, entre os quais: perda neuro-sensorial auditiva, atraso mental, cegueira cortical e convulsões (6,8,19).

Serótipos capsulares (CPS) de GBS e a sua epidemiologia

Este microrganismo é classificado, de acordo com os polissacarídeos capsulares em vários serotipos: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e recentemente no serotipo IX. No entanto, existem ainda estirpes sem serotipo determinado, talvez devido a uma possível mutação nos genes capsulares (6,10,20). A distribuição dos serotipos está dependente da região geográfica e da etnia (6,21,22). Assim, na Europa os serotipos Ia, II, III e V representam 80 a 90% das estirpes de GBS, enquanto os serotipos IV, VI, VII, VIII e IX que têm sido identificados esporadicamente (6,10,15). Em Portugal, o serotipo V é considerado o mais frequente na colonização assintomática das mulheres em idade reprodutiva, enquanto o serotipo Ia é o mais comum em casos de doença invasiva. O serotipo III é comum a ambos os casos e é descrito como o mais virulento em diversas partes do mundo, como é o caso da Holanda, Taiwan e África do Sul. Contudo, em Portugal, na Suécia e em Israel o serotipo Ia é considerado o mais invasivo, estando associado à DNP enquanto o serotipo III está relacionado com a DNT (6,10).

Prevalência da colonização de GBS

Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a prevalência da colonização materna por GBS a nível mundial varia entre 10 a 30%. Na Europa, num estudo realizado entre Outubro de 2011 e Outubro de 2013 verificou-se uma taxa de colonização retovaginal variável entre 6,5 e 36% (3,8,23) Face a estes resultados, o Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC) recomenda que seja realizado o rastreio de GBS a todas as grávidas que se encontrem entre as 35 e as 37 semanas de gestação, de modo a prevenir possíveis patologias tanto para as grávidas como para os RN (4).

Diagnóstico Laboratorial

O produto recomendado é o exsudado retovaginal. Este deve ser colhido pelo Obstetra, utilizando uma zaragatoa com meio de transporte (Amies ou outros) (24–26). É imperativo que a colheita seja efetuada entre as 35 e

as 37 semanas de gravidez, dado que a colonização por GBS pode ser transitória, crónica ou intermitente, pois nesta fase da gravidez existe uma maior probabilidade de detetar a existência ou não de colonização por esta bactéria na altura do parto. Isto é, saber se existe ou não risco de ocorrer transmissão vertical, pois a colonização da mulher nos primeiros meses de gravidez não é sugestiva de causar infeções neonatais (19,24,25). As amostras enviadas, após a sua identificação e o seu registo são inoculadas em meio líquido seletivo de enriquecimento - o Todd-Hewitt broth suplementado com gentamicina e ácido nalidíxico. Estes são incubados a 37°C durante 18 a 24 horas. E após faz-se subcultura do Todd-Hewitt broth em Gelose Sangue, colocando-se um disco de Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT) no primeiro quadrante (GBS é resistente ao SXT). As culturas são incubadas a 37°C durante 18 a 24 horas, em atmosfera de CO₂. Caso as culturas sejam identificadas como GBS, efetua-se o teste de sensibilidade aos antibióticos, de modo a proporcionar às portadoras as medidas profiláticas necessárias (4,26).

Profilaxia Antibiótica

A prevenção da infeção por GBS é de extrema importância, sendo imprescindível a administração de antibióticos, tanto às grávidas como aos RN. A profilaxia pode ser efetuada antes ou durante o parto, no entanto, é no momento do parto que se torna mais eficaz para a prevenção de DNP no RN (3,8). A profilaxia intraparto baseia-se na administração de antibióticos de forma intravenosa, pois permite obter concentrações elevadas de antibiótico no líquido amniótico e no soro materno, que serão transferidos pela placenta para a circulação sistémica do feto. Como o GBS é sensível aos antimicrobianos β -lactâmicos, nomeadamente à penicilina, este é o antibiótico de eleição para a profilaxia intraparto, sendo importante a sua administração quatro horas antes do parto (6,8,27,30). Nas situações de alergia às Penicilinas é recomendado o uso dos Macrólidos / Lincosamidas (15,24,27,31).

Objetivos

Os objetivos específicos desta investigação foram: analisar a prevalência das portadoras de GBS em grávidas do CHP, durante o período de 1 Janeiro de 2013 a 31 Dezembro de 2015; relacionar a idade das grávidas da amostra em estudo com a frequência de colonização por GBS; analisar a suscetibilidade do GBS aos antibióticos e comparar resultados obtidos neste estudo com um efetuado neste serviço em 2011.

Materiais e Métodos

Para avaliar a prevalência de grávidas portadoras de GBS no CHP, foi desenvolvido um estudo observacional descritivo transversal, por meio da recolha de registos de dados da aplicação informática e-Deia do Serviço de Microbiologia. A amostra estudada corresponde a todas as gestantes a quem foi feito rastreio de portador de GBS entre as 35 e 37 semanas, no período de 1 Janeiro de 2013 a 31 de Dezembro de 2015. Na base de dados efetuada, as variáveis recolhidas foram: data de realização do rastreio, idade da gestante, resultados culturais para pesquisa GBS e em relação ao teste de suscetibilidade efetuado na presença de GBS. Tendo a amostra em estudo sido categorizada em grupos etários (GE) semelhantes ao do estudo realizado em 2011 na mesma instituição, de modo a obter uma validade externa. Os dados obtidos para as diferentes variáveis, foram compilados no programa informático Microsoft Excel® Office 2013, tendo sido efectuado uma análise descritiva uni e bivariada com o intuito de determinar a prevalência de portadoras de GBS e sua suscetibilidade numa população de grávidas do CHP. Para a descrição das variáveis foram utilizados gráficos e tabelas de frequências.

Resultados

O presente estudo foi realizado entre Janeiro de 2013 a Dezembro de 2015 onde foram avaliadas 7375 grávidas, com idades compreendidas entre os 14 e os 53 anos, que foram agrupadas em vários GE. A **Tabela 1** indica a Frequência Relativa (FR) dos rastreios efetuados ao GBS no CHP nesse período de tempo, onde é possível verificar que o GE dos 29 aos 33 anos foi o que teve a maior percentagem de rastreios efetuados (34,12%), ao contrário do GE das grávidas com mais de 43 anos, que obteve a menor percentagem (0,42%). Das 7375 grávidas estudadas, 2322 foram rastreadas no ano de 2013, sendo 225 portadoras do GBS; em 2014 realizaram o rastreio 2332 grávidas, das quais apenas 121 eram portadoras da bactéria e em 2015 o rastreio foi efetuado a 2721 grávidas, das quais 266 eram portadoras. Deste modo, o **Gráfico 1** apresenta o resultado das culturas retovaginais para GBS no CHP em 2013, 2014 e 2015, respetivamente. Assim, em 2013 obteve-se uma prevalência de 9,69%, de 5,19% e de 9,78% em 2013, 2014. 2015 respetivamente. No **Gráfico 2** podem observar os resultados dos exames culturais por grupo etário. As

Tabela 1: Frequência relativa dos rastreios efetuados ao GBS no CHP no período de tempo de 2013 a 2015.

GE	Negativo	FR (%)*	Positivo	FR (%)	Total	FR (%)
<19 anos	172	2,54%	14	2,29%	186	2,52%
19 a 23 anos	789	11,67%	66	10,78%	855	11,59%
24 a 28 anos	1576	23,30%	128	20,92%	1704	23,11%
29 a 33 anos	2313	34,20%	203	33,17%	2516	34,12%
34 a 38 anos	1514	22,39%	153	25,00%	1667	22,60%
39 a 43 anos	371	5,49%	45	7,35%	416	5,64%
>43 anos	28	0,41%	3	0,49%	31	0,42%
Total	6763		612		7375	

Legenda - * Frequência Relativa em percentagem em relação à coluna

Gráfico 1: Resultado das culturas retovaginais para GBS

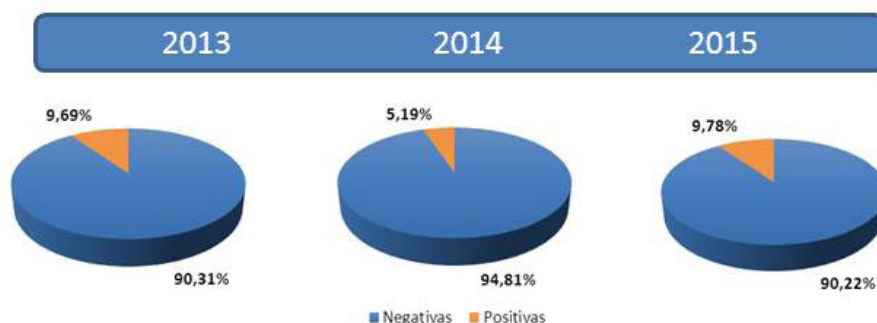
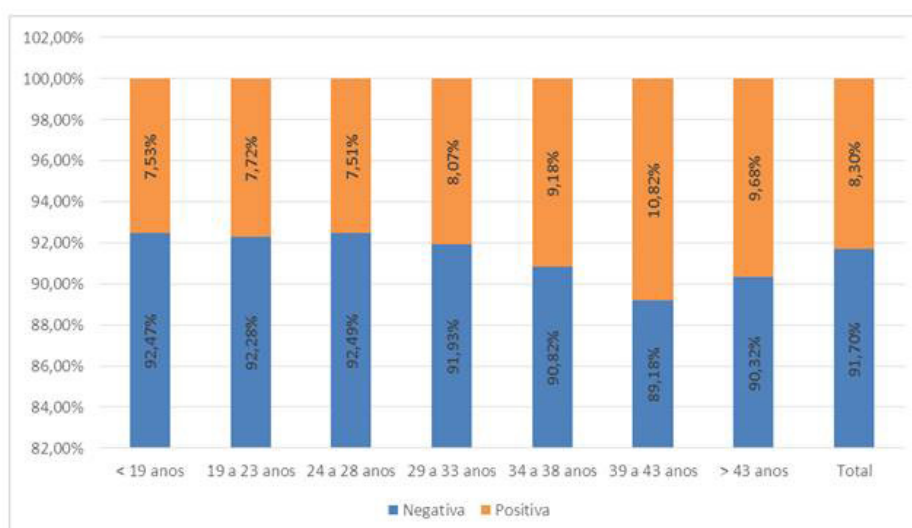


Gráfico 2: Associação entre os grupos etários das grávidas e a presença de GBS



grávidas com idades compreendidas entre os 39 e os 43 anos apresentam uma maior percentagem de colonização por GBS, em oposição às grávidas do GE dos 24 aos 28 anos, que evidenciam a menor percentagem de colonização. Relativamente à positividade das culturas retovaginais ao longo dos três anos, no Gráfico 2 está representada e associada aos GE das grávidas. O estudo revelou que, relativamente aos dados do comportamento dos GBS aos antimicrobianos, verificamos que todas as estirpes da amostra apresentavam-se susceptíveis à Penicilina, já em

Tabela 2: Relação entre os antibióticos testados no CHP e a respetiva sensibilidade no período de 2013 a 2015.

Antibiótico	Sensibilidade	Resistência	Indeterminação
Penicilina	100%	0%	0%
Clindamicina	75,20%	24,80%	0%
Eritromicina	70,02%	29,01%	0,97%

Tabela 3: Relação do teste de suscetibilidade à eritromicina no período de 2013 a 2015

Ano	R	S	I	Total
2013	28,51%	70,18%	1,32%	100%
2014	31,15%	68,03%	0,82%	100%
2015	28,36%	70,90%	0,75%	100%

Legenda – R: Resistência; S: Sensibilidade; I: Indeterminação

Tabela 4: Relação do teste de suscetibilidade à clindamicina no período de 2013 a 2015

Ano	R	S	Total
2013	24,12%	75,88%	100%
2014	28,69%	71,31%	100%
2015	23,60%	76,40%	100%

Legenda – R: Resistência; S: Sensibilidade; I: Indeterminação

relação aos macrólidos e Clindamicina os valores encontrados foram distintos conforme pode ser visto nas **tabelas 2, 3 e 4**. Ao longo do projeto de investigação foram analisados os dados sobre a suscetibilidade dos antibióticos mais utilizados na profilaxia intraparto. Assim, a Tabela 2 evidencia a relação entre os três antibióticos utilizados e a respetiva sensibilidade da bactéria aos mesmos, nos três anos em estudo. Deste modo, verifica-se que a penicilina é o antibiótico que apresenta uma maior sensibilidade (100%), seguindo-se a clindamicina (75,20%) e, finalmente, a eritromicina (70,02%). A Tabela 4 apresenta os resultados do teste de suscetibilidade à clindamicina, no período de 2013 a 2015. Verifica-se, de igual modo, uma maior resistência em 2014 (28,69%) e menor em 2015 (23,60%).

Discussão

As frequências dos rastreios efetuados entre 2013 a 2015 apresentam concordância com o estudo realizado em 2011 na mesma instituição. Apesar de não haver registos que indiquem que o rastreio foi realizado apenas na primeira gravidez, de acordo com os dados de 2013 da “Pordata”, a idade média da mulher aquando do nascimento do primeiro filho é, aproximadamente, 30 anos. Desta forma explica-se a razão do GE dos 29 aos 33 anos ser o que realizou a maior percentagem de rastreios (32). A prevalência de portadoras de GBS deste estudo é mais baixa em comparação com o estudo realizado em 2011 (10,2%), no entanto, sofreu algumas variações ao longo dos anos. Do ano de 2013 para 2014 houve uma diminuição na prevalência que voltou a aumentar em 2015, não sendo possível retirar conclusões, uma vez que não existe qualquer tendência. Assim, o período de tempo em estudo é considerado uma limitação. Em Portugal, no ano de 2005 foi realizado um estudo no Porto na Maternidade Júlio Dinis onde se verificou uma prevalência de portadoras de 19,3%. Uns anos mais tarde (2009 a 2011) na mesma localidade foi realizado um estudo com apenas 47 gestantes e obteve-se uma prevalência de 15%. Avaliando as taxas de colonização ao longo dos anos, é possível observar uma crescente melhoria, à exceção do ano de 2015 do presente estudo (2,8). Os valores obtidos encontram-se abaixo da taxa mundial de colonização retovaginal por GBS

que, de acordo com os dados da OMS, varia entre 10 a 30%. No entanto, de acordo com a literatura, a prevalência de GBS está dependente de diversos fatores, entre os quais a idade materna, número de parceiros sexuais, nível socioeconómico, nível de escolaridade, nutrição, grupo étnico e a localização geográfica (3,10,33,34). Segundo um estudo de Turrentine et al, realizado em 2008, verificou-se que a diminuição da prevalência da colonização materna por GBS foi observada em mulheres com etnia hispânica e com uma relação conjugal estável. Por outro lado, a raça afro-americana e a obesidade são alguns fatores associados ao aumento da prevalência da colonização materna por esta bactéria, descritos também noutros estudos (3,18,24,35). Os estudos não são constantes quando comparados com outras regiões geográficas. Uma investigação realizada na Tanzânia (Agricola Joachim *et al*, 2009) demonstrou que a idade materna, o estado civil, o número de parceiros sexuais e o nível de escolaridade não são estatisticamente significativos para os associar à colonização por GBS (36). Relativamente à idade materna, diversos estudos referem que a prevalência é maior em grávidas com idade inferior a 20 anos, no entanto, os resultados obtidos são contraditórios. Neste projeto de investigação, as mulheres mais velhas apresentam a maior taxa de colonização por esta bactéria, sendo mais concordante com o estudo realizado na área metropolitana do Porto de 2009 a 2011 (entre os 31 e os 40 anos). Ainda numa dissertação realizada na Universidade Nova de Lisboa, foi descrito que a taxa de colonização aumenta com a idade, confirmando os resultados obtidos (8,10,19,37). A penicilina é um antibiótico β -lactâmico e, segundo o CDC, apresenta uma excelente resposta contra o GBS, o que foi comprovado com o presente estudo. Desta forma, e como não estão descritas resistências a esta bactéria, é considerado o antibiótico de eleição. Dado que também possui um espectro estreito de ação, oferece um menor risco de resistência a outros microrganismos (30,38). A eritromicina e a clindamicina são os antibióticos de escolha, quando existe alergia à penicilina por parte das grávidas. Neste projeto de investigação, a eritromicina apresenta uma maior resistência que a clindamicina, estando de acordo com outros estudos. Em França, (DE MOUY *et al*, 2001) detetou uma resistência à eritromicina e à clindamicina de 21% e 18%, respetivamente; e na Alemanha, (Schoening et al, 2005) verificou que as resistências aos mesmos antibióticos eram de 11% e 4%, respetivamente (15). Em Portugal, num estudo realizado de Janeiro a Junho de 2008 no Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, observou-se uma resistência de 15% à eritromicina e de 9,6% à clindamicina (39). Apesar de em todos os estudos se verificar uma resistência superior à eritromicina comparativamente à clindamicina, estas são variáveis nos diversos países da Europa. Em Portugal, as resistências obtidas no CHP e no Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro são bastante distintas, observando-se uma maior resistência neste estudo que abrange os anos mais recentes. As resistências antibióticas são mais frequentes pois verifica-se um aumento das infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS) e às utilizações indiscriminadas de antibióticos (27). No CHP a eritromicina é utilizada como primeira opção em relação à clindamicina, dado que esta última apresenta mais efeitos secundários para a grávida. No entanto, uma vez que a clindamicina apresenta uma sensibilidade superior à da eritromicina, era interessante avaliar-se os riscos e verificar se seria uma boa opção optar primeiramente pela clindamicina (40,41). Os testes de suscetibilidade da eritromicina e da clindamicina foram divididos pelos três anos e, em ambos os antibióticos, verificou-se um aumento da resistência de 2013 para 2014 e uma diminuição de 2014 para 2015. Uma vez que não existe uma tendência linear, não é possível retirar conclusões. Contudo, obteve-se um bom resultado neste último ano, apesar de inesperado, dada a elevada multiresistência das bactérias aos antibióticos. Os resultados obtidos neste estudo são representativos do CHP entre os anos 2013 e 2015. Desta forma, estão apenas limitados à região do Porto, não abrangendo a população Portuguesa no geral. A amostra em estudo também poderá ser discutível devido ao facto do estudo ser realizado num serviço público e este abranger grande parte da população. Deste modo, se o mesmo estudo fosse realizado num Hospital privado, as frequências obtidas seriam discordantes.

Conclusão

A prevalência de portadoras de GBS no CHP ao longo dos três anos foi irregular, no entanto, é inferior à do estudo realizado em 2011 na mesma instituição e também em outros estudos realizados em Portugal. Face ao crescimento do número de deteções de GBS no ano de 2015 é imperativo que o programa pré-natal de rastreio laboratorial de portadoras por GBS permaneça, potenciando a diminuição dos riscos para o RN (23,26). A variável “idade materna” ficou por esclarecer, por isso seria interessante em investigações futuras incluir outras como a raça, o peso corporal e o nível de escolaridade. Seria ainda pertinente analisar a prevalência de RN infetados por GBS. Com a evolução da ciência surgiram no mercado meios cromogénicos (ex: Bio-Rad – Strep B Select), encontrando-se desde Janeiro de 2016 em utilização no Serviço de Microbiologia do CHP. Com esta nova metodologia, o meio é mais seletivo e inibe o crescimento de bactérias gram negativas e algumas gram positivas, potenciando o isolamento dos GBS (42). Apesar da profilaxia antibiótica intrapartum ser a medida preventiva recomendada pelo CDC, existem limitações associadas à sua utilização, dado que há a possibilidade da resistência aos antibióticos aumentar, não só pelo microrganismo que se pretende combater mas também por parte das bactérias de origem comensal. Desta forma, em alternativa à administração de antibióticos era recomendável a implementação de uma vacina (10). Teoricamente, a vacinação contra o GBS tem grande hipótese de erradicar a doença e prevenir a infeção nos RN, resolvendo o problema do uso de antibioterapia. No entanto, as vacinas em estudo tem como alvo o polissacarídeo capsular da bactéria (CPS), não

conferindo proteção para todos os serotipos, não estando ainda disponível (9). No futuro seria interessante investigar por Biologia molecular as estirpes isoladas das amostras retovaginais, de modo a obter informação acerca dos serotipos capsulares para que seja possível implementar a vacina no mercado.

Agradecimento

As autoras deste artigo querem agradecer a colaboração imprescindível para a realização deste estudo ao Dr Paulo Pereira, pelo apoio incondicional na obtenção dos dados estatísticos (Médico Patologista Clínico do Serviço de Microbiologia do CHP) e Dr^a Maria Helena Ramos (Diretora do Serviço de Microbiologia do CHP).

Referências Bibliográficas

1. Coutinho T, Coutinho CM, Zimmermann JB, *et al.* Prevenção da doença perinatal pelo estreptococo do grupo B: atualização baseada em algoritmos. 2011; 39: 329–333.
2. Areal A, Nunes S, Moreira M, *et al.* Infecção perinatal por *Streptococcus agalactiae* pode ser evitada : Prevalência da colonização em parturientes no Hospital São Marcos , factores de risco e a sua relação com a infecção perinatal . Acta Pediatr Port 2010; 41: 16–21.
3. Dias JF. Colonização por estreptococo do grupo B em gestantes em Cuiabá. 2014; 1–62.
4. Zardeto G, Guillen F, Camacho D. Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* em gestantes como rotina laboratorial de exames pré-natais. 2014; 42: 77–84.
5. Gomes MJ. Gênero *Streptococcus* spp. FAVET-UFRGS 2013.
6. Silvestre I. Evolução de genótipos de *Streptococcus agalactiae* associados a colonização na grávida. 2013.
7. Vassoler R, Catapan K, Jaskulski M. Colonização pelo *Streptococcus* beta-hemolítico do grupo B em gestantes atendidas em um laboratório de Chapecó-SC. 2016; 40: 131–138.
8. Chaves BA. Estudo da colonização por *Streptococcus agalactiae*, de mulheres em idade fértil, na área metropolitana do Porto. Diss do 2º Ciclo Estud Conducente ao Grau Mestre em Análises Clínicas 2011.
9. Morais C. Anticorpos IgG anti-GAPDH no soro de grávidas durante o 3o trimestre de gestação : Correlação com a colonização recto-vaginal por *Streptococcus agalactiae*. Univ do Porto - Inst Ciências Biomédicas Abel Salazar 2013; 1–72.
10. Farinha C. Caracterização de estirpes de *Streptococcus agalactiae* provenientes de colonização dos tratos genitourinário e gastrointestinal da mulher grávida Caracterização de estirpes de *Streptococcus agalactiae* provenientes de colonização dos tratos genitourinário. Univ Lisboa - Inst Hig e Med Trop 2012; 1–112.
11. Shabayek S, Bauer R, Mauerer S, *et al.* A streptococcal NRAMP homologue is crucial for the survival of *Streptococcus agalactiae* under low pH conditions. Molecular Microbiology, 2016.
12. Bidgani S, Navidifar T, Najafian M, *et al.* Comparison of group B streptococci colonization in vaginal and rectal specimens by culture method and polymerase chain reaction technique. 2016.
13. Função J, Narchi N. Pesquisa do estreptococo do Grupo B em gestantes da Zona Leste de São Paulo. 2013.
14. Lo JYC. Early-onset group B streptococcus neonatal disease: a target for prevention? Hong Kong Med J 2009; 15: 412–3.
15. Corrêa A. Diversidade genética e patogenicidade em *Streptococcus agalactiae*. Univ Fed do Rio Janeiro - Inst Microbiol ProfPaulo Góes 2009; 1–184.
16. Abid L, Charfeddine S, Kammoun S. Isolated *Streptococcus agalactiae* tricuspid endocarditis in elderly patient without known predisposing factors : Case report and. J Saudi Hear Assoc 2015; 28: 119–123.
17. Maria B, Norcia DM, Belei RA, *et al.* Prevenção da doença invasiva neonatal precoce pelo *Streptococcus agalactiae*: experiência de um hospital escola Preventing measures of early *Streptococcus agalactiae* invasive infections in newborns : experience of a school hospital. 2012; 105–114.
18. Santos Â, Sousa B, Gama A. Infecção tardia por *streptococcus agalactiae* – um caso de artrite séptica neonatal. 2013; XXII: 241–243.
19. Kiss FS, Rossato JDS, Graudenz MS, *et al.* Prevalência da colonização por *Streptococcus agalactiae* em uma amostra de mulheres grávidas e não grávidas de Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul. Sci Med (Porto Alegre) 2013; 23: 169–174.
20. Chukwu MO, Mavnyengwa RT, Monyama CM, *et al.* Original article Antigenic distribution of *Streptococcus agalactiae* isolates from pregnant women at Garankuwa hospital – South Africa. 2015; 5: 125–133.
21. Fiolo K, Zanarex C, Salvadego M. Taxa de infecção e sorotipos de *Streptococcus agalactiae* em amostras de recém-nascidos infectados na cidade de Campinas (SP), Brasil. Rev Bras Ginecol Obstet, 2012, pp. 545–549.
22. Sadeh M, Firouzi R, Derakhshandeh A, *et al.* Molecular Characterization of *Streptococcus agalactiae* Isolates From Pregnant and Non-Pregnant Women at Yazd University Hospital , Iran. 2016; 9: 0–5.
23. Bastos AN. *Streptococcus agalactiae* em gestantes : incidência em laboratório clínico de Juiz de Fora (MG) - 2007 a 2009. 2012; 45–50.

24. Almeida A, Agro J, Ferreira L. Estreptococo β Hemolítico do Grupo B. 2013; 191–197.
25. Costa NDVL, De Carvalho M, Pone SM, *et al.* Gestantes colonizadas pelo Streptococcus do grupo B e seus recém-nascidos: análise crítica da conduta adotada no Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz. Rev Paul Pediatr 2010; 28: 155–161.
26. George FHM. Exames laboratoriais na Gravidez de Baixo Risco. Norma da Direção-Geral da Saúde 2013; 37: 1–4.
27. Florindo C, Damião V, Lima J, *et al.* Accuracy of prenatal culture in predicting intrapartum group B streptococcus colonization status. J Matern Fetal Neonatal Med 2013; 7058: 640–642.
28. Rutledge TF, Boyd MF. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. Centers for Disease Control and Prevention, 2010.
29. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Módulo V: 1–93.
30. Secção de Neonatologia SPP. Consenso Clínico - Rastreamento e Prevenção da Doença Perinatal causada pelo *Streptococcus agalactiae*. 2013.
31. Bolukaoto JY, Monyama CM, Chukwu MO, *et al.* Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa. BMC Res Notes 2015; 6–12.
32. Pordata. Retrato de Portugal na Europa. 2015.
33. Dyke M, Phares C, Lynfield R. Evaluation of Universal Antenatal Screening for Group B Streptococcus. The New England Journal of Medicine, 2009.
34. Khan M, Faiz A, Ashshi A. Maternal colonization of group B streptococcus: prevalence, associated factors and antimicrobial resistance. Ann Saudi Med 2015; 35.
35. Kleweis SM, Cahill AG, Odibo AO, *et al.* Maternal Obesity and Rectovaginal Group B Streptococcus Colonization at Term. 2015; 2015.
36. Joachim A, Matee MI, Massawe FA, *et al.* Maternal and neonatal colonisation of group B streptococcus at Muhimbili National Hospital in Dar es Salaam, Tanzania: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance. BMC Public Health 2009; 9: 437.
37. Santos AL. Estudo de incidência de infeção por Estreptococos do Grupo B, antes e após implementação do protocolo de abordagem profilática da infeção a Estreptococos do Grupo B. Univ da Beira Inter - Ciências da Saúde 2014.
38. Thiago N, Cayres N, Leonardo H, *et al.* Detecção da colonização por *Streptococcus agalactiae* e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos em gestantes atendidas no Hospital Universitário de Brasília. 2012; 49: 18–26.
39. Pinheiro S. Caracterização genética da resistência à eritromicina em *Streptococcus agalactiae* de gestantes saudáveis. Univ Trás-os-Montes e Alto Douro 2009.
40. Infarmed. Folheto Informativo: Eritromicina. 2011.
41. Infarmed. Folheto Informativo: Clindamicina. 2014; 2–6.
42. Bio-Rad Laboratories - Clinical Microbiology. Chromogenic Media. 2012; 52: 3–4.

A Prevalência de Micobactérias atípicas em doentes do Centro Hospitalar do Porto

Catarina Isabel Ribeiro Leal

Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto – Instituto Politécnico do Porto

Júlio Manuel Pereira Teixeira

Centro Hospitalar do Porto (CHP), Hospital Geral de Santo António, Laboratório de Microbiologia

Maria Helena Ramos

Directora do Serviço de. Microbiologia do Centro Hospitalar do Porto

Resumo

Introdução: Recentemente tem-se assistido a um aumento significativo de micobactérias não tuberculosas (MNT). As MNT encontram-se dispersas na natureza sendo patogénicos oportunistas que apresentam patogenicidade variável. O seu aumento deve-se a uma maior susceptibilidade a estes microrganismos, ao aumento da sensibilidade das técnicas de diagnóstico e também ao maior número de pacientes com fatores predisponentes. **Objetivo:** Avaliar a prevalência destas bactérias, como responsáveis por doenças, em amostras provenientes de pacientes do Centro Hospitalar do Porto (CHP) atendendo a algumas variáveis, no período compreendido entre Janeiro de 2010 e Dezembro de 2015. **Material e métodos:** Foi realizado um estudo observacional descritivo transversal, para pesquisa de MNT, no CHP. **Resultados:** A MNT mais prevalente neste estudo foi o *Mycobacterium avium complex (MAC)* seguida pelo *M. gordonae*. O grupo de diagnóstico mais frequente diz respeito às patologias do sistema respiratório. A prevalência de MNT durante os anos do estudo foi respetivamente: 2010 (0,06%), 2011 (0,55%), 2012 (1,38%), 2013 (0,38%), 2014 (1,31%) e 2015 (0,78%). **Conclusão:** A elevada percentagem de isolamentos de *MAC* e *M. gordonae* é justificada pelo facto do primeiro ser um agente patogénico pulmonar que afeta indivíduos cujo sistema imunológico se encontre debilitado. Já a segunda espécie mencionada pode ser considerada apenas como uma contaminante do produto. A prevalência de MNT ao longo dos anos não permitiu estabelecer uma relação linear. Com o desenvolvimento de metodologias que permitem uma correta identificação e suscetibilidade das MNT, deverá existir uma eficaz coordenação entre o laboratório e a clínica para valorização destes agentes.

Palavras-chave: Micobactérias atípicas, prevalência, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium avium complex*.

Introdução

Micobactérias

As micobactérias são bactérias que pertencem ao género *Mycobacterium*, família *Mycobacteriaceae*, ordem *Actinomycetales* e classe *Actinomycetes* (1,2).

As infeções provocadas por micobactérias estão implicadas nas patologias mais antigas com impacto na saúde pública, sendo a tuberculose e a lepra as mais descritas. A descoberta do agente etiológico da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, em 1882 por Robert Koch, impulsionou o início do estudo destas bactérias (1,3, 4).

Para se incluir uma espécie no género *Mycobacterium* é necessário que contenham as seguintes características (5, 6):

- Serem bacilos álcool-ácido resistentes que podem apresentar-se na forma cocobacilar ou filamentosa, variando de espécie para espécie.
- Microrganismos imóveis, não esporulados, aeróbios e microaerófilos (2,4).

A álcool-ácido resistência apresentada por estas micobactérias, demonstrada pela coloração de Ziehl-Neelsen, deve-se essencialmente à elevada quantidade de ácidos micólicos presentes na sua parede. Assim, quando corados

com fucsina, as micobactérias, resistem à descoloração subsequente com uma solução de álcool-ácido, permanecendo com a cor do primeiro reagente utilizado (fucsina) neste tipo de coloração.

Micobactérias atípicas ou Micobacterias não tuberculosas

As micobactérias não tuberculosas (MNT) encontram-se dispersas na natureza sendo patogênicos oportunistas e ao contrário das espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* apresentam patogenicidade variável (7). A capacidade das MNT em produzir doença está documentada na literatura e a sua importância vem aumentando progressivamente, com isolamentos de diferentes espécies (8).

Possuem uma parede celular com hidrofobicidade, o que lhes permite resistir ao glutaraldeído e aos processos de cloração utilizados para o tratamento das águas. Para além disso ainda apresentam como mais-valia à sua sobrevivência a capacidade de formar biofilmes. Todas estas características de resistência apontam como fonte mais provável de infecção no Homem o consumo de água contaminada por estes agentes, quer por inalação quer por ingestão (4, 5,9–13).

Ao longo dos últimos anos, as infeções por MNT têm vindo a adquirir maior visibilidade. A sua incidência vem aumentando, principalmente devido à sua implicação como agente etiológico de severas patologias que afectam principalmente pulmões, pele e ossos; o aumento da sensibilidade nos métodos de diagnóstico e identificação e o aumento de pacientes imunocomprometidos (3).

Epidemiologia

Estes microrganismos são agentes ubíquos do ambiente, geralmente isolados a partir de fontes de água natural ou canalizada, aerossóis e material cirúrgico. A grande maioria destas micobactérias tem a capacidade de se multiplicar em condições pouco favoráveis a nível alimentar e ambiental (a temperaturas elevadas e pH de valores extremos).

Os mecanismos de transmissão mais descritos são as vias respiratória e digestiva e por contato direto com a pele (4,5,11–15).

Relativamente à incidência desta patologia este é um parâmetro difícil de precisar, uma vez que atualmente as patologias provocadas por micobactérias atípicas não são de declaração obrigatória. No entanto, na literatura é mencionada uma incidência aproximada, nos países industrializados, de 1-2 casos por 100 000 habitantes (números estimados no ano de 2012). Em outro artigo é mencionado um valor para a incidência desta patologia, a nível mundial, de 1,78 casos por 100 000 habitantes (4, 12).

Fatores de risco

Estes agentes etiológicos poderão provocar tuberculose em indivíduos infetados com VIH, doentes com doença pulmonar subjacente e em pacientes sem doença pulmonar prévia. Em doentes infetados com VIH as infeções disseminadas por MNT normalmente só surgem quando o número de linfócitos T CD4 é inferior a 50 células por microlitro (μ l), sendo que quando este número se encontra inferior a 40 células por μ l o risco de infecção aumenta 2,5 vezes. Nos indivíduos não afetados por esta infecção, a patologia poderá ocorrer devido a anormalidades dos recetores da IL-12 e do interferão- γ (3, 4, 12, 5, 16).

Segundo dados bibliográficos, a manifestação clínica mais relatada é a doença pulmonar (90% dos casos), seguida da patologia disseminada, infecção dos gânglios linfáticos e a ocorrência de infecção a nível da pele e tecidos moles (5,12,13, 17-20).

Existem alguns síndromas clínicos, que favorecem o aparecimento desta infecção como o hábito tabágico (66%), patologia pulmonar crónica (42%), infecção por VIH (26%) e hábitos alcoólicos (20%). No que diz respeito à patologia pulmonar crónica, as doenças mais associadas incluem DPOC, bronquiectasias, sequelas de tuberculose, fibrose quística, fibrose por radioterapia, e pneumoconioses (4, 15, 16, 19).

Identificação das diferentes estirpes de Micobactérias atípicas

As micobactérias atípicas pertencem a um grupo heterogéneo de microrganismos que compreendem um número elevado de espécies, que apresentam entre si uma grande variação a diferentes níveis, tais como a morfologia de colónias, tempo de crescimento, sensibilidade a antibióticos e virulência. A sua identificação é conseguida com base em critérios fenotípicos, tais como:

- **Tempo de crescimento:** a partir deste parâmetro distinguem-se dois grupos de micobactérias, as de crescimento lento (as colónias demoram cerca de 7 dias ou mais a surgirem em meio sólido) e as de crescimento rápido (as colónias surgem em menos de 7 dias em meio sólido).4, 9
- **Temperatura de crescimento:** a maioria destes agentes desenvolve-se bem a 37 °C, no entanto existem estirpes cuja temperatura ideal de desenvolvimento varia entre os 30 e os 42 °C.4,9
- **Produção ou não de pigmento e fotoreatividade:** a partir deste critério poderão distinguir-se estirpes fotocromogéneas (pigmentam somente na presença da luz), escotocromogéneas (pigmentam na presença ou não da luz) e acromogéneas (não produzem pigmento).4, 9
- **Morfologia das colónias:** no que diz respeito a este parâmetro as colónias poderão adquirir a forma lisa, rugosa ou mucosa.4

Para além destas características fenotípicas, actualmente existem metodologias como a espectrometria de massa (MALDI-TOFF) e métodos moleculares que permitem uma identificação mais precisa e rápida destes agentes (4, 9, 17).

Agentes etiológicos

A identificação das espécies de micobactérias atípicas tem uma importância relevante no âmbito da clínica e do tratamento que deverá ser adotado, visto ser diferente consoante o agente em causa.

No **Quadro 1**, encontram-se mencionadas as espécies relatadas neste estudo, de acordo com o seu processo de crescimento e com o local predominantemente afetado.

Quadro 1 - Espécies de MNT organizadas segundo o seu processo de crescimento e de acordo com o local predominantemente afetado

Estirpe de Micobactéria atípica (crescimento lento)	Local predominantemente afetado
<i>M. kansasii</i>	Pulmões, infeção disseminada (4, 5, 13).
<i>M. malmoense</i>	Pulmões (4, 5, 13)
<i>M. xenopi</i>	Pulmões (4, 5, 13)
<i>M. aviumcomplex (MAC)</i>	Pulmões, linfonodos, infeção disseminada (4, 5, 13)
<i>M. gordonae</i>	Pulmões, tecidos moles, sistema urinário, infeção disseminada (4, 20)
<i>M. ulcerans</i>	Pele (4, 5, 13)
Estirpe de Micobactéria atípica (crescimento rápido)	Local predominantemente afetado
<i>M. abscessus</i>	Pele, ossos, articulações, catéter, infeção disseminada (4, 5, 13)
<i>M. chelonae</i>	Pele, catéter, infeção disseminada (4, 5, 13)
<i>M. fortuitum</i>	Pele, cateter (4, 5, 13)

O diagnóstico de doença por MNT exige muita prudência, pois o isolamento a partir de amostras clínicas com flora comensal pode significar colonização transitória ou contaminação, e não necessariamente doença. Torna-se desta forma importante uma boa comunicação do laboratório com o clínico no âmbito da identificação e avaliação de possíveis infeções por MNT (8).

Os fatores ambientais podem favorecer o predomínio de determinada espécie em detrimento de outra o que torna relevante a realização de estudos que indiquem as MNT mais relevantes, as patologias associadas, a prevalência das espécies em cada zona geográfica para um melhor conhecimento da realidade local (18)

Objetivos

O objetivo deste estudo é avaliar a prevalência destas bactérias como responsável por infeções em amostras provenientes de doentes do Centro Hospitalar do Porto atendendo a algumas variáveis (idade, género, diagnóstico, produto biológico e espécie de micobactéria atípica), no período compreendido entre Janeiro de 2010 e Dezembro de 2015.

Materiais e Métodos

Tipo de estudo

Estudo observacional, descritivo, transversal.

Amostra

A amostra é constituída por registos de resultados de culturas de produtos biológicos, para pesquisa de Micobactérias, com isolamento e identificação de micobactérias atípicas, no serviço de Microbiologia do Centro Hospitalar do Porto, estudados no período compreendido entre Janeiro de 2010 e Dezembro de 2015.

3.2.1. Critério de exclusão

Todos os registos de amostras com resultados inconclusivos na identificação de Micobactérias atípicas.

Instrumentos

Os instrumentos utilizados neste estudo foram registos existentes na base de dados do sistema LIS (sistema informático existente no Serviço de Microbiologia). Os dados foram inseridos na base de dados “eDeiaLab” e devidamente validados pelo patologista do serviço.

Procedimento

Acedeu-se à base de dados “eDeiaLab”, com o intuito de recolher registos de amostras testadas para pesquisa de Micobactérias, com identificação de micobactérias atípicas. Foi construída uma base de dados no programa informático Microsoft Excel® de 2007, com os resultados existentes no LIS e efectuado o estudo tendo em conta as variáveis anteriormente referidas.

A variável idade encontra-se expressa em anos, categorizada nas seguintes faixas etárias: <20, 20-29, 30-39, 40-49, 50-59, 60-69, 70-79, 80-89 e ≥ 90. Quanto ao diagnóstico, este encontra-se expresso em grupos de patologias, categorizado nos seguintes grupos: Doenças do Sistema Respiratório, Doenças do Foro Oncológico, Infeções Víricas-Imunodepressão, Doenças do Sistema Urinário, Doenças Cutâneas e Outras Patologias.

Estatística

Os dados obtidos foram tratados a partir de uma análise descritiva das variáveis em estudo, com o auxílio do programa informático Microsoft Excel ® de 2007. Os resultados encontram-se apresentados sob a forma de frequências absolutas e relativas uni e bivariadas, em gráficos e tabelas.

Resultados

Da análise descritiva dos dados verificou-se que no total de 16 863 amostras para estudo micobacteriológico, no período do estudo em questão, apenas 137 delas apresentaram um resultado positivo para a presença de MNT. Perante estes resultados deduz-se que a frequência relativa destes microrganismos, no período compreendido entre janeiro de 2010 e dezembro de 2015, foi de 0,81%.

Das 137 amostras com resultado positivo para a pesquisa de MNT, 93 delas diziam respeito a indivíduos do sexo masculino enquanto as restantes 44 amostras eram referentes a indivíduos do sexo feminino.

A nossa amostra foi distribuída por grupos etários atendendo á idade dos pacientes. Observou-se que o grupo etário mais atingido é aquele que compreende indivíduos com idades entre os 50 e os 59 anos (21%). A estes seguem-se os indivíduos com idade compreendida entre os 40 e os 49 anos (19%). Os grupos etários onde estas bactérias foram menos prevalentes, foram os dos indivíduos com idade <20 (3%) e os doentes com idade ≥90 (2,19%). Dos grupos etários maioritariamente afetados observou-se que a espécie de MNT mais frequentemente isolada foi, respetivamente, o *MAC* e o *Micobacterium gordonae*.

Das amostras analisadas com resultado positivo para a presença de MNT identificaram-se as espécies mencionadas na **Tabela 1**. Verificou-se que a mais isolada foi o *MAC* (n= 52), seguida do *M. gordonae* (n= 51). Houve

apenas um caso de co-infecção por *M. chelonae* e *M. abscessus* (n=1).

Tabela 1- Espécies de MNT isoladas nas amostras com resultado positivo, e respectivas frequências absoluta e relativa

Espécie de MNT isolada	Frequência absoluta	Frequência relativa
<i>M. abscessus</i>	2	1,46%
<i>M. aviumcomplex</i>	52	37,96%
<i>M. chelonae</i>	2	1,46%
<i>M. chelonae/ abscessus</i>	1	0,73%
<i>M. fortuitum</i>	6	4,38%
<i>M. gordonae</i>	51	37,23%
<i>M. kansasii</i>	12	8,76%
<i>M. lentiflavum</i>	1	0,73%
<i>M. malmoense</i>	2	1,46%
<i>M. marinum</i>	1	0,73%
<i>M. ulcerans</i>	1	0,73%
<i>M. xenopi</i>	6	4,38%
Total Geral	137	100,00%

No que diz respeito aos produtos biológicos analisados, observou-se uma maior percentagem de amostras de secreções respiratórias (60,58%), seguido das amostras de aspirado bronco-alveolar (22,63%), tecido (6,57%) e urina (2,92%).

Relativamente ao diagnóstico, com base nos registos clínicos de cada indivíduo, verificou-se uma maior ocorrência de patologias a nível do Sistema Respiratório, tal como evidencia a **Tabela 2**.

Dentro deste grupo de diagnóstico, as patologias mais observadas foram as bronquiectasias (14,60%), sequelas de tuberculose pulmonar (10,95%), infeção respiratória (8,76%), pneumonia (5,11%), DPOC (2,92%) e fibrose quística (2,19%). Foram registadas outras patologias como a pneumonia adquirida na comunidade (PAC), derrame pleural, e expectoração hemoptoica, mas com valores percentuais residuais.

Tabela 2 - Grupos de diagnóstico observados no processo clínico dos indivíduos cuja amostra foi estudada, e respectivas frequências absoluta e relativa

Grupos de diagnóstico	Frequência absoluta	Frequência relativa
Doenças do Sistema Respiratório	76	55,47%
Outras patologias	6	4,38%
Infeções víricas - Imunodepressão	36	26,28%
Doenças Cutâneas	4	2,92%
Doenças do foro oncológico	10	7,30%
Doenças do Sistema Urinário	4	2,92%
Sem diagnóstico encontrado	1	0,73%
Total Geral	137	100,00%

O segundo grupo de diagnóstico mais registado diz respeito às infeções víricas/ imunossupressão (26,28%). Deste grupo a patologia mais comum foi a infeção pelo VIH (16,79%). Das restantes patologias registadas neste grupo constam a infeção do VIH associada com outras patologias, como adenopatias, pneumonia, tumor ganglionar, hepatite C e tuberculose.

Numa análise bivariada dos resultados obtidos verificou-se, perante a relação género/espécie, que a espécie mais isolada nas amostras dos indivíduos do sexo masculino era o *M. gordonae*. Já nas amostras de indivíduos do sexo feminino prevalecia o isolamento do MAC.

Nas secreções respiratórias, observou-se que as MNT maioritariamente isoladas foram o MAC (39,76%), seguido pelo *M. gordonae* (37,35%) e o *M. kansasii* (9,64%). O **Gráfico 1** apresenta esses resultados, bem como a relação entre os restantes produtos biológicos e as espécies de MNT. No que diz respeito ao número de isolamentos de MNT por ano, deduziu-se que o ano em que houve maior número de isolamentos destes agentes foi em 2012, sendo o *M. gordonae* a espécie mais isolada (n= 20), seguida do MAC (n= 16).

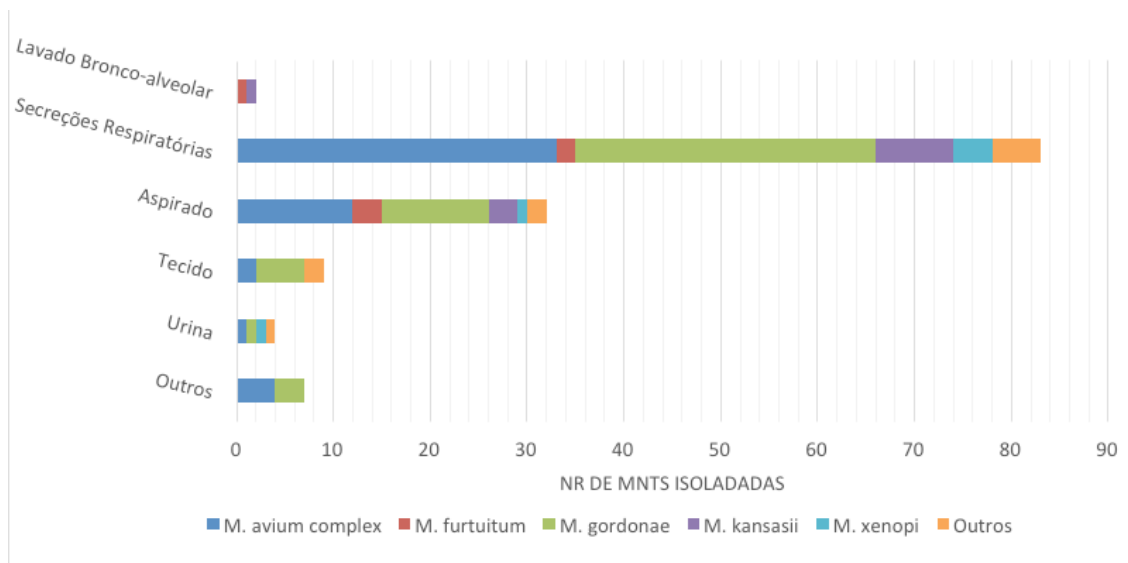


Gráfico 1 - Relação entre a espécie de MNT identificada e o produto biológico a partir do qual foi isolada

Na relação espécie/diagnóstico, verificou-se que no grupo de diagnóstico onde se verificou maior prevalência de resultados positivos para a pesquisa de Micobactérias atípicas (Doenças do Sistema Respiratório), as MNT maioritariamente isoladas foram: MAC (n=31), *M. gordonae* (n=28) e *M. kansasii* (n=9). Relativamente ao segundo grupo de diagnóstico mais frequente Infecções víricas/ Imunodepressão (n=36) as espécies com maior prevalência foram o MAC (n=14) e o *M. gordonae* (n=12). Sem diagnóstico conhecido foi apenas registada uma amostra, cujo agente isolado foi o MAC. A nível das Doenças do foro oncológico (n=10), observou-se que as espécies maioritariamente isoladas foram novamente o MAC e o *M. gordonae*, com igual número de casos (n=4, respetivamente). No que diz respeito ao grupo de diagnóstico da patologia do Sistema urinário, verificou-se que a MNT prevalente era o *M. gordonae* (n=3) existindo registo de apenas mais um caso cujo agente era o *M. malmoense*.

O isolamento de MNTs não foi uniforme ao longo dos anos do estudo, sendo que a prevalência foi maior nos anos 2012 e 2014.

Discussão

Durante o período de estudo foi reportado o isolamento de MNT em 137 casos.

A identificação das várias espécies de micobactérias, no Serviço de Microbiologia do CHP, é feita por metodologia molecular. Após cultura de micobactérias positiva, procede-se à sua identificação reportando como micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, ou no caso de uma MNT, identificada a espécie envolvida. Na grande maioria dos laboratórios de Microbiologia não faz parte da rotina laboratorial proceder-se à identificação das MNT, verificando-se apenas a sua presença ou ausência. Em vários estudos é relatado um aumento significativo dos isolamentos de MNT evidenciado essencialmente pelo decréscimo da incidência de casos de TB, em especial nos países desenvolvidos, o que torna importante a sua identificação. Segundo um estudo publicado de Grubek-Jaworska (21) realizado na Polónia, entre 1999 e 2005, verificou-se que 68,1% de amostras de pacientes VIH negativos com suspeita de TB eram positivas para MNT, embora apenas 8,7% tivessem causado doença (13, 21).

Perante os resultados obtidos neste estudo verificou-se um isolamento superior de MNT em indivíduos do sexo masculino (n=93) relativamente aos obtidos no sexo feminino (n=44). Na literatura existem vários estudos com resultados semelhantes, exemplo é o estudo realizado no Porto, no Hospital de São João, no ano de 2011, por A. Marinho *et al* (10), mantém estes mesmos resultados, verificando-se um maior número de isolamentos nos homens (n=

68) do que nas mulheres (n=34). Num estudo realizado em Lisboa, no ano de 2012 por Inês Rodrigues (1), os resultados relativos a estas variáveis foram concordantes com os obtidos neste estudo, visto a obtenção de 71% de estirpes provenientes de indivíduos do sexo masculino contra 29% do sexo feminino (1,10, 19).

Neste estudo analisou-se também a prevalência de agentes isolados segundo determinados grupos etários. O conhecimento dos principais grupos de risco e a respetiva distribuição etária é uma mais-valia no que respeita ao diagnóstico clínico. A média de idades neste estudo foi de 58 anos de idade, havendo uma variação entre os 10 e os 98 anos. O grupo etário onde se observou maior isolamento de MNT compreende os indivíduos com idades entre os 50 e os 59 anos de idade. Segundo um estudo realizado por Chy CY *et al.* (22) em 2016, no âmbito do estudo de pacientes com infeção por MNT, verificou-se uma média de idades igual à demonstrada neste estudo (22).

Entre as MNT isoladas verificou-se a identificação de 12 espécies distintas, sendo que a maior parte dessas diz respeito a MNT potencialmente patogénicas (*MAC*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. abscessus*, *M. malmoense* e *M. ulcerans*). Apenas duas das espécies isoladas se caracterizam como MNT não patogénicas, sendo essas o *M. gordonae* e *M. lentiflavum* (14, 19,16,23). De entre as espécies identificadas, as três mais prevalentes foram o *MAC* (37,96 %), *M. gordonae* (37,23%) e o *M. kansasii* (8,76%). As outras espécies identificadas apresentaram uma percentagem de isolamento residual. O *MAC* é um agente patogénico, cuja sua prevalência tem sofrido um aumento dramático. É uma MNT que poderá causar doença pulmonar em indivíduos seropositivos para o VIH, em pacientes com doença pulmonar subjacente e em pessoas sem doença pulmonar prévia. É um agente que poderá afetar indivíduos cujo sistema imune se encontre afetado de alguma forma (24). Neste estudo observou-se que o grupo de diagnóstico mais prevalente foi o que dizia respeito a patologias do Sistema respiratório, no qual também o *MAC* foi o agente maioritariamente isolado, como seria de esperar. Verificou-se que dentro deste grupo de diagnóstico as patologias mais decorrentes foram as bronquiectasias, tuberculose pulmonar, infeção respiratória, e fibrose quística. Também no segundo grupo de diagnóstico mais afetado – infeções víricas/ imunodepressão– foi o *MAC* o agente mais isolado. Relativamente aos produtos biológicos dos quais foram isoladas mais MNT, verificou-se que os mais frequentes foram secreções respiratórias e aspirado brônquico, estando este resultado coerente com o grupo de diagnóstico frequentemente encontrado. Em ambos os produtos a espécie mais prevalente foi o *MAC*. Esta elevada percentagem de isolamentos em ambos os grupos de diagnóstico mencionados encontra-se concordante com o que seria de esperar, uma vez que sendo o *MAC* um agente que causa patologia pulmonar este iria ser maioritariamente isolado a partir de produtos biológicos provenientes de indivíduos pertencentes a esses grupos de diagnóstico. Verifica-se assim que existe uma diminuição das defesas do sistema imune dos indivíduos manifestantes destas patologias (devido ao decorrer de cada perturbação em particular), o que poderá promover a infeção (24–28). A água aerossolizada é uma importante fonte de infeção, e assim a elevada prevalência deste agente poderá também dever-se à substituição de banhos por duchas, a nível dos hábitos de higiene (16). No estudo de Hans Dabó *et al.* (8) (2015) verificou-se a presença de patologias semelhantes às detetadas neste estudo. Observou-se a presença de DPOC (36%), bronquiectasias (31%) e sequelas de TP (20%). Também o *MAC* foi a estirpe maioritariamente isolada (58%) (8).

A percentagem de isolamentos de *M. gordonae* neste estudo também foi elevada e poderá ser justificada pelo facto desta ser uma das MNT mais frequentemente isolada, encontrando-se dispersa na água, solos, trato urinário, fluido gástrico, e em membranas mucosas de indivíduos sadios. Na maior parte das vezes, o isolamento desta estirpe deve-se a contaminação da amostra ou de colonização, não sendo representativa de patologia (29). Noutros estudos, tais como os realizados por A. Marinho *et al.* (2008) (10) e Suely Uekl *et al.* (2004) (19), também foram relatadas pelo menos duas das três estirpes mais isoladas neste estudo, como as mais prevalentes, no entanto, em percentagens distintas. No estudo realizado por A. Marinho *et al.* (2008) (10) observou-se uma maior percentagem de *MAC* (47%), e uma percentagem de 18,5% de isolamentos da estirpe *M. gordonae*. Já no estudo realizado por Suely Uekl *et al.* (2004) (19) observou-se uma maior prevalência de *MAC* (64,9%), seguida pelo *M. kansasii* (12,2%) e por fim o *M. gordonae* (10,2%) (10, 19). Perante o seu amplo espetro de colonização, encontra-se justificada a percentagem distribuída de isolamentos pelos vários tipos de produtos biológicos em estudo – secreções respiratórias (37,35%), aspirado (34,38%), tecido (55,56%), líquido pleural (50,00%), urina (25,00%). Também no produto não identificado contabilizado, se verificou que o agente isolado era o *M. gordonae*.

Este estudo, tal como mencionado anteriormente, é baseado em dados registados durante o período de tempo de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2015. Como tal estudou-se a distribuição das várias estirpes identificadas pelos anos do estudo. Verificou-se que nos anos de 2010, 2011 e 2013 houve um predomínio do *MAC*, e nos anos 2012, 2014 e 2015 a estirpe mais isolada foi o *M. gordonae*.

Relativamente à prevalência de MNT ao longo dos anos do estudo, não se verificou uma distribuição linear, uma vez que se obtiveram diversas variações ao longo dos anos - 2010 (0,06%), 2011 (0,55%), 2012 (1,38%), 2013 (0,38%), 2014 (1,31%) e 2015 (0,78%).

Conclusão

O aumento crescente do número de casos de infeção por MNT faz com que estudos nesta área se desenvolvam de forma a poder identificar-se a causa deste número, bem como a estirpe mais frequentemente isolada, o seu valor clínico e consequentemente a sua forma de tratamento. Pode permitir ainda que se desenvolvam medidas de controlo da infeção.

Neste estudo em concreto verificou-se que as espécies de MNT maioritariamente isoladas foram o MAC e o *M. gordonae*. Importa referir que o facto de se ter isolado estas estirpes não implica que se tenha desenvolvido patologia nos indivíduos em questão.

Deve ainda realçar-se o facto da percentagem de isolamentos de *M. gordonae* ter sido elevada. Sendo este um agente típico de colonização, podendo ser encontrado, por exemplo, na água da torneira usada para a lavagem de instrumentos médicos ou no corante adicionado ao anestésico tópico utilizado em broncoscopia, torna-se relevante que haja uma vigilância eficaz e contínua, de forma a minimizar este número. Relativamente à prevalência destas micobactérias no CHP pode concluir-se que a sua distribuição pelos vários anos do estudo não foi linear, e por isso não se pode estabelecer nenhuma relação a esse nível. Com o desenvolvimento de metodologias para identificação e suscetibilidade das MNT, o conhecimento das causas do surgimento de MNT, deve favorecer uma correta coordenação entre laboratório e clínica para valorização destes agentes de modo a minimizar o seu impacto na saúde pública. Futuramente seria interessante continuar, ou desenvolver novos estudos de forma a obter-se mais dados que permitissem conseguir observar a variabilidade, ou não, da prevalência destes agentes na população abrangida pelo CHP.

Referências Bibliográficas

1. Rodrigues IJ dos S da S. Validação de um algoritmo para identificação de Mycobacterium spp. no diagnóstico laboratorial. *Universidade de Lisboa Faculdade de Medicina de Lisboa*.
2. Araujo D, Maria O, Baptista F. Micobactérias. *Opromolla* 2008; 7–11.
3. Diana S, Sousa F De. *Estudo do papel da imunidade inata nas infeções por micobactérias Estudo do papel da imunidade inata nas infeções por micobactérias*. Universidade de Lisboa, 2014.
4. Valdés F, Cid A. Micobactérias atípicas. *Actas Dermosifiliogr* 2004; 95: 331–57.
5. Rodrigues S. *Validação de um algoritmo para identificação de Mycobacterium spp. no diagnóstico laboratorial*. Universidade de Lisboa- Faculdade de Medicina de Lisboa, 2012.
6. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev sci tech Off int Epiz* 2001; 20: 21–54.
7. Gnatta JR, Fumiko L, Kurebayashi S, et al. Artigo de Revisão Micobactérias atípicas associadas à acupuntura: revisão integrativa. *Enfermagem*; 21www.eerp.usp.br/rlae (2013, accessed 8 July 2016).
8. Dabó H, Santos V, Marinho A, et al. Nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens: clinical significance at a tertiary care hospital in the north of Portugal. 2015; 7: 292–294.
9. Bombarda S, Chimara É, Seiscento M, et al. Recomendações para o diagnóstico e tratamento das micobacterioses não tuberculosas no estado de são paulo. 2011; 1–15.
10. Marinho A, Fernandes G, Carvalho T, et al. Micobactérias atípicas em doentes sem síndrome de imunodeficiência adquirida. *Rev Port Pneumol* 2011; XIV: 323–337.
11. Cerca PAR. *Identificação de micobactérias não tuberculosas através de métodos moleculares não comerciais*. Universidade Nova de Lisboa [http://run.unl.pt/bitstream/10362/10220/1/Tese Pedro Cerca.pdf](http://run.unl.pt/bitstream/10362/10220/1/Tese%20Pedro%20Cerca.pdf) (2010, accessed 9 March 2016).
12. Antunes A, Viveiros F, Carvalho A, et al. Micobacterioses Não-Tuberculosas - Das Manifestações Clínicas ao Tratamento. *Arq Med* 2012; 26: 25–30.
13. Wildner LM. *Isolamento e Identificação de Micobactérias Não-Tuberculosas em Laboratório e Hospital de Referência do Estado de Santa Catarina*. Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
14. Junior AF. Género Mycobacterium. *Universidade Estadual Paulista* http://www.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/MicrobiologiaeImunologia/aula_mycobacterium.pdf (accessed 9 March 2016).
15. Pereira MF, Castro RS e, Vasconcelos O, et al. Infeções por Micobactérias atípicas. *Acta Med Port* 1999; 12: 371–379.
16. Marinho A, Fernandes G, Carvalho T, et al. Micobactérias atípicas em doentes sem Síndrome de imunodeficiência adquirida. *Rev Port Pneumol* 2011; 14: 323–337.
17. Luna JAC. Micobactérias atípicas. *BSCP Can Ped* 2001; 25: 237–247.
18. Silva AS. *Fatores e espécies de Micobactérias não-tuberculosas associadas aos casos de Micobacteriose pulmonar e extrapulmonar no estado de Pernambuco*. Fundação Oswaldo Cruz <http://www.cpqam.fiocruz.br/bibp->

- df/2014lima-as.pdf (2014, accessed 9 March 2016).
19. Ueki S, Martins M, Telles M, *et al.* Micobactérias não tuberculosas: Diversidade das espécies no estado de São Paulo. *J Bras Patol Med Lab* 2005; 41: 1–8.
 20. Mazumder SA, Hicks A, Norwood J. Mycobacterium gordonae pulmonary infection in an immunocompetent adult. *N Am J Med Sci* 2010; 2: 205–7.
 21. Thomas Glück M, . Pulmonary TB – Or Nontuberculous Mycobacterial Infection? *NEJM J Watch* 2009; 2009: 739–744.
 22. Chi C-Y, Lin C-H, Ho M-W, *et al.* Clinical manifestations, course, and outcome of patients with neutralizing anti-interferon- γ autoantibodies and disseminated nontuberculous mycobacterial infections. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95: e3927.
 23. Molteni C, Gazzola L, Cesari M, *et al.* Mycobacterium lentiflavum Infection in Immunocompetent Patient. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 119–122.
 24. Janak Koirala, MD, MPH, FACP F. Mycobacterium avium- intracellulare. *Medscape*<http://emedicine.medscape.com/article/222664-overview> (2015).
 25. Araújo T. Bronquiectasias. *Fundação Portuguesa do Pulmão* <http://www.fundacaoportuguesadopulmao.org/bronquiectasias.html> (2015).
 26. Almeida J. DPOC. *Fundação Portuguesa do Pulmão* <http://www.fundacaoportuguesadopulmao.org/dpoc.html> (2015).
 27. Varella D. Tuberculose. *Site Drauzio*.
 28. Antonio de Abreu Silva F, Scatolin I, da Fonseca Andrade Procianoy E, *et al.* Fibrose Cística- Manifestações Pulmonares. *Portaria SAS/MS nº 224*.
 29. Klaus-Dieter Lessnau, MD F. Mycobacterium gordonae. *MedScape*.
 30. Campos-Herrero MI, Chamizo FJ, Caminero JA, *et al.* Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis patients on the Island of Gran Canaria. A population study. *J infect Chemother* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub-med/27262751> (2016).
 31. Shiau M-Y, Lee M-S, Huang T-L, *et al.* Mycobacterial Prevalence and Antibiotic Resistance Frequency Trends in Taiwan of Mycobacterial Clinical Isolates From 2002 to 2014. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95: e2942.

Estudo da alteração das características da voz feminina durante o período pré-menstrual

Bárbara Santos

Faculdade de ciências e tecnologias da Universidade Nova de Lisboa – bfc.santos@campus.fct.unl.pt

Sandra Hespanhol

Hospital Beatriz Ângelo

Alberto Santos

Hospital Beatriz Ângelo

André Pinto

Faculdade de ciências e tecnologias da Universidade Nova de Lisboa

Carlos Macor

Hospital Beatriz Ângelo

Resumo

Com este estudo pretendemos detetar se existem variações relacionadas com o período pré-menstrual na voz falada. A população do estudo é constituída por 12 voluntárias, com idades entre os 18 e os 40 anos, não fumadoras, sem patologia vocal ou hormonal e que não tomam contraceptivos orais. Constituíram-se dois grupos: grupo A - Voz de mulheres gravada entre o segundo dia antes do início do período menstrual e o segundo dia após o início da menstruação; grupo B - Voz das mesmas mulheres gravada fora deste período. A onda sonora foi gravada por um sistema de análise de voz da Xion® em ambiente de silêncio. Foi analisada a emissão sustentada de uma vogal “a”, durante 5 segundos, com o microfone a 15 centímetros de distância da boca. Analisámos o *Jitter*, o *Shimmer* e as alterações de frequência da onda sonora. Os resultados sugerem alterações destas grandezas entre o período pré-menstrual e o período fora do pré-menstrual. Concluiu-se que, durante o período pré-menstrual, a voz falada das mulheres sofre alterações semelhantes as sentidas na voz cantada.

Palavras-chave: Voz, disfonia, pré-menstrual

Introdução

A voz é um instrumento essencial à comunicação do ser humano. Uma boa voz é aquela que é compreendida pelos ouvintes e emitida sem desconforto pelo emissor (1).

A voz é produzida pela vibração da mucosa da corda vocal, a essa deformação cíclica e controlada, provocada pela passagem do ar expirado, chama-se onda vocal (2). A mucosa das cordas vocais contém recetores específicos de hormonas sexuais femininas, que afetam as cordas vocais a nível histológico e a laringe a nível funcional (3).

Os efeitos provocados pelas hormonas sexuais femininas na laringe, durante o período pré-menstrual, são, em termos histológicos, idênticos aos registados no endométrio, durante estes mesmo período. A diminuição dos níveis de progesterona provoca um edema nas cordas vocais, que aumenta a viscosidade das mesmas e os níveis de acidez das células das glândulas da laringe. O estrogénio, por outro lado, aumenta a secreção das glândulas da laringe e provoca alterações do muco (3).

Estudos publicados que analisaram apenas a voz cantada, conferem justificação científica ao facto de muitas cantoras de ópera serem dispensadas de cantar durante o período pré-menstrual, por sentirem algumas limitações vocais das quais se destacam a incapacidade de atingir registos vocais mais altos (3). Estes estudos mediram a frequência da voz (F_0), a amplitude (A), o nível de decibéis (dB), o *Shimmer* e o *Jitter*. O *Jitter* corresponde a uma medida feita de ciclo a ciclo que determina variações involuntárias da frequência da voz, que se altera principalmente com a falta de controlo das cordas vocais. O *Shimmer* é a medida da irregularidade percentual na amplitude da onda sonora (4).

Os resultados publicados, para a voz cantada, demonstram um aumento da frequência da onda vocal bem como dos valores do *Shimmer* e aumentos menos significativos no *Jitter*. Foi também detetada uma maior instabilidade vocal que surgiria, geralmente, dois a três dias antes do início da menstruação e manter-se-ia por três dias (5). No entanto, em muitas mulheres, estas alterações vocais não são perceptíveis ao ouvido humano ³.

Objetivos

Com este estudo pretendemos detetar se existem variações relacionadas com o ciclo menstrual na voz falada.

Material e métodos

A população do estudo é constituída por 12 indivíduos do sexo feminino com idades entre os 18 e os 40 anos, não fumadoras, sem patologia vocal ou hormonal e que não tomam contraceptivos orais.

Constituíram-se dois grupos:

Grupo A - Voz de mulheres gravada entre o segundo dia antes do início do período menstrual e o segundo dia após o início da menstruação.

Grupo B - Voz das mesmas mulheres gravada fora deste período.

A onda sonora foi gravada por um sistema de análise de voz da Xion® em ambiente de silêncio. Foi analisada a emissão sustentada de uma vogal “a”, durante 5 segundos, com o microfone a 15 centímetros de distância da boca. Analisou-se o *Jitter* e o *Shimmer* e as alterações de frequência e amplitude da onda sonora com o intuito de determinar diferenças das características vocais na voz falada durante período menstrual.

Resultados

Como está descrito na tabela 1, na população deste estudo, durante o período pré-menstrual, em média, o *Shimmer* aumentou 0,49%, o *Jitter* teve um aumento insignificante de 0,04% e a frequência diminuiu 24,5Hz.

Tabela 1 – Variação do *shimmer*, *Jitter* e frequência durante o período pré-menstrual

	<i>Jitter</i>	<i>Shimmer</i>	frequência
Variação média entre o período pré-menstrual e o período não menstrual	+0,04%	+0,49%	-24,5HZ

Discussão

Tanto o aumento do *Jitter* como o do *Shimmer* provam que existe um aumento do descontrolo vocal durante o período pré-menstrual. No entanto, o aumento significativo do *Shimmer* demonstra que as participantes sofreram alterações involuntárias acentuadas na amplitude vocal o que leva a variações não controladas da intensidade da onda vocal e, portanto, variações de decibéis que, em alguns casos, podem ser notadas. A diminuição da frequência permite constatar que a voz fica mais grave.

Assim durante o período pré-menstrual na voz falada, tal como na voz cantada (5), as alterações da laringe, provocadas pelas mudanças hormonais, originaram uma voz mais grave, com um maior descontrolo associado ao aumento do *Jitter* e do *Shimmer*.

Conclusão

Ressalvando o facto de a população deste estudo ser reduzida conclui-se que durante o período pré-menstrual, a voz falada das mulheres sofre alterações específicas e típicas que se podem considerar semelhantes às sentidas na voz cantada.

Bibliografia

1. Souza, Lourdes BR, Monteiro, Daniely F, Araujo, Thaisa RS. “Análise acústica da voz falada nos períodos pré e pós-menstruais: estudo comparativo “. Revista de ciências médicas e biológicas. 2008; Vol 7(2): 115-122.
2. Mcfarland DH. “Anatomia em ortofonia”, editora Lusodidacta (2006).
3. Çelik O, Atespare A, Celik A, Aksungar FB. “Voice and speech changes in various phases of menstrual cycle”. Journal of Voice. 2013; Vol 27(5): 622-6.
4. Teixeira JP, Ferreira D, Carneiro SM.(2011). “Análise acústica vocal-Determinação do Jitter e shimmer para diagnóstico de patologias da fala”. In 6º Congresso Luso-Moçambicano de Engenharia. Maputo, Moçambique.
5. Figueiredo LC, Gonçalves MIR, Pontes A, Pontes P.“Estudo do comportamento vocal no ciclo menstrual: avaliação perceptivo-auditiva, acústica e auto-perceptiva” Revista Brasileira de Otorrinolaringologia. 2004; 70(3): p.331-9.

Dietary compounds that modify Bilirubin levels

Rosa Pereira^a,

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

Sandrine Monteiro^a,

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

Carina Rodrigues^a,

Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico de Bragança, Avenida D. Afonso V - 5300-121 Bragança, Portugal –
Email: carina@ipb.pt

Josiana Vaz^{a,b}

a) Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico de Bragança, Avenida D. Afonso V - 5300-121 Bragança, Portugal.
Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253
Bragança, Portugal – josiana@ipb.pt

Isabel C.F.R. Ferreira^b

b) Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado
1172, 5301-855 Bragança, Portugal.

Abstract

Bilirubin (BL) is a bile pigment that arises from the catabolism of hemeproteins and it is an important biochemical marker for diagnosis and monitoring of hepatic and hematologic diseases. The high concentration of this metabolite in plasma may be associated with disturbances in production, metabolism and/or excretion. Several *in vivo* and *in vitro* studies established the antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumoral properties of bilirubin. Clinical and prospective studies show that slightly elevated serum bilirubin levels are positively correlated with a lower prevalence of oxidative stress-mediated diseases. In this review, detailed information on dietary compounds related to changes in serum bilirubin levels are provided. Most of the reviewed articles described compounds that inhibit or induce the most important enzymes in BL metabolism. Knowing how to modulate bilirubin levels by these compounds would be useful as a therapeutic approach, either to lowering serum bilirubin levels, in cases of hyperbilirubinemia, or to increase bilirubin concentration in order to protect against oxidative stress. Several studies refer four botanical groups as associated to changes in bilirubin concentrations: Cruciferae (e.g., broccoli), Rutaceae (citrus), Liliaceae (e.g., onions), and Leguminosae (legumes).

Key words: bilirubin levels, hyperbilirubinemia, oxidative stress prevention, dietary compounds.

Introduction

Bilirubin (BL) is a yellow-orange pigment resulting from the catabolism of hemeproteins(1). This tetrapyrrolic metabolite belongs to one of the most conserved superfamily of molecules in living organisms. BL has been subject of study for more than three centuries by chemists, biochemists, biologists and researchers from many fields. In clinical diagnosis, BL is a marker of liver function and used to monitoring hematological diseases(2). In the general population, there are several factors known to influence serum bilirubin levels (SBL), including genetic (3–5) and non-genetic variables (6).

The enzyme that catalyzes BL conjugation is the hepatic uridine diphosphate glucuronyl transferase 1A1 (UGT1A1). Unconjugated BL (UCB) is a lipid soluble molecule but after conjugation (with one or two molecules of glucuronic acid) becomes water soluble (conjugated bilirubin: CB), allowing its excretion via the bile canaliculi. The most prevalent metabolic disorder in the Caucasian population is Gilbert's Syndrome (GS). It's a benign condition, characterized by moderate hyperbilirubinemia in the absence of hemolysis or liver dysfunction(3). The common variant associated with this syndrome is the TA duplication at position c.-41_-40dupTA (variant UGT1A1*28 or A(TA)7TAA allele) located in the promoter region of the UGT1A1 gene(3). The presence of hyperbilirubinemia, associated with GS, can lead to the worsening of clinical symptoms of individuals with chronic hemolytic diseases (7). Moreover, patients with GS are more sensitive to the adverse effects of antineoplastic drugs and others suffering hepatic glucuronidation, whereby the diagnosis gains importance in terms of treatment of many disorders(8).

At high concentrations, as described in children with Crigler-Najjar syndrome type I (SCN-I) or type II (SCN-II), BL can be extremely toxic. For many years, the bile pigment bilirubin was considered to be a cytotoxic lipid-soluble waste product formed during heme catabolism. Since the early nineties, several biochemical and clinical studies suggests that bilirubin acts as a potent physiologic antioxidant that may provide important protection against stress related disorders (9–11).

Most of the work undertaken to understand the potential protective effect of BL focuses on BL protection mechanisms in atherosclerosis (12). Atherosclerosis is an inflammatory process in which lipid deposition on the arterial wall results from high levels of circulating cholesterol, a stage in the early injury. BL, as an antioxidant, reduces the formation of oxidized low density lipoprotein (LDL), also an important step to initiate this process (13,14), inhibits chemotaxis of monocytes and attenuates the expression of adhesion molecules on endothelial cells (15).

The properties of BL as an antioxidant were confirmed in the animal model, the Gunn rat, which has an autosomal recessive deficiency of the enzyme UGT1A1. Homozygous rats present hyperbilirubinemia and heterozygous have normal levels of BL (16). The use of this animal model showed that serum bilirubin exerted a protective effect against oxidative damage during the neonatal period when they were exposed to hypoxia and neonatal jaundice (17).

Another protective effect of BL is related to its anti-carcinogenic activity (18), as verified in caco cells and HepG2 cells, where the addition of tetrapyrrolic compounds, such as protoporphyrin, urobilin or estercobilin has induced DNA damage and apoptosis of tumor cells (18). These observations have encouraged researchers to conduct numerous epidemiological and experimental studies to clarify the mechanisms involved in its potential protective effect.

Certain dietary compounds may increase or decrease BL levels. It is well known that drugs and other substances that can compete with BL for glucuronidation also contribute to the raising of SBL(19). Some herbal extracts can even exert inhibitory effects of UGT1A1 activity and thereby increase BL levels (19). On the other hand, there are dietary components that increase enzymatic activity of UGT1A1 , such as citrus fruit(20) and some constituents of Cruciferous vegetables (eg. cabbage and broccoli) (21) by increasing the expression of UGT1A1 gene. In animal models it was demonstrated that soy protein and soy isoflavones enhance hepatic UGT activity (22)and the allyl sulfides onion and garlic also had the same effect on different enzymes of the UGT family (20). These interactions must be recognized as a possibility to modulate bilirubin levels in different situations. On one hand the management of the most important clinical entity, the hyperbilirubinemia by diminishing (decreasing) SBL and in contrary (on the other hand – para ser coerente), raising SBL to prevent stress related diseases.

Revision

Brief description of bilirubin metabolism

In human plasma there are 4 main forms of circulating BL: unconjugated bilirubin (UCB, also known as indirect bilirubin – IB); conjugated bilirubin (CB, or direct bilirubin); bilirubin covalently bound to albumin (Alb); free BL that is not bound to albumin (23). The free BL presents a very low nanomolar concentration increase when BL exceeds the molar concentration of Alb, saturating his binding site (24). The binding of BL to ALB increases with postnatal age but is reduced in the presence of certain drugs (25). The free BL correlates better with BL toxicity than any other fraction.

The main source of BL is the heme group of hemoglobin from the destruction of senescent erythrocytes, which contributes around 80-85% of total production(1). The remaining 15 to 20% of BL production results from the turnover of other liver hemeproteins such as myoglobin, catalase and cytochrome (1). A small proportion (1-5%) results from the premature destruction of premature erythrocytes in bone marrow or spleen. In normal adult, approximately 250-300 mg of BL is produced per day, equivalent at 3.8 mg/kg (26).

Under physiological conditions, the majority of normal erythrocytes are removed from the circulation after 120 days of life and they enter into the reticuloendothelial system. The heme catabolism, resulting in BL production, occurs within macrophages of the spleen, bone marrow and in Kupffer cells. After the heme breakdown BL is released into the plasma (1). In this mechanism, the ring of ferroprotoporfirina IX heme group, the prosthetic group of proteins such as hemoglobin, myoglobin and cytochrome P-450, suffers the catalytic action of heme oxygenase (HO-1). This enzyme consumes three molecules of oxygen and requires a reducing agent, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). The enzyme HO-1 acts at the central bridge methionine, forming biliverdin (BLV) (27) and is located in the plasma membrane of the endoplasmic reticulum, nucleus and mitochondria (27). The activity of this enzyme is rate limiting step in heme catabolism and BL production(28). Its synthesis is induced by stimuli associated with oxidative stress, including free oxygen and bacterial lipopolysaccharide radicals (29) by increasing the intracellular concentration

of hepatic heme induced by various drugs, natural compounds, cytokines and growth factors (29). From the oxidation of heme also results iron (Fe²⁺), carbon monoxide (CO) and BLV. The BLV is, in turn reduced to BL in a reaction that is catalyzed by biliverdin reductase (BVR), dependent on NADPH (30). At this stage, BL is called UCB and circulates in the blood bound to albumin (Alb). Alb greatly enhances their solubility due to two binding sites for this molecule and also prevents its excretion into urine. In healthy individuals, about 99.9% of BL circulates in complex with albumin as CB (27).

The liver plays a central role in the metabolism of BL. It is responsible for their capture, storage, conjugation and excretion (31). As already mentioned, the BNC circulates in plasma in a complex bound to Alb (BL- Alb) entering the hepatocyte by its sinusoidal surface (figure 1). The complex passes through the thin and discontinuous cells, with pores, that contour the endothelial sinusoidal and reach the space of Disse, which has direct contact with the sinusoidal basolateral surface of liver cells (32).

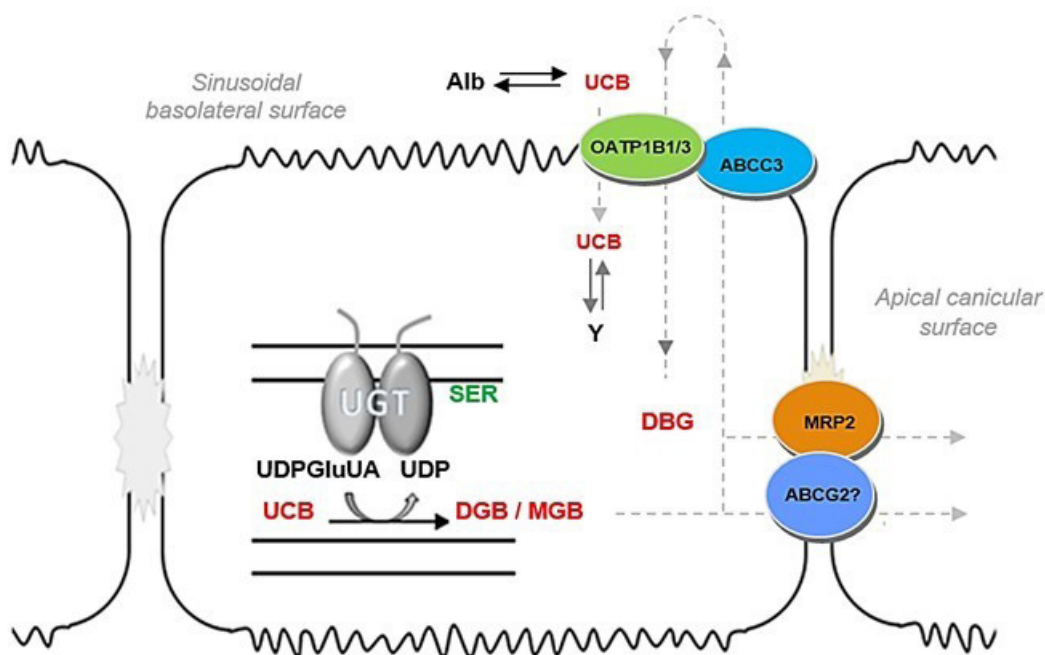


Figure 1 – Bilirubin hepatic uptake, conjugation and glucuronid transporters.

SER: smooth endoplasmic reticulum; UCB: unconjugated bilirubin; Alb: albumin; MGB e DGB: mono and diglucuronid; Y: ligandin; UGT1A1: uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT); UDPGlcUA: glucuronic acid residue; OATP1B1/3: organic anion transporter, 1B1 and 1B3; ABCC3: ATP-Binding Cassette transporter, (Sub-Family C, CFTR/MRP, Member 3); MRP2: Multidrug Resistance-associated Protein 2; ABCC2: ATP-Binding Cassette transporter (sub-family G member 2). The image also shows the location of UGT1A1 in the membrane of smooth endoplasmic reticulum membrane (SER); transport of unconjugated bilirubin (UCB) into hepatocyte at the sinusoidal surface by the action of the organic anion basolateral transporters OATP1B1/3 (organic anion transporter, 1B1 and 1B3); ligandin assembles and transport UCB to the SER; conjugation of UCB by UGT1A1 results in bilirubin glucuronides (MGB, DGB); glucuronides are water soluble and are transported to the exterior of the hepatocyte, at the apical canaliculi surface, by the MRP2 (Multidrug Resistance-Associated Protein 2) and ABCC2 (ATP-Binding Cassette transporter - sub-family G member 2), and possibly by the ligandin (initially named Y protein) a glutathione-S-transferases (32), which despite being in much smaller quantity, can pass through the protein ABCC3 a ATP-Binding Cassette transporter, (Sub-Family C, CFTR/MRP, Member 3) and be again captured by OATP transporters.

After hepatic uptake and metabolism, BL may remain in the liver cells (storage) connected to cytoplasmic proteins. It can also move to the smooth endoplasmic reticulum of the hepatocyte and undergo conjugation with one or two residues of glucuronic acid (UDPGlcUA) by the catalytic action of UGT1A1 forming monoglucuronide (MGB) or diglucuronide (DGB), named as conjugated bilirubin (CB). In the gut this CB undergoes oxidation by the action of intestinal enzymes and bacterial flora and urobilinogen is formed as other pigments. The Urobilinogen may again be captured to the liver (enterohepatic circulation) and may be conjugated (33).

The SBL reflect the hemoglobin catabolism as a result of destruction of erythrocytes or the ability of hepatocytes

to process bilirubin (absorption, storage and conjugation) or the functioning of the biliary system that transfers the bile to the duodenum.

Disease Risk and bilirubin protection

Some studies point out that UCB may prevent cardiovascular disease (CVD) and other chronic diseases. Clinical evidence indicates that hyperbilirubinaemic individuals with GS, with mild hyperbilirubinemia, are at reduced risk of developing cardiovascular and chronic kidney disease. There are currently several studies that have established an association between low BL and the presence and severity of various cardiovascular diseases (34,35) and the respective causes or co-morbidities such as, type 2 diabetes (36), metabolic syndrome, hypertension (37), chronic kidney disease (38) and albuminuria (39). It was observed the same association, as described above, with other disease conditions which physiopathology is related to oxidative stress, such as rheumatoid arthritis(40), multiple sclerosis (41), cancer (42,43) and overall mortality (42). Similarly, the analysis of the association between SBL and risk factors for these chronic diseases, such as lipid profile (35), anthropometric index (44) and C-reactive protein (45) was also performed in several studies.

Acquired factors that modulate Serum bilirubin levels

It has been shown that there is a significant difference in plasma levels of BL (SPB) between men and women and between different age groups (46). The differences between gender have been attributed to hormonal differences (46), in particular, because testosterone decreases the activity of UGT1A1 and estrogens and/or progestogens increase the activity of the same (47). The effect of testosterone may however, explain that GS, a hereditary hyperbilirubinemia, is more often detected in males during puberty than in females, and also explain the difference in accordance with age (47). It is believed that gender differences may be due to the fact that men have higher cell mass or greater turnover of the hemoglobin (48).

BL levels reach a maximum between 19 and 24 years old individuals, decreasing continuously throughout life (48,49). But it is in the neonatal period where significant variations of BL levels are observed. Virtually all infants have higher levels of BL in the first days of life (50). There is a significant difference in ethnicity between NPB. One of the first studies conducted to evaluate these differences was conducted on a sample of 1,538 Americans. The study revealed that African-Americans have lower levels of BL than Latinos, Asians and Caucasians of European origin (51) in addition to these racial differences the differences are more pronounced among women than among men (51). Genetic factors greatly contribute for inter-racial differences, since there are differences in gene frequencies.

It is described that smokers have lower SBL than non-smokers (52,53). Recently, it was also revealed that the cessation of smoking is followed by an increase in the concentration fractions of all BL (53). Studies revealed that BL is inversely associated with the duration of tobacco exposure and the amount of cigarettes smoked per day (54). The relationship between alcohol consumption and SBL is controversial, since there are studies that indicate that BL increases with alcohol consumption (55,56) and others describe no clear association with this factor (57).

Dietary compounds and bilirubin levels

An extensive variety of fruits and vegetables offer a range of nutrients and different bioactive compounds including phytochemicals, vitamins, minerals and fibers. Many dietary compounds, present in fruits, vegetables and spices have been isolated and evaluated for their therapeutic potential. Evidence suggests that the health benefits of fruits and vegetables are attributed to the interactions of the phytochemicals present in whole foods by modulating several metabolic pathways. The impression that these compounds have health promoting effects emerged because their consumption was related to a reduced incidence of cancer, cardiovascular, neurological, respiratory, and age related diseases (58–61). However, the molecular mechanism by which food-derived compounds exert their beneficial effects remains poorly understood due to the complexity of related pathways. The clinical importance of controlling elevated SBL(hyperbilirubinemia) and in other hand the possible beneficial effects of BL mildly elevated levels on chronic diseases (potential protective effect of BL) suggests the search for strategies to modulate SBL. This strategies may include administration of drugs or dietary compounds which can increase or decrease the efficiency of hepatic bilirubin conjugation by UGT1A1 enzyme, administration of HO-1 or BLVR inducers (to produce more BL) and rise tetrapyrroles by supplementation with BL or BLV or similar compounds from other sources. Some studies cited in this article did not aim directly to perceive the interference of certain dietary compounds in the SBL. However, their results were analyzed because in some way the observations are associated with changes in BL production or excretion. Firstly we will summarize inducers and inhibitors of UGT genes, the superfamily where the gene that encodes UGT1A1 belongs to.

The UGT superfamily is divided into UGT1 and UGT2 families; both are a phase II biometabolizing enzymes.

The UGT1A subfamily, is in charge for the glucuronidation of endogenous compounds such as bilirubin (62), as well as phenols, anthraquinones, and flavones(62), sex steroids, 17 β -estradiol (eg. estrogen) and estriol (63) and cooked-food carcinogens(64). From the nine proteins that belongs to this subfamily the UGT1A1 is responsible for BL conjugation(8). In the UGT1 family the presence of genetic variants can alter considerably their clearance efficacy. Variants of the UGT1A1 gene that decrease UGT1A1 enzyme activity can lead to jaundice as seen in Gilbert's syndrome or in Crigler-Najjar syndrome. As already mentioned, the most important genetic variant responsible for the SBL variation observed in Caucasian population is the repeat polymorphism in the TATA box region of the UGT1A1 promoter. This allele variant consists of seven thymine adenine (TA) repeats, in the A(TA)_nTAA motif (allele 7), while the common allele is characterized by the presence of six TA repeats (allele 6). Homozygous individuals carrying the 7/7 genotype had higher levels of unconjugated bilirubin caused by a reduction of 30% in UGT1A1 transcription (65).

Recent published works try to analyze the impact of several dietary compounds in UGT1A1 activity using serum bilirubin as an endogenous marker of enzyme activity. They also take in account the genotype for the TA promoter polymorphism of the participants in order to analyze the genetic-environmental interaction (20,21,66). Four of these studies, performed by the same group of researchers, investigated whether food from different botanical groups were associated with changes in UGT1A1 activity. Most of the tested food were cruciferous, soy and citrus, all sources of UGT inducers (67). Table 1 shows the resume of these works and others that described changes in SBL.

Table 1 – Sources or dietary compounds that potentially modulate serum bilirubin levels.

Dietary compounds or dietary sources intake	Type of study	Effect on bilirubin levels Summary	Reference
Record of food intake from four botanical groups: Cruciferae, Rutaceae, Liliaceae and Leguminosae.	Observational	Decreased. Only homozygotes 7/7 showed decreased bilirubin concentrations after consuming cruciferous vegetables but not with the intake of other investigated botanical groups.	(21)
Cruciferous, citrus and soy (doses adjusted for body weight)	Clinical	Decreased. The intake of cruciferous vegetables, soy foods and citrus fruit seems to be associated to a decrease on SBL but only in women that are homozygous 7/7.	(66)
Record of food intake Citrus fruit, cruciferous and soy	Observational	Decreased. Women homozygous 7/7 that consume citrus fruit may exhibit a higher activity of this gene than those who do not include it on their diet.	(20)
Cruciferous, citrus and soy (Different quantities of Cruciferous supplementation)	Clinical	Decreased within all of three group of vegetable and it was observed in the three genotypes. Results suggest a dose-response.	(68)
Soy	In vivo	Decreased	
Resveratrol (Resveratrol doses)	Clinical	Decreased. UGT1A1 activities were minimally affected by the intervention. Is more pronounced in individuals with low baseline enzyme activity.	(69)
Dandelion	In vivo	Decreased	(70)
Rooibos	In vivo	Decreased	(71)
Honeybush tea	In vivo	Decreased	(71)
Rosemary	In vivo	Decreased	(71)
Ellagic acid	In vivo	Decreased	(71)
Ferulic acid	In vivo	Decreased	(71)
Curcumin	In vivo	Decreased	(71)
Astaxanthin	In vivo	Decreased	(71)
Green tea	In vitro	Increased	(71)
Rutin	In vitro	Increased	(71)
Naringenin	In vitro	Increased	(71)
Allspice	In vitro	Increased	(71)
Peppermint oil	In vitro	Increased	(71)
Cacao	In vitro	Increased	(71)
Quercetin (polyphenolic)	In vivo / In vitro	Increased	(71)
Carnosol	In vitro	Increased	(71)

Discussion

Peterson and colleagues (21), performed an observational study (using food records) to analyze the association between the four botanical groups: Cruciferae, Rutaceae, Liliaceae, and Leguminosae (all sources of UGT inducers) and bilirubin concentrations. Results showed an interaction between UGT1A1 genotype and Cruciferous intake. Individuals with the 7/7 genotype with increased intake of cruciferous vegetables had lower SBL. One explanation given by the authors for this results is that individuals with 7/7 genotype had elevated BL concentration and the ability to detect differences in the serum of these participants is greater. Intake of food from the other three botanical groups showed no association with SBL.

Another study, a randomized, controlled, fruit and vegetable feeding trial (66) with doses adjusted for body weight, showed that the intake of cruciferous vegetables, soy foods and citrus was associated with a decrease in SBL, but it was only observed in women that were homozygous 7/7.

The third work, based on food record showed that citrus fruit intake elevated the activity of UGT1A1 gene among individuals that included it on their diet. But this was only observed in women homozygous for allele 7 too.

In a controlled feeding study with a mixed diet of cruciferous, soy and citrus (68) researchers tested different dosages relatively to a basal diet. The results showed that SBL decreased in response to all three vegetables-containing diets comparing to the fruit –and vegetable-free basal diet. This results were also more pronounced among individuals with 7/7 genotype, however, it was also possible to observe the same association among other genotypes.

In a study performed to evaluate the ability of soy to induce phase II detoxification enzymes, the researchers concluded that dietary soy enhances the enzyme activity, especially quinone reductase and UGT1A enzymes, which could lead to protection from potentially harmful xenobiotics (69). At the same time UCB will also have to induce this group of enzymes, including dandelion, rooibos tea, honeybush tea, rosemary, ellagic acid (present in berries, pomegranate, grapes, walnuts, and blackcurrants), ferulic acid, curcumin (major active component of the food flavor turmeric and curcumin) , and astaxanthin, to enhance UGT activity and therefore diminishing SBL (table 1). In contrast, there are some dietary compounds like polyphenols epicatechin and chrysin that can inhibit UGTs (72). Among other food components that have the same effect on UGTs enzymes are green tea, quercetin (natural polyphenol flavonoid: 3, 3', 4', 5', 7-pentahydroxyflavone that is abundant in various fruits and vegetables and stimulates antioxidant and anti-inflammatory activities), rutin glycoside between the flavonol quercetin and the disaccharide rutinose), naringenin, allspice, peppermint oil and cacao (73).

As already described above, HO-1 catalysis heme degradation producing CO, which has anti-inflammatory properties; biliverdin that is converted to bilirubin by BVR that also has a powerful antioxidant capability; and free iron bound to the heavy chain ferritin (H-ferritin), another antioxidant molecule. HO-1 has been suggested to be an important therapeutic target in various disease (29,74). The fact that HO -1 represents the rate limiting enzyme of BL production, elevating the expression of HO-1 could lead to more BL production. This enzyme is inducible by numerous agents which promote oxidative stress, and is now known to provide important antioxidant protection, as demonstrated in animal models and epidemiologic studies. One of the most studied phytochemical that induces HO-1 activity is quercetin which, as already described above, is a polyphenolic compound that also increases BL concentration. In a recent study, the authors reported the results offsetting 56 compounds on the up-regulation of protein HO-1 in microglia cells in vitro. The compounds were selected over more than 100 and their HO-1 stimulating capacity with their effect on cell viability was analyzed. They selected 10 positives (including hemin) and 5 negatives to further examine their effect on heme metabolism and modulation of the inflammatory response. They carnosic acid, carnosol, cobalt protoporphyrin IX, dimethyl fumarate and supercurcumin as the compounds causing the greatest HO-1 induction and low cytotoxicity. They also distinguished between those compounds capable of promoting the generation of HO-1-derived products (bilirubin) namely the dietary compounds carnosol, supercurcumin and others that do not, indicating that HO-1 induction may be independent of heme-degradation metabolism.

Curcumin can also induce this cytoprotective enzyme. It is extracted from dry rhizome of *Curcuma longa* Linn (Zingiberaceae). This herb is widely cultivated in tropical regions of Asia. It has been used for centuries in indigenous medicine for the treatment of a variety of inflammatory conditions and other diseases. Several studies in recent years have shown that curcumin is a potent inhibitor of tumor initiation in vivo and (75) and possesses antiproliferative activities against tumor cells (76). Although, the exact mechanisms by which curcumin promotes these effects remains to be elucidated. It has been shown in vivo that this compound enhances the activities of detoxifying enzymes such as UGT but it also induces a distinct antioxidant genes such as HO-1 in mammalian tissues contributing to the variety of pharmacological actions mediated. These facts could seem contradictory but the inducing HO-1 could not result in more bilirubin production, it could be an independent induction of heme degradation pathway. In the process of

scavenging physiological oxidants by electron donation BL is often reconverted to BLV and the enzyme BLVR quickly regenerates BL. This seems to be the reason why BL is an effective antioxidant. However, the exact mechanism underlying this system remains largely undefined (77).

Inducing or inhibiting BLVR would lead to changes on BL regeneration about food components that may alter BLVR. We didn't find any information. An hypothesis suggested by McCarty (78) to raise tissue or serum BL could be oral administration of BL or the more soluble BLV. The same author reviewed several experimental studies that demonstrate the anti-inflammatory properties of BLV when it was administrated in rodents (79). Other authors propose that supplementation with nutraceuticals containing plant tetrapyrroles, such as phycocyanobilins (80), or their improved consumption in the form of natural foods (81) might be used as a novel method of the chemoprevention of obesity, metabolic syndrome, and diabetes.

Conclusion

From all that was exposed in this review about BL metabolism and considering all genetic and acquired factors that can affect his serum concentration, it is obvious that modulating SBL, by means of dietary compounds, would be a challenge. In a hyperbilirubinemiastate, where it is important to decrease serum bilirubin levels, the best approach would include the increasing UGT1A1 expression and this can be achieved with foods from the different botanical families Cruciferae (e.g., broccoli), Rutaceae (citrus) and Liliaceae (e.g., onions).

Regulation of UGTs by phytochemicals has been investigated with a focus on cancer prevention and numerous inhibitors from plant origin (epicatechin gallate, epigallocatechin gallate, octyl gallate, propyl gallate, quercetin, tannic acid, benzoin gum, capsaicin, dihydrocapsaicin, eugenol, galocatechin gallate, geraniol, menthol, menthyl acetate, naringenin, allspice berry oil, N-vanillylnonanamide, clovebud oil, peppermint oil, silibinin, and silymarin).

The results presented in this review demonstrate that that some beneficial effects of curcumin might take place because of the intrinsic ability of this yellow pigment to increase HO-1 and possibly other intracellular protective pathways.

The strategy to rise SBL in order to fight oxidative stress by inhibiting UGT1A1 activity appears to be unreasonable because UGT1A1 also glucuronides estrogens and several dietary carcinogens. The enzymes HO-1 and BLV would also have an important role in the development of therapeutic strategies based on dietary compounds to prevent stress related diseases by elevating SBL; however, for these two enzymes there was considerable less information about their inducers and inhibitors. Additional studies are needed to stablish the compounds that best modulate SBL and the molecular mechanisms involved.

References

1. Fevery J. Bilirubin in clinical practice: a review. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver* [Internet]. 2008;28(5):592–605.
2. Sticova E, Jirsa M. New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. *World Journal of Gastroenterology*. 2013. p. 6398–407.
3. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer a, Oostra B a, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med*. 1995;333(18):1171–5.
4. Rodrigues C, Vieira E, Santos R, de Carvalho J, Santos-Silva A, Costa E, et al. Impact of UGT1A1 gene variants on total bilirubin levels in Gilbert syndrome patients and in healthy subjects. *Blood Cells, Mol Dis*. 2012;48(3):166–72.
5. Canu G, Minucci A, Zuppi C, Capoluongo E. Gilbert and Crigler Najjar syndromes: An update of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene mutation database. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;50(4):273–80.
6. Rodrigues C, Costa E, Vieira E, De Carvalho J, Santos R, Rocha-Pereira P, et al. Bilirubin dependence on UGT1A1 polymorphisms, hemoglobin, fasting time and body mass index. *Am J Med Sci* [Internet]. 2012;343(2):114–8.
7. Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for ??- tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 1994;269(24):16712–9.
8. Strassburg CP, Lankisch TO, Manns MP, Ehmer U. Family 1 uridine-5'??-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT1A): From Gilbert's syndrome to genetic organization and variability. *Arch Toxicol*. 2008;82:415–33.

9. Schwertner H a, Jackson WG, Tolan G. Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease. *Clin Chem.* 1994;40(1):18–23.
10. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* (80-). 1987;235(4792):1043–6.
11. Stevenson DK, Vreman HJ, Wong RJ. Bilirubin Production and the Risk of Bilirubin Neurotoxicity. *Seminars in Perinatology.* 2011. p. 121–6.
12. Kang SJ, Lee C, Kruzliak P. Effects of serum bilirubin on atherosclerotic processes. *Ann Med* [Internet]. 2014;46(May 2014):138–47.
13. Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:16093–8.
14. Stocker R, Perrella MA. Heme oxygenase-1: A novel drug target for atherosclerotic diseases? *Circulation.* 2006;114(20):2178–89.
15. Ollinger R, Bilban M, Erat A, Froio A, McDaid J, Tyagi S, et al. Bilirubin: a natural inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* [Internet]. 2005;112(7):1030–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16087796>
16. Labrune P, Myara A, Trivin F, Odievre M. Gunn rats: a reproducible experimental model to compare the different methods of measurements of bilirubin serum concentration and to evaluate the risk of bilirubin encephalopathy. *Clin Chim Acta.* 1990;192(1):29–33.
17. Luquita MG, Catania V a, Pozzi EJ, Veggi LM, Hoffman T, Pellegrino JM, et al. Molecular basis of perinatal changes in UDP-glucuronosyltransferase activity in maternal rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2001;298(1):49–56.
18. Mölzer C, Pflieger B, Putz E, Roßmann A, Schwarz U, Wallner M, et al. In vitro DNA-damaging effects of intestinal and related tetrapyrroles in human cancer cells. *Exp Cell Res.* 2013;319(4):536–45.
19. Katoh M, Yoshioka Y, Nakagawa N, Yokoi T. Effects of Japanese herbal medicine, Kampo, on human UGT1A1 activity. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2009;24(3):226–34.
20. Saracino MR, Bigler J, Schwarz Y, Chang J-L, Li S, Li L, et al. Citrus fruit intake is associated with lower serum bilirubin concentration among women with the UGT1A1*28 polymorphism. *J Nutr* [Internet]. 2009;139(3):555–60.
21. Peterson S, Bigler J, Horner NK, Potter JD, Lampe JW. Cruciferae interact with the UGT1A1*28 polymorphism to determine serum bilirubin levels in humans. *J Nutr.* 2005;135(December 2004):1051–5.
22. LC AMR. Soy feeding induces phase II enzymes in rat tissues. *Nutr Cancer.* 1997;28(3):270–5.
23. Condezo-Hoyos L, Abderrahim F, Conde MV, Sus??n C, D??az-Gil JJ, Gonz ez MC, et al. Antioxidant activity of liver growth factor, a bilirubin covalently bound to albumin. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(5):656–62.
24. Ahlfors CE. Measurement of plasma unbound unconjugated bilirubin. *Anal Biochem* [Internet]. 2000;279(2):130–5.
25. Roca L, Calligaris S, Wennberg RP, Ahlfors CE, Malik SG, Ostrow JD, et al. Factors affecting the binding of bilirubin to serum albumins: Validation and application of the peroxidase method. *Pediatr Res.* 2006;60(6):724–8.
26. Wong RJ, Stevenson DK, Ahlfors CE, Vreman HJ. Neonatal Jaundice: Bilirubin Physiology and Clinical Chemistry. *Neoreviews* [Internet]. 2007;8(2):e58–67.
27. Hong AL, Huo D, Kim HJ, Niu Q, Fackenthal DL, Cummings S a., et al. UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene polymorphisms and total bilirubin levels in an ethnically diverse cohort of women. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(8):1254–61.
28. V??tek L, Schwertner HA. The Heme Catabolic Pathway and its Protective Effects on Oxidative Stress-Mediated Diseases. *Advances in Clinical Chemistry.* 2007. p. 1–57.
29. Ryter SW, Alam J, Choi AMK. Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol Rev.* 2006;86:583–650.
30. Jansen T, Daiber A. Direct antioxidant properties of bilirubin and biliverdin. Is there a role for biliverdin reductase? *Front Pharmacol.* 2012.
31. Zucker SD, Goessling W. Mechanism of hepatocellular uptake of albumin-bound bilirubin. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2000;1463:197–208.
32. Goessling W, Zucker SD. Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in plasma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2000;279(2):G356–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10915645>
33. Roberts MS, Magnusson BM, Burczynski FJ, Weiss M. Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(10):751–90.
34. Djousse L, Rothman KJ, Cupples LA, Levy D, Ellison RC. Serum albumin and risk of myocardial infarction and all-cause mortality in the Framingham Offspring Study. *Circulation* [Internet]. 2002;106(23):2919–24.
35. Bulmer AC, Verkade HJ, Wagner KH. Bilirubin and beyond: A review of lipid status in Gilbert's syndrome and its relevance to cardiovascular disease protection. *Prog Lipid Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;52(2):193–205.
36. Cheriya P, Gorrepati VS, Peters I, Nookala V, Murphy ME, Srouji N, et al. High Total Bilirubin as a Protective Factor for Diabetes Mellitus: An Analysis of NHANES Data From 1999 - 2006. *J Clin Med Res.* 2010;2(5):201–6.

37. Kwon KM, Kam JH, Kim MY, Chung CH, Kim JK, Linton JA, et al. Inverse association between total bilirubin and metabolic syndrome in rural Korean women. *J Womens Heal* [Internet]. 2011;20(6):963–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21671781>
38. Tanaka M, Fukui M, Tomiyasu K, Akabame S, Nakano K, Hasegawa G, et al. Low serum bilirubin concentration is associated with coronary artery calcification (CAC). *Atherosclerosis* [Internet]. 2009;206:287–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19296952>
39. Targher G, Bosworth C, Kendrick J, Smits G, Lippi G, Chonchol M. Relationship of serum bilirubin concentrations to kidney function and albuminuria in the United States adult population. Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 2001–2006. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2009;47(9):1055–62.
40. Fischman D, Valluri A, Gorrepati VS, Murphy ME, Peters I, Cheriyath P. Bilirubin as a Protective Factor for Rheumatoid Arthritis: An NHANES Study of 2003 - 2006 Data. *J Clin Med Res* [Internet]. 2010;2(6):256–60.
41. Peng F, Deng X, Yu Y, Chen X, Shen L, Zhong X, et al. Serum bilirubin concentrations and multiple sclerosis. *J Clin Neurosci*. 2011;18(10):1355–9.
42. Temme EHM, Zhang J, Schouten EG, Kesteloot H. Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population. *Cancer Causes Control*. 2001;12(10):887–94.
43. Lacko M, Roelofs HMJ, Te Morsche RHM, Voogd AC, Ophuis MBO, Peters WHM, et al. Genetic polymorphism in the conjugating enzyme UGT1A1 and the risk of head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2815–21.
44. Belo L, Nascimento H, Kohlova M, Bronze-da-Rocha E, Fernandes J, Costa E, et al. Body fat percentage is a major determinant of total bilirubin independently of UGT1A1*28 polymorphism in young obese. *PLoS One*. 2014;9(6).
45. Ohnaka K, Kono S, Inoguchi T, Yin G, Morita M, Adachi M, et al. Inverse associations of serum bilirubin with high sensitivity C-reactive protein, glycated hemoglobin, and prevalence of type 2 diabetes in middle-aged and elderly Japanese men and women. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010;88(1):103–10.
46. Rosenthal P, Pincus M, Fink D. Sex- and age-related differences in bilirubin concentrations in serum. *Clin Chem*. 1984;30(8):1380–2.
47. Buyukasik Y, Akman U, BUYUKASIK NS, GOKER H, KILICARSLAN A, SHORBAGI AI, et al. Evidence for Higher Red Blood Cell Mass in Persons With Unconjugated Hyperbilirubinemia and Gilbert's Syndrome. *Am J Med Sci* [Internet]. 2008;335(2):115–9.
48. Winkel P, Statland BE, Bokelund H. Factors contributing to intra-individual variation of serum constituents: 5. Short-term day-to-day and within-hour variation of serum constituents in healthy subjects. *Clin Chem* [Internet]. 1974;20(12):1520–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4430128>
49. Reiser DJ. Neonatal jaundice: Physiologic variation or pathologic process. *Critical Care Nursing Clinics of North America*. 2004. p. 257–69.
50. Carmel R, Wong ET, Weiner JM, Johnson CS. Racial Differences in Serum Total Bilirubin Levels in Health and in Disease (Pernicious Anemia). *JAMA J Am Med Assoc*. 1985;253(23):3416–8.
51. O'Malley SS, Wu R, Mayne ST, Jatlow PI. Smoking cessation is followed by increases in serum bilirubin, an endogenous antioxidant associated with lower risk of lung cancer and cardiovascular disease. *Nicotine Tob Res*. 2014;16(8):1145–9.
52. Schwertner H a. Association of smoking and low serum bilirubin antioxidant concentrations¹The views expressed in this article are those of the author and do not reflect the official policy of the Department of Defense or other Departments of the US Government.¹. *Atherosclerosis*. 1998;136:383–7.
53. Jo J, Kimm H, Yun JE, Lee KJ, Jee SH. Cigarette smoking and serum bilirubin subtypes in healthy Korean men: The Korea Medical Institute Study. *J Prev Med Public Heal*. 2012;45(2):105–12.
54. Frei B, Forte TM, Ames BN, Cross CE. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid. *Biochem J*. 1991;277 (Pt 1):133–8.
55. Horsfall LJ, Rait G, Walters K, Swallow DM, Pereira SP, Nazareth I, et al. Serum bilirubin and risk of respiratory disease and death. *JAMA*. 2011;305(7):691–7.
56. Kimm H, Yun JE, Jo J, Jee SH. Low Serum Bilirubin Level as an Independent Predictor of Stroke Incidence A Prospective Study in Korean Men and Women. *Stroke* [Internet]. 2009;40(11 PG-3422-3427):3422–7. Available from: NS -
57. Breimer L, Mikhailidis D, H. Breimer L, P. Mikhailidis D. Is bilirubin a marker of vascular disease and/or cancer and is it a potential therapeutic target? *Curr Pharm Des* [Internet]. 2011;17(33):3644–55. Available from: <http://link3.kesli.or.kr:3410/cmclib?sid=Entrez%3APubMed&id=pmid%3A22074434>
58. Liu RH. Dietary bioactive compounds and their health implications. *J Food Sci*. 2013;78(SUPPL.1).
59. WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *World Health Organ Tech Rep Ser* [Internet]. 2003;916:i–viii-1-149-backcover.
60. Thorburn AN, Macia L, Mackay CR. Diet, Metabolites, and “Western-Lifestyle” Inflammatory Diseases. *Immunity*. 2014. p. 833–42.
61. Khambete N, Kumar R. Carcinogens and cancer preventors in diet. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis* [Internet]. 2014;4(1):4.

62. Wells PG, Mackenzie PI, Chowdhury JR, Guillemette C, Gregory PA, Ishii Y, et al. Glucuronidation and the UDP-glucuronosyltransferases in health and disease. *Drug Metabolism and Disposition*. 2004. p. 281–90.
63. Senafi SB, Clarke DJ, Burchell B. Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation. *Biochem J*. 1994;303
64. Girard H, Thibaudeau J, Court MH, Fortier LC, Villeneuve L, Caron P, et al. UGT1A1 polymorphisms are important determinants of dietary carcinogen detoxification in the liver. *Hepatology*. 2005;42(2):448–57.
65. Bosma P. <Title/>. *J Hepatol [Internet]*. 2003;39:882.
66. Chang J-L, Bigler J, Schwarz Y, Li SS, Li L, King IB, et al. UGT1A1 polymorphism is associated with serum bilirubin concentrations in a randomized, controlled, fruit and vegetable feeding trial. *J Nutr*. 2007;137(October 2006):890–7.
67. Lampe J, Skor H, Li SkW ha" la", Howald WN, Chen C. Wheat Bran and Soy Protein Feeding Do Not Alter Urinary Excretion of the Isoflavan Equol in Premenopausal Women. *J Nutr* 2001;131(3):740–4.
68. Navarro SL, Peterson S, Chen C, Makar KW, Schwarz Y, King IB, et al. Cruciferous vegetable feeding alters UGT1A1 activity: Diet- and genotype-dependent changes in serum bilirubin in a controlled feeding trial. *Cancer Prev Res*. 2009;2(4):345–52.
69. Marahatta A, Bhandary B, Jeong S-K, Kim H-R, Chae H-J. Soybean greatly reduces valproic acid plasma concentrations: A food-drug interaction study. *Sci Rep* 2014;
70. Chow HHS, Garland LL, Hsu CH, Vining DR, Chew WM, Miller JA, et al. Resveratrol modulates drug- and carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study. *Cancer Prev Res*. 2010;3(9):1168–75.
71. Carl, Jenkinson, Jenkinson, Petroczi A, Naughton D. No TitleEffects of Dietary Components on Testosterone Metabolism via UDP-Glucuronosyltransferase. *Front Endocrinol*. 2013;4(80):4.
72. Mizuma T, Awazu S. Dietary polyphenols (-)-epicatechin and chrysin inhibit intestinal glucuronidation metabolism to increase drug absorption. *J Pharm Sci*. 2004;93(9):2407–10.
73. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*. 2008. p. 325–37.
74. Soares MP, Bach FH. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol Med*. 2009;15(2):50–8.
75. Ramadan G, Al-Kahtani MA, El-Sayed WM. Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of curcuma longa (turmeric) versus Zingiber officinale (ginger) rhizomes in rat adjuvant-induced arthritis. *Inflammation*. 2011;34(4):291–301.
76. Chen X, Pei L, Zhong Z, Guo J, Zhang Q, Wang Y. Anti-tumor potential of ethanol extract of *Curcuma phaeocaulis* Valetton against breast cancer cells. *Phytomedicine*. 2011;18(14):1238–43.
77. Liu D, He Z, Wu L, Fang Y. Effects of Induction/Inhibition of Endogenous Heme Oxygenase-1 on Lipid Metabolism, Endothelial Function, and Atherosclerosis in Rabbits on a High Fat Diet. *J Pharmacol Sci*. 2012;118(1):14–24.
78. McCarty MF. Iatrogenic Gilbert syndrome"- A strategy for reducing vascular and cancer risk by increasing plasma unconjugated bilirubin. *Med Hypotheses*. 2007;69(5):974–94.
79. Nakagami T, Toyomura K, Kinoshita T, Morisawa S. A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: Anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. *BBA - Gen Subj*. 1993;1158(2):189–93.
80. Lee EH, Park J-E, Choi Y-J, Huh K-B, Kim W-Y. A randomized study to establish the effects of spirulina in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutr Res Pract*. 2008;2(4):295–300.
81. Tonstad S, Butler T, Yan R, Fraser GE. Type of vegetarian diet, body weight, and prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(5):791–6.

Caracterização dos fatores de risco cardiovascular numa população envelhecida

Cecília Rodrigues - arc@ess.ipp.pt

Anabela Moreira - adm@ess.ipp.pt

Stéphanie Ferreira - slf@ess.ipp.pt

Teresa Moreira - tlm@ess.ipp.pt

Sandra Mota - smm@ess.ipp.pt

Manuela Amorim - mas@ess.ipp.pt

Escola Superior de Saúde – Politécnico do Porto – Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400 – 4200-072, Porto
CISA – Centro de Investigação em Saúde e Ambiente – Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400– 4200-072, Porto

Palavras-chave: envelhecimento; risco cardiovascular; perfil bioquímico; doenças cardiovasculares; dieta

Resumo

O envelhecimento é um processo fisiológico e psicossocial de regressão resultante da interação de múltiplos fatores. Deste processo surgem alterações, subjacentes à maior incidência de doenças cardiovasculares (DCV). A adoção de estilos de vida saudável, atividade física (AF) e a uma dieta equilibrada, são assim uma prioridade de intervenção para prevenir as DCV. Os objetivos deste estudo foram avaliar a influência da AF e da dieta alimentar nos perfis lipídico e glicémico, avaliação antropométrica, da pressão arterial (PA), e do risco de desenvolver DCV a 10 anos por dois métodos na amostra em estudo. Realizou-se um estudo observacional analítico transversal a uma amostra constituída por 29 indivíduos com idade superior a 50 anos fisicamente ativos pertencentes a uma associação do distrito do Porto. Encontrou-se uma variação significativa da PAD em função da AF entre o grupo de AF baixa e elevada. A nível nutricional verificaram-se diversas variações significativas: entre a PAS e gorduras saturadas; entre colesterol HDL e níveis de riboflavina; entre colesterol total e vitamina B6; entre IMC e iodo; e entre perímetro abdominal e selénio ingerido. Tanto na avaliação do risco global cardiovascular (SCORE) como no cálculo do risco de Framingham se destaca um risco acrescido de desenvolver DCV a 10 anos no sexo masculino. Assim, tal como descrito na literatura, a nossa amostra revelou uma elevada prevalência dos diversos fatores de risco cardiovascular. Futuramente, propõe-se a realização de um estudo de caso-controlo de modo a obter resultados mais consistentes.

Introdução

O envelhecimento é um processo fisiopsicossocial de regressão característico dos seres vivos, que resulta da interação de fatores endógenos e exógenos responsáveis pela resposta biológica adaptativa e expressando-se na perda de capacidade ao longo da vida. O equilíbrio dinâmico entre fatores físicos, genéticos, psíquicos e sociais condiciona os processos do envelhecimento. Um envelhecimento saudável pressupõe o desenvolvimento de uma resposta adaptativa aos desafios relacionados com o decorrer da idade (1,2).

O envelhecimento populacional é um fenómeno universal existindo atualmente cerca de 400 milhões de idosos, dos quais mais de metade pertence aos países desenvolvidos. Estima-se que em 2020 o número de indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos ultrapasse o número de crianças com menos de 5 anos e que entre 2015 e 2020 a proporção de indivíduos com mais de 60 anos passe de 12% para 22% (3). Este aumento deve-se principalmente ao aumento da população idosa e redução da população jovem, que se tem vindo a agravar nos últimos anos (1,3,4). Os resultados dos censos de 2011 indicam que 15% da população residente em Portugal se encontra no grupo etário mais jovem (0-14 anos), enquanto 19% pertence ao grupo dos mais idosos (idade superior a 65 anos), sendo o índice de envelhecimento de 128 (4).

O processo natural de envelhecimento implica alterações ao nível da constituição corporal, sensações, estado nutricional, capacidade física e motora (5), refletidas na maior frequência de observação de patologias crónicas como doenças cardiovasculares (DCV), diabetes mellitus (DM), hipertensão arterial (HTA), entre outras. Parte das alterações

que conduzem às patologias citadas desenvolvem-se muitas vezes por volta dos 50 anos, idade em que se observa, em ambos os sexos, mudanças fisiológicas subjacentes ao surgimento destas patologias (1,2,5-7).

As DCV continuam a ser a principal causa de morte no mundo, com diversos fatores de risco (FR) associados como dislipidemia, HTA, obesidade, entre outros, denominados de FR cardiovascular (FRCV) modificáveis (8,9) que interagem entre si aumentando exponencialmente a possibilidade de ocorrência destas doenças (10-13).

Distúrbios no metabolismo dos lípidos, conhecidos por dislipidemias, têm repercussões nos níveis de lipoproteínas na circulação sanguínea e nos seus diferentes componentes. Essas repercussões traduzem-se no aumento dos níveis de colesterol total (CT), triglicérides (TG) e colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (C-LDL) e diminuição dos níveis de colesterol das lipoproteínas de alta densidade (C-HDL) (14,15). Estudos indicam a importância da redução dos níveis de C-LDL e TG e aumento de C-HDL para reduzir o risco CV (16).

Com avançar da idade verifica-se maior frequência de alteração no metabolismo da glicose e de DM tipo 2, existindo vários fatores relacionados com este desequilíbrio como modificações fisiopatológicas e da constituição corporal, no estado nutricional e na capacidade física e motora (17).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a obesidade é uma doença crónica cuja prevalência tem vindo a aumentar à escala mundial. A avaliação da obesidade é realizada pelo índice de massa corporal (IMC) e distribuição da massa gorda corporal existindo evidência de que a gordura visceral está associada a complicações metabólicas tais como DM tipo 2 e HTA (18-20).

A HTA é outro fator importante no desenvolvimento de DCV. Vários fatores podem estar associados à HTA, entre os quais a ingestão de sal e a AF (14,21).

Vários estudos evidenciam a importância da adoção de estilos de vida saudáveis como a prática de AF e hábitos alimentares saudáveis na redução de FRCV e prevenção destas doenças (10,16,22). A AF regular está associada a um efeito benéfico sobre os FR como a dislipidemia, obesidade, DM e HTA sendo um dos mecanismos de equilíbrio metabólico a maior sensibilidade dos tecidos à insulina (23,24). Por outro lado, uma dieta equilibrada deve ponderar a ingestão de nutrientes com as necessidades energéticas (5,7,22). Os macronutrientes (lípidos, proteínas, carboidratos e fibras) são geradores de energia e, juntamente com os micronutrientes (vitaminas, antioxidantes e minerais) são fundamentais no funcionamento saudável de vias metabólicas e hormonais (7,25). A ingestão de gorduras saturadas é responsável pelo aumento do CT, C-LDL e TG (26,27), sendo que as gorduras monoinsaturadas e poliinsaturadas promovem a diminuição dos níveis de CT e C-LDL e o aumento de C-HDL (27). As proteínas são importantes na dieta já que estão diretamente relacionadas com a massa muscular (17). Os carboidratos estão associados ao metabolismo da glicose pelo que devem estar incluídos numa dieta equilibrada (28,29). Estudos epidemiológicos reforçam a importância da dieta mediterrânea na redução dos FRCV associada à prática de atividade física. (17,30-33).

Os objetivos deste estudo foram a avaliação da influência da AF e da dieta alimentar nos perfis lipídico e glicémico, avaliação antropométrica, da PA e do risco de desenvolver DCV a 10 anos através do Systematic Coronary Risk Evaluation (SCORE) e do risco de Framingham, em indivíduos com idade superior ou igual a 50 anos.

Materiais e Métodos

Realizou-se um estudo analítico transversal numa amostra de 29 indivíduos fisicamente ativos com idade \geq a 50 anos do distrito do Porto. Foram critérios de inclusão idade \geq a 50 anos e autonomia física e de exclusão amostras de sangue hemolisadas ou lipémicas.

Foram autoaplicados três questionários: 1) caracterização da amostra; 2) avaliação da AF; e 3) avaliação da dieta. A AF foi avaliada pela versão curta do International Physical Activity Questionnaire (IPAQ), categorizada em 3 grupos (baixa, moderada e elevada) usando o Metabolic Equivalent (MET, 1 MET = 1 kcal/kg/hora, 3,5 ml de O₂/kg/min) (34). O perfil nutricional da amostra foi avaliado pelo Questionário da Frequência Alimentar (QFA) desenvolvido e validado pela Unidade de Epidemiologia Nutricional do Serviço de Higiene e Epidemiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Os alimentos ingeridos foram registados e convertidos em nutrientes e comparados com o Valor Diário Recomendado (VDR) (35).

A avaliação antropométrica (36) consistiu na determinação do peso, altura, IMC e perímetro abdominal (PAb). Mediu-se ainda a PA (37) e foram doseados os níveis séricos de glicose, CT, C-HDL, C-LDL e TG após 12h de jejum no autoanalisador Prestige 24i, Cormay® (Diamond Diagnostics, Massachusetts, United States of America). Estimou-se

também o risco de desenvolver DCV a 10 anos com recurso à tabela derivada do projeto SCORE (38,39), bem como o risco de Framingham através do cálculo da percentagem com base em valores numéricos, positivos e negativos a partir de zero, de acordo com o risco atribuível aos valores de idade, CT, C-HDL, PA, hábitos tabágicos e DM (40,41).

Realizou-se o teste estatístico ANOVA para verificar a existência de diferenças significativas entre os grupos de AF e nutrientes da dieta (<VDR e ≥VDR). Posteriormente, recorreu-se ao teste de Tukey e de Bonferroni para determinar que grupos diferiam entre si. Para grupos formados em função da ingestão de nutrientes realizou-se um teste de Mann-Whitney, teste não paramétrico para duas amostras independentes. O valor prova dos testes estatísticos realizados foi inferior a 0,05.

Resultados

A amostra é composta por 29 indivíduos, 18 do sexo feminino (62,1%) e 11 do sexo masculino (37,9%), com média de idades de 69,5±6,6 anos, sendo a maioria casado (72,4%) e não fumadores (79,3%). Observou-se no nível de escolaridade um destaque para o 1º ciclo com 12 indivíduos (41,4%), seguindo-se do 3º ciclo com 7 indivíduos (24,1%). Ainda no registo de patologias existentes, observou-se maior frequência de HTA (n=17), seguida por dislipidemias (n=16), e ausência de patologias em 4 indivíduos. Relativamente às medidas antropométricas e parâmetros bioquímicos, obtiveram-se valores médios elevados de pressão arterial sistólica (PAS) (148,3 ± 18,8 mmHg), pressão arterial diastólica (PAD) (83,8 ± 7,3 mmHg), CT (203,4 ± 33,7 mg/dL), C-LDL (130,8 ± 42,4 mg/dL) e PAb (99,5 ± 10,5 cm). O valor médio de IMC (28,6 ± 3,9 kg/m²) também se encontra acima do desejável. Os restantes valores encontram-se dentro dos valores normais de referência (tabela 1).

Estimou-se o risco global cardiovascular (SCORE), cujos valores estão expressos na tabela 2. O sexo masculino apresenta um risco entre 3-4% (média = 68,6 anos, mínimo/máximo = 59/75 anos) e 5-9% (média = 72,2 anos, mínimo/máximo = 61/82 anos). Já no sexo feminino o risco mais prevalente é de 2% (média = 69,4 anos; mínimo/máximo = 63/79 anos) e de 3-4% (média = 68,9 anos; mínimo/máximo = 59/78 anos). Realizou-se o cálculo do risco de Framingham (tabela 3) para os indivíduos que cumpriam critério de idade inferior a 74 anos (n=24). Observou-se no sexo masculino um maior número de indivíduos cujo risco de desenvolver DCV a 10 anos se situa entre os 20-25%. Nos 20%, a idade média dos indivíduos é de 68,3 anos (mínimo/máximo = 59/73 anos) e nos 25% de 71,5 anos (mínimo/máximo = 69/74 anos). Nos indivíduos do sexo feminino, 8 apresentaram risco compreendido entre 11-15%. Nos 11%, a idade média é 67,3 anos (mínimo/máximo = 61/71 anos), nos 13% é de 68,5 anos (mínimo/máximo = 63/74 anos), e nos 15% é de 66,7 anos (mínimo/máximo = 65/70 anos).

Na recolha de informação sobre a AF dos indivíduos, verificou-se que, do total da amostra, 19 indivíduos praticam AF moderada, 7 AF elevada e 3 AF baixa. Na tabela 4 estão reunidos os valores médios e respetivos desvios-padrão dos parâmetros laboratoriais, medidas antropométricas e PA para cada grupo de AF. Na análise da relação entre a AF e estas variáveis encontrou-se uma variação significativa da PAD em função do tipo de AF entre o grupo de AF baixa e elevada (tabela 4). No grupo com nível baixo de AF, observam-se valores de glicose elevados face aos de referência; os valores de CT e C-LDL apresentam-se também superiores aos de referência no grupo com nível moderado de AF.

O PAb e a PAS apresentam valores aumentados em todos os grupos de AF e o IMC aparece com valores sugestivos de obesidade nos grupos de AF com nível baixo e elevado.

O tratamento dos dados obtidos pelo QFA evidenciou que o total da amostra ingere uma quantidade superior ou igual ao VDR de sódio, potássio, cálcio e fósforo. No caso da ingestão das vitaminas D e K, biotina e ácido pantoténico observa-se o inverso. Da análise realizada para verificar a existência de diferenças significativas das médias dos parâmetros laboratoriais, medidas antropométricas e PA entre os grupos de ingestão de nutrientes [inferior ao VDR (< VDR) e superior ou igual ao VDR (≥VDR)], observaram-se diferenças entre: PAS por ingestão de gorduras saturadas [< VDR: 141,0 ± 15,4 mmHg; ≥VDR: 155,1 ± 19,6 mmHg, p= 0,042]; CT por ingestão de vitamina B6 [< VDR: 219,9 ± 34,1 mg/dL; ≥VDR: 193,3 ± 29,9 mg/dL, p=0,036]; PAb por ingestão de selénio [< VDR: 91,3 ± 13,0 cm; ≥VDR: 102,1 ± 8,3 cm, p=0,015]; IMC por ingestão de iodo [< VDR: 27,8 ± 3,6 kg/m²; ≥VDR: 31,4 ± 3,8 kg/m², p=0,036]; C-HDL por ingestão de riboflavina [<VDR: 43,6 ± 7,9 mg/dL; ≥VDR: 51,5 ± 9,0 mg/dL, p=0,036] (tabela 5).

Tabela 1 – Caracterização da amostra, valores de referência e respectivas frequências absoluta e relativa

Variável (unidade)	Média ± Desvio-padrão	
Idade (anos)	69,5 ± 6,6	
Altura (m)	1,61 ± 0,1	
Peso (Kg)	74,4 ± 12,4	
Variável		n (%)
Glicose (mg/dL) (20)		
Normal (<110)	102,3 ± 24,8	22 (75,9%)
Anomalia Glicemia em Jejum (≥110 e <126)		4 (13,8%)
Diabetes Mellitus (≥126)		3 (10,3%)
Colesterol Total (mg/dL) (9)		
Categoria de risco CV	203,4 ± 33,7	
Valor desejável (< 200)		13 (44,8%)
Risco Moderado (200 – 239)		9 (31,0%)
Risco Alto (≥ 240)		7 (24,1%)
HDL (mg/dL) (9)		
Categoria de risco CV	49,3 ± 9,3	
Risco alto (♂ <40; ♀ <50)		4 (13,8%)
Valor Desejável (40-59)		21 (72,4%)
Fator de Proteção (≥ 60)		4 (13,8%)
LDL (mg/dL) (9)		
Categoria de risco CV	130,8 ± 42,4	
Valor desejável (< 100)		7 (24,1%)
Valor próximo do desejável (100 – 129)		10 (34,5%)
Risco moderado (130 – 159)		7 (24,1%)
Risco elevado (160 – 189)		4 (13,8%)
Risco muito elevado (≥ 190)		1 (3,4%)
Triglicerídeos (mg/dL) (9)		
Categoria de risco CV	120,6 ± 55,0	
Valor Desejável (<150)		24 (82,8%)
Risco Moderado (150 – 199)		3 (10,3%)
Risco Alto (200 – 499)		2 (6,9%)
Risco Muito Alto (≥ 500)		0 (0%)
IMC (Kg/m²) (36)		
Baixo peso (<18,5)	28,6 ± 3,9	0 (0%)
Variação normal (18,5 – 24,9)		2 (6,9%)
Pré-obesidade/Excesso de peso (25,0 – 29,9)		20 (69,0%)
Obesidade classe I (30,0 – 34,9)		5 (17,2%)
Obesidade classe II (35,0 – 39,9)		2 (6,9%)
Obesidade classe III (≥ 40,0)		0 (0%)
Perímetro Abdominal (cm) (36,42)		
Categoria de risco CV	99,5 ± 10,5	
Valor Desejável (♂ < 94; ♀ < 80)		3 (10,3%)
Risco aumentado (♂ ≥ 94; ♀ ≥ 80)		5 (17,3%)
Risco muito aumentado (♂ ≥ 102; ♀ ≥ 88)		21 (72,4%)
PAS/PAD (mmHg) (9,42)		
Normal (<140/<90)	148,3 ± 18,8 / 83,8 ± 7,3	9 (31,0%)
HTA (≥140/≥90)		19 (65,5%)
Hipertensão Sistólica isolada (HSi) (≥140 e <90)		1 (3,5%)

Legenda: ♂:Homens;♀:Mulheres; CV: Cardiovascular; HDL: High-density lipoprotein; LDL: Low-density lipoprotein; IMC: Índice de massa corporal; PAD: Pressão arterial diastólica; PAS: Pressão arterial sistólica.

Tabela 2 – Risco global cardiovascular (SCORE)








SCORE (n = 29)				
Percentagem de Risco		Homens (n=11)	Mulheres (n=18)	Total
<1%		0	0	0
1%		0	2	2
2%		0	8	8
3 – 4%		5	7	12
5 – 9%		6	1	7
10 – 14%		0	0	0
≥ 15%		0	0	0

Tabela 3 – Risco de Framingham

Framingham (n = 24)			
% a 10 anos	Homens (n = 9)	% a 10 anos	Mulheres (n = 15)
2%	0	1%	0
3%	0	2%	0
4%	0	3%	1
5%	0	4%	1
7%	0	5%	1
8%	0	6%	0
10%	0	7%	0
13%	0	8%	2
16%	1	10%	1
20%	3	11%	3
25%	2	13%	2
31%	0	15%	3
37%	1	18%	0
45%	1	20%	0
53%	1	24%	1
		≥ 27%	0

Tabela 4 – Média dos parâmetros bioquímicos, medidas antropométricas e PA em função da atividade física

Variável (unidades)	Atividade Física (Média ± DP)			p
	Baixa (n=6)	Moderada (n=17)	Elevada (n=6)	
Glicose (mg/dL)	129,02 ± 50,10	95,88 ± 15,48	108,11 ± 28,01	0,071
Colesterol Total (mg/dL)	183,51 ± 19,43	213,16 ± 32,83	185,44 ± 32,47	0,095
Colesterol HDL (mg/dL)	47,53 ± 15,49	50,18 ± 8,81	47,64 ± 9,23	0,791
Colesterol LDL (mg/dL)	107,81 ± 19,58	134,30 ± 33,11	110,08 ± 28,91	0,146
Triglicerídeos (mg/dL)	117,65 ± 19,31	128,77 ± 65,40	99,52 ± 20,32	0,499
IMC (Kg/m ²)	31,65 ± 3,11	27,48 ± 3,84	30,16 ± 3,24	0,096
Perímetro Abdominal (cm)	106,33 ± 6,03	96,63 ± 11,75	104,43 ± 3,64	0,120
PAS (mmHg)	146,83 ± 8,89	149,68 ± 19,35	145,21 ± 22,0	0,866
PAD (mmHg)	76,00 ± 1,32	83,18 ± 7,66	88,29 ± 4,62	0,041* # (0,036* & (0,042*)

Legenda: DP: Desvio-padrão; HDL: *High-density lipoprotein*; LDL: *Low-density lipoprotein*; IMC: Índice de massa corporal; PA: Pressão arterial; PAD: Pressão arterial diastólica; PAS: Pressão arterial sistólica; P = Valor de prova obtido através do teste de ANOVA; #: valor de prova obtido através do teste de Tukey para diferença de médias entre grupo de AF baixa e grupo de AF elevada; &: valor de prova obtido através do teste de teste Bonferroni para diferença de médias entre grupo de AF baixa e grupo de AF elevada. Nível de significância = 0,05

Discussão

O baixo número de indivíduos da amostra (n=29) bem como a existência de uma assimetria na distribuição por gênero (62,1% de indivíduos do sexo feminino) são limitações do nosso estudo (42–44). No entanto, importa referir que a assimetria de gênero foi também encontrada em estudos semelhantes nos quais também se verificou uma maior representatividade do sexo feminino (45–47).

Atualmente, diversos FR como HTA, obesidade, tabagismo, DM tipo 2 e alterações dos valores do perfil lipídico são importantes no desenvolvimento do processo aterosclerótico (8,48,49). Relativamente aos FR modificáveis, neste estudo, 69,0% da amostra tem excesso de peso, 24,1% são obesos, 3,5% são fumadores e 58,6% referem ser hipertensos, apesar de 65,5% apresentarem valores de PA indicadores de HTA. Segundo o estudo português “The PHYSA study” com uma amostra de 3720 indivíduos com idades compreendidas entre 18 e 90 anos, obteve-se que quase metade da população em Portugal tem excesso de peso ou obesidade, 30,2% são fumadores e 42,2% têm HTA (50,51). Comparativamente, na nossa amostra (idade superior a 50 anos), há uma maior frequência de casos de obesidade e HTA mas uma menor percentagem de fumadores. O mesmo estudo indica um aumento progressivo da PA com a idade, o que poderá explicar a maior frequência de hipertensos na nossa amostra (51).

As patologias mais frequentemente registadas na amostra em estudo, foram a HTA com 58,6% (n=17) dos indivíduos, e as dislipidemias com 55,2% (n=16) dos participantes. Dos 17 indivíduos diagnosticados com HTA, 14 apresentaram determinações de PA concordantes com a patologia. Contudo, registou-se valores indicativos de HTA em 19 indivíduos dos 29 que compunham a amostra. Isto poderá dever-se ao efeito da “bata branca” (19,52), ou a alguma falha no preenchimento do questionário, nomeadamente no esquecimento/ocultação de alguma informação clínica importante. A presença de valores sugestivos de HTA em mais de metade da amostra em estudo pode dever-se também ao excesso de ingestão de sal já que toda a amostra revelou consumo de sal superior ou igual ao VDR, de acordo com os resultados do QFA (19,51,53).

Tabela 5 – Comparação das médias dos parâmetros bioquímicos, medidas antropométricas e PA entre os grupos de ingestão de nutrientes (<VDR e ≥VDR)

	Glicose p	CT p	HDL p	LDL p	TG p	IMC p	PAb p	PAS p	PAD p
Proteínas	0,277	0,626	0,880	0,467	0,394	0,501	0,095	0,816	0,973
Carboidratos	0,723	0,779	0,235	0,565	0,198	0,778	0,617	0,423	0,631
Gorduras	0,964	0,284	0,365	0,189	0,295	0,660	0,620	0,460	0,692
Gorduras saturadas	0,194	0,826	0,223	0,611	0,172	0,867	0,725	0,042*	0,880
Colesterol	0,489	0,760	0,460	0,653	0,334	0,859	0,504	0,257	0,561
Vitamina A	0,292	0,771	0,800	0,601	0,895	0,181	0,143	0,634	0,839
Fibras	0,615	0,166	0,842	0,264	0,347	0,795	0,705	0,766	0,895
Ferro	0,424	0,541	0,651	0,710	0,083	0,940	0,563	0,358	0,179
Tiamina	0,585	0,137	0,327	0,115	0,054	0,762	0,816	0,126	0,892
Riboflavina	0,700	0,893	0,039*	0,823	0,069	0,312	0,183	0,094	0,821
Niacina	0,106	0,796	0,683	0,661	0,729	0,469	0,184	0,515	0,316
Vitamina B6	0,450	0,036*	0,774	0,083	0,056	0,970	0,484	0,195	0,915
Iodo	0,751	0,144	0,955	0,081	0,503	0,036*	0,286	0,057	0,327
Magnésio	0,908	0,526	0,169	0,431	0,080	0,831	0,870	0,398	0,398
Zinco	0,660	0,629	0,119	0,992	0,352	0,669	0,356	0,855	0,995
Selénio	0,236	0,804	0,458	0,527	0,952	0,186	0,015*	0,618	0,617
Manganésio	0,155	0,242	0,338	0,382	0,566	0,422	0,066	0,936	0,978

Legenda: CT: Colesterol total; HDL: *High-density lipoprotein*; LDL: *Low-density lipoprotein*; IMC: Índice de massa corporal; PAb: Perímetro abdominal; PAD: Pressão arterial diastólica; PAS: Pressão arterial sistólica; TG: Triglicerídeos; VDR: Valor diário recomendado. P = Valor de prova obtido através do teste de ANOVA; Nível de significância = 0,05

Os valores de glicose obtidos foram concordantes com as respostas aos questionários, uma vez que os 3 indivíduos que referiram ser diabéticos obtiveram valores de glicose sugestivos da patologia. Foram identificados 20 indivíduos com excesso de peso e 7 obesos (36). Registaram-se 21 indivíduos com PAb superior aos valores normais apresentando risco aumentado para complicações metabólicas (54,55). A relação dos dados desta variável com os níveis de glicose permitem realçar a importância de estimular a AF nos indivíduos diabéticos, os quais na nossa amostra apresentam alterações no PAb. É de salientar que um dos diabéticos é obeso e tem risco muito elevado de complicações metabólicas tendo em conta o PAb e os outros dois apresentam-se com excesso de peso e risco elevado de complicações metabólicas. A AF é um importante fator que melhora a saúde das populações (56–58). Verificou-se, com a aplicação do IPAQ, que a maioria dos indivíduos (65,5%) pratica AF moderada, seguida de AF elevada (24,1%) e de AF baixa (10,3%).

Num estudo que compara a prevalência da AF em 20 países no mundo, os resultados de Portugal, de 2002-2004, evidenciaram que 45,3% praticava AF elevada, 28,5% praticava uma AF moderada enquanto que 26,2% praticava uma AF baixa (59). Neste estudo, Portugal foi um dos países que evidenciou uma maior AF por parte do sexo feminino (59). No entanto, outros estudos apontam para um maior sedentarismo na prática de AF na população portuguesa em contexto europeu (22). No nosso estudo, os indivíduos eram fisicamente ativos, a maioria com nível moderado a elevado, com maior frequência do nível moderado nos indivíduos do sexo feminino.

Relativamente à relação da PA com a AF, verificou-se diferença estatisticamente significativa da variável PAD entre os grupos AF baixa e a elevada. A literatura aponta que a HTA é mais frequente em idosos sedentários e a prática de exercício físico ligeiro a moderado está associado a uma diminuição da PA na ordem de 13 a 10 mmHg, respetivamente (60,61).

A autoaplicação dos questionários da frequência alimentar permitiu observar que a maioria dos indivíduos, 65,5%, ingere uma quantidade de calorias superior ou igual ao VDR. Verificou-se também que o total da amostra ingere uma quantidade superior ou igual ao VDR de determinados nutrientes, como o sódio, potássio, cálcio e fósforo.

Por outro lado observou-se níveis abaixo do VDR em nutrientes como vitaminas D e K, biotina e ácido pantoténico.

Relativamente à associação entre os nutrientes ingeridos e as variáveis em estudo verificou-se existirem variações significativas entre PAS e gorduras saturadas; o C-HDL e níveis de riboflavina; o CT e a vitamina B6; o IMC e o iodo; e o PAb e o selénio ingerido. Há um consenso de que uma baixa ingestão de gorduras saturadas reduz o risco de DCV (62–64). No entanto, continua por descobrir quais os nutrientes recomendados para substituírem as gorduras saturadas, visto que as recomendações dietéticas têm dois grandes objetivos que são: reduzir os valores de PA e melhorar os valores do perfil lipídico. Por um lado, de acordo com a Dietary Approaches to Stop Hypertension (65), uma dieta rica em carboidratos reduz a PA e os níveis de C-LDL mas, por outro lado, reduz os níveis de C-HDL (66). Outros estudos recomendam dietas ricas em gorduras monossaturadas e polinsaturadas para a redução do risco cardiovascular, uma vez que estas dietas atuam na redução da PA, TG, CT e C-LDL e aumento do C-HDL (26,62,64,67). Dos 17 indivíduos que afirmaram ser hipertensos, 58,8% (n = 10) ingere uma quantidade de gorduras saturadas superior ou igual ao VDR.

Em relação à riboflavina, apesar de ainda não ser totalmente conhecido o seu mecanismo de ação, na literatura é referida a sua proteção contra DCV (68,69). Nestas doenças também níveis elevados de C-HDL são considerados como fatores de proteção (70). Contudo ainda não se conhece a relação entre a ingestão de riboflavina e os níveis de C-HDL. No nosso estudo, 86,2% (n=25) da amostra apresenta níveis satisfatórios de C-HDL, sendo que destes, 80% referem uma ingestão superior ou igual ao VDR de riboflavina. Isto poderá indicar que, de facto, a riboflavina influencia os níveis de C-HDL.

A vitamina B6, com um importante papel no metabolismo dos lípidos e com efeitos benéficos na manutenção de níveis normais de homocisteína, encontra-se muitas vezes em falta na alimentação dos idosos (71–73). Níveis elevados de homocisteína no plasma estão associados a um maior risco de DCV (71–73). Observou-se associação entre os valores de CT e ingestão de vitamina B6, sendo que dos 62,1% que ingere uma quantidade igual ou superior ao VDR, 55,6% (n=10) apresenta valores normais de CT.

O iodo é um nutriente indispensável para o correto funcionamento da tiróide, para que esta glândula possa produzir e libertar na circulação as suas hormonas essenciais para diversos processos (74). Quando ocorre uma disfunção na libertação das hormonas, poderá ocorrer hiper ou hipotiroidismo que provocam alterações na taxa metabólica basal conduzindo a alterações no peso corporal e, conseqüentemente, no IMC (75,76). Os nossos resultados indicam uma possível ligação entre a ingestão de iodo e alterações do IMC, que somente com outro desenho de estudo é possível explorar. Teria sido útil e interessante realizar avaliação da função tiroideia para uma melhor associação com a obesidade e IMC à semelhança de diversos estudos já realizados (75,77–79).

O selénio é um oligoelemento antioxidante relacionado com a proteção frente ao dano provocado pelo stress oxidativo (72,80,81). Propõe-se que a ingestão deste mineral diminua o risco de doenças crónicas por reduzir a atividade pró-inflamatória, estando também envolvida na defesa do organismo (81,82). Os antioxidantes controlam a quantidade de radicais livres ou converte-os em produtos inofensivos (72). São vários os grupos que apresentam necessidades acrescidas de controlo na ingestão de antioxidantes. Os atletas necessitam de ingerir maiores quantidades de oligoelementos do que os indivíduos sedentários, de modo a neutralizar a maior produção de radicais livres de oxigénio (72). Este nutriente é responsável por um efeito protetor nos idosos através da modulação do sistema imunológico (82). Frequentemente, tanto os idosos como os jovens fazem uma ingestão inadequada deste oligoelemento, que está disponível para uso em suplementos (82). À semelhança do iodo, o selénio tem uma relação íntima com a função tiroideia (83).

Conclusão

Neste estudo, verificou-se que a maioria da amostra apresenta excesso de peso e um PAb elevado. A HTA e as dislipidemias, condições clínicas mais frequentes na amostra, constituem FR de grande impacto, principalmente, para o desenvolvimento de DCV devido ao reconhecimento dos seus efeitos e à sua prevalência na população. Desta forma, é extremamente importante tomar medidas que diminuam ou controlem estes FR de forma a diminuir a morbidade e mortalidade por DCV. De entre as medidas passíveis de ser adotadas destacam-se o combate ao sedentarismo, referido em alguns estudos como elevado em Portugal e a adoção de uma dieta alimentar que permita controlar os níveis de glicose, colesterol (CT, C-LDL) e TG e aumentar os níveis de C-HDL. Uma vez que a dieta mediterrânea tem sido associada a uma melhoria do risco cardiovascular, nomeadamente no perfil lipídico (30,84) seria importante promover este tipo de alimentação na nossa população.

Referências bibliográficas

1. Oliveira CR de, Rosa M santos, Anabela Mota Pinto MA, Botelho S, Morais A, Veríssimo MT. Estudo do Perfil do Envelhecimento da População Portuguesa. 2010. 251 p.
2. Mesquita K, Franchi B, Magalhães R, Junior M. Perspectivas e controvérsias Atividade física: uma necessidade para a boa saúde na terceira idade. 2005;
3. WHO. WHO | Ageing and health. WHO. 2016;
4. INE Instituto Nacional de Estatística. Censos 2011 Norte. Vol. 60. 2011. 1-223 p.
5. Direção-Geral da Saúde. Envelhecer com sabedoria: alimente-se melhor para manter a sua saúde e independência. 2008;5.
6. Fernandes AA, Burnay R, Gomes I, Gil PA, Marques MA, Botelho AM. Envelhecimento e Saúde : Uma Análise de Género. 2012;
7. Rescigno T, Micolucci L, Tecce M, Capasso A. Bioactive Nutrients and Nutrigenomics in Age-Related Diseases. *Molecules* [Internet]. 2017;22(1):105. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/1/105>
8. Bezerra De Brito B, Vieira Leal JD, Maria L, Formiga F, De Macêdo K, Frota G, *et al.* Doenças cardiovasculares: fatores de risco em adolescentes Cardiovascular diseases: risk factors in adolescents. 2016;1239–64600.
9. INCEP-ATPIII. Executive Summary of the Third Report (NCEP) Expert Panel on Detection , Evaluation , and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA J Am Med Assoc.* 2001;285(19):2486–97.
10. King DE, Mainous AG, Geesey ME, Mensink GBM, Gößwald A, Endres M, *et al.* Turning Back the Clock: Adopting a Healthy Lifestyle in Middle Age. *Am J Med* [Internet]. 2007 Jul [cited 2017 Jan 15];120(7):598–603. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002934306011855>
11. Gupta S, Gudapati R, Gaurav K, Bhise M. Emerging risk factors for cardiovascular diseases: Indian context. *Indian J Endocrinol Metab* [Internet]. 2013 Sep [cited 2017 Jan 15];17(5):806–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24083161>
12. European Heart Network. Diet, Physical Activity and Cardiovascular Disease Prevention in Europe. 2011;
13. Buttar DVM HS, Li T, Ravi N, Buttar H, Li T, Ravi N. Prevention of cardiovascular diseases: Role of exercise, dietary interventions, obesity and smoking cessation. *Exp Clin Cardiol.* 2005;10(4).
14. Trejo-Gutierrez JF, Fletcher G. Impact of exercise on blood lipids and lipoproteins. *J Clin Lipidol.* 2007;1(3):175–81.
15. Direção-Geral da Saúde. Ministério da Saúde. Abordagem Terapêutica das Dislipidemias no Adulto. Norma Da Direção Geral Da Saúde. 2015;1–17.
16. Direção-Geral da Saúde. Ministério da Saúde. Prescrição de exames laboratoriais para avaliação de dislipidemias no Adulto. Norma Da Direção Geral Da Saúde. 2015;1–15.
17. M.Ferry EA. Nutrição da pessoa idosa - Aspectos fundamentais, clínicos e psicossociais. 2a Edição. Lusociência; 2004.
18. Direção Geral de Saúde. Programa Nacional de Combate à Obesidade. Div Doenças Genéticas, Crónicas e Geriátricas, Direção Geral Saúde. 2005;24.
19. Direção Geral da Saúde. Processo Assistencial Integrado do Risco Cardiovascular no Adulto. 2014. 1-142 p.
20. Direção-Geral da Saúde. Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. Norma da Direção Geral da Saúde. 2011;1–13.
21. National Heart, Lung and BI. Your Blood Pressure Lowering Guide to What Are High Blood Pressure and Prehypertension? 2003.
22. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, *et al.* 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J.* 2016;37(29):2315–81.
23. Roberts CK, Hevener AL, Barnard RJ. Metabolic Syndrome and Insulin Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training. *Compr Physiol.* 2013;3(1):1–58.
24. Kaur J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. 2014;
25. Diabetes SB De. Manual Oficial de Contagem de Carboidratos para as Pessoas com Diabetes. 2009;
26. Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM. Saturated Fatty Acids and Risk of Coronary Heart Disease: Modulation by Replacement Nutrients. *Curr Atheroscler Rep.* 2010;12(6):384–90.
27. Fagherazzi S, Dias R da L, Bortolon F. Impacto do exercício físico isolado e combinado com dieta sobre os níveis séricos de HDL, LDL, colesterol total e triglicérides. *Rev Bras Med do Esporte* [Internet]. 2008 Aug [cited 2017 Jan 15];14(4):381–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-86922008000400012&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
28. Alessa HB, Bhupathiraju SN, Malik VS, Wedick NM, Campos H, Rosner B, *et al.* Carbohydrate quality and quantity and risk of type 2 diabetes in US women 1,2.
29. Lindstrom J, Khoshniat M, Poorsoltan N, Akhoundan M, Omidvar M, Larijani B, *et al.* Prevention of Diabetes Mellitus in Subjects with Impaired Glucose Tolerance in the Finnish Diabetes Prevention Study: Results From a Randomized Clinical Trial. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2017 Jan 15];14(90002):108S – 113. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1097/01.ASN.0000070157.96264.13>
30. Grosso G, Marventano S, D'Urso M, Mistretta A, Galvano F. The Mediterranean healthy eating, ageing, and li-

- festyle (MEAL) study: rationale and study design. *Int J Food Sci Nutr* [Internet]. 2016;0(0):1–10. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09637486.2016.1262335>
31. Sanchez-Aguadero N, Alonso-Dominguez R, Garcia-Ortiz L, Agudo-Conde C, Rodriguez-Martin C, De Cabo-Laso A, *et al.* Diet and physical activity in people with intermediate cardiovascular risk and their relationship with the health-related quality of life: results from the MARK study. *Health Qual Life Outcomes*. 2016;14:10.
 32. Di Daniele N, Noce A, Vidiri MF, Moriconi E, Marrone G, Annicchiarico-Petruzzelli M, *et al.* Impact of Mediterranean Diet on metabolic syndrome, cancer and longevity. *Oncotarget* [Internet]. 2016; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27894098%5Cnhttp://www.oncotarget.com/abstract/13553>
 33. Alemán JA, Pilar M, Rentero Z, Montoro-García S, Mulero J, Garrido AP, *et al.* Adherence to the “Mediterranean Diet” in Spain and Its Relationship with Cardiovascular Risk (DIMERICA Study). *Nutrients*. 2016;8:14.
 34. Ipaq. Guidelines for Data Processing and Analysis of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) – Short and Long Forms. Ipaq. 2005;(November):1–15.
 35. Nutrition C for FS and A. Labeling & Nutrition - Guidance for Industry: A Food Labeling Guide (14. Appendix F: Calculate the Percent Daily Value for the Appropriate Nutrients). 2015;
 36. Saúde DG de. Avaliação antropométrica no adulto. 2013;1–9. Available from: <http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-0172013-de-05122013.aspx>
 37. George HM. Hipertensão Arterial: definição e classificação. *Direção-Geral da Saúde*. 2013;1–6.
 38. George HM. Avaliação do Risco Cardiovascular. *Normas da Direção Geral da Saúde* [Internet]. 2011;1–16. Available from: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0052013-de-19032013-jpg.aspx>
 39. European Society of Cardiology. Systematic Coronary Risk Evaluation (SCORE) [Internet]. 2016 [cited 2017 Jan 13]. Available from: <http://www.escardio.org/Education/Practice-Tools/CVD-prevention-toolbox/SCORE-Risk-Charts#>
 40. National Heart, Lung and BI. Cardiovascular Disease | Risk | Framingham Heart Study [Internet]. Framingham Heart Study. 2016 [cited 2017 Jan 13]. Available from: <https://www.framinghamheartstudy.org/risk-functions/cardiovascular-disease/10-year-risk.php>
 41. National Heart, Lung and BI. Estimate of 10-Year Risk for Coronary Heart Disease Framingham Point Scores - NHLBI, NIH [Internet]. National Heart, Lung, and Blood Institute. 2014 [cited 2017 Jan 13]. Available from: <https://www.nhlbi.nih.gov/health-pro/guidelines/current/cholesterol-guidelines/quick-desk-reference-html/10-year-risk-framingham-table>
 42. Batsis J, Singh S, Lopez-Jimenez F. Anthropometric measurements and survival in older Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Nutr Heal Aging*. 2014;18(2):123–30.
 43. Covatti F, Santos M, Vicente ADS, Greff T, Vicentini P. Fatores de risco para doenças cardiovasculares em adultos e idosos de um hospital universitário Risk factors for cardiovascular diseases in elderly and adults. 2016;36(1):24–30.
 44. Reedy J, Krebs-smith SM, Miller PE, Liese AD, Kahle LL, Park Y, *et al.* Higher Diet Quality Is Associated with Decreased Risk of All-Cause, Cardiovascular Disease, and Cancer Mortality among Older Adults 1,2. *J Nutr*. 2014;144:881–9.
 45. Fan H, Li X, Zheng L, Chen X, Ian Q, Wu H, *et al.* Abdominal obesity is strongly associated with Cardiovascular Disease and its Risk Factors in Elderly and very Elderly Community-dwelling Chinese. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Feb 17 [cited 2017 Jan 9];6:21521. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep21521>
 46. Gomes IC, dos Santos VR, Christofaro DG, Fernandes RA, Bueno DR, Freitas Júnior IF. Cardiovascular risk factors and body fat distribution in brazilians aged 80 years or over. *Ribeirão Preto Online*. 2016;49(1):17–25.
 47. Martins RA, Jones JG, Cumming SP, Silva MJC e, Teixeira AM, Veríssimo MT, *et al.* Glycated hemoglobin and associated risk factors in older adults. *Diabetes Care* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2017 Jan 9];32(Supplement_1):S13–61. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc09-S013>
 48. Gullace G. Behavioral Cardiovascular Risk Factors: Changing Perspective to Approach the Problem. *Rev Artic J Cardiol Cardiovasc Ther*. 2016;2(1).
 49. Barel M, Louzada JC de A, Monteiro HL, Amaral SL do. Associação dos fatores de risco para doenças cardiovasculares e qualidade de vida entre servidores da saúde. *Rev Bras Educ Física e Esporte* [Internet]. 2010 Jun [cited 2017 Jan 9];24(2):293–303. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-55092010000200012&lng=pt&nrm=iso&tlng=en
 50. Instituto Nacional de Estatística/Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Inquérito Nacional de Saúde 2014. 2015;1–17.
 51. Polonia J, Martins L, Pinto F, Nazare J. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension and salt intake in Portugal. *J Hypertens* [Internet]. 2014;32(6):1211–21. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00004872-900000000-98584nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24675681>
 52. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, B??hm M, *et al.* 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2013;34(28):2159–219.

53. WHO. A Global Brief on Hypertension. *A Glob Br Hypertens* [Internet]. 2013;40. Available from: http://ish-world.com/downloads/pdf/global_brief_hypertension.pdf
54. Suliga E, Koziel D, Głuszek S. Prevalence of metabolic syndrome in normal weight individuals. *Ann Agric Environ Med* [Internet]. 2016;23(4):631–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28030935>
55. Han TS, Lean ME. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease.
56. National Institutes of Health. Benefits of Physical Activity [Internet]. [cited 2017 Jan 9]. Available from: <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/phys/benefits>
57. Rejeski WJ, Ambrosius WT, Burdette JH, Walkup MP, Marsh AP. Community Weight Loss to Combat Obesity and Disability in At-Risk Older Adults. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci* [Internet]. 2017 Jan 6 [cited 2017 Jan 9];glw252. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28064148>
58. Febbraio MA. Exercise metabolism in 2016: Health benefits of exercise — more than meets the eye! *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2017 Jan 4 [cited 2017 Jan 9]; Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrendo.2016.218>
59. Bauman A, Bull F, Chey T, Craig CL, Ainsworth BE, Sallis JF, *et al.* International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity The International Prevalence Study on Physical Activity: results from 20 countries. *Int J Behav Nutr Phys Act* [Internet]. 2009 [cited 2017 Jan 9];6(6). Available from: <http://www.ijbnpa.org/content/6/1/21>
60. WHO. WHO | Physical Activity and Older Adults. WHO. 2015;
61. Taylor D. Physical activity is medicine for older adults. 2013;
62. Anand S, De Souza RJ, Mente A, Maroleanu A, Cozma AI, Ha V, *et al.* Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *bmj BMJ*. 2015;1013978006.
63. Hooper L, Martin N, Abdelhamid A, Davey Smith G. Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease. In: Hooper L, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2015 [cited 2017 Jan 10]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD011737>
64. Khadka DB, Pokhrel B, Pokhrel S. Saturated fat and cardiovascular disease. *Food Wave*. 2014;2:29–44.
65. National Heart, Lung and BI. Lowering Your Blood Pressure With DASH. NIH Public Access. 2015;64.
66. Chiu S, Bergeron N, Williams PT, Bray GA, Sutherland B, Krauss RM. Comparison of the DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) diet and a higher-fat DASH diet on blood pressure and lipids and lipoproteins: A randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2016;103(2):341–7.
67. Turner JM, Spatz ES. Nutritional Supplements for the Treatment of Hypertension: A Practical Guide for Clinicians.
68. Nelson Alexandre Rodrigues Tavares. Riboflavin status and effects of supplementation on biomarkers of cardiovascular disease in the elderly Academic Dissertation. 2009.
69. Porter K, Hoey L, Hughes CF, Ward M, McNulty H. Causes, Consequences and Public Health Implications of Low B-Vitamin Status in Ageing.
70. Portuguesa de Cardiologia R, Donas-Botto Bordalo Á, Lucas Nobre Â, Dantas M, Cravino J. Um valor elevado de HDL é o principal fator protetor contra a doença coronária no idoso com doença fibrocalcificante valvular aórtica. *Rev Port Cardiol* [Internet]. 2012 [cited 2017 Jan 11];31(6):415–24. Available from: www.revportcardiol.org
71. Ehrlich SD. Vitamin B6 (Pyridoxine) [Internet]. University of Maryland, Medical Center. 2015 [cited 2017 Jan 11]. Available from: <http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/vitamin-b6-pyridoxine>
72. Teixeira P, Sardinha LB, Barata JLT. Nutrição, Exercício e Saúde [Internet]. Lidel; 2008 [cited 2017 Jan 11]. Available from: <https://www.lidel.pt/pt/catalogo/ciencias-da-saude/nutricao/nutricao-exercicio-e-saude/>
73. Office of Dietary Supplements. Vitamin B6 — Health Professional Fact Sheet [Internet]. National Institutes of Health. 2016 [cited 2017 Jan 11]. Available from: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminB6-HealthProfessional/>
74. Daniell K, Nucera C. Effect of the micronutrient iodine in thyroid carcinoma angiogenesis. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2016 Dec 20 [cited 2017 Jan 11];8(12):3180–4. Available from: <http://www.aging-us.com/full/101143>
75. Solanki A, Bansal S, Jindal S, Saxena V, Shukla US. Relationship of serum thyroid stimulating hormone with body mass index in healthy adults. *Indian J Endocrinol Metab* [Internet]. 2013;17(Suppl 1):S167–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3830292&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
76. Merkiel S, Chalcarz W. The Relationship Between Physical Fitness, Urine Iodine Status, and Body-Mass Index in 6-to 7-year-old Polish Children. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2011;21(4):318–27.
77. Biondi B. Thyroid and Obesity: An Intriguing Relationship. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(8):3614–7.
78. Knudsen N, Laurberg P, Rasmussen LB, Bülow I, Perrild H, Ovesen L, *et al.* Small differences in thyroid function may be important for body mass index and the occurrence of obesity in the population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(7):4019–24.
79. Johnstone AM, Murison SD, Duncan JS, Rance KA, Speakman JR. Factors influencing variation in basal metabolic rate include fat-free mass, fat mass, age, and circ.pdf. 2005;941–8.

80. Tajaddini MH, Keikha M, Razzazzadeh A, Kelishadi R. A systematic review on the association of serum selenium and metabolic syndrome. *J Res Med Sci* [Internet]. 2015 Aug [cited 2017 Jan 11];20(8):782–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26664427>
81. Carolina A, Volp P, Bressan J, Hermana H, Hermsdorff M, Zulet MÁ, *et al.* Selenium antioxidant effects and its link with inflammation and metabolic syndrome. 2010;23(4):581–90.
82. Panziera FB, Dorneles MM, Durgante PC, Silva VL da. Avaliação da ingestão de minerais antioxidantes em idosos. *Rev Bras Geriatr e Gerontol* [Internet]. 2011 Mar [cited 2017 Jan 11];14(1):49–58. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-98232011000100006&lng=pt&nrm=iso&tlng=en
83. Rayman MP. Selenium and human health. *Rev 1256 www.thelancet.com Lancet*. 2012;379(379):1256–68.
84. Grosso G, Mistretta A, Frigiola A, Gruttadauria S, Biondi A, Basile F, *et al.* Mediterranean Diet and Cardiovascular Risk Factors: A Systematic Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(5):593–610.

Qualidade do Sono e Marcadores Endócrinos e Bioquímicos

Ana Sofia Coelho de Carvalho

Doutoranda em Investigación Aplicada a las Ciencias Sanitarias, Universidad de León, Espanha
Unidade Local de Saúde do Nordeste, Centro de Saúde de Santa Maria, Bragança, Portugal – ana.s.coelho@hotmail.com

Adília Pires Fernandes

Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior de Saúde, Bragança, Portugal – adilia@ipb.pt

Matilde Sierra Vega

Universidad de León, Espanha – msiev@unileon.es

Ana Belen Gallego

Universidad de León, Espanha – ana.ggallego@unileon.es

Josiana Adelaide Vaz

Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior de Saúde, Portugal – josiana@ipb.pt

Resumo

Introdução: O sono e o repouso constituem o ritmo biológico base da espécie humana e são fundamentais para uma boa saúde e qualidade de vida, com especial significado em crianças e jovens. Procedemos à revisão da literatura utilizando os motores de busca *PubMed*, *ScienceDirect*, *B-on*, *Scielo*, no espaço cronológico 2006 a 2016, objetivando-se relacionar a qualidade do sono com os marcadores endócrinos e bioquímicos. **Revisão:** Há cada vez mais evidências de que o sono tem influência sobre os hábitos alimentares e consequentemente sobre o balanço energético e a regulação do peso corporal, estando também associado a outros fatores de risco metabólico na adolescência. A redução das horas de sono e os distúrbios do sono estão associadas ao aumento da ingestão de alimentos, a dietas de má qualidade e excesso de peso. Por outro lado uma dieta saudável pode promover o sono e a sua qualidade, dado o seu impacto na síntese de serotonina e melatonina. A má qualidade do sono tem um impacto negativo na qualidade de vida, verificando-se que a privação do sono é um fator de risco relevante para a saúde e segurança, aumentando o risco cardiovascular e metabólico. **Discussão:** Os diferentes estudos demonstram a relação da qualidade do sono com as hormonas e proteínas essenciais ao desenvolvimento físico, cognitivo e emocional. **Conclusão:** A investigação na área do sono é fundamental para aumentar o conhecimento sobre a correlação do sono com as diferentes variáveis e consequentemente desenvolver programas de promoção efetivos.

Palavras-chave: Qualidade Sono, Marcadores Endócrinos e Bioquímicos

Introdução

O sono e o repouso constituem o ritmo biológico base da espécie humana e são fundamentais para uma boa saúde e qualidade de vida, com especial significado em crianças e jovens (1).

Passamos um terço da vida a dormir e neste período ocorrem fenómenos específicos que têm repercussões na nossa saúde e na qualidade de vida em geral. Dormir bem é fundamental para a recuperação física e psíquica do indivíduo, indispensável para sermos saudáveis e essencial para nos mantermos ativos, concentrados e bem-dispostos. O sono é um equilibrador do humor e das emoções, recupera o corpo e a memória, estimula a criatividade e aumenta e consolida a capacidade de aprendizagem (2,3).

A qualidade do sono é hoje em dia um importante indicador da qualidade de vida global do indivíduo e sua família (1). Segundo a neurologista Teresa Paiva (3) o bem-estar físico e psicológico está dependente de um sono reparador e de qualidade. As crianças e os adultos que dormem pouco têm uma maior propensão para ter um peso aumentado, assim como para desenvolver diabetes tipo 2 e hipertensão arterial. Os adultos e idosos veem, ainda, aumentado o risco de outras patologias como o cancro e a doença de Alzheimer.

Há cada vez mais evidências de que o sono tem influencia sobre os hábitos alimentares e consequentemente sobre o balanço energético e a regulação do peso corporal, estando também associado a outros fatores de risco

metabólico na adolescência (4). Os diferentes estudos demonstram a relação da qualidade do sono com as hormonas e proteínas essenciais ao desenvolvimento físico, cognitivo e emocional.

A redução das horas de sono e os distúrbios do sono estão associadas ao aumento da ingestão de alimentos, a dietas de má qualidade e excesso de peso. Por outro lado uma dieta saudável pode promover o sono e a sua qualidade, dado o seu impacto na síntese de serotonina e melatonina (5).

O papel do sono é fundamental no desenvolvimento cerebral e no equilíbrio metabólico de crianças e adolescentes, o que não deve ser ignorado por pais, educadores e profissionais da saúde (1, 3).

O impacto das alterações do sono, em particular as alterações do ciclo sono-vigília e as dissonais, sobre a vida quotidiana, individual e social é enorme. De referir também que as marcadas mudanças de hábitos sociais, laborais e individuais registadas no último século têm consequências fundamentais na duração e organização do sono-vigília, aumentando consideravelmente as perturbações do sono e o seu impacto na saúde e na sociedade (2).

Vários estudos apontam para uma diminuição do tempo médio de sono, da ordem de hora e meia, relativamente ao início do século passado (6). Cerca de 25% dos portugueses sofrem de insónia crónica (3). No que se refere aos adolescentes e jovens, diversos estudos comprovam que os estudantes portugueses dormem pouco e com pouca qualidade, com prevalências elevadas de sonolência (2). Os distúrbios do sono, como insónia, insuficiência do sono, sonolência diurna e horários irregulares do ciclo sono-vigília, são aspetos frequentemente verificados nos adolescentes e adultos (7).

Objetivando-se relacionar a qualidade do sono com os marcadores endócrinos e bioquímicos procedemos a uma revisão da literatura utilizando os motores de busca *PubMed*, *ScienceDirect*, *B-on*, *Scielo*, no espaço cronológico 2006 a 2016. Foram incluídos artigos em língua portuguesa, espanhola e inglesa, cujo objeto de estudo fosse a qualidade do sono e sua relação com marcadores endócrinos e bioquímicos. Os descritores utilizados contemplaram as seguintes palavras: qualidade do sono, marcadores endócrinos e bioquímicos, obesidade, glucose, risco metabólico, saúde, adolescentes. Foram identificados 65 artigos, analisando a associação da qualidade do sono com os marcadores endócrinos e bioquímicos.

Revisão

O sono é um estado multifuncional, exercendo várias funções fundamentais à homeostasia do organismo. Assume assim funções essenciais na manutenção da vigiância; na conservação da energia; nos mecanismos de termorregulação; no desempenho psicomotor; no desenvolvimento, maturação, equilíbrio e plasticidade cerebral; na estimulação da memória, aprendizagem e funções cognitivas globais; na estabilidade psicoafectiva e nos processos adaptativos; na produção de citocinas fundamentais ao sistema imunitário; na produção de diversas hormonas essenciais ao desenvolvimento e na regulação de inúmeros processos metabólicos (2).

Alterações da qualidade do sono, em particular a privação do sono, aumentam a propensão para o excesso de peso, doença cardiovascular, obesidade, diabetes e hipertensão, existindo ainda um aumento do risco para outras patologias como cancro, doença de Alzheimer e doenças psiquiátricas. Existe também relação entre a redução do sono e o nível de desempenho psicomotor. A falta de horas de sono está correlacionada com o deficit de concentração e de consolidação da memória, dificuldades de raciocínio, alterações no desempenho escolar e horários escolares, hábitos alimentares inadequados, menor prática de exercício físico e sensação de fadiga em qualquer fase do ciclo vital (3, 8, 9, 10).

Embora não tenha sido ainda definido o que se entende por sono ótimo, existem cada vez mais evidências que suportam a ideia de que sono inadequado pode ser um fator que contribui para o excesso de peso e aumento da prevalência de obesidade entre crianças e adolescentes (11).

A redução das horas de sono e os distúrbios do sono estão associadas ao aumento da ingestão de alimentos, a dietas de má qualidade e excesso de peso. Sono inadequado, seja em qualidade ou quantidade, deve ser considerado como um fator de risco plausível para o desenvolvimento de obesidade e diabetes tipo 2 (5).

Com a análise dos diferentes estudos e artigos de revisão sistemática da literatura apresentam-se as potenciais explicações para a relação entre a má qualidade do sono e o aumento da ingestão de alimentos, dietas de má qualidade e conseqüente excesso de peso e risco acrescido de obesidade e diabetes tipo 2.

Estudos recentes sugerem que adultos e crianças que dormem poucas horas têm uma maior probabilidade de apresentarem índice de massa corporal elevado e maior percentagem de massa gorda, dado o aumento da ingestão calórica relacionado com o tempo disponível para comer, mas também com alterações hormonais e cerebrais que motivam a ingestão de alimentos de alta densidade calórica (4,5,12).

A considerar ainda as modificações na resposta cerebral aos estímulos alimentares, provocada por distúrbios circadianos (13,14). Uma elevada variabilidade na duração do sono e contínuas perturbações de sono produzem distúrbios circadianos, o que leva a potenciais efeitos adversos no metabolismo da glucose (15).

Alterações da qualidade e quantidade do sono relacionam-se com baixos níveis de serotonina que podem levar a um aumento do consumo de hidratos de carbono simples, de modo a estimular a secreção de serotonina (4). Perturbações do sono levam à diminuição da leptina e o aumento da grelina (15), provocando uma menor saciedade e aumentando a absorção alimentar.

Poucas horas de sono ou distúrbios do sono estão também associados com indicadores de diabetes tipo 2, como intolerância à glucose, aumento da adiposidade abdominal ou insulino-resistência (4,15,16).

O aumento de ingestão de comida conduz ao aumento dos níveis de cortisol ao final do dia e, conseqüentemente pode diminuir a sensibilidade à insulina na manhã seguinte (5,17). O aumento dos níveis de cortisol promove o consumo de alimentos com alta densidade energética e conseqüente aumento da adiposidade abdominal (18). A ingestão de comida a horas mais tardias pode levar a um aumento da secreção de insulina, causando uma maior eficácia na transformação de glucose em gordura visceral, aumentando a acumulação de tecido adiposo intra-abdominal (19).

A quantidade do sono, mas também a sua qualidade, está associada com a regulação de glucose e funções metabólicas (20,21,22). Em estudos citados por Quist *et al.*, verificou-se a associação entre a fragmentação do sono e alterações adversas no metabolismo da glucose em crianças com distúrbios respiratórios do sono, bem como a diminuída tolerância à glucose em adolescentes com transtorno do sono-vigília do ritmo circadiano (4).

Sono inadequado, seja em qualidade ou quantidade, deve ser considerado como um fator de risco plausível para o desenvolvimento de obesidade e diabetes do tipo 2, em crianças e adultos (5). As perturbações do sono estão relacionadas com o risco de obesidade em crianças e jovens, pelo aumento matinal do cortisol e redução da leptina e maior risco de diabetes tipo 2, pela resistência à insulina (4, 11, 23,24,25).

Alguns mecanismos não associados diretamente com o consumo alimentar também tentam explicar o aumento de peso causado pelas curtas horas de sono, tais como a reduzida oxidação da gordura, a redução na atividade física e o reduzido gasto de energia (15, 24).

Os estudos procuram também uma associação entre sono inadequado e a dislipidemia, focando-se no aumento da ingestão de gordura, aumento da fadiga, reduzida atividade física e alterações na adiponectina, associando-se à regulação do perfil das lipoproteínas (4). Bhattacharjee *et al.*, citados por Quist *et al.* (4) sugeriram a ligação entre o sono e o metabolismo lipídico em crianças, associando a restrição do sono, fragmentação do sono, distúrbios respiratórios do sono e a obesidade com alterações do metabolismo lipídico.

Os mecanismos que podem possivelmente explicar uma associação entre sono inadequado e dislipidemia incluem: aumento da ingestão de alimentos de alta densidade calórica e conseqüente aumento de colesterol, ácidos gordos e gordura saturada; aumento da fadiga diária e conseqüentemente reduzida atividade física; alterações na adiponectina, que para além dos efeitos positivos na homeostasia da glucose, parece também estar associada com a regulação do perfil das lipoproteínas (4,15).

De forma inversa, analisando também a influência do estilo de vida na qualidade e quantidade do sono, o conhecimento científico remanescente dos estudos recentes remete-nos para a influência da alimentação nutricionalmente equilibrada e da atividade física regular na promoção do ciclo circadiano sono-vigília estável e sono de qualidade. Uma dieta saudável pode promover o sono e a sua qualidade, dado o seu impacto na síntese de serotonina e melatonina (5). Os estudos demonstram ainda a influência negativa das horas a ver televisão ou em “ecrãs” e do baixo nível de exercício físico na duração do sono (4,11, 23, 26).

Apesar da relevante evolução dos conhecimentos sobre o sono nas últimas décadas (10) existem lacunas no que se refere a investigações com populações adolescentes, cujos dados possam legitimar intervenções educativas e terapêuticas adequadas e cientificamente fundamentadas (27).

Discussão

As evidências observadas a partir de um número crescente de estudos observacionais sugerem que alterações na qualidade e quantidade do sono estão relacionadas com o excesso de peso, obesidade, diabetes tipo 2 e risco cardiometabólico aumentado em crianças, adolescentes e adultos.

Mais consistentes são as associações entre o sono inadequado e o aumento da ingestão calórica, acúmulo de adiposidade abdominal, alteração na regulação de glicose e funções metabólicas e diminuição da sensibilidade à insulina.

O sono tem influencia sobre os hábitos alimentares e conseqüentemente sobre o balanço energético e regulação do peso corporal. Sono insuficiente aumenta a vulnerabilidade de comer em excesso, com dietas de má qualidade (4,5,12). Alterações da qualidade do sono relacionam-se com baixos níveis de serotonina que podem levar a um aumento do consumo de hidratos de carbono simples, de modo a estimular a secreção de serotonina (4).

Os diferentes estudos remetem-nos para a associação entre o sono inadequado e o aumento da ingestão de alimentos de alta densidade calórica, aumento do cortisol e redução da leptina, aumento da grelina, aumento do tecido adiposo intra-abdominal, alteração do metabolismo da glicose, diminuição da sensibilidade à insulina e maior risco de diabetes tipo 2 (4, 15,19,23, 25).

Os dados observados nos estudos sugerem que sono curto e com perturbações são fatores de risco para adiposidade abdominal em jovens (28) .

A considerar ainda os mecanismos não associados diretamente com o consumo alimentar, mas que também tentam explicar o aumento de peso causado pelas curtas horas de sono, tais como a reduzida oxidação da gordura, a redução na atividade física e o fraco dispêndio de energia, com grande enfoque nos artigos recentes, contudo com estudos inconclusivos em crianças e adolescentes(15) .

A relação entre o sono e a alteração do perfil lipídico são menos consistentes em crianças e adolescentes, dado existirem poucos estudos experimentais realizados nesta população-alvo. No entanto os estudos realizados em adultos são sólidos na associação do sono com a dislipidemia, propondo os principais mecanismos relacionados com a regulação do perfil das lipoproteínas: alterações na regulação do apetite, aumento da ingestão de gordura, aumento da fadiga, reduzida atividade física, alterações na adiponectina e alterações na regulação da glicose (4,15). Permite-nos assim, inferir sobre o impacto do sono inadequado no perfil lipídico.

Globalmente os estudos e evidências científicas sugerem que alterações na qualidade e quantidade de sono estão relacionadas com a alteração dos marcadores endócrinos e bioquímicos e aumento do risco cardiometabólico, tal como é evidenciado na figura 1. De referir que os estudos realizados com crianças e adolescentes são ainda limitados, contudo as potenciais explicações para a relação da qualidade do sono e alterações metabólicas são consistentes e remetem-nos para a importância da investigação e implementação de programas de promoção do sono efetivos e ajustados.

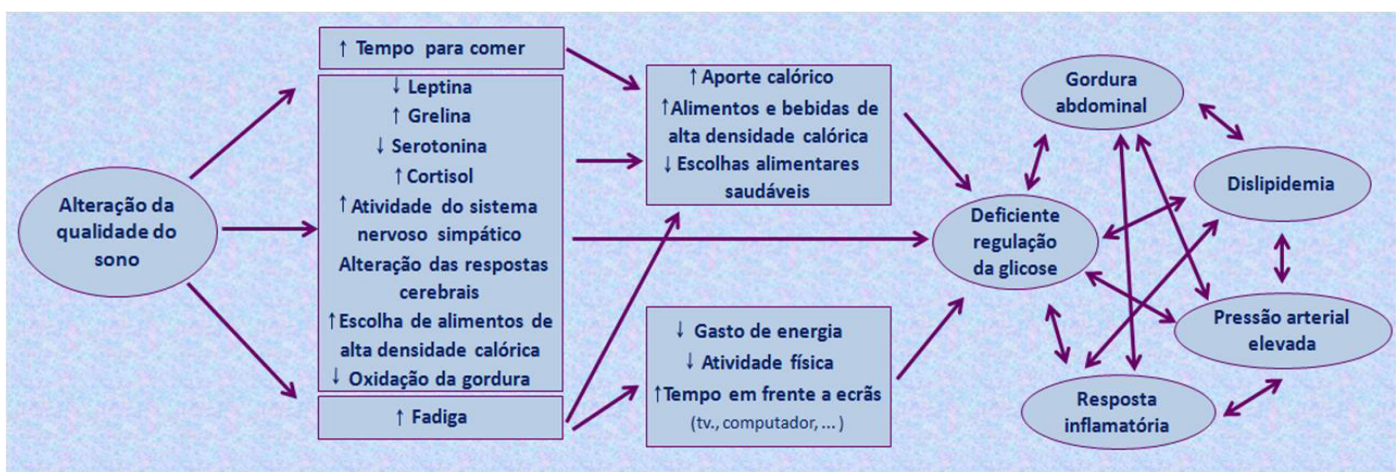


Figura 1 – Vias potenciais que têm sido propostas para relacionar o sono inadequado com o risco metabólico. Adaptado de Quist et al., 2016.

A má qualidade do sono tem um impacto negativo na qualidade de vida, verificando-se que a privação do sono é um fator de risco relevante para a saúde e segurança, aumentando o risco de doenças cardiovasculares, hipertensão, obesidade, diabetes, depressão, ansiedade e outros distúrbios de humor (29).

A intervenção é fundamental. A promoção de bons hábitos de sono desde a infância deve ser encarada como uma componente essencial da promoção da saúde e da prevenção da diabetes, obesidade e risco cardiovascular (1, 5, 29).

Conclusão

Existem várias conexões entre padrões de sono, comportamento alimentar, balanço energético e marcadores metabólicos e endócrinos, devendo a promoção do sono ser incluída como parte essencial do empowerment da comunidade para estilos de vida promotores da saúde (1,5, 29).

As perturbações da qualidade do sono constituem um problema de saúde pública que requer uma intervenção quer a nível individual, quer num âmbito mais vasto, envolvendo a adoção de medidas educativas e de programas de intervenção fundamentados na informação disponível sobre o problema. A realização de investigação na área do sono é fundamental para aumentar o conhecimento sobre a correlação do sono com as diferentes variáveis e consequentemente desenvolver programas de promoção efetivos para as populações-alvo, em particular em crianças e adolescentes (1, 4, 8,23).

Referências

1. Direção Geral da Saúde Programa Nacional de Saúde Escolar. Lisboa: Ministério da Saúde de Portugal, 2015.
2. Paiva T, Penzel T. Centro de Medicina do Sono – Manual Prático. Lisboa: Lidel, 2011.
3. SPN - Sociedade Portuguesa de Neurologia Dia Mundial do Sono. Jornal Comemorativo, 2015.
4. Quist JS, Sjödin A, Chaput JF, Hjorth MF. Sleep and cardiometabolic risk in children and adolescents. *Sleep Medicine Reviews*, 2016; 29, 76-100.
5. Chaput JP. Sleep patterns, diet quality and energy balance. *Physiology & Behavior* 2014 Jul; 134:86–91.
6. Observatório Nacional de Saúde [ONSA]. Uma observação sobre a prevalência de perturbações do sono em Portugal Continental. Lisboa: Ministério da Saúde e ONSA, 2006.
7. Chung KF, Kan KK, Yeung WF. Assessing insomnia in adolescents: comparison of Insomnia Severity Index, Athens Insomnia Scale and Sleep Quality Index. *Sleep Medicine* 2011;12:463-470.
8. Dewald JF, Meijer AM, Oort J, Kerkhof GA, Bogels SM. The influence of sleep quality, sleep duration and sleepiness on school performance in children and adolescents: A meta-analytic review. *Sleep Medicine Reviews*, 2010; 14, 179–189.
9. Cunhal P, Cunhal M, Paiva, T. Gender differences in sleep habits of university students. *Journal Sleep Resources*, suppl 2010; 27-34.
10. Paiva T. Bom Sono, Boa Vida. Cruz Quebrada: Oficina do Livro, 2008.
11. Cappuccio FP, Taggart FM, Kandala NB, Currie A, Peile E, Stranges S, et al. Meta-analysis of short sleep duration and obesity in children and adults. *Sleep* 2008 May; 31(5):619-26.
12. Hart CN, Carskadon MA, Considine RV, Fav JL, Lawton J, ...Raynor HA. Changes in children's sleep duration on food intake, weight, and leptin. *Pediatrics*, 2013; 132(6), 1473-1480.
13. Hasler BP, Dahl RE, Holm SM, Jakubcak JL, Ryan ND, Silk JS, et al. Weekendweekday advances in sleep timing are associated with altered reward-related brain function in healthy adolescents. *Biol Psychol* 2012 Aug; 30; 91(3):334-4.
14. Holm SM, Forbes EE, Ryan ND, Phillips ML, Tarr JA, Dahl RE. Reward-related brain function and sleep in pre/early pubertal and mid/late pubertal adolescents. *J Adolesc Health* 2009 Oct; 45(4):326-34.
15. Schmid SM, Hallschmid M, Schultes B. The metabolic burden of sleep loss. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015 Jan; 3(1):52-62.
16. Ruiz N, Rangel A, Rodriguez C, Rodriguez L, Rodriguez V. Relationship among nocturnal sleep deficit, excess weight and metabolic alterations in adolescents. *Arch Argent Pediatr* 2014 Dec; 112(6):511-8.
17. Anagnostis P, Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Clinical review: the pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: syndrome: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 Aug;94(8):2692-701.
18. Spruyt K, Molfese DL, Gozal D. Sleep duration, sleep regularity, body weight, and metabolic homeostasis in school-aged children. *Pediatrics* 2011 Feb;127(2):345-52.
19. Garaulet M, Ordovas JM, Madrid JA. The chronobiology, etiology and pathophysiology of obesity. *Int J Obes (Lond)* 2010; Dec; 34(12):1667-83.

20. Armitage R, Lee J, Bertram H, Hoffmann R. A preliminary study of slow-wave EEG activity and insulin sensitivity in adolescents. *Sleep Med* 2013; Mar. 14(3):257-60.
21. Zhu Y, Li A, Au C, Kong A, Zhang J, Wong C, et al. Association between sleep architecture and glucose tolerance in children and adolescents. *J Diabetes* 2015; 7:10-5.
22. Koren D, Levitt Katz LE, Brar PC, Gallagher PR, Berkowitz RI, Brooks LJ. Sleep architecture and glucose and insulin homeostasis in obese adolescents. *Diabetes Care* 2011 Nov; 34(11):2442e7.
23. McNeil J, Doucet E, Chaput JP Inadequate Sleep as a Contributor to Obesity and Type 2 Diabetes. *Canadian Journal of Diabetes*, 2013; 37, 103-108.
24. Anic GM, Titus-Ernstof L, Newcomb PA, Trentham-Dietz A, Egan KM. Sleep duration and obesity in a population-based study. *Sleep Medicine*, 2010. 11, 447-451.
25. Padez C, Mourão I, Moreira P, Rosado V. Long sleep duration and childhood overweight/obesity and body fat. *Am J Hum Biol: Off J Hum Biol Counc* 2009; 21(3):371-6.
26. Orzeł-Gryglewska J. Consequences of sleep deprivation. *Int J Occup Med Environ Health*, 2010; 23(1), 95-114.
27. Paiva T, Rebelo-Pinto H. Clínica do sono da criança e do adolescente. In: Paiva T, Andersen M, Tufik S, O Sono e a Medicina do Sono. São Paulo: Ed. Manole Ltda; 2014. p. 599-624.
28. Lakshman R, Elks CE, Ong KK. Childhood obesity. *Circulation* 2012; Oct 2; 126(14):1770-9.
29. Rebelo-Pinto T, Pinto JC, Rebelo-Pinto H, Paiva T. Validation of a three-dimensional model about sleep: Habits, personal factors and environmental factors. *Sleep Science*, Elsevier, 2014; 7, 197-202.

Atividade enzimática da glutathiona como antioxidante em idosos sujeitos a exercício

Joana Sousa¹, Luís Silva², Maria Paula Pacheco³, Cristina Maria Patrício³, Maria Fátima Constantino³, Maria António Castro³, Rui Soles Gonçalves³, Luís Manuel Cavalheiro³, Anabela Correia Martins³, João Paulo Figueiredo⁴, Nádía Osório¹, Fernando Mendes¹, Armando Caseiro¹, António Gabriel¹ e Ana Valado^{1*}

¹Instituto Politécnico de Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Ciências Biomédicas Laboratoriais, Rua 5 de Outubro, S. Martinho do Bispo, Ap. 7006, 3046-854 Coimbra, Portugal

²Fisioterapeuta da Associação Social de Avelãs de Caminho (ASAC), Rua Seabra Fonseca, nº165, 3780-351, Avelãs de Caminho, Anadia, Portugal

³Instituto Politécnico de Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Fisioterapia, Rua 5 de Outubro, S. Martinho do Bispo, Ap. 7006, 3046-854 Coimbra, Portugal

⁴Instituto Politécnico de Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Ciências Complementares, Rua 5 de Outubro, S. Martinho do Bispo, Ap. 7006, 3046-854 Coimbra, Portugal

*autor correspondente: Ana Valado – valado@estescoimbra.pt

jp_sousa10@sapo.pt; ft.luis.silva@sapo.pt; paulap@estescoimbra.pt; cpatricio@estescoimbra.pt; fconstantino@estescoimbra.pt; mac@estescoimbra.pt; ruisolesgoncalves@gmail.com; luisc@estescoimbra.pt; anabelacmartins@estescoimbra.pt; jpfigueiredo@estescoimbra.pt; nadia.osorio@estescoimbra.pt; fjmendes@estescoimbra.pt; armandocaseiro@estescoimbra.pt; agabriel@estescoimbra.pt; valado@estescoimbra.pt

Resumo

Introdução: O envelhecimento é um processo irreversível, com grandes implicações na saúde, favorecendo o aparecimento de patologias. O *stress* oxidativo, resultante do desequilíbrio entre as espécies oxidantes e antioxidantes, é em parte responsável pelo envelhecimento. A glutathiona é um antioxidante de síntese endógena, constituída por glutamato, cisteína e glicina. No seu ciclo a enzima glutathiona peroxidase, converte a glutathiona reduzida em oxidada e a glutathiona redutase, transforma esta em reduzida. Assim, o objetivo foi avaliar o efeito do exercício na atividade das enzimas glutathiona peroxidase e glutathiona redutase em indivíduos idosos. **Material e Métodos:** 14 idosos, distribuídos por 2 grupos, controlo e experimental, sujeitos a um plano de exercícios durante 12 semanas. Efetuaram-se colheitas de sangue venoso em três momentos: T0 antes do exercício, T1 imediatamente após o término e T2 passadas 12 semanas do final do plano. Realizaram-se os kits: *Glutathione Peroxidase Assay* e *Glutathione Reductase Assay*, da *Randox*. Os resultados foram obtidos por leitura no espectrofotómetro *EnSpire*, da *PerkinElmer*. **Resultados:** Ausência de diferenças significativas entre os grupos controlo e experimental, nos diversos tempos e em ambas as enzimas. Contudo, quer na enzima glutathiona redutase, quer na enzima glutathiona peroxidase observou-se uma diminuição significativa das suas atividades de T0 para T1, em ambos os grupos. **Discussão:** A redução da atividade das enzimas glutathiona peroxidase e da glutathiona redutase após o exercício parece sugerir que o plano de exercício poderá não ter sido suficiente para alterar as enzimas; a diminuição pode dever-se à idade, ou a possível desvio da via metabólica antioxidante endógena. **Conclusão:** Nesta amostra o exercício parece não ter influenciado a atividade das enzimas glutathiona peroxidase e redutase.

Palavras-chave: *Stress* oxidativo; Envelhecimento; Glutathiona redutase e peroxidase; Antioxidantes.

Introdução

O envelhecimento é um processo biológico natural e universal que consiste em mudanças morfológicas, funcionais, bioquímicas e psicológicas, com impacto na saúde e na qualidade de vida do indivíduo (1).

Com a idade, surgem mudanças fisiológicas e um dos fatores mais importantes é o sistema imune que se torna menos competente na resposta a infeções e a algumas patologias. Também o mecanismo de reparação do ácido desoxirribonucleico (ADN) perde eficiência revelando maior presença de células mutadas e síntese de proteínas anormais (2).

O envelhecimento pode também estar relacionado com a presença e a ação dos radicais livres no organismo, que condicionam um aumento do consumo de oxigénio na mitocôndria, diminuindo a sua longevidade e, assim, predispondo ao desenvolvimento de certas doenças, entre as quais o cancro e a aterosclerose (2). Os radicais livres são átomos ou moléculas desemparelhados com caráter instável e altamente reativos, ou seja, possuem a capacidade de oxidar elétrons de diversas moléculas da estrutura celular e seus derivados (3). Em organismos aeróbios são produzidos durante o normal funcionamento celular e maioritariamente na forma de espécies reativas de oxigénio (ERO) (4).

Quando em excesso, os radicais livres, podem levar o organismo a um estado de *stress* oxidativo, provocando lesões moleculares nas estruturas celulares, desequilíbrio ou mesmo perda das suas funções. A nível molecular, atuam como potentes agentes oxidantes e são parte da causa do envelhecimento (2). A maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes da célula, diminuídas com o decorrer da idade, incluindo enzimas e moléculas não enzimáticas. Como enzimas temos por exemplo a glutatona peroxidase (GSH-Px), a glutatona redutase (GSR), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). Os antioxidantes não enzimáticos são, entre outros, a glutatona reduzida (GSH), os peptídeos de histidina e as proteínas ligadas ao ferro (5).

A glutatona é um tripéptido de baixo peso molecular, de síntese endógena, composta por glutamato, cisteína e glicina. Tem um grupo tiol na cisteína, é muito abundante e constitui o principal tampão redox intracelular. Como defesa antioxidante, além de outras funções, é quelante de radicais livres, reagindo direta ou indiretamente com eles (4), pelo que a glutatona e todos os intervenientes do seu ciclo constituem um importante sistema de defesa contra o seu aumento no organismo (6). A enzima GSH-Px funciona como mecanismo de proteção contra o *stress* oxidativo, convertendo a glutatona reduzida em glutatona oxidada, removendo o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e formando água (7).

No processo de neutralização dos radicais livres, a glutatona é oxidada com a formação do radical GS. Este radical livre também é reativo, mas reage rapidamente com um segundo radical GS, formando a molécula GSSG, que não é oxidante. A GSSG é novamente reduzida a duas glutatonas pela enzima GPH-R. A GSH é utilizada para regenerar ao seu estado ativo outras moléculas antioxidantes como as vitaminas C e E (4). Esta sua capacidade para regenerar as moléculas antioxidantes mais importantes está associada ao estado redox do par GSSG/GSH (8). Deste modo, o equilíbrio entre a produção de radicais livres, as defesas antioxidantes e a presença de vitaminas são essenciais para o normal funcionamento do organismo (9).

O exercício parece ser um fator importante na ativação de mecanismos antioxidantes. Contudo, há que ter algum cuidado relativamente à frequência, intensidade, duração e tipo de exercício praticado, pois, como se sabe, quando realizado de modo muito intenso, pode levar ao aumento da produção de radicais livres e, conseqüentemente, ao *stress* oxidativo (3).

Assim, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a atividade das enzimas glutatona peroxidase e glutatona redutase em idosos institucionalizados sujeitos a um plano de exercício, durante 12 semanas, seguidas de uma pausa.

Material e Métodos

Amostra

A amostra foi constituída por 14 idosos, distribuídos aleatoriamente pelos grupos experimental ($n=7$) e controlo ($n=7$), com idades compreendidas entre 77 e 88 anos. A participação no estudo tinha como critérios de inclusão ter idade igual ou superior a 75 anos e estar institucionalizado e critério de exclusão a presença de qualquer incapacidade física, que impossibilitasse a realização de exercício.

Plano de exercícios

Os idosos integrados no grupo experimental (GE) realizaram um plano predeterminado de exercícios de força, resistência, equilíbrio, flexibilidade e marcha, durante 12 semanas, sob supervisão do fisioterapeuta.

Método de recolha de dados

O estudo envolveu três momentos distintos de avaliação: **T0** antes de realizar o plano de exercícios, **T1** no término do plano e **T2** decorridas 12 semanas após esse término (10).

As informações sobre a caracterização demográfica, medicação usual, comorbilidades, quedas e utilização de auxiliar de marcha foram obtidas através de inquérito realizado para o efeito. Recorreu-se à escala *Late-Life Function and Disability Instrument* (LLFDI), adaptada e validada para a cultura portuguesa (11), para conhecer o grau funcional e de incapacidade e ao Teste de Diminuição Cognitiva para o nível cognitivo dos participantes.

A colheita sanguínea foi realizada por punção venosa e o sangue distribuído por dois tubos, um com EDTA K₃ e outro sem preparação. Todas as amostras foram centrifugadas a 1800 xg, por 10 min, a 4°C, seguindo-se a separação do soro, plasma e glóbulos em criotubos e conservados a - 23°C, por um período de 8 meses, de forma a efetuar a determinação simultânea da atividade enzimática da totalidade das amostras. Todas as amostras foram efetuadas em duplicado.

Para quantificar a atividade das enzimas glutatona redutase e glutatona peroxidase recorreu-se aos kits *Glutathione Peroxidase Assay Kit* e *Glutathione Reductase Assay Kit*, da casa comercial *Randox Laboratories, United Kingdom*. As técnicas foram realizadas segundo a descrição do kit. A glutatona redutase foi quantificada em soro e a glutatona peroxidase em sangue total. Os resultados foram medidos por espectrofotometria a 340 nm, no equipamento *EnSpire Multimode Plate Reader* da *PerkinElmer*, Singapura.

Estatística

A estatística realizou-se com o programa *SPSS Statistics 22.0* da IBM. Foi aplicada uma análise descritiva e de seguida os testes ANOVA e *t-Student*. Os resultados foram apresentados na forma de média±desvio padrão (DP) e considerados estatisticamente significativos para valores de $p < 0,05$.

Resultados

Caracterização da amostra

Tratados os dados demográficos, os elementos do grupo experimental apresentaram uma média de idades de 83±3,8 anos, sendo 87,5% dos idosos do sexo feminino. Todos revelaram ter várias patologias crónicas, das quais dislipidémia, insuficiência respiratória ou cardíaca, diabetes *Mellitus* ou alterações no sistema nervoso central e afirmaram, tomar no mínimo, 4 medicamentos por dia. No grupo controlo a média de idades registada foi de 84±2,5 anos, sendo 87,5% dos idosos do sexo feminino. Apenas 6,7% não possui nenhuma patologia, os restantes possuem várias das anteriormente referidas. No consumo de fármacos, 85,7% confirmou tomar mais de 4 por dia.

Relativamente a quedas ocorridas nos 6 meses anteriores, 87,5% dos constituintes do grupo experimental não registou nenhuma, enquanto 12,5% caiu uma vez. No total 25% dos idosos não utiliza auxiliar de marcha, 25% desloca-se com ajuda de bengala e os restantes com ajuda de outro auxiliar de marcha. No grupo controlo, 57,1% referiu não ter caído nos 6 meses precedentes, 57% utiliza como auxiliar de marcha a bengala e os restantes outro tipo de auxílio.

A nível cognitivo foram realizados vários desafios e a avaliação fez-se com base nos erros revelados. Em média, foram referidos 7,25 erros no total dos desafios no grupo experimental e 6,14 no controlo.

Após análise dos resultados foi possível registar algumas melhorias ao nível da função física como andar, subir e descer escadas, no tempo entre T0 e T2, no grupo experimental.

Em relação à parte cognitiva os erros registados durante os desafios foram diminuindo gradualmente de T0 (7,3±2,8), para T2 (6,4±2,9).

Atividade enzimática da glutatona redutase

A análise comparativa dos resultados da glutatona redutase entre os grupos controlo e experimental, em T0, T1 e T2, não registou diferenças estatisticamente significativas. No entanto, quando se avaliaram os resultados nos três momentos, em cada grupo observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p=0,0003$ grupo controlo e $p=0,0163$ grupo experimental), figura 1. No grupo controlo mostrou-se uma diminuição significativa da atividade enzimática da glutatona redutase (T0: 18,69±8,63 U/L; T1: 4,80±3,63 U/L), figura 1A. No grupo experimental verificou-se também uma diminuição significativa da atividade enzimática da glutatona redutase (T0: 19,57±10,54 U/L; T1: 7,48±8,78 U/L), figura 1B.

Em ambos os grupos entre T1 e T2 também foi notório um aumento significativo da atividade enzimática da glutatona redutase no grupo controlo (T1: $4,8 \pm 3,6$ U/L; T2: $8,7 \pm 9,3$ U/L) e no grupo experimental (T1: $7,4 \pm 8,7$ U/L; T2: $14,0 \pm 11,0$ U/L), figura 1A e B.

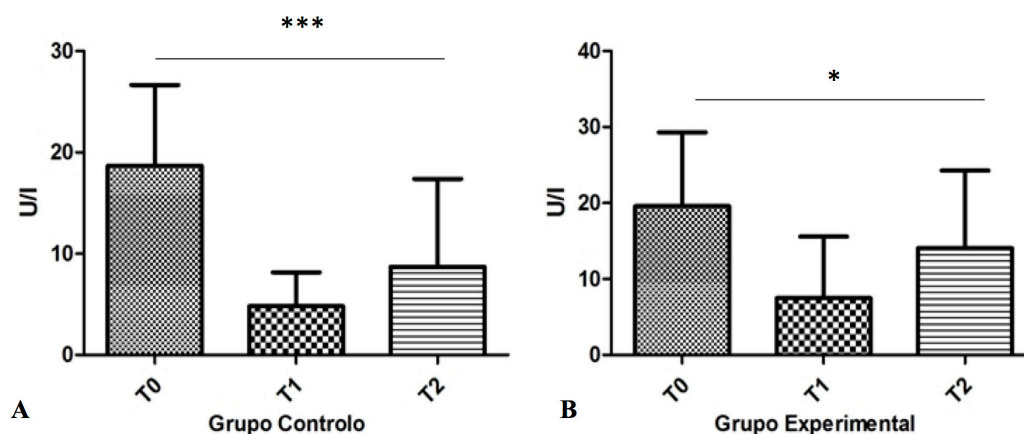


Figura 1 – Atividade da glutatona redutase em T0, T1 e T2 no grupo controlo (A) e no grupo experimental (B). Os resultados apresentam-se em U/L e na forma de média±desvio padrão.

* $p < 0,05$: T0 vs T1 vs T2. *** $p < 0,001$: T0 vs T1 vs T2.

Atividade enzimática da glutatona peroxidase

Ao compararmos os resultados da atividade enzimática da glutatona peroxidase entre os grupos controlo e experimental, nos tempos T0, T1 e T2 não houve diferenças estatisticamente significativas. Após pesquisa das alterações nos 3 tempos em cada grupo, registaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,0218$ grupo controlo; $p = 0,0004$ grupo experimental), figura 2. No grupo controlo observou-se uma diminuição da atividade enzimática da glutatona peroxidase nos 3 tempos (T0: $1087 \pm 244,4$; T1: $758,4 \pm 186,1$; T2: $610,9 \pm 400,0$), figura 2A. No grupo experimental verificou-se, também, um comportamento semelhante com diminuição da atividade enzimática da glutatona peroxidase (T0: $1377 \pm 123,7$; T1: $848,8 \pm 7,6$; T2: $719,2 \pm 45,2$), figura 2B.

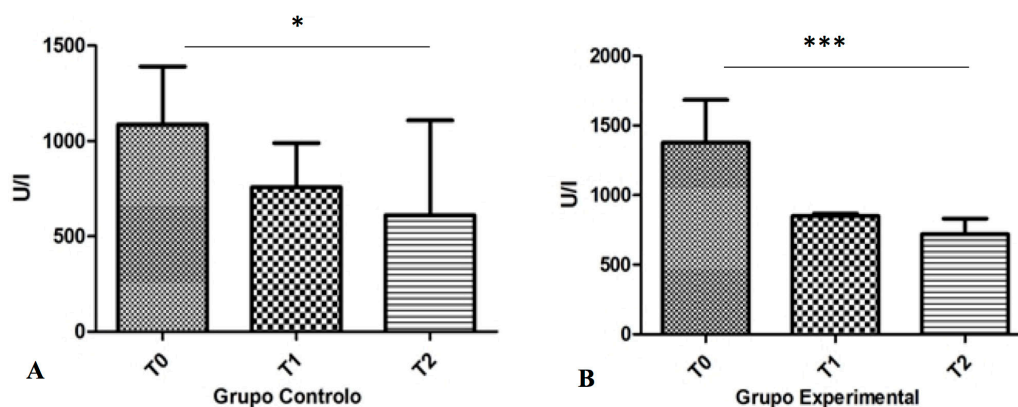


Figura 2 - Atividade da glutatona peroxidase em T0, T1 e T2 no grupo controlo (A) e no grupo experimental (B). Os resultados apresentam-se em U/L e na forma de média±desvio padrão.

* $p < 0,05$: T0 vs T1 vs T2. *** $p < 0,001$: T0 vs T1 vs T2.

Discussão

O envelhecimento é um processo gradual e irreversível que provoca uma perda funcional progressiva no organismo a nível fisiológico, psicológico e social (12). A idade, o estado fisiológico, os hábitos alimentares, o estilo de vida, o estado emocional, o exercício intenso, o envelhecimento e as doenças degenerativas, são fatores que influenciam o *stress* oxidativo no organismo humano (13). Assim, as defesas antioxidantes revelam ser essenciais para minimizar os efeitos do *stress* oxidativo, com a idade. As defesas antioxidantes enzimáticas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase, glutatona redutase, entre outras, estão dispersas por todo o organismo,

tanto a nível intra como extracelular (4) excess free radicals may damage cellular lipids, proteins and DNA, inhibiting his normal function and leading to various diseases. In aerobic organisms, the free radicals are constantly being produced during the normal cellular functioning, mainly in the form of Reactive Oxygen Species (ROS). A eficiência do sistema antioxidante está relacionada com a ingestão nutricional e a produção de enzimas antioxidantes endógenas, que podem sofrer modificações pelo exercício/atividade física, nutrição e envelhecimento (14). Nelson e colaboradores, 2007 referem claramente que a participação de idosos em programas de atividade física é uma forma independente de reduzir e/ou prevenir uma série de declínios funcionais associados ao envelhecimento (15).

No nosso estudo a atividade enzimática da glutathione redutase e da glutathione peroxidase, não mostrou diferenças entre os grupos controlo e experimental, nos tempos T0, T1 e T2. Em contrapartida, analisando os grupos isoladamente observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre T0, T1 e T2. Observou-se uma diminuição da atividade enzimática de T0 para T1, em ambas as enzimas. Os dois grupos apresentaram diferenças significativas quando analisados separadamente, o que não era de todo exetável no grupo controlo, devendo ser mais uniforme nos seus resultados, uma vez que os idosos não realizaram exercício, como os do grupo experimental. Deste modo, as diferenças registadas não podem ser imputadas ao plano de exercício realizado, parecendo-nos que talvez o volume e intensidade concretizados não tenham sido suficientes para produzir as modificações perspetivadas e ainda, que outros fatores devem estar implicados. Pode ser, por exemplo, que a idade avançada esteja a induzir uma redução da atividade enzimática da glutathione. Segundo o estudo de Matsubara e colaboradores 1992, ao comparar indivíduos de 30 anos com os de 69 anos, ambos saudáveis, encontrou resultados que mostraram níveis inferiores de GSH e uma diminuição da atividade enzimática da glutathione redutase e da peroxidase nos mais velhos relativamente aos mais jovens (16). Desta forma poderá justificar-se a diminuição da atividade enzimática da glutathione redutase e da peroxidase nos idosos que constituem a nossa amostra. Outra hipótese pode estar relacionada com um desvio da eficiência na utilização das vias antioxidantes endógenas com o aumento da via mais favorável em detrimento de outra. Por exemplo, um incremento da via de dismutação da superóxido dismutase e diminuição da via da glutathione. Outro aspeto importante é o sistema de transporte via cisteína/glutamato, realizando a troca de glutamato por cisteína, processo que sob condições fisiológicas providencia uma fonte de cisteína para a produção de glutathione, antioxidante endógeno. Caso se verifique um excesso de glutamato extracelular poderá levar à inibição desse transporte ocorrendo assim, uma diminuição da GSH (17). Por outro lado, a quantidade de medicamentos ingeridos diariamente, também pode interferir com a atividade das enzimas GPx e GR e, no mínimo, os idosos tomavam 4 medicamentos por dia.

Contudo, apesar dos nossos resultados não serem relevantes na relação, prática de exercício e aumento do sistema antioxidante, poderá ainda, ser explicado pela composição da nossa amostra, sendo maioritariamente constituída por mulheres. De acordo com o trabalho de Rebelatto e coautores, 2007 evidenciou-se que a prática regular de exercício de intensidade moderada induzia *stress* oxidativo em mulheres, o que, por sua vez, originava uma diminuição significativa nos níveis de GSH, após o exercício realizado em mulheres idosas (18). Ainda, segundo a Sociedade Brasileira de Medicina do Desporto e da Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia, o exercício praticado de forma regular melhora a qualidade de vida do idoso e as suas capacidades funcionais, minimizando os efeitos das alterações fisiológicas, melhorando o seu bem-estar geral, a sua saúde física e psicológica, ajudando a preservar a independência, a controlar as doenças e a minimizar as consequências de determinadas incapacidades (19).

Conclusão

A atividade das enzimas glutathione peroxidase e redutase está diminuída após o exercício, o que parece indicar que não foi o plano de exercício aplicado que determinou a alteração destas enzimas. Eventualmente outros fatores, tais como a idade, a nutrição, ou até, um desvio da via antioxidante endógena tenham condicionado esta redução da atividade das enzimas.

A importância do tema implica ser mais estudado de forma a revelar resultados evidentes, dado que o *stress* oxidativo é uma realidade com grande impacto na nossa saúde, quer benéfico, quer prejudicial e os antioxidantes podem reduzir as consequências negativas provocadas pelo excesso de radicais livres.

Agradecimentos

A equipa de investigação agradece o apoio e financiamento ao Labinsaúde. Projeto co-financiado pelo QREN, no âmbito do Programa Mais Centro, da Comissão de Coordenação da Região Centro e da União Europeia através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional.

Bibliografia

1. Hayflick L. Biological Aging Is No Longer an Unsolved Problem. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1100(1):1–13.
2. Zorrilla García LAE. El Envejecimiento Y El Estrés Oxidativo. *Rev Cuba Investig Biomédicas.* 2002;21(3):178–85.
3. Oliveira EMA de, Assunção EMS, Meneses DYP da SF de. Influência do Exercício Físico no Processo de Envelhecimento e Stress Oxidativo Humano. *FIEP Bull.* 2015;85(1).
4. Ferreira IC, Abreu RM. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Soc Port Bioanalistas da Saúde.* 2007;32–9.
5. Barreiros ALBS, David JP. Stress Oxidativo: Relação Entre a Formação de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. *Quim Nov.* 2006;29(1):113–23.
6. Maher P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev.* 2005;4(2):288–314.
7. Schneider CD, de Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: Mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med do Esporte.* 2004;10(4):308–18.
8. Pastore A, Federici G, Bertini E PF. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta.* 2003;(333):19–39.
9. Valko M, Leibfritz D, Moncol J *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39:44–84.
10. Lindelöf N. Effects and experiences of high-intensity exercises programmes among older people with physical or cognitive impairment. *Dep Heal Sci Div Heal Rehabil Luleå Univ Technol Sweden Tese doutoramento.* 2008;
11. Castanheira P., cavalheiro I. Adaptação e Validação para a cultura portuguesa da Late-Life Function and Disability Instrument (LLFDI) [Dissertação Mestrado na área da Fisioterapia na especialidade do Movimento Humano]. *Inst Politécnico Coimbra Esc Super Tecnol da Saúde Coimbra.* 2013;
12. Maciel MG, Física EDE, Antipoff FH. Atividade física e funcionalidade do idoso. 2010;1024–32.
13. DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. *PhysiolRev.* 2002;v.82(n.1):p.47-95.
14. Sampaio RC, Moraes C De, Pós P De, Humano M, Ciências I De, Cruzeiro U, *et al.* Stress oxidativo e envelhecimento : papel do exercício físico. 2010;506–15.
15. NELSON ME *et al.* Physical Activity and Public Health in Older Adults: Recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;v. 39(n. 8):1435–45.
16. MATSUBARA LS *et al.* Influence of diabetes mellitus on the glutathione redox system of human red blood cells. *J MedBiol Res.* 1992;v.25:331–5.
17. Valli, L.; Sobrinho J. Mecanismo de acção do glutamato no sistema nervoso central e a relação com doenças neurodegenerativas. 18(1):58–67.
18. Activity P, Stress O, Delgado MA, Galan AI, Sánchez RM, Sp SC. Antioxidantes , Atividade Física e Estresse Oxidativo em Mulheres Idosas. 2007;14:4–7.
19. Guerra H. Exercício físico na terceira idade. 2007.

Superoxide dismutase activity in elderly subjected to exercise

Vânia Gomes¹, Luís Silva², Maria Paula Pacheco³, Cristina Maria Patrício³, Maria Fátima Constantino³, Maria António Castro³, Rui Soles Gonçalves³, Luís Manuel Cavalheiro³, Anabela Correia Martins³, João Paulo Figueiredo⁴, Nádia Osório¹, Fernando Mendes¹, Armando Caseiro¹, António Gabriel¹ e Ana Valado^{1*}

¹Polytechnic Institute of Coimbra, Coimbra Health School, Biomedical Laboratorial Sciences, Portugal

²Physiotherapist of the Social Association of Avelãs de Caminho (SAAC), Portugal

³ Polytechnic Institute of Coimbra, Coimbra Health School, Physiotherapy, Portugal

⁴ Polytechnic Institute of Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Complementary Sciences, Portugal

*Corresponding author: valado@estescoimbra.pt

jp_sousa10@sapo.pt; ft.luis.silva@sapo.pt; paulap@estescoimbra.pt; cpatricio@estescoimbra.pt; ftconstantino@estescoimbra.pt; mac@estescoimbra.pt; ruisolesgoncalves@gmail.com; luisc@estescoimbra.pt; anabelacmartins@estescoimbra.pt; jpfigueiredo@estescoimbra.pt; nadia.osorio@estescoimbra.pt; fjmendes@estescoimbra.pt; armandocaseiro@estescoimbra.pt; agabriel@estescoimbra.pt; valado@estescoimbra.pt

Abstract

Introduction: Oxidative stress is defined as the imbalance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses, which is responsible for several pathologies, and also associated with aging. Superoxide dismutase (SOD) is critical in reduction oxidative stress, catalysing the dismutation of the superoxide ion in hydrogen peroxide and oxygen. In acute exercise there is a high production of ROS however, when practiced regularly and moderately it seems to stimulate antioxidant capacity. **Material and methods:** 14 blood samples were collected from individuals aged 77-88 years, at 3 different times: **T0** before exercise, **T1** after 12 weeks of exercise and **T2** after 12 weeks of rest. A combined exercise plan was applied. The activity of the SOD enzyme was determined by the Randox Kit, UK, with a reading on the PerkinElmer spectrophotometer, model EnSpire. The statistic was performed with the SPSS Statistics program (22.0) and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. **Results:** The enzymatic activity of SOD showed differences in the three moments, with a significant increase between T0 and T1 ($p = 0.015$), after exercise. The cognitive activity seems to show an improvement in T1. **Discussion:** Corroborated by the results of other researchers, we stated a significant increase in SOD activity levels after exercise. **Conclusion:** Despite the advanced age of the individuals, the antioxidant activity of the enzyme seems to be stimulated with exercise.

Key words: Oxidative stress; SOD; Exercise; Aging.

Introduction

Oxidative stress is defined as the imbalance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses, which is responsible for several pathologies, and associated with aging. The production of reactive species of oxygen, nitrogen or others, integrates metabolism with important biological functions, such as phagocytosis. When the amount of ROS increases abnormally, the action of antioxidants is required. The harmful effect of free radicals occurs in the presence of excessive amounts in the body, by the inability of neutralization by natural antioxidant systems (1). The ROS are formed by the incomplete reduction of oxygen, generating the superoxide radical, which can undergo dismutation in hydrogen peroxide (2, 3).

The organism has natural systems to eliminate free radicals, which may be enzymatic or not, leading to the elimination or preventing the transformation into products of greater cellular toxicity. The oxidant system includes enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase and peroxidase. SOD plays a key role in reducing oxidative stress by catalyzing the dismutation of the superoxide ion in hydrogen peroxide and oxygen. It is a metalloprotein with metal ions in its structure giving it certain characteristics and functions. According to the composition can be classified as copper zinc SOD (CuZnSOD), manganese SOD (MnSOD), and extracellular SOD (EC-SOD) (4,5). CuZnSOD is encoded as SOD1, located in the cytosol and intermembrane space, very stable and appears to be present in all eukaryotic cells

(6). MnSOD is encoded as SOD2, it is found in the mitochondrial matrix, plays an important role in the defense against ROS in eukaryotic mitochondria, allowing to maintain the redox balance of the immune system, it is also essential in the maintenance of cellular homeostasis (7-9). EC-SOD catalyzes the dismutation of the superoxide radical in hydrogen peroxide and oxygen in the interstitial spaces of tissues and extracellular fluids, such as plasma, lymph and synovial fluid, and also plays an important role in the regulation of erythropoietin, in the preservation of vascular tone, pulmonary function, and pathologies such as atherosclerosis, diabetes, and arthritis (10,11). Mitochondria is the main source of ROS production, with several origins such as intensive exercise(5). The situations of acute and intense exercise increase the consumption of oxygen and increase the production of ROS (12). According to several studies, it can be said that the cellular and tissue injury caused by free radicals, lipid peroxidation and inflammation, happens after exercise, mainly with high intensity efforts (13,14). However, it's known that the practice of regular exercise, frequent and of moderate intensity can induce adaptation of the antioxidant system, contributing to reduce oxidative stress. Some studies carried out in older people have shown that resistance training, working strength and muscle power is beneficial, with the elderly being subjected to this training in a situation of acute exercise, respond more effectively to the oxidative stress caused by this exercise, compared to individuals with similar age but, sedentary (15,16). In addition to the harmful effects of ROS and oxidative stress, it's also known that aging is a consequence of the action of both endogenous free radicals produced in mitochondria and exogenous, UV radiation, and environmental factors such as pollution. Some researchers have observed the importance of oxidative stress, the antioxidant system, as well the influence of exercise on aging, and demonstrated an association of SOD with anti-aging effects, acting positively on all degenerative processes (17-19). It seems pertinent to constantly evaluate the influence of exercise on oxidative stress and the adaptation of the antioxidant system when an organism undergoes regular exercises. Since oxidative stress is closely related with some pathologies, the elimination of ROS, namely by stimulating SOD activity, can be an effective strategy in preventing these diseases, developing ways to delay the harmful effects of aging by increasing the quality of Life of the elderly (20).

Thus, the objective of this study was to investigate if the SOD activity expressed changes in older adults when subjected to an exercise plan for 12 weeks, followed by a pause of the same time, constituting an antioxidative stress defense.

Material and methods

Subjects

The sample involved 14 individuals, divided randomly by the control and experimental groups, aged between 77 and 88 years. Integration into the study had age as an inclusion criterion, aiming to evaluate individuals aged 75 or over and institutionalized.

Exercise plan

The individuals integrated in the experimental group performed a predetermined plan of strength, resistance, balance, flexibility and gait exercises for 12 weeks, under the supervision of a physiotherapist, according to Lindelöf, 2008 (21).

Method of data collection

The study had 3 different moments of evaluation: **T0** before performing the exercise plan, **T1** after 12 weeks of exercise and **T2** after a 12 weeks pause without exercise. Demographic characterization, usual medication, comorbidities, falls and use of walking aid were recorded in an appropriate survey. As a complement, the Late Life Function and Disability Instrument (LLFDI) scale was adapted and validated for Portuguese culture in order to understand the functional and disability degree (22, 23). For the cognitive level the cognitive impairment test was applied.

Blood collection was performed for anticoagulant tube (EDTA K₂) at 3 different times (T0, T1 and T2). In the laboratory the samples were properly treated and stored at -23 °C until analysis.

The SOD activity in erythrocytes was performed with the Randox Commercial Kit, United Kingdom, following protocol and indications. The reading was performed at 340 nm on the PerkinElmer spectrophotometer model EnSpire, Singapore. The technique was run on microplate, all samples were processed in duplicate and the results presented in U/L.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the program SPSS version 22.0 (IBM). Was performed descriptive

analysis and dispersion measurements. The Student's t test was applied for paired samples, comparing the times (T0, T1 and T2) separately and the Wilcoxon t test verifying the behavior of the samples. The results were shown as mean \pm standard deviation (SD) and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Sample characterization

The demographic characterization of the experimental group (EG; $n = 7$) and the control group (CG; $n = 7$) is shown in table 1. EG mean age was 83.0 ± 3.8 years and CG was 84.0 ± 2.5 years. In each group 6 individuals were female and 1 was male. The elderly manifested several chronic conditions, such as dyslipidemia, respiratory or cardiac insufficiency, central nervous system diseases or diabetes mellitus, and reported taking at least 4 medications per day. In the CG 6.7% of the elderly didn't manifest any pathology, the rest have several of them.

Table 1 – Demographic characterization of the sample

	EG (n=7)	CG (n=7)
Age (years)	$83,0 \pm 3,8$	$84,0 \pm 2,5$
(min/max)	77/86	82/88
Sex (female/male)	6/1	6/1
Weight (kg)	$74,3 \pm 17,5$	$72,7 \pm 10,5$
(min/max)	54/106	62/86
height (cm)	$150,0 \pm 5,2$	$152,5 \pm 8,4$
(min/max)	141/157	142/167

Results are presented as mean \pm standard deviation. EG - Experimental Group; CG - Control Group

Regarding falls recorded in the 6 months prior to the study, 87.5% of the elderly of the experimental group did not indicate any registry, while 12.5% fell once. In all, 25% of the elderly do not use walking aid, 25% move with the aid of a walking stick and the rest with the help of another walking aid. In the control group, 57.1% reported not having fallen in the previous 6 months, 57% used as walking aid the cane and the remaining other type of aid.

At the cognitive level, several challenges were realized and the evaluation was made based on the revealed errors. Regarding the cognitive part, errors recorded during the challenges were gradually reduced from T0 (7.3 ± 2.8) to T2 (6.4 ± 2.9), table 2.

Table 2 – Cognitive evaluation in the experimental group

	T0	T1	T2
Errors made by the elderly	$7,3 \pm 2,8$	$5,9 \pm 2,7$	$6,4 \pm 2,9$

T0 – before the exercise; T1 – after 12 weeks of exercise; T2 – 12 weeks after the end of the exercise.

In the end it was possible to register some improvements in physical function such as walking, climbing and descending stairs, in the time between T0 and T2, in the experimental group.

Superoxide dismutase activity

The comparative analysis of the results of the SOD activity between the control and experimental groups at the various moments (T0, T1 and T2) showed no significant differences. However, when the results were evaluated in the three moments, in each group there were statistically significant differences ($p = 0.015$) in the experimental group between T0 and T1. At the time T1, after 12 weeks of exercise, the mean value of SOD activity 116.32 ± 17.02 U/L was higher than T0 (100.9 ± 8.5 U/L), table 3.

In the control group there were no differences between the mean values at the three moments.

Table 3 – Evaluation of superoxide dismutase activity

	T0	T1	T2
SOD - EG	100,9±8,5	116,3±17,0*	97,6±13,0
SOD - CG	108,2±16,2	107,9±9,9	102,7±34,1

T0 – before the exercise; T1 – after 12 weeks of exercise; T2 – 12 weeks after the end of the exercise; EG-experimental group; CG—control group; Results are presented as mean ± standard deviation in U/L.

**p* value<0,05 (T0 vs T1)

Discussion

Many researchers studied the antioxidant system and observed a possible relationship between increased activity of the various enzymes in this system when stimulated by exercise (14, 22). Combining several exercise programs according to each study, many results point to an increase in the activity of the SOD enzyme, important in the removal of ROS, after exercise (24, 25). Also, there seems to be a possible adaptation of the organism to the training, allowing to maintain these enzymes elevated during some time (26).

In the present study, the cognitive evaluation of the errors made by the experimental group seems to decrease after exercise compared to T0, and there seems to be a favorable trend in physical and cognitive function with moderate and controlled exercise.

Also the activity of the SOD enzyme in the three moments revealed a statistically significant increase in T1 compared to T0, decreasing in T2, manifesting a stimulation of the SOD activity after exercise. Our results corroborate with those described by other researchers who applied tai chi, swimming and yoga exercises respectively, and registered significant differences in SOD values before and after exercise, increasing SOD activity with exercise (24, 25, 27). The increase in SOD activity and consequently antioxidant defenses with the practice of controlled and moderate exercise programs performed regularly tend to be beneficial to the body, increasing the activity of enzymatic antioxidants. In the present study, the levels found at 12 weeks after the end of the exercise did not show a possible adaptation to the training, since in T2 the values were close to T0. This can be justified by the advanced age of the individuals, making it difficult to perform some exercises, or the possibility of the short duration of the exercise plan applied, taking into account the target population. However, the performance of the exercise shows to be beneficial increasing the activity of SOD and demonstrating also, although with small changes, advantages in cognitive and physical level. However, we recognize the fragility of our study by the low number of participants.

The antioxidant system has been intensively studied because of its importance as a defense against several pathologies and the need to keep the oxidant species in balance. Ji LL in 1993, performed a study in mice applying successive stimuli through exercise and found an increase in the activity of the enzymes of antioxidant system (28). A recent study by Ha and colleagues, 2015 (23,25) performed in women showed an increase in SOD activity after performing 16 weeks of yoga exercises, obtaining a significant difference, and realizing that moderate exercise is favorable (25). This study also supports our results, since our sample is made up mostly of women. Moreover, Hwang and coauthors, 2007 found a positive response of the SOD enzyme in a population that was subjected to controlled hydrotherapy exercises, showing an increase of SOD, after a stimulus of 10 weeks (27). Ceci and colleagues, 2013 evaluated the antioxidant system in elderly individuals subject to resistance training and concluded that the elderly in the study developed more capacities and higher levels of SOD, when compared with sedentary individuals of the same age group (15).

According to our study and those presented, all corroborate the same conclusion it seems to be a great tendency for the moderate practice of the exercise to be beneficial in the stimulation of the antioxidant system, allowing the maintenance of the balance. It is also known that besides being related to several pathologies, free radicals are also the basis of aging, which makes it more important to eliminate them.

The theory that aging results from lesions caused by free radicals was credited to Denham Harman in 1956 (29). He studied mice and found that free radicals shortened the life span of the animals and produced similar changes to aging. According to this theory, the slow development of irreversible cellular lesions leads to aging, and the chemical and enzymatic oxidations involved in the formation of free radicals accelerate the phenomenon of aging (29). Considering the relationship between aging and formation of free radicals, several studies have been carried out (19,28,30). It is

concluded that eliminating free radicals (in various forms) can delay and decrease aging mainly at the cutaneous level (31).

Thus, it is important to evaluate the impact of exercise on reducing the formation of free radicals and applying it to the elderly, as we know that we are reducing one of the causes of aging.

However, we recognize some limitations to the study due to the small samples, which justify the future replication of the study with a greater number of elderly, and to determine other parameters such as glutathione, nitric oxide and malonildialdehyde, important markers of oxidative stress.

Conclusion

Knowing the several processes and associated pathologies with oxidative stress, it is pertinent to investigate those relationships, as well as the factors that can interfere in the maintenance of the balance between oxidative and antioxidant species. This study sought to understand how to reduce oxidative stress and consequently its harmful effects. Despite the advanced age of the sample, significant differences were found, similar to other studies. In this way, it is important to promote personalized programs of moderate exercise, under supervision of a physiotherapist, monitoring its benefit in health and aging process, improving the quality of life, even in the oldest populations.

Acknowledgments

The research team thanks the support and funding to the Labinsaúde. Project co-financed by the NSRF under the Greater Center Program of the Coordination Commission of the Central Region and the European Union through the European Regional Development Fund.

References

1. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signalling. *Cellular signalling*. 2012;24(5):981-90.
2. Koskenkorva-Frank TS, Weiss G, Koppenol WH, Burckhardt S. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free radical biology & medicine*. 2013;65:1174-94.
3. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*. 2014;224:164-75.
4. Carillon J, Rouanet JM, Cristol JP, Brion R. Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action. *Pharmaceutical research*. 2013;30(11):2718-28.
5. O'Brien KM, Dirmeier R, Engle M, Poyton RO. Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(50):51817-27.
6. Letendre J, Chouquet B, Rocher B, Manduzio H, Leboulenger F, Durand F. Differential pattern of Cu/Zn superoxide dismutase isoforms in relation to tidal spatio-temporal changes in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology : CBP*. 2008;148(3):211-6.
7. Jia H, Sun R, Shi W, Yan Y, Li H, Guo X, *et al*. Characterization of a mitochondrial manganese superoxide dismutase gene from *Apis cerana cerana* and its role in oxidative stress. *Journal of insect physiology*. 2014;60:68-79.
8. Qiu X, Aiken KJ, Chokas AL, Beachy DE, Nick HS. Distinct functions of CCAAT enhancer-binding protein isoforms in the regulation of manganese superoxide dismutase during interleukin-1beta stimulation. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(38):25774-85. Epub 2008/06/19.
9. Umasuthan N, Revathy KS, Bathige SD, Lim BS, Park MA, Whang I, *et al*. A manganese superoxide dismutase with potent antioxidant activity identified from *Oplegnathus fasciatus*: genomic structure and transcriptional characterization. *Fish & shellfish immunology*. 2013;34(1):23-37.
10. Skrzycki M, Czczot H. [Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD)--structure, properties and functions]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2004;58:301-11. Zewnatzkomorkowa dysmutaza ponadtlenkowa (EC-SOD)--budowa, wlasciwosci i funkcje.
11. Zelko IN, Folz RJ. Extracellular superoxide dismutase functions as a major repressor of hypoxia-induced ery-

- thropoietin gene expression. *Endocrinology*. 2005;146(1):332-40.
12. Porter C, Reidy PT, Bhattarai N, Sidossis LS, Rasmussen BB. Resistance Exercise Training Alters Mitochondrial Function in Human Skeletal Muscle. *Medicine and science in sports and exercise*. 2015;47(9):1922-31.
 13. Parker L, McGuckin TA, Leicht AS. Influence of exercise intensity on systemic oxidative stress and antioxidant capacity. *Clinical physiology and functional imaging*. 2014;34(5):377-83.
 14. Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, *et al*. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *European journal of applied physiology*. 2001;84(1-2):1-6.
 15. Ceci R, Beltran Valls MR, Duranti G, Dimauro I, Quaranta F, Pittaluga M, *et al*. Oxidative stress responses to a graded maximal exercise test in older adults following explosive-type resistance training. *Redox biology*. 2013;2C:65-72.
 16. Shahar S, Kamaruddin NS, Badrasawi M, Sakian NI, Abd Manaf Z, Yassin Z, *et al*. Effectiveness of exercise and protein supplementation intervention on body composition, functional fitness, and oxidative stress among elderly Malays with sarcopenia. *Clinical interventions in aging*. 2013;8:1365-75.
 17. Hirata LL, Sato MEO, Santos CAdM. Free radicals and skin aging. 2004;23(3).
 18. Park G, Kim TM, Kim JH, Oh MS. Antioxidant effects of the sarsaparilla via scavenging of reactive oxygen species and induction of antioxidant enzymes in human dermal fibroblasts. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2014;38(1):305-15.
 19. Vasilaki A, van der Meulen JH, Larkin L, Harrison DC, Pearson T, Van Remmen H, *et al*. The age-related failure of adaptive responses to contractile activity in skeletal muscle is mimicked in young mice by deletion of Cu,Zn superoxide dismutase. *Aging cell*. 2010;9(6):979-90.
 20. Volvaard NB, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress:myths, realities and physiological relevance. *Sports Med*. 2005;35(12):1045-62. Epub 2005/12/13.
 21. Nordin E, Lindelof N, Rosendahl E, Jensen J, Lundin-Olsson L. Prognostic validity of the Timed Up-and-Go test, a modified Get-Up-and-Go test, staff's global judgement and fall history in evaluating fall risk in residential care facilities. *Age and ageing*. 2008;37(4):442-8.
 22. Daussin FN, Zoll J, Ponsot E, Dufour SP, Doutreleau S, Lonsdorfer E, *et al*. Training at high exercise intensity promotes qualitative adaptations of mitochondrial function in human skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 2008;104(5):1436-41.
 23. Castanheira P. CI. Adapt and validation for the Portuguese culture of Late-life Function and Disability Instrument (LLFDI). 2013.
 24. Huang XY, Eungpinichpong W, Silsirivanit A, Nakmareong S, Wu XH. Tai chi improves oxidative stress response and DNA damage/repair in young sedentary females. *Journal of physical therapy science*. 2014;26(6):825-9.
 25. Ha MS, Kim DY, Baek YH. Effects of Hatha yoga exercise on plasma malondialdehyde concentration and superoxide dismutase activity in female patients with shoulder pain. *Journal of physical therapy science*. 2015;27(7):2109-12.
 26. Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol (1985)*. 1995;79(3):675-86.
 27. Hwang HJ, Kwak YS, Yoon GA, Kang MH, Park JH, Lee BK, *et al*. Combined effects of swim training and ginseng supplementation on exercise performance time, ROS, lymphocyte proliferation, and DNA damage following exhaustive exercise stress. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition*. 2007;77(4):289-96.
 28. Ji LL. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Medicine and science in sports and exercise*. 1993;25(2):225-31.
 29. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*. 1956;11(3):298-300.
 30. Meydani M, Evans WJ, Handelman G, Biddle L, Fielding RA, Meydani SN, *et al*. Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *The American journal of physiology*. 1993;264(5 Pt 2):R992-8.
 31. Seynnes O, Fiatarone Singh MA, Hue O, Pras P, Legros P, Bernard PL. Physiological and functional responses to low-moderate versus high-intensity progressive resistance training in frail elders. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2004;59(5):503-9.

Capacidade Funcional e Adesão ao Regime Terapêutico: A realidade de uma população idosa

Marcos, A.⁽¹⁾; Magalhães, C.P.⁽²⁾; Fernandes, A.M.P.S.⁽²⁾; Mata, M.A.P.⁽²⁾;

Unidade Local Saúde do Nordeste; ⁽²⁾ Instituto Politécnico de Bragança – ESSa
alipiomarcos@gmail.com; cmagalhaes@ipb.pt; adilia@ipb.pt; augustamata@ipb.pt

Resumo

Introdução: Em idades mais avançadas é comum encontrar-se um maior risco da presença de patologias, essencialmente de cariz crónico, sendo estas por enumeras vezes responsáveis, por um lado, pela necessidade de um maior consumo do número de fármacos, por outro, por uma perda da capacidade funcional. **Objetivo:** Avaliar a relação entre a adesão terapêutica e a capacidade funcional da pessoa idosa na realização das atividades de vida diária. **Material e método:** Desenhou-se um estudo descritivo, analítico, transversal de cariz quantitativo. A população alvo incluiu idosos do concelho de Macedo de Cavaleiros. Aplicou-se um formulário constituído por questões sociodemográficas e clínicas, pela escala de Barthel e pela escala Medida de Adesão Terapêutica (MAT). **Resultados:** Obteve-se uma amostra de 376 pessoas idosas, maioritariamente do sexo feminino (56,6%), com maior predomínio do estado civil casado/união de facto (48,4%). Verificou-se ainda que 44,1% da amostra refere viver com o cônjuge e a maioria (55,9%) não possui qualquer tipo de apoio domiciliário. Do total de inquiridos, 67,29% foram considerados independentes, 26,86% como ligeiramente dependentes e 5,85% como moderadamente dependentes. Verificaram-se valores médios mais baixos de adesão ao regime terapêutico medicamentoso no grupo dos que se encontravam na categoria ligeiramente/moderadamente dependentes, comparativamente ao grupo dos independentes, com significância estatística ($p=0,000$). **Conclusão:** Atendendo às responsabilidades das instituições de saúde para com o processo de adesão ao regime terapêutico, será fulcral envolver equipas multidisciplinares, redes de apoio social informais ou formais, que apostem na identificação atempada das necessidades das pessoas idosas, com consequente definição e implementação de intervenções/programas de boas práticas, que visem a melhor adesão terapêutica possível.

Palavras Chave: Pessoa idosa; Capacidade funcional; Adesão terapêutica.

Introdução

Em Portugal, nas últimas décadas, o aumento da esperança média de vida, o aumento do índice de envelhecimento, bem como do índice de longevidade, são uma realidade. Tendo por base os últimos censos realizados pelo Instituto Nacional de Estatística (INE), entre 2001 e 2011, o índice de envelhecimento aumentou de 102,23 pessoas idosas por cada 100 jovens, para 127,8 (1). O concelho de Macedo de Cavaleiros constitui um dos concelhos com um envelhecimento demográfico exacerbado, pois em 2011 o índice de envelhecimento alcançou os 240 (2), acarretando preocupações, mas também desafios.

O envelhecimento é um processo dinâmico e progressivo, responsável por alterações morfológicas, bioquímicas e psicológicas. Estas alterações contribuem para uma perda da capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente e para a sua maior vulnerabilidade aos processos patológicos que acabam por torná-lo dependente e levá-lo à morte (3). Em idades mais avançadas existe um maior risco da presença de patologias, essencialmente de cariz crónica, sendo estas por enumeras vezes responsáveis, por um lado, pela necessidade de um maior consumo do número de medicamentos, por outro, por um aumento do grau de dependência da pessoa idosa nas atividades básicas de vida diária. As patologias crónicas podem representar um "... alto custo na assistência à saúde, além de propiciarem o surgimento de complicações com grande interferência no grau de dependência e qualidade de vida das pessoas" (4). Vários estudos revelam que os utentes portadores de patologia crónica são os que menos aderem à terapêutica (5).

A Organização Mundial de Saúde considera como determinantes na adesão à terapêutica: os fatores económicos e sociais, o sistema de saúde, as características da doença, a terapêutica e o utente (6).

Face ao anteriormente exposto, pretendeu-se neste estudo avaliar a relação entre a adesão terapêutica e a capacidade funcional da pessoa idosa na realização das atividades de vida diária.

Material e Métodos

Visando alcançar o objetivo proposto, desenhou-se um estudo observacional, descritivo, analítico de caráter transversal.

Amostra: A população idosa (indivíduo com idade igual ou superior a 65 anos) do Concelho de Macedo de Cavaleiros era constituída por 4455 indivíduos. Recorrendo-se a uma amostragem acidental, obteve-se uma amostra de 376 indivíduos. Utilizaram-se como critérios de inclusão: i) utentes com idade igual ou superior a 65 anos; ii) utentes em tratamento farmacológico. Paralelamente definiram-se como critérios de exclusão: i) utentes não orientados no espaço e no tempo; ii) utentes com dificuldades de comunicação (ex: impossibilidade de falar).

Instrumento de recolha de dados: Como instrumento de recolha de dados, aplicou-se um formulário constituído pela caracterização sociodemográfica e clínica, bem como pelas escalas: Barthel e Medida de Adesão Terapêutica (MAT). A escala de Barthel avalia a capacidade funcional ao nível de dez atividades de vida diária, tendo sido já validada para Portugal por Araújo, Pais Ribeiro, Oliveira e Pinto, numa amostra de 209 idosos não institucionalizados (7). A pontuação mínima de zero corresponde à máxima dependência, e a máxima de 100 corresponde à independência total. Sequeira, numa versão do Índice de Barthel, com uma redação dos itens ligeiramente distinta, mas avaliando conteúdo semelhante, apresentou os seguintes pontos de corte: 90-100 Independente; 60-90 Ligeiramente dependente; 40-55 Moderadamente dependente; 20-35 Severamente dependente; <20 Totalmente dependente (8). A escala MAT foi adaptada para Portugal por Delgado e Lima (9), sendo constituída por 7 itens, correspondendo cada item a uma questão do âmbito com seis possibilidades de resposta. A classificação de adesão ao regime terapêutico medicamentoso foi realizada a partir da mediana do nível de adesão, isto é, valores de mediana abaixo de 5 consideram-se não aderentes e valores iguais ou superiores a 5 são considerados aderentes, tal como o efetuaram Monterroso, Pierdevara e Joaquim (10).

Procedimentos éticos, de recolha e tratamento de dados: Envolvendo idosos da comunidade (em meio rural e urbano), a recolha de dados foi efetuada nos dois primeiros meses de 2013. Inicialmente explicou-se o objetivo de estudo, solicitando-se a colaboração da pessoa idosa. Disponibilizou-se o consentimento informado, construído de acordo com os princípios da declaração de Helsínquia e a Convenção de Oviedo, que regulamenta a investigação com seres humanos. Para tratar os dados, recorreu-se ao *SPSS for Windows (versão 20.0)*. Realizou-se uma análise descritiva dos dados em função da natureza das variáveis em estudo, utilizando-se as medidas estatísticas como: frequências absolutas e relativas, média e desvio padrão. Para o estudo da adesão à terapêutica medicamentosa, em função da capacidade funcional, operacionalizou-se esta última em duas categorias (idosos independentes e idosos ligeiramente/moderadamente dependentes), aplicando-se o teste paramétrico *t de Student*, uma vez verificados os pressupostos inerentes à sua utilização.

Resultados

Procedemos inicialmente a caracterização sociodemográfica (tabela 1) e clínica (tabela 2) da amostra. A maioria da amostra obtida é do sexo feminino (56,6%; n=213). A sua idade média situa-se nos 78,8±8,11 anos. Quanto à idade por classes, 41,5% (n=156) tem idade compreendida entre 76 a 85 anos. Quanto ao estado civil, 48,4% (n=182) estão casados ou em união de facto. No que confere às habilitações literárias, 44,6% (n=168) não sabe ler nem escrever e 40,7% (n=153) sabe ler e escrever. Relativamente à coabitação, 44,1% (n= 166) vive com o cônjuge. A maioria da amostra refere usufruir de apoio domiciliário.

Quanto ao número de doenças, a amostra apresenta uma média de 3,34±1,45 doenças. Constata-se que 46,5% (n=175) da amostra padece de três a quatro doenças. Quanto ao número de medicamentos, em média cada inquirido toma 6,38±3,29 medicamentos por dia. Esta variável foi operacionalizada em três categorias, verificando-se que 51,3% (n=193) refere tomar de cinco a nove medicamentos. A maioria dos inquiridos (87,2%; n=328) refere que às vezes necessita de orientação na preparação da medicação (tabela 2).

Tabela 1 – Caracterização sociodemográfica

Variáveis Sociodemográficas		n	%
Sexo	Feminino	213	56,6
	Masculino	163	43,4
Idade	65-75 anos	132	35,1
	76-85 anos	156	41,5
	Mais de 85 anos	88	23,4
	Média	Desvio padrão	
	78,80	8,11	
Estado Civil	Solteiro	22	5,9
	Casado/União de facto	182	48,4
	Divorciado/Separado	1	0,3
	Viúvo	171	45,4
Habilitações literárias	Não sabe ler/ escrever	168	44,6
	Sabe ler e escrever	153	40,7
	1.º ciclo	38	10,1
	2.º ciclo	9	2,4
	3.º ciclo	3	0,8
	Secundário	3	0,8
	Curso Técnico/ Superior	2	0,6
Coabitação	Cônjuge	166	44,1
	Familiar	69	18,4
	Sozinho	141	37,5
Apoio domiciliário	Sim	166	44,1
	Não	210	55,9

Tabela 2 – Caracterização clínica

Variáveis Clínicas		n	%
Nº de doenças	Uma a duas	120	31,9
	Três a quatro	175	46,6
	Mais de quatro	81	21,5
	Média	Desvio padrão	
3,34	1,45		
Nº de medicamentos	Até quatro	128	34,0
	De cinco a nove	193	51,3
	Dez ou mais medicamentos	55	14,6
	Média	Desvio padrão	
6,38	3,29		
Necessita de orientação na preparação da medicação	Nunca	17	4,5
	Às vezes	328	87,2
	Sempre	31	8,2

Do total de inquiridos, tendo por base a capacidade funcional para as atividades de vida diária, 67,29% foram considerados independentes, 26,86% como ligeiramente dependentes e 5,85% como moderadamente dependentes (gráfico 1).

Tendo por base o critério de classificação de adesão ao regime terapêutico medicamentoso, constatamos que 80,9% (304) da amostra inquirida enquadra-se na categoria não aderente e 19,1% (n=72) na categoria aderente (gráfico 2).

Gráfico 1 – Caracterização da amostra segundo o grau de dependência

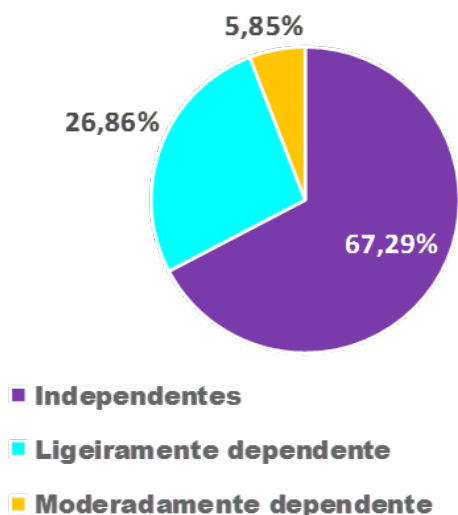
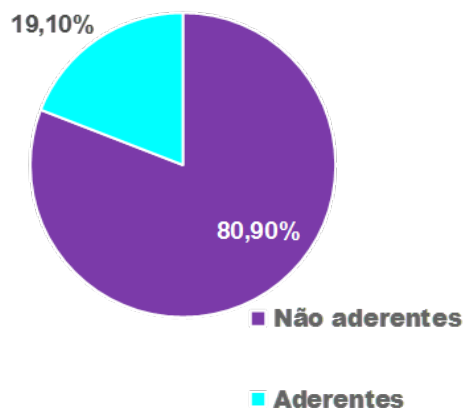


Gráfico 2 – Percentagem de aderentes e não aderentes ao regime terapêutico medicamentoso



Operacionalizada a variável capacidade funcional em duas categorias, constata-se a existência de valores médios mais baixos de adesão ao regime terapêutico medicamentoso no grupo das pessoas idosas que se encontram na categoria ligeiramente/moderadamente dependente, comparativamente ao grupo dos idosos incluídos na categoria independente, diferença esta, estatisticamente significativa ($p=0,000$), como se pode observar na tabela 3.

Tabela 3 – Relação entre a variável capacidade funcional e os valores médios obtidos no MAT

Variável	n	Média	Desvio padrão	Teste	Valor de prova
Capacidade Funcional - Índice de Barthel -	Independente	253	4,41	<i>t de Student</i>	0,000
	Ligeira/Moderadamente dependente	122	3,69		

Discussão

Tendo por base o critério comumente utilizado na categorização da Polimedicação, que a define como aquele indivíduo que consome cinco ou mais fármacos por dia (11), constatamos que a maioria da amostra estudada se enquadra na mesma. Com base nos resultados obtidos com o MAT, constatamos que uma elevada percentagem de idosos é considerada não aderente ao regime terapêutico medicamentoso (80,9%), corroborando com outros estudos, como por exemplo o do Monterroso, Joaquim e Sá, onde procuraram avaliar a adesão do regime terapêutico medicamentoso dos idosos integrados nas equipas domiciliárias de Cuidados Continuados, verificando que 72,7% dos idosos enquadrava-se na categoria de não aderente à terapêutica medicamentosa (12).

Verificou-se ainda, que os idosos que apresentam algum grau de dependência são os que possuem resultados mais baixos de adesão ao regime terapêutico medicamentoso. O processo de envelhecimento (primário e secundário), pode potencializar, essencialmente em idades mais avançadas, o surgimento de défices nos distintos aparelhos do nosso organismo (13), que dificultam a execução de determinadas atividades de vida diária.

Conclusão

No presente estudo, a adesão ao regime terapêutico está significativamente associada à capacidade funcional da pessoa idosa. A terapêutica medicamentosa ocupa um lugar de primordial importância, quer pela sua ação curativa quer pela preventiva. Atendendo às responsabilidades das instituições de saúde para com o processo de adesão ao regime terapêutico, será fulcral envolver equipas multidisciplinares, redes de apoio social informais ou formais, que apostem na identificação atempada das necessidades das pessoas idosas, com conseqüente definição e implementação de intervenções/programas de boas práticas, que visem a melhor adesão terapêutica possível.

Referências Bibliográficas

- (1) INE. Censos 2011 – Resultados Definitivos Norte. [Internet]. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística; 2012 [acesso em 2015 Set 06]. Disponível em: http://censos.ine.pt/xportal/xmain?xpid=CENSOS&xpgid=ine_censos_publicacao_det&contexto=pu&PUBLICACOESpub_boui=156638623&PUBLICACOESmodo=2&selTab=tab1&pcensos=61969554
- (2) INE. Censos 2011 - Município de Macedo de Cavaleiros [Internet]. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística; 2013 [acesso em 2015 Out 18]. Disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0006041&contexto=bd&selTab=tab2
- (3) Filho ETC, Alencar YMG. Teorias do envelhecimento. In: Filho ETC, Netto MP, editores. Geriatria, clínica e terapêutica. São Paulo: Editora Atheneu; 1998. p. 1-8.
- (4) Marin MJS, Cecílio LCO, Peres AEUF, Santella F, Silva CBA, Filho JRG, Roceti LC. Caracterização do uso de medicamentos entre idosos de uma unidade do Programa Saúde da Família. Cad Saú Públ, 2008 julho; 24 (7): 1545-1555.
- (5) Dias AM, Cunha M, Santos A, Neves A, Pinto A, Silva A, Castro S. Adesão ao regime Terapêutico na Doença Crónica: Revisão da literatura. Rev Millen. 2011; 40: 201-219.
- (6) WHO. Adherence to long-term therapies: Evidence for action. [Internet]. World Health Organization; 2003 [acesso em 2014 set 15]. Disponível em: http://www.who.int/chp/knowledge/publications/adherence_report/en/#
- (7) Araújo F, Pais Ribeiro J, Oliveira A, Pinto C. Validação do Índice de Barthel numa amostra de idosos não institucionalizados. Rev Port Saú Públ. 2007; 5(2): 59-66.
- (8) Sequeira C. Cuidar de idosos dependentes. Coimbra: Quarteto Editora; 2007.
- (9) Delgado AB, Lima ML. Contributo para a validação concorrente de uma medida de adesão aos tratamentos. Rev. Psicol, Saú & Doenç. 2001; 2(2): 81-100.
- (10) Monterroso L, Pierdevara L, Joaquim N. Avaliação da Adesão Regime Terapêutico dos Utentes Seguidos na Consulta Externa de Psiquiatria do Centro Hospitalar Barlavento Algarvio. Rev Port Enf Saú Ment. 2012; 7: 21-25.
- (11) Abrantes MFB. Seguimento farmacoterapêutico em idosos polimedicados. [dissertação de Mestrado]. Porto (Portugal): Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa; 2013. [acesso em 2015 nov 13]. Disponível em: <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4102/1/Seguimento%20farmacoterapêutico%20em%20idosos%20polimedicados-signed.pdf>
- (12) Monterroso L, Joaquim N, Sá LO. Adesão do regime terapêutico medicamentoso dos idosos integrados nas equipas domiciliárias de Cuidados Continuados. Rev Enf Refer. 2015; 4 (5): 9-16.
- (13) Novoa JML, Bouza JIP, Núñez JFM. Biología del envejecimiento. In: Núñez JFM, editor. Geriatria desde el principio. 2ªed. Barcelona: Editorial Glosa; 2005. p.15-38.

Conhecimentos dos adolescentes acerca do HPV

Borges, M. P. M.⁽¹⁾; Fernandes, A.M.P.S.⁽²⁾; Mata, M.A.P.⁽²⁾; Sousa, M.F.G.⁽²⁾

⁽¹⁾ ULSNE - Centro de Saúde de Bragança, Unidade da Sé; ⁽²⁾ Instituto Politécnico de Bragança – ESSa
mpaulob@hotmail.com; adilia@ipb.pt; augustamata@ipb.pt; filomena@ipb.pt

Resumo

Introdução: A infeção pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) é uma das infeções sexualmente transmissíveis (ISTs) mais comuns em todo o mundo sendo que, a infeção persistente pelas suas estirpes oncogénicas é a principal etiologia do cancro do colo do útero. Dado que esta patologia constitui uma das principais causas de morte por neoplasia nas mulheres, em todo o mundo e, como tal, um problema de Saúde Pública que urge combater, torna-se necessário o estabelecimento de medidas de intervenção comunitária tendo em mente a capacitação dos jovens para a prevenção desta infeção. **Objetivos:** Avaliar os conhecimentos acerca do HPV em alunos do Ensino Secundário de uma escola em Bragança. **Material e Métodos:** Com recurso à metodologia quantitativa desenhou-se um estudo observacional, descritivo e correlacional de caráter transversal. Aplicou-se um questionário a uma amostra acidental de 196 estudantes de ambos os sexos. Os dados foram tratados com recurso à estatística descritiva e inferencial. **Resultados:** 93,4% respondeu erradamente à questão sobre qual o agente mais comum das ISTs, referindo o VIH como o agente mais responsável por estas infeções. A maioria dos adolescentes (82,7%) referiu já ter ouvido falar em HPV e destes, a grande maioria conhecia o significado da sigla HPV. Verificou-se ainda que os estudantes mais jovens apresentaram maior nível de conhecimentos acerca do HPV ($p < 0,001$) e que os alunos do 11º ano são os que evidenciaram mais conhecimentos acerca da temática ($p < 0,001$). A grande maioria dos adolescentes (90,7%) realçou o papel da escola e dos profissionais de saúde enquanto fontes de informação acerca da infeção. **Conclusão:** Os resultados evidenciam a importância da educação para a saúde na capacitação dos jovens para uma tomada de decisão consciente e esclarecida no que à sua saúde diz respeito.

Palavras Chave: Vírus do Papiloma Humano; conhecimentos; adolescentes

Introdução

O Vírus do Papiloma Humano, também conhecido pela sua abreviatura HPV (Human Papillomavirus), é o agente sexualmente mais transmissível, que pertence à Família Papillomaviridae e ao Género Papillomavirus, é considerado o maior responsável pelo Cancro do Colo do Útero (CCU) (1). Em 1977, Zur Hausen sugeriu e demonstrou a existência da relação entre o HPV e o Cancro do Colo do Útero e esta relação foi comprovada ao longo da década de 80 do séc. XX com o isolamento do vírus em células de tumores cervicais (2).

A infeção pelo HPV é uma das infeções sexualmente transmissíveis mais comuns em todo o mundo (3). Os vários tipos de HPV podem ser classificados de acordo com o seu potencial oncogénico em vírus de “baixo risco” ou de “alto risco” (4). A persistência desta infeção por um período superior a doze meses está associada a um risco aumentado de neoplasia. Na presença de uma infeção persistente por HPV, esta tem um período de latência prolongado, podendo levar anos e, nalguns casos pode mesmo demorar décadas, desde o início da infeção até ao desenvolvimento de tumores, passando por várias fases evolutivas. As três fases do processo de Carcinogénese do Colo do Útero são a infeção com os genótipos específicos de alto risco oncogénico de HPV, a progressão para lesões pré-neoplásicas e, por último, instalação de lesões invasivas (5).

A infeção por este vírus é “...mais frequente nos mais jovens nos primeiros anos após início da atividade sexual” e, nestes, “...mais comuns nos adolescentes e adultos jovens sendo mais frequentes nos indivíduos com múltiplos parceiros sexuais ao longo da vida” (6), observando-se a nível mundial um pico da sua prevalência em mulheres de idade inferior a 25 anos (6). Estes dados epidemiológicos realçam a importância da Promoção/Educação para a saúde junto desta camada da população tendo em mente a sua capacitação para a prevenção desta infeção e, conseqüentemente, a prevenção do cancro do colo do útero, uma vez que estratégias nacionais e internacionais para a prevenção deste cancro pressupõem a aplicação dos três clássicos níveis de prevenção, nomeadamente a “...prevenção da infeção por HPV e dos cofatores que aumentam o risco de cancro do colo do útero” (6) e que inclui a “Implementação das estratégias apropriadas para influenciar alterações comportamentais, tendo em conta os

cofatores de risco” (6) e a vacinação contra o HPV.

No entanto, antes de se colocar em ação qualquer processo de intervenção há necessidade de conhecer a situação do grupo pelo que, o processo deverá ser sempre antecedido pela identificação das reais necessidades de intervenção visando a definição de objetivos, bem como a eleição de métodos e técnicas mais adequadas (7). Assim, o presente estudo tem como principal objetivo avaliar os conhecimentos acerca do HPV em alunos do Ensino Secundário de um agrupamento de escolas sediado em Bragança.

Material e Métodos

Estudo observacional, descritivo e correlacional de caráter transversal que respeita os princípios éticos, aceites pela comunidade de investigação e pela Declaração de Helsínquia, como o consentimento informado dos participantes, confidencialidade, respeito, e garantia dos direitos dos que participaram voluntariamente. Por se tratar de um questionário já elaborado e validado por outros autores (8, 9), foi solicitada a autorização para o seu uso, tendo a mesma sendo concedida.

Foi também enviado um pedido de autorização, para aplicação do questionário ao Presidente do Conselho Executivo do Agrupamento de Escolas.

Por se tratar de menores de idade, outro pedido de autorização foi endereçado aos encarregados de educação.

Aquando da entrega dos questionários aos alunos, foi-lhes explicado qual o objetivo e o âmbito do estudo, que a sua participação era livre e voluntária e que podiam abandonar a investigação a qualquer momento. Foram ainda garantidos a confidencialidade e o sigilo e que, caso pretendessem, podiam ter acesso aos resultados do estudo.

População e Amostra: A população-alvo deste estudo são os 396 alunos que frequentavam o Ensino Secundário (10º, 11º e 12º ano). A amostra selecionada de forma acidental teve em consideração o seguinte: - **Crítérios de inclusão:** alunos matriculados no Ensino Secundário de uma escola em Bragança. - **Crítérios de exclusão:** questionários com respostas incompletas, alunos ausentes no dia da aplicação do questionário e ainda aqueles de quem não se tivesse obtido a autorização dos encarregados de educação. A amostra ficou constituída por 196 alunos (49,5% do total de estudantes deste nível de ensino).

Dos 115 alunos do 10º ano foram inquiridos 67, (34,2%). Dos 155 alunos do 11º ano foram inquiridos 80 (40,8%). Os restantes 49 alunos (25,0%) frequentam o 12º ano). A maioria (56%; n=110) pertencem ao sexo feminino e os restantes 44% (n=86) do sexo masculino, têm idades compreendidas entre os 15 e os 19 anos (média: 16,54±1,04 anos) e provêm maioritariamente de ambiente urbano (58,0%; n=113).

Metodologia de Colheita de Dados: Para aplicação do questionário, foi solicitada a colaboração dos professores a quem foram previamente explicados os objetivos do estudo. No início de cada aula os professores distribuíram o instrumento de colheita de dados aos estudantes presentes e com autorização escrita, recolhendo-os logo que estivessem preenchidos.

Metodologia de Tratamento de Dados: O tratamento de dados foi realizado no SPSS versão 20 para Windows, recorrendo-se à seguinte metodologia estatística:

- Estatística descritiva com cálculo de frequências absolutas e relativas, bem como medidas de tendência central e de dispersão.
- Para testar a normalidade das variáveis fez-se uso do Teste de Kolmogorov-Smirnov uma vez que a amostra tinha uma dimensão superior a 50 elementos
- Para estabelecer a correlação entre variáveis quantitativas, e atendendo à distribuição não normal das mesmas, recorreu-se ao teste rho de Spearman.

Resultados

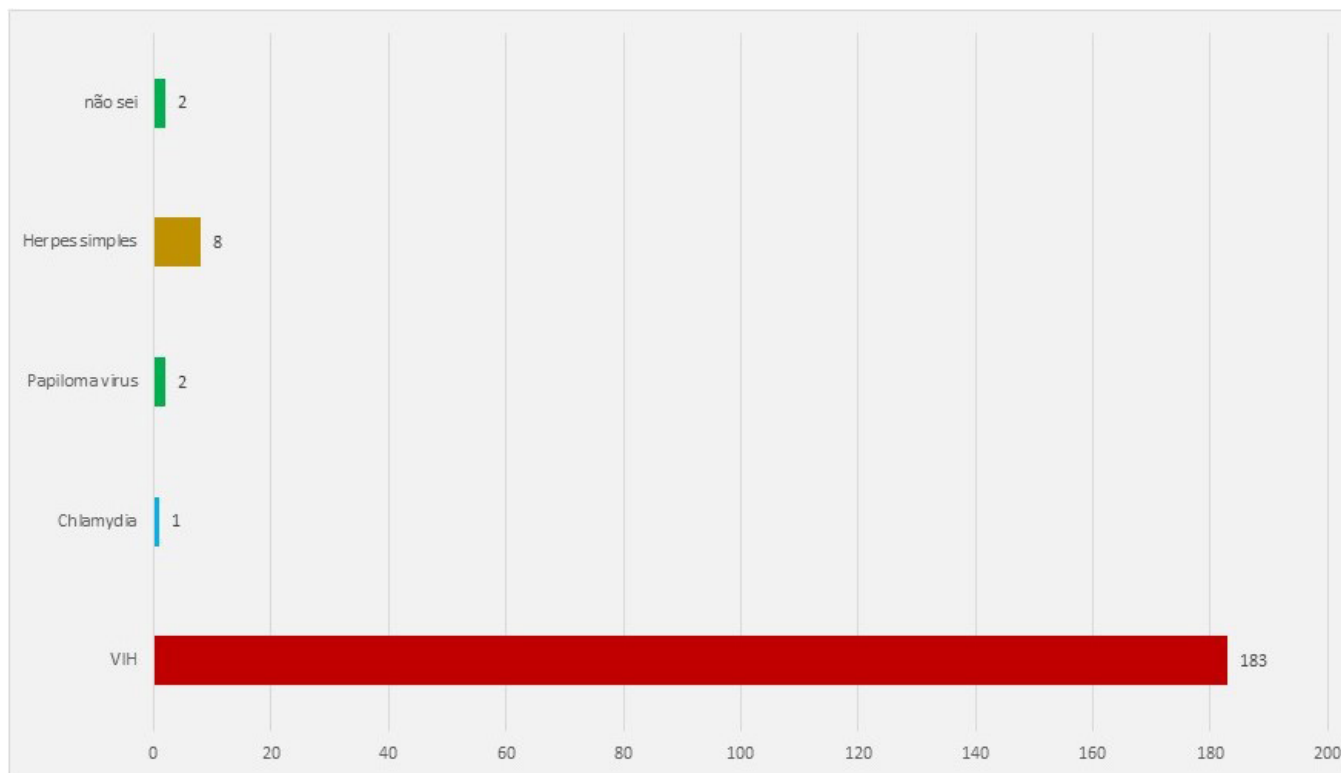
A grande maioria dos estudantes (83%; n=162) referiu já ter ouvido falar do HPV . Registe-se no entanto uma percentagem de 17% (n=34) que apresentou resposta negativa a esta questão.

Quando questionados se sabiam qual o agente mais frequente das infeções sexualmente transmissíveis

(gráfico 1), a maioria (n= 183; 93,4%) afirmou ser o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e um reduzido número de estudantes identificou o HPV (n=8; 4,1%).

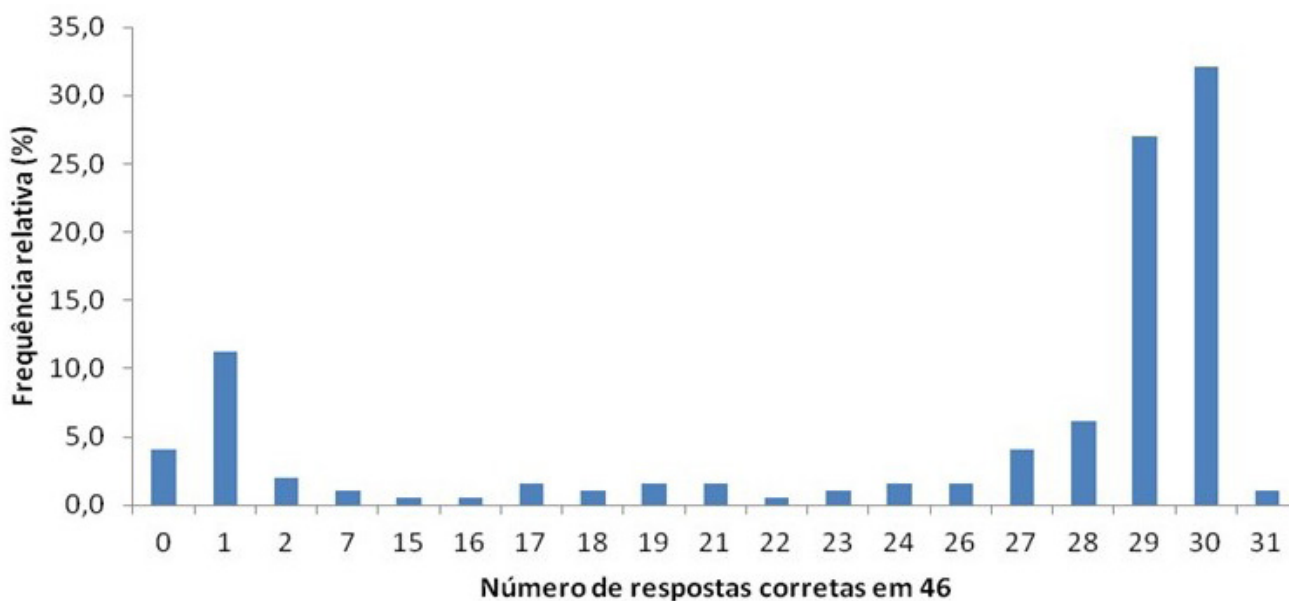
Assim, face aos resultados acima apresentados, verifica-se que, apesar da grande maioria dos estudantes já terem ouvido falar em HPV, também a maioria identifica o VIH como sendo o agente causal mais comum das ISTs.

Gráfico 1 – Distribuição dos estudantes segundo as respostas apresentadas acerca de qual o agente mais comum responsável pelas ISTs



No gráfico 2 está representada a distribuição da amostra de acordo com o número de respostas corretas às questões que lhes foram colocadas em relação HPV (num total de 46). Da sua análise pode observar-se que o número de respostas correto varia entre 0 e 31, sendo 29 e 30 o mais frequente.

Gráfico 2 – Distribuição dos estudantes segundo o número de respostas corretas às questões relativas ao HPV



Ao estabelecer a correlação entre a idade e o ano em que os estudantes estavam inscritos e os conhecimentos acerca do HPV expressos na tabela 1, verifica-se que existe correlação negativa fraca mas significativa entre o ano em que estão inscritos e os conhecimentos apresentados ($r_s = -0,435$; $p < 0,001$), bem como entre a idade e os conhecimentos manifestados ($r_s = -0,319$; $p < 0,001$), resultados que parecem indicar que quanto maior a idade e o ano de frequência, menores são os conhecimentos acerca do HPV.

Tabela 1 – Matriz das correlações entre os conhecimentos acerca do HPV, a idade e o ano de escolaridade frequentado

		Conhecimento HPV	
r de Spearman	Conhecimento HPV	rs	1,000
		p	.
	ano em que está inscrito	rs	-,435**
		p	<0,001
	Idade	rs	-,319**
		p	<0,001

Discussão

A amostra por nós estudada é constituída maioritariamente por pessoas do sexo feminino (56,0%), resultados contrários à realidade nacional onde, no ano letivo de 2013/2014 havia mais alunos do sexo masculino a frequentarem o ensino secundário (10), verificando-se também diferenças no que à idade diz respeito relativamente a outros estudos efetuados, como aquele que foi desenvolvido junto de estudantes universitários portugueses (8, 9), mas com semelhanças no que à idade diz respeito a um outro estudo desenvolvido no Brasil onde os inquiridos pertenciam a um grupo etário semelhante ao da amostra por nós inquirida (11), apesar de já frequentarem o ensino superior, mas onde a maioria frequentava o primeiro ano.

No presente estudo obteve-se uma proporção elevada de estudantes que já tinham ouvido falar do HPV (83%), proporção mais elevada quando comparada com outras obtidas noutros estudos (8, 9, 11). No entanto, apesar da elevada proporção de estudantes que já tinham ouvido falar do vírus, só 4,1% o identificaram como sendo o agente responsável pelas ISTs mais comum, corroborando os resultados obtidos noutras investigações (8, 9, 11).

A correlação estabelecida entre o ano de frequência e os conhecimentos bem como entre a idade e os conhecimentos evidenciou uma correlação negativa mas significativa entre as variáveis. Estes resultados contrariam outro que, apesar de efetuados em estudantes de outro nível de ensino (básico a secundário), concluíram que os estudantes do 10º ano possuem maior nível de conhecimentos acerca das ISTs que os do 8º ano (12).

Conclusão

Os resultados do estudo permitem concluir pela necessidade da manutenção/implementação de um trabalho de parceria de profissionais de diversas áreas, (saúde, educação, comunicação) com o envolvimento ativo e participativo dos estudantes para uma tomada de decisão consciente e esclarecida. O incentivo à vacinação a par da implementação de programas de educação/promoção da saúde e prevenção da doença, abre caminho à diminuição do problema com a ambição da erradicação do cancro do colo do útero por infeção do HPV.

Referências Bibliográficas

1. Camara, G.N.N.L., Cruz, M.R., Veras, V.S. & Martins, C.R. Os Papilomavirus Humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. [Internet] Universitas Ciências da Saúde. 2003; 1(1): 149-158. [Acesso em 2015 junho 8] Disponível em <https://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/cienciasaude/article/view/502/323>
2. Corrêa, F.M., Russomano, F.B. Novas Tecnologias de Prevenção do Câncer do Colo do Útero: Quem de fato se beneficia? [Internet] Revista Brasileira de Cancerologia. 2012; 58(3): 525-527. [Acesso em 2015 junho 8]. Disponível em http://www1.inca.gov.br/rbc/n_58/v03/pdf/23_artigo_novas_tecnologias_prevencao_cancer_colo_uterio_quem_fato_beneficia.pdf.

3. Sociedade Portuguesa de Ginecologia (SPG). Vacina contra o HPV – Reunião de Consenso Nacional. [Internet] Fevereiro 2007; 6-7. [acesso em 2015 setembro 10]. Disponível em http://www.spginecologia.pt/uploads/consenso_final_rev31maio.doc.
4. Schiffman, M., Castle, P. E. Human papillomavirus: epidemiology and public health. [Internet]. Pathol Lab Med, August 2003; 127 (8): 930-4.[Acesso em 2016 janeiro 10]. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub-med/12873163>.
5. Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Vacinação (PNV): Introdução da vacina contra infeções por Vírus do Papiloma Humano. Comissão técnica de vacinação.[Internet] . DGS. 2008; [Acesso em 2015 junho 8]. Disponível em <https://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i010242.pdf>.
6. Direção-Geral da Saúde. Vacinação contra Infeções por Vírus do Papiloma Humano (HPV). Comissão técnica de vacinação. 2008.
7. Pérez, M.R. Metodología de Educación para la Salud. [Internet]. Revista Pediátrica Atención Primaria. 2012; Supl (21): 77-82. [Acesso em 2017 dezembro 8]. Disponível em http://scielo.isciii.es/pdf/pap/v14s22/11_sup22_pap.pdf.
8. Ramada, D. C. P. Conhecimentos dos Jovens Universitários Acerca do HPV e do Cancro do Colo Uterino (Dissertação de Mestrado em Oncologia). [Internet]. Universidade do Porto; 2010. [Acesso em 2015 abril 5]. Disponível em <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/45435/4/TeseDianaRamada.pdf>.
9. Medeiros, R., Ramada, D. Knowledge differences between male and female university students about human papillomavirus (HPV) and cervical cancer: Implications for health strategies and vaccination. [Internet]. Elsevier, Vaccine; 2011 (29); 153– 160. [Acesso em 2015 abril 5] Disponível em http://www.hu.ufsc.br/projeto_hpv/Knowledge%20differences%20between%20male%20and%20female%20university%20students%20about.pdf.
10. Direção-Geral de Estatísticas da Educação e Ciência (DGEEC). Educação em Números: Portugal 2015. [Internet]. Direção-Geral de Estatísticas da Educação e Ciência (DGEEC); 2015. [Acesso em 2017 janeiro 10]. Disponível em <http://www.spef.pt/image-gallery/9714453332295-Notcias-A-Educao-em-Nmeros-2015-DGEEC.pdf>.
11. Panobianco, M.; Faim de Lima, A. Oliveira, I. Gozzo, T. O Conhecimento sobre o HPV entre Adolescentes Estudantes de Graduação em Enfermagem. Texto Contexto Enfermagem, Florianópolis, 2013 Jan-Mar; 22(1): 201-207.
12. Costa, S. Conhecimentos, Atitudes e Crenças Face à Sexualidade e Educação Sexual de Adolescentes do 8º e 10º Ano de Escolaridade. (Dissertação de Mestrado em Enfermagem de Saúde Infantil e Pediatria). [Internet] ESEP; 2015. [Acesso em 2017 janeiro 10]. Disponível em <https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/10779/1/Tese%20Sandra%20Costa%20.pdf>

Forssman antigen expression in tumor tissue- What is the relevance?

Raquel Costa^{1#}, Paulo Teixeira^{1,2#}, Camilla Hesse³, Ali-Reza Moslemi³, Ana Valado¹, Nádía Osório¹ Armando Caseiro¹, António Gabriel¹, Lola Svensson³, and Fernando Mendes^{1,4,5,6}

Emails: raquelcosta1394@gmail.com; paulo.teixeira@estescoimbra.pt; camilla.hesse@biomedlab.gu.se; ali--reza.moslemi@pathology.gu.se; valado@estescoimbra.pt; nadia.osorio@estescoimbra.pt; armandocaseiro@estescoimbra.pt; agabriel@estescoimbra.pt; lola.svensson@clinchem.gu.se; fjmendes@estescoimbra.pt;

#-Both authors contributed equally to the manuscript.

1 Polytechnic Institute of Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Department of Biomedical Laboratory Sciences, Coimbra, Portugal

2 Pathology Service, Coimbra Hospital and University Centre, Coimbra, Portugal

3 Biomedical Laboratory Sciences, Institute for biomedicine, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden

4 Biophysics Unit-IBILI, Faculty of Medicine of University of Coimbra, Portugal

5 CNC.IBILI, Faculty of Medicine of University of Coimbra, Coimbra, Portugal

6 CIMAGO, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

Abstract

Introduction: The Forssman antigen (Ag) can be expressed in erythrocytes, cells, and organs. FORS antibody (Ab) titer is conditioned by the Forssman Ag expression. This blood group Ag may play a key role in carcinogenesis; according to several studies, this Ag is present in gastric, colon, and lung cancers. The anti-Forssman Ab titer is influenced by the histologic type of cancer and the stage of the disease. The anti-Forssman may function as an anti-tumor Ab, which means that it could be used to control the cancer reoccurrence in post-surgically cancer patients. **Aim:** The aim was to optimize the immunohistochemistry procedure in order to study twenty samples of colon cancer, and identify the FORS Ag and compare with normal and neoplastic tissue. **Methods:** Fresh surgical specimens of lung, stomach, and colon from neoplastic tissues were collected together with the transitional mucosa. All specimens were fixed in 4 % buffered formaldehyde for 24 hours, processed and embedded in paraffin. Paraffin sections were cut at 3 μ m and stained with hematoxylin-eosin for histological evaluation. After selecting the zones of interest, immunohistochemistry assays were performed. **Results:** After alkaline hydrolysis and neuraminidase digestion, immunostaining pattern was identified only in four of twenty samples, raising the question about the reliability of the method and the materials used. It also highlights the importance of validating the immunohistochemistry assay. **Discussion/Conclusion:** The immunostaining results were different from what has been previously demonstrated. Further studies are necessary to clarify and better understand the pattern identified.

Key-words: Forssman; antigen; antibody, cancer; Immunohistochemistry

Introduction

The International Society of Blood Transfusion in 2012 recognized Forssman (FORS) as new blood group system. FORS include all the conditions for a blood group system such as independent from other blood group antigen (Ag), heritable, expressed on red blood cells (RBC) and the presence of naturally occurring antibodies (Ab) (1). John Frederick Forssman first identified the Ag in 1911 after injecting rabbits with a suspension of kidney tissue from the guinea pig. The rabbits produced Ab that haemolysed sheep RBC (2). In 1987 three unrelated English families were described with an A subgroup called A_{pae} . However, in 2012, Svensson *et al.* were able to show that the subgroup A_{pae} should be obliterated and a new histo-blood group should be created: the FORS blood group system (3,4).

FORS Ag has several similarities with the histo-blood group A Ag, FORS Ag is synthesized by Fs-synthase, a

homologous enzyme of the ABO transferase (globoside 3- α -N-acetyl-D-galactosaminyltransferase). The FORS Ag also terminates with α 3-N-acetylgalactosamine and can be used by pathogens as a host receptor. FORS is remarkably rare and most individuals are FORS negative (4–6)3-N-acetylgalactosaminyltransferase; EC 2.4.1.88. The FORS Ag can be distinguished from others by their solubility in lipid solvents and stability to boiling as it has a glycosphingolipid structure (7,8). It has been described in guinea pigs, horses, hamsters, sheep and chicken (2,9). The FORS Ag is unequally distributed within the same tissue in the same species. Consequently, Yamamoto *et al.*, conclude that the rejection in transplantation through FORS Ab could be conditioned by FORS Ag expression on the tissue (2).

The expression of blood group Ag is not restricted to the surface of RBC, they are expressed also in other body fluids, cells, tissues and organs. The Ab anti-FORS may play a significant role in binding complement and it could probably cause intravascular lysis of transfused FORS-positive RBC (4). These Ab might have repercussions in transfusion medicine, organ transplantation and even during pregnancies as they might be involved in perinatal haemolytic disease as well as others naturally occurring anti-carbohydrate Ab (6,10). Some authors propose that this Ag might have a key role in carcinogenesis, according to several studies the FORS Ag is present in gastric, colon, and lung cancer and its expression in tissues could be related with the Ab titer in patient's plasma (1,11–14).

The incidence of FORS Ab in cancer patients is only 35-40% but in random healthy individuals, it is more than 75% (15). The anti- FORS Ab titer may be influenced by some features such as age, sex and in cancer patients, also by the histologic type of cancer. The titer is lower in differentiated adenocarcinoma and varies by disease stage (13,16).

The Anti- FORS Ab may function as an anti-tumour Ab; this was recognized due to the decrease of FORS Ab titer caused by the establishment of anti-FORS – FORS immune complexes through the absorption of FORS Ag shed by the tumour. Phagocytes remove these complexes from circulation. Therefore, the serum level of FORS Ab has been suggested to be used clinically to control the cancer reoccurrence in post-surgically cancer patients (13,14,16).

Nowadays, the numbers of new cancer cases increase significantly, revealing it as a major public health problem. It is expected to be the main cause of death in the next coming years. According to the latest cancer statistics, lung, colon and gastric cancer are amongst the most frequent new types of cancer (17).

The presence of FORS Ag at the cytoplasm of colon goblet cells, especially those in the transitional mucosa adjacent to carcinoma was conclusively verified by Ono *et al.* considering that the detection of a FORS Ag assay would be of great value to detect cancer (18). Subsequently, the FORS Ag might be tumour-specific and it is possible to incorporate it in conjugate vaccines used to mark different types of cancer; to increase an immune response against the FORS pentasaccharide expressed on cancer cells surface (19).

Immunohistochemistry (IHC) is associated with methodologies that use immunoassays to co-locate an epitope of interest in tissue sections. Essentially, tissue is collect and preserved by chemical methods, namely formaldehyde, and posteriorly embedded in paraffin. Subsequently, very thin sections are obtained and placed on glass slides. Thus, it is possible to locate Ag in histological components keeping the original tissue architecture. Depending on the method of fixing the samples may have to undergo antigenic recovery (20,21).

In addition, IHC use Ab as specific reagents able to identify and bound to cellular constituents that act as Ag. This bonding will allow the localization and identification of various substances in cells and tissues by means of colour. Consequently, microscopic observation is possible and allow us to identify where the Ag is expressed (22).

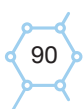
The aim of this study was to optimize the IHC technique needed to test the FORS Ag presence in tissues by investigating twenty samples of colon cancer and compare with the Ag expression in normal and neoplastic tissue. We consider essential to optimize the IHC procedure once that every Ab requires specific conditions and concentrations to bind as better as possible to the antigen.

Material and Methods

Population

The sample consisted of twenty cancer samples from the colon. Only patients with adenocarcinoma were included, exclusion criteria were having any other type of cancer or autoimmune diseases.

Sample Characterization



The sample is constituted by seven female samples and thirteen male samples the average age is 68, ranging between 38 and 90 years old as described in detail in Table 1.

Table 1 – Characterization of the 20 patients with colon cancer, all adenocarcinoma included in the study. Assessment was performed based on sex, age, type of cancer and stage

Sample	Gender	Age (years)	Cancer Type	Diagnose	TNM
1	F	64	Colon	Low Grade Invader Adenocarcinoma	T3N2aM0
2	M	52	Colon	Low Grade Invader Adenocarcinoma	T3N0M0
3	F	81	Colon	Low Grade Adenocarcinoma	T4aN0M0
4	M	79	Colon	Low Grade Adenocarcinoma	T3 N0 M0
5	M	60	Colon	Low Grade Adenocarcinoma	T3 N0M0
6	M	58	Colon	Low Grade Adenocarcinoma	T3N0M0
7	M	65	Colon	High Grade Invader Stenotic Adenocarcinoma	T4aN2aM1b
8	M	81	Colon	Low Grade Invader Adenocarcinoma	T2N0M0
9	M	90	Colon	High Grade Invader Adenocarcinoma	T4aN1aM0
10	M	87	Colon	High Grade Invader Stenotic Adenocarcinoma	T3N1aM0
11	M	76	Colon	High Grade Invader Adenocarcinoma	T3N1cM0
12	F	38	Colon	Low Grade Invader Adenocarcinoma	T3N1aM0
13	F	67	Colon	Adenocarcinoma	not available
14	M	76	Colon	Mucinous Invader Adenocarcinoma	T4aN2bM1a
15	F	54	Colon	Low Grade Invader Adenocarcinoma	T3N2aM0
16	M	53	Colon	Low Grade Adenocarcinoma	T3N0M0
17	M	80	Colon	Mucinous Adenocarcinoma	T3N0M0
18	F	80	Colon	Low Grade Invader Adenocarcinoma	T3N1aM0
19	F	67	Colon	Low Grade Invader Adenocarcinoma	T2N0M0
20	M	55	Colon	Low Grade Adenocarcinoma	T3N0M0

Legend: F- female; M- Male

Tissue specimens

Fresh surgical specimens of colon were collected at Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Samples from neoplastic tissues were removed together with the transitional mucosa. All specimens were fixed in 4 % buffered formaldehyde for 24 hours, processed through alcohols and xylenes and embedded in paraffin.

Paraffin sections, cut at 3 µm of each specimen were stained with hematoxylin and eosin (HE) for histological evaluation (results not shown). After performing the HE technique, a multi-tissue block was built in order to perform the assays.

All tissues were classified using TMN system, histotype, and stage grading according to the TNM Classification of Malignant Tumors criteria.(23)

Immunohistochemical Staining

The Ono *et al* technique was replicated with some minor revisions (18). Tissue slides prepared to IHC, cut at 3 µm of the multi-tissue block were first heated in a dry oven promoting electro-statically attraction to *Superfrost™ Plus Microscope Slides (ThermoFisher Scientific™)*. Sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohols.

Antigenic recovery was possible through the use of *Cell Conditioning 1 (CC1) (Ventana Medical Systems, Inc. - Roche Diagnostics)*, at 95° C during 20 minutes which is a pre-diluted solution, pH=8, used as a pre-treatment step in the processing of tissue samples for IHC reactions;

Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation of films in H₂O₂ 3% (*Ventana Medical Systems, Inc. - Roche Diagnostics*) for 10 minutes at room temperature (RT).

After inhibiting unspecific bindings by *Discovery Ab Diluent* (*Ventana Medical Systems, Inc. - Roche Diagnostics*) for 4 minutes at RT, slides were incubated overnight at 4° C with the primary Ab (supernatant of the cell line M1/22.25.8.HL - ATCC® TIB121™).

Between staining steps, slides were rinsed with Reaction Buffer (10x) (*Ventana Medical Systems, Inc. - Roche Diagnostics*) a Tris-based buffer solution (pH 7.6±0.2) which provides a stable aqueous environment for the IHC; The sections were rinsed in deionized water, counterstained with hematoxylin, bluing with copper sulphate at 0,5 % dehydrated, cleared, and mounted with resinous mounting medium.

Before incubation with the primary Ab solution, some sections were subjected only to alkaline hydrolysis, only to neuraminidase digestion or neuraminidase digestion after alkaline hydrolysis.

Neuraminidase (from *Clostridium perfringens*) (11585886001 ROCHE) was used at a concentration of 1 UI/ml in 0.05 M Phosphate Buffer, pH 7, at 37°C for 18 hours. The ability of neuraminidase to digest sialic acid in the section was confirmed by staining a section of the small intestine with Alcian Blue, which visualizes mucin acidic (results not showed).

Alkaline hydrolysis was performed for 15 min at RT with 1% KOH in 70% ethanol.

OptiView DAB IHC Detection Kit (*Ventana Medical Systems, Inc. - Roche Diagnostics*) is an indirect, biotin-free system for detecting mouse IgG, mouse IgM and rabbit primary Ab. The kit is intended to identify targets by IHC in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded and frozen tissue that are stained.

In addition, normal multi-tissue (appendix, tonsil, skin, liver, prostate, and pancreas) was used as immunostaining control.

Results

Several immunohistochemistry techniques were performed to analyze how different aspects would affect the immunostaining: IHC without previous treatment, IHC with previous Alkaline Hydrolysis, IHC with previous Neuraminidase Digestion and IHC with previous Alkaline Hydrolysis and Neuraminidase Digestion.

The results of tissue subjected only to Ag recovery (*CC1*) showed diffuse nuclear and cytoplasmic unspecific staining both in normal and tumor tissue without background staining as shown in Figure 1.

After testing with prior alkaline hydrolysis (potassium hydroxide), some unspecific binding was removed without evident cytoplasmic staining (Figure 2 B).

Testing with prior neuraminidase digestion, let us remove some unspecific binding without evident cytoplasmic staining.

After performing IHC with previous alkaline hydrolysis and neuraminidase digestion, we were able to eliminate unspecific binding. However, it seemed that the crypts of the colon tissue were immunostained but at high magnification, we clearly observe the existence of nonspecific staining of the goblet cells (Figure 2 C).

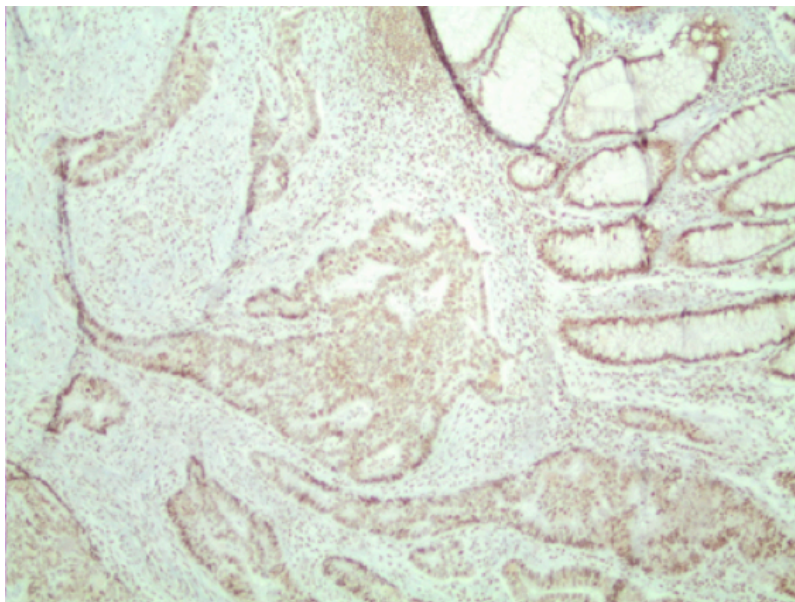


Figure 1 – Colon tissue subjected only to Ag recovery (CC1) (Ventana Medical Systems, Inc. - Roche Diagnostics), at 95° C during 20 minutes which is a pre-diluted solution, pH=8, used as a pre-treatment step in the processing of tissue samples for IHC reactions. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation of tissue sections in H₂O₂ 3% (Ventana Medical Systems, Inc. - Roche Diagnostics) for 10 minutes at room temperature (RT). After inhibiting unspecific bindings by Discovery Ab Diluent (Ventana Medical Systems, Inc. - Roche Diagnostics) for 4 minutes at RT, slides were incubated overnight at 4° C with the primary Ab (supernatant of the cell line M1/22.25.8.HL - ATCC® TIB121™). Between staining steps, slides were rinsed with Reaction Buffer (10x) (Ventana Medical Systems, Inc. - Roche Diagnostics) a Tris-based buffer solution (pH 7.6±0.2) which provides a stable aqueous environment for the IHC; The sections were rinsed in deionized water, counterstained with hematoxylin, bluing with copper sulphate at 0,5 % dehydrated from OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc. - Roche Diagnostics), cleared, and mounted with resinous mounting medium. As it is showed in the picture (40x) diffuse nuclear and cytoplasmic unspecific staining both in normal and tumor tissue without background staining.

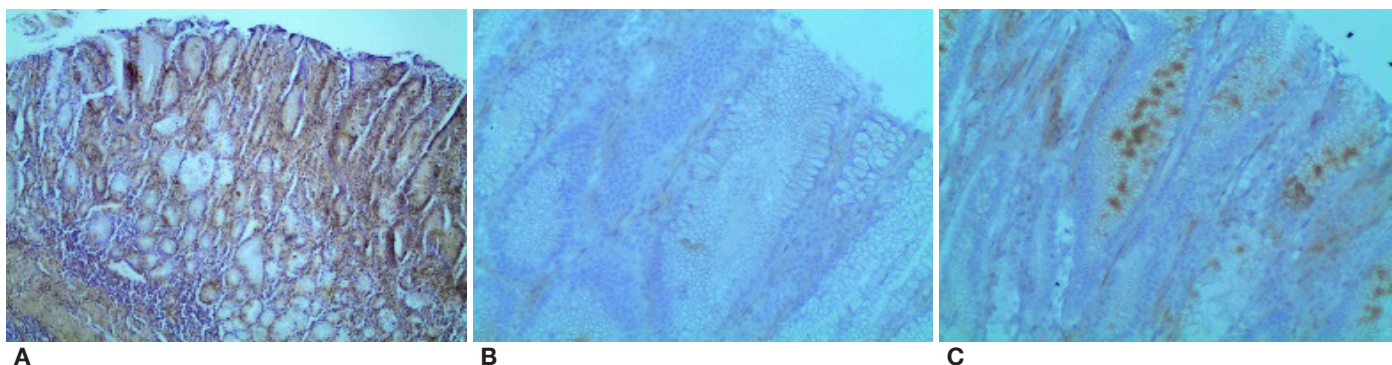


Figure 2 – Anti-Forssman labeling with rat monoclonal antibody Forssman following the IHQ technique: Colon tissue subjected only to Ag recovery (CC1) (Ventana Medical Systems, Inc. - Roche Diagnostics), at 95° C during 20 minutes which is a pre-diluted solution, pH=8, used as a pre-treatment step in the processing of tissue samples for IHC reactions. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation of tissue sections in H₂O₂ 3% (Ventana Medical Systems, Inc. - Roche Diagnostics) for 10 minutes at room temperature (RT). After inhibiting unspecific bindings by Discovery Ab Diluent (Ventana Medical Systems, Inc. - Roche Diagnostics) for 4 minutes at RT, slides were incubated overnight at 4° C with the primary Ab (supernatant of the cell line M1/22.25.8.HL - ATCC® TIB121™). Between staining steps, slides were rinsed with Reaction Buffer (10x) (Ventana Medical Systems, Inc. - Roche Diagnostics) a Tris-based buffer solution (pH 7.6±0.2) which provides a stable aqueous environment for the IHC; The sections were rinsed in deionized water, counterstained with hematoxylin, bluing with copper sulphate at 0,5 % dehydrated from OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc. - Roche Diagnostics), cleared, and mounted with resinous mounting medium. **A** – Labelling without any previous treatment (magnification 40x); **B** – Results after Alkaline hydrolysis (potassium hydroxide) before Anti-Forssman, some unspecific binding was removed without evident cytoplasmic staining (magnification 100x); **C** - Alkaline hydrolysis and neuraminidase digestion before Anti-Forssman (were able to eliminate unspecific binding. However, it seemed that the crypts of the colon tissue were immunostained but at high magnification (100x), we clearly observe the existence of nonspecific staining of the goblet cells).

Discussion

In order to better study the expression of the FORS Ag in tissues the IHC technique needed to be optimized. We choose to perform a manual assay as the IHC equipment didn't allow overnight incubations and different temperature as it was referred in the previous study (18).

From the 20 colon cases studied, only four showed identical immunostaining results.

We think that antigenic recovery is required to execute this technique, once it exposes Ag that were previously blocked by the fixative agent, making possible and improving the formation of the Ag-Ab complex (21,22).

Ono *et al* demonstrated the presence of Forssman Ag at the cytoplasm of colon goblet cells, in the transitional mucosa adjacent to carcinoma, and show that sialic acids might be linked to glycoproteins masking the Forssman antigenicity (18). Due to that, using neuraminidase after alkaline hydrolysis endorsed to cleave sialic acids residues such as α 2,3-, α 2,6-, or α 2,8-linked to Gal, GlcNAc, GalNAc, AcNeu, GlcNeu, oligosaccharides, glycolipids, and glycoproteins.

We consider that without previous alkaline hydrolysis and neuraminidase digestion it will not be possible to observe the Forssman Ag, once it is necessary to remove unspecific bindings. We considered that the cell culture supernatant should be concentrated to ensure more binding specific.

Conclusion

The lack of the immunostaining pattern in 16 samples may reflect the inability of the method used to identify the Forssman Ag or the inability of the cell culture supernatant used as Ab without any previous concentration, raising the question about the reliability in the reagents used and highlighting the importance of IHC assay validation.

We endorse the necessity of performing more tests with the aim of assessing the right incubation time for neuraminidase digestion so we can avoid over digestion as we observed in some tissues. A positive control sample would be useful for further testing.

Several associations have been identified between blood group glycans and different diseases, disease stages and health promoting factors which make histo-blood group glycans an intriguing topic in the field of personalized medicine (25). Merging studies of genomic, proteomics, metabolomics and glycomics data containing histo-blood group Ag information may offer disease biomarkers as well as therapeutic targets in the near future (19,25,26). Therefore, we conclude that it is highly important to maintain the study of the FORS histo-blood group, bearing in mind the potential and contributing to better information of this blood group's relevance in transfusion medicine and oncology.

Bibliographic References

1. Storry JR, Castilho L, Daniels G, Flegel W a, Garratty G, de Haas M, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Cancun report (2012). *Vox Sang* [Internet]. 2014;107(1):90–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24372289>
2. Yamamoto M, Cid E, Yamamoto F. Molecular genetic basis of the human Forssman glycolipid antigen negativity. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 Jan 13 [cited 2015 Nov 14];2:975. Available from: <http://www.nature.com/srep/2012/121213/srep00975/full/srep00975.html>
3. Stamps R, Sokol R, Leach M, Herron R, Smith G. A new variant of blood group A. *Apae. Transfusion* [Internet]. 1987 Jul [cited 2015 Nov 25];27(4):315–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1537-2995.1987.27487264737.x>
4. Svensson L, Hult AK, Stamps R, Ångström J, Teneberg S, Storry JR, et al. Forssman expression on human erythrocytes: biochemical and genetic evidence of a new histo-blood group system. *Blood* [Internet]. 2013 Feb 21 [cited 2015 Nov 10];121(8):1459–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23255552>
5. Haslam DB, Baenziger JU. Expression cloning of Forssman glycolipid synthetase: a novel member of the histo-blood group ABO gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996;93(20):10697–702. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38217&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
6. Kaczmarek R, Buczkowska A, Mikołajewicz K, Krotkiewski H, Czerwinski M. P1PK, GLOB, and FORS Blood Group Systems and GLOB Collection: Biochemical and Clinical Aspects. Do We Understand It All Yet? *Transfus Med Rev* [Internet]. 2014;28(3):126–36. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/>

S0887796314000455

7. Nilsson Ulf, Ray Asim K. MG. Synthesis of the Forssman pentasaccharide and terminal tetra-, tri-, and di-saccharide fragments. Elsevier Science BV, Amsterdam [Internet]. 1994 [cited 2015 Nov 25];137–48. Available from: <http://moscow.sci-hub.bz/da5b520a308de40c1a4bb9fd30f0a210/10.1016%400008-6215%2894%2990011-6.pdf>
8. Tanaka H, Takeuchi R, Jimbo M, Kuniya N, Takahashi T. Synthesis and biological evaluation of the Forssman antigen pentasaccharide and derivatives by a one-pot glycosylation procedure. *Chem - A Eur J*. 2013;19(9):3177–87.
9. Tanaka N, Leduc EH. A Study of the Cellular Distribution of Forssman Antigen in Various Species Information about subscribing to The Journal of. 2015;
10. Poole J, Daniels G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfus Med Rev* [Internet]. 2007 Jan [cited 2015 Nov 14];21(1):58–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17174221>
11. Yamamoto F, Cid E, Yamamoto M, Blancher A. ABO Research in the Modern Era of Genomics. *Transfus Med Rev* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;26(2):103–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmr.2011.08.002>
12. Kawanami J. The appearance of forssman hapten in human tumor. *J Biochem*. 1972;72(3):783–5.
13. Hirayama R, Hirokawa K, Takagi Y, Utsuyama M, Maejima S, Takemura K, et al. Changes in serum levels of Forssman-like antibody in patients with gastric cancer. *Cancer* [Internet]. 1989;63(8):1528–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2924260>
14. Kitamura H, Levine P, Cheng P, Egeli RA, Liu Y, Good RA, et al. Forssman-like Antibody Levels in Sera of Patients with Lung Cancer. *Cancer Res*. 1979;39(12):2909–14.
15. Ezzelarab M, Ayares D, Cooper DKC. Carbohydrates in xenotransplantation. *Immunol Cell Biol*. 2005;83(February):396–404.
16. Diagnostics O. CHARACTERIZATION OF ANTI-FORSSMAN (ANTI-Fs) ANTIBODIES IN HUMAN SERA : THEIR SPECIFICITY AND POSSIBLE CHANGES IN PATIENTS WITH CANCER. 1979;123(1):22–6.
17. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2015 Jan 5 [cited 2015 Jan 9];65(1):5–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25559415>
18. Ono K, Hattori H, Uemura K, Nakayama J, Ota H, Katsuyama T. Expression of Forssman antigen in human large intestine. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 1994;42(5):659–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7512587>
19. Feng J, Hevey R, Ling C-C. Synthesis of a Forssman antigen derivative for use in a conjugate vaccine. *Carbohydr Res* [Internet]. 2011 Dec 13 [cited 2015 Nov 14];346(17):2650–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22015168>
20. Borges A. *Imunohistoquímica*. 2014.
21. Werner Martin, Chott Andreas FA and BH. Effect of Formalin on Digestive system. 2000.
22. Werner M, Von Wasielewski R, Komminoth P. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*. 1996;105:253–60.
23. Leslie H. Sobin (Editor), Mary K. Gospodarowicz (Editor) CW (Editor). *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th Edition. 2009. 336 p.
24. Christiansen MN, Chik J, Lee L, Anugraham M, Abrahams JL, Packer NH. Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics*. 2014;14(4-5):525–46.
25. Dotz V, Wuhler M. Histo-blood group glycans in the context of personalized medicine. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;1860(8):1596–607. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.12.026>
26. Li Q, Anver MR, Li Z, Butcher DO, Gildersleeve JC. GalNAc α 1-3Gal, a new prognostic marker for cervical cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2010;126(2):459–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19585575> <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/ijc.24716/asset/24716ftp.pdf?v=1&t=hamey70y&s=6eae3e98270d27bc3b6cdd8dbd1e37266a8bd476>

A acreditação de laboratórios. Um exemplo em Genética Forense.

Joana Cerqueira (joana.i.cerqueira@inmlcf.mj.pt), Paula Matos, Maria João Pereira, Gabriela Lima, Laura Cainé, Benedita Ferreira da Silva, David Abrantes, Lurdes Pontes, Maria João Porto

Serviço de Genética e Biologia Forenses do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

Resumo

A acreditação de laboratórios consiste num reconhecimento a nível internacional da competência técnica do laboratório para a realização de um determinado ensaio. O Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Norte (SGBF-N) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF), encontra-se acreditado pela norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, representando, juntamente com os outros dois laboratórios do SGBF (Delegação do Centro e Delegação do Sul), os únicos laboratórios com acreditação na área da genética forense em Portugal. O processo de acreditação implica uma série de desafios para o laboratório, que passa a evidenciar de forma transparente, todas as suas atividades. O que à partida parece apenas um acréscimo de trabalho, acaba por se revelar uma mais valia no fortalecimento da sua relação com os seus clientes, que representam uma peça fundamental em todo este processo. A acreditação garante um compromisso de melhoria contínua no funcionamento do laboratório e uma adequação às necessidades apresentadas. As atividades e ensaios executados são completamente controlados dentro do Sistema de Gestão da Qualidade implementado, de forma a tornar possível a sua repetição integral num outro momento e por outro executante. É o controlo rigoroso aplicado à atividade de um laboratório acreditado, que garante uma elevada capacidade de execução técnica, o que naturalmente acaba por satisfazer e dar segurança a quem efetua e a quem requisita as perícias.

Palavras Chave: Acreditação, NP EN ISO/IEC 17025:2005, SGBF-N.

Introdução

A acreditação de laboratórios consiste num reconhecimento a nível internacional da competência técnica do laboratório para a realização de um determinado ensaio. A norma de referência que regula a atividade de um laboratório acreditado, é a norma NP EN ISO/IEC 17025:2005.

Por determinação da União Europeia cada Estado-Membro designou um organismo nacional de acreditação único, sendo o Instituto Português de Acreditação (IPAC) o organismo responsável em Portugal. A atividade de acreditação está sujeita a legislação comunitária que obriga a um funcionamento harmonizado, verificado através de um sistema de avaliação pelos pares. Uma vez que esta atividade é regulada segundo metodologias padronizadas em todo o mundo, existem acordos de reconhecimento mútuo entre os organismos de acreditação, facilitando a livre circulação de serviços abrangidos pela acreditação.

De forma a melhor identificar uma entidade acreditada, o IPAC emite um Certificado de Acreditação com um Anexo Técnico que descreve as atividades por ele acreditadas. A cada Certificado de Acreditação corresponde um número de registo inequívoco, que consta do símbolo de acreditação utilizado pela respetiva entidade.

De modo a facilitar a obtenção de informação, pode ser consultada uma lista de todas as entidades acreditadas por tipo de atividade executada (<http://www.ipac.pt/pesquisa/acredita.asp>) (1).

Revisão

A acreditação pode representar um percurso longo, difícil e muito trabalhoso, mas que no final permite alcançar uma série de mais valias que à partida pareciam inexistentes.

O Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do Norte (SGBF-N) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF), encontra-se acreditado pela norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, representando, juntamente com os outros dois laboratórios do SGBF (Delegação do Centro e Delegação do Sul), os únicos laboratórios com acreditação em Portugal, na área da genética forense.

O SGBF-N iniciou este percurso em 2010, tendo submetido o pedido de concessão da acreditação ao IPAC em julho de 2013. A primeira avaliação ficou agendada para setembro de 2014, tendo o SGBF-N concretizado o seu objetivo em janeiro de 2015 com a acreditação do laboratório para o ensaio de determinação de perfil genético em amostras de referência.

Este processo implicou uma série de desafios para o laboratório, que passou a evidenciar de forma transparente todas as suas atividades. Começou a realizar uma monitorização constante de todo o seu funcionamento, passando por avaliar o tempo despendido na realização das perícias, as tendências do número de exames requisitados, a forma como interage com os seus clientes e satisfaz os seus pedidos, os erros que comete e com que eficácia os deteta e resolve, o compromisso de melhoria contínua e a sua adequação às necessidades apresentadas, o grau de cumprimento dos objetivos que traçou, adaptando-os à evolução do sistema ou definindo novas metas para o futuro (2,3). A preocupação permanente com os colaboradores, como peça fundamental no funcionamento do laboratório, garante a mais correta qualificação dos mesmos, de forma a estarem sempre preparados para novos procedimentos e desafios que a própria evolução do sistema implica. A definição de responsabilidades e competências, a averiguação das necessidades de formação e a avaliação dos colaboradores representam os principais mecanismos de gestão de recursos humanos (2,3). Todas as metodologias usadas nos ensaios acreditados tiveram que ser tecnicamente validadas, de forma a garantir a sua adequabilidade e eficácia na realidade concreta do laboratório. A validação das metodologias representa uma demonstração de competência técnica na realização dos ensaios, o que garante a validade dos resultados obtidos.

Uma forma de garantir o cumprimento dos pressupostos estabelecidos, assim como, permitir uma evolução que resolva as novas exigências que surgem, consiste numa avaliação do Sistema de Gestão implementado, que apesar de ser documentada apenas uma vez em cada ano, se trata de um processo contínuo e de uma preocupação sempre presente em todos os colaboradores.

De todas as vantagens observadas, salientam-se o maior controlo das atividades, o maior rigor na execução técnica e acima de tudo uma maior rapidez na obtenção de informação. Torna-se fácil evidenciar um elevado grau de confiança e transparência nos resultados obtidos.

Uma vez implementado um sistema de gestão da qualidade, o cumprimento dos procedimentos e diretivas a ele associados passam a fazer parte da rotina do laboratório, enraizando-se de tal maneira, que já não é possível fazer de outra forma. O sistema, ao início difícil e burocrático, facilmente se torna imprescindível. Aliás, torna-se necessário fazer sempre mais e melhor.

Desta forma, após a concessão inicial, foram sendo introduzidas alterações nos métodos de forma a contribuir para uma evolução técnica, mais eficaz na resolução das perícias, alterações essas também validadas, avaliadas pelo organismo responsável e posteriormente acreditadas (2015).

Mais recentemente (2016), foi pedida a extensão do âmbito da acreditação para o ensaio de determinação de perfil genético em amostras problema, um processo já avaliado pelo organismo competente, e validado no início de 2017 com alargamento do Anexo Técnico de Acreditação.

Dois anos depois da primeira auditoria, o SGBF-N consegue trabalhar com a quase totalidade das suas amostras, ensaiadas no âmbito da acreditação, o que representa sem dúvida uma segurança e um enorme avanço na valorização técnica das perícias por ele realizadas.

Discussão

A grande concorrência na área laboratorial começa a exigir uma diferenciação que destaque a atividade do laboratório no âmbito da sua atuação. A acreditação representa um importante fator de reconhecimento, pelo que se tornou um objetivo da grande parte dos laboratórios.

No domínio das atividades forenses, até pela importância e sensibilidade das perícias executadas como instrumento judicial, essa necessidade surgiu como fundamental. O SGBF comprometeu-se com este objetivo e tem vindo a trabalhar, sempre focado, na demonstração inequívoca da sua competência técnica e na melhoria contínua dos serviços por ele prestados.

As exigências comunitárias relativamente à necessidade da acreditação dos laboratórios forenses ao serviço da justiça (4) foram cumpridas pelo SGBF, que se orgulha de todo o processo e da enorme evolução que sentiu.

Este processo representa, sem dúvida, uma diferenciação do SGBF na área forense, relativamente ao tipo de perícias que realiza no âmbito da acreditação.

Conclusão

A acreditação representa um acréscimo considerável no trabalho realizado, mas cujos benefícios dela decorrentes, compensam todo o esforço necessário na implementação de um Sistema de Gestão da Qualidade.

Referências bibliográficas

1. Instituto Português de Acreditação (IPAC). A acreditação. <http://www.ipac.pt/>.
2. Instituto Português de Acreditação. Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025 – OGC001. Março de 2010.
3. Instituto Português da Qualidade. NP EN ISO/IEC 17025:2005 - Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. 2 Ed. Dezembro de 2005.
4. Council framework decision 2009/905/JHA, on Accreditation of forensic service providers carrying out laboratory activities, Official Journal of the European Union, 9 December 2009.

Metaloproteínases da Matriz-2 e -9 e o seu Inibidor Tecidual 1 na Diabetes *Mellitus* Tipo 1

Telma Almeida ¹, Brenda Sozinho ¹, Cátia Rosa ¹, Simone Graça ¹, Amélia Pereira ², Élio Rodrigues ², Marta Amaral ², João Paulo Figueiredo ³, Fernando Marques ⁴, Fernando Mendes ¹, Ana Valado ¹, António Gabriel ¹, Nádía Osório ¹ e Armando Caseiro ^{1,5}

¹ Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra Health School - ESTeSC, Ciências Biomédicas Laboratoriais, Portugal

² Serviço de Medicina Interna, Hospital Distrital da Figueira da Foz, Figueira da Foz, Portugal

³ Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra Health School - ESTeSC, Ciências Complementares, Portugal

⁴ Instituto Português de Medicina Dentária, Aveiro, Portugal

⁵ Unidade I&D Química-Física Molecular, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

Contacto: Telma Antunes Almeida – Email: telma7a@hotmail.com

Resumo

Introdução: A diabetes *Mellitus* (DM) tipo 1 consiste na destruição autoimune das células β pancreáticas produtoras de insulina. A hiperglicemia crónica conduz ao desenvolvimento de complicações microvasculares na DM. As metaloproteínases da matriz (MMPs), responsáveis pela remodelação da matriz extracelular, estão implicadas na patofisiologia da DM. A metaloproteínase da matriz-2 (MMP-2) e a metaloproteínase da matriz-9 (MMP-9) têm um papel ativo nos processos inflamatórios que advêm da DM e são inibidas pelo inibidor tecidual da metaloproteínase 1 (TIMP-1). **Objetivo:** Avaliaram-se os níveis e a atividade da MMP-2 e da MMP-9 e os níveis de TIMP-1 em amostras de soro de indivíduos diabéticos tipo 1. **Material e Métodos:** Amostras de soro de indivíduos diabéticos tipo 1, recolhidas em jejum e analisadas com recurso às técnicas de *slot blot* e zimografia, face a um grupo controlo saudável. **Resultados:** A atividade enzimática da MMP-9 foi tendencialmente maior e os níveis de TIMP-1 diminuíram tendencialmente no grupo de DM. A razão MMP-9/TIMP-1 revelou valores tendencialmente mais elevados nos doentes. Não se observaram correlações entre a MMP-9 e TIMP-1, nem entre os níveis de pró-MMP-2, pró-MMP-9, MMP-9 e TIMP-1 e os níveis de HbA1c. **Discussão e Conclusão:** Os resultados obtidos sugerem a possibilidade de existir uma relação entre o aumento das MMPs e a progressão da DM e das complicações que dela advêm. Contudo é necessário aumentar a amostra de indivíduos com DM tipo I e estratificar a mesma relativamente à evolução da doença de forma a se poder correlacionar os dados clínico-patológicos com os resultados do estudo.

Palavras-chave: Diabetes *Mellitus* tipo 1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1

Introdução

A diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença metabólica crónica com múltiplas complicações, provocadas por picos de hiperglicemia e pela consequente desregulação metabólica (1-5). O controlo metabólico da DM influencia a concentração de hemoglobina glicada (HbA1c) no sangue total, possibilitando a identificação de períodos de hiperglicemia a longo prazo (3).

A DM tipo 1 consiste na destruição autoimune das células β pancreáticas produtoras de insulina (6-9). O défice de insulina conduz à hiperglicemia crónica e, consequentemente ao aumento do *stress* oxidativo e à síntese de citocinas pró-inflamatórias, resultando em alterações estruturais das paredes dos vasos sanguíneos e no desenvolvimento de complicações macrovasculares, como as doenças cardiovasculares, e complicações microvasculares, destacando-se a retinopatia e a nefropatia (3, 6, 10, 11).

É de extrema importância reconhecer as complicações relacionadas com a diabetes nas suas fases iniciais, permitindo aos médicos prescrever a medicação necessária e/ou a intervenção cirúrgica antes da falência renal ou da perda de visão, no caso das complicações microvasculares a nível renal e a nível da retina (2).

As metaloproteínases da matriz (MMPs), uma família de enzimas proteolíticas dependentes de zinco e cálcio que

degradam as proteínas da matriz extracelular (MEC), são essenciais para a remodelação do tecido vascular (11-16). As MMPs são expressas na forma de zimogénios (pró-MMPs), necessitando de uma clivagem proteolítica nos seus domínios pró-peptídicos para se tornarem ativas (16-18).

Elevados níveis de glicose induzem a expressão e ativação das MMPs que são secretadas pelas células endoteliais (gelatinase A ou metaloproteinase da matriz-2 (MMP-2) e estromalisina-1 ou metaloproteinase da matriz-3 (MMP-3)) e pelos macrófagos (gelatinase B ou metaloproteinase da matriz-9 (MMP-9)) no tecido vascular (19-21). Outro fator que induz a expressão das MMPs são as citocinas pró-inflamatórias, sendo as MMPs também conhecidas como mediadoras da inflamação por degradarem substratos patológicos como parte da resposta inflamatória (13, 20-22).

A atividade das MMPs é ainda regulada endogenamente pela presença de inibidores tecidulares das metaloproteinases (TIMPs) que mantêm o equilíbrio entre a degradação e a síntese do tecido conjuntivo, controlando assim a integridade da MEC (14, 19, 23). O inibidor tecidular da metaloproteinase 1 (TIMP-1) é capaz de inibir todas as MMPs conhecidas e, como tal, desempenha um papel central na regulação da degradação da MEC e na remodelação dos tecidos (18, 19). É o inibidor natural da MMP-9, uma vez que apresenta maior afinidade por esta enzima (24).

As MMPs estão implicadas na fisiopatologia da DM e nas complicações associadas a esta doença (10, 12, 19). A MMP-2 e a MMP-9 têm um papel ativo nos processos inflamatórios que advêm da DM, principalmente os que ocorrem a nível da retina e a nível renal (17, 24-27).

A hiperglicemia crónica na DM altera a relação entre a atividade das MMPs e os seus inibidores, conduzindo a uma desregulação do equilíbrio entre a degradação e a remodelação tecidular (17, 18, 23). A deteção de alterações dos níveis e da atividade da MMP-2 e da MMP-9 e dos níveis de TIMP-1 poderá ser sugestiva de uma excessiva remodelação vascular, alertando precocemente para o desenvolvimento de múltiplas complicações em doentes com DM tipo 1, tais como retinopatia e nefropatia (10, 15, 18, 28).

A investigação de novos biomarcadores que reconheçam e monitorizem as complicações que advêm da DM permitirá um controlo antecipado da progressão destas lesões, contribuindo para uma melhor qualidade de vida desta crescente população (17). O objetivo desta investigação consistiu em avaliar os níveis e a atividade da MMP-2 e da MMP-9 e os níveis de TIMP-1 em amostras de soro de indivíduos diabéticos tipo 1 face a um grupo controlo saudável e também possíveis correlações com o parâmetro bioquímico HbA1c.

Material e Métodos

População do estudo

Fizeram parte da população de estudo 12 indivíduos diabéticos tipo 1 com pelo menos 7 anos de doença e 10 indivíduos saudáveis como grupo controlo.

De acordo com os critérios de inclusão os indivíduos participantes eram diabéticos tipo 1 com pelo menos 7 anos de doença, havendo um emparelhamento em relação ao género e a amplitude de idades variou entre os 24 e os 69 ($47,79 \pm 12,70$) anos. De acordo com os critérios de exclusão, não se admitiram no estudo indivíduos com complicações macrovasculares, neuropatias, outras doenças agudas ou crónicas e fumadores.

Efetuaram-se, a cada participante, colheitas sanguíneas em jejum.

Os dados correspondentes à população em estudo (características individuais, anos de doença e marcadores bioquímicos) encontram-se descritos na tabela 1.

A Comissão de Ética do Hospital Distrital da Figueira da Foz aprovou o projeto de investigação de acordo com a Declaração de Helsínquia e todos os indivíduos incluídos no estudo deram o seu consentimento informado por escrito, após serem esclarecidos sobre a natureza do projeto de pesquisa e aceite voluntariamente ingressar nele.

Tabela 1 – Caracterização da população em estudo

	Grupo DM	Grupo Controlo
Características individuais		
Idade (anos)	47,79±12,70	47,4± 4,452
Anos de doença	23±10,03	-
Marcadores bioquímicos		
Colesterol Total (mg/dL)	197,4±41,71*	193,9±28,30
Glicemia em jejum (mg/dL)	205±100,64**	79,27±4,57
HbA1c (%)	7,38±0,93	-
Doentes com complicações da DM		
Retinopatia	7	-
Retinopatia e nefropatia	2	-
Doentes sem complicações da DM	5	-

Os dados da caracterização da população estão apresentados sob a forma de média ± desvio padrão; * $p > 0,05$ (Grupo DM vs Grupo Controlo); ** $p < 0,0001$ (Grupo DM vs Grupo Controlo)

Tratamento da amostra

A colheita das amostras de sangue venoso, em jejum, efetuou-se por punção sanguínea para tubos de gel seco e para tubos de ácido etilenodiamino tetracético tri-potássico (K_3 EDTA). Os níveis de HbA1c mediram-se em sangue total, colhido para os tubos de K_3 EDTA, usando o *kit Cobas HbA1c Test (Roche, Indianopolis, USA)* e o equipamento *Cobas c 501 da Roche (Indianopolis, USA)*.

As amostras de soro centrifugaram-se a 3000 g, durante 10 minutos, a 4°C e armazenaram-se a -80° C até à sua análise. A quantificação de proteínas totais obteve-se utilizando o *kit LQ total protein (Cormay)* e recorrendo-se ao analisador automático *Prestige 24i (PZ Cormay S. A., Poland)*. A determinação dos parâmetros bioquímicos, tais como os níveis de glicemia em jejum e níveis de colesterol total, realizou-se no equipamento *Cobas 6000 da Roche (Indianopolis, USA)*.

Análise por slot blot

A análise dos níveis de TIMP-1 por *slot-blot* efetuou-se de acordo com Caseiro *et al.*(9). As amostras de soro diluíram-se numa solução salina tamponada com *Tris Buffered Saline (TBS)* (10 mM Tris, 500 mM NaCl), com o objetivo de se obter uma concentração final de proteína de 0,02 µg/ µL e aplicou-se um volume de 150 µL nas membranas de nitrocelulose - *Hybond ECL Nitrocellulose Membrane (GE Healthcare, Pittsburgh, USA)*. As membranas de nitrocelulose bloquearam-se numa solução com 5% (m/v) de leite em pó magro em TBS (10%) durante uma hora e meia e, posteriormente, incubaram-se à temperatura ambiente em agitação constante durante uma hora e quinze minutos com o anticorpo primário anti-TIMP-1 (Clone 63515; R&D systems, Minneapolis, USA), diluído a 1:500. Seguidamente as membranas lavaram-se três vezes, durante 10, 15 e 10 minutos, respetivamente, com TBS-Tween (TBS-T) e incubaram-se durante uma hora e meia com anticorpo secundário (*alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse, Bio-Rad, Hercules, USA*) numa diluição de 1:3000. Após a incubação com o anticorpo secundário as membranas lavaram-se novamente três vezes, durante 10, 15 e 10 minutos, respetivamente com TBS-T. A deteção realizou-se por quimiluminescência de acordo com as instruções do *kit Immun-Star™ AP Chemiluminescent Protein Detection System (Bio-Rad, Minneapolis, USA)*, expondo-se a um filme fotográfico *Kodak BioMax Light Film (Carestream Health, Rocherter, USA)* numa cassete (*Kodak® X-OMAT Casset, Carestream Health, Rocherter, USA*) durante 4 minutos. A análise da densidade ótica (D.O.) das bandas efetuou-se com recurso ao sistema de aquisição de imagem *GelDoc XR+ (Bio-Rad Hercules, USA)* e ao *software ImageLab® Versão 3.0 (Bio-Rad Hercules, USA)*.

Análise por zimografia

A análise da atividade proteolítica da MMP-2 e da MMP-9 por zimografia realizou-se de acordo com o descrito por Caseiro *et al.* (10). As amostras de soro diluíram-se em água destilada com a finalidade de se obter uma concentração de proteína de 15 µg/ 10 µL. Prepararam-se dois géis *SDS-PAGE (Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)*: o gel de separação numa concentração de 10%, copolimerizado com gelatina a 0,1% e, após a

polimerização deste, adicionou-se gel de concentração a 4%, colocando-se os pentes até este polimerizar. Depois aplicaram-se dois padrões de pesos moleculares (marcador capilar e marcador comercial - *Precision Plus Protein™ Standards kaleidoscope™*; *Bio-Rad Hercules*, USA) e 26 µl de amostra nos poços, que previamente foram preparadas com tampão de carregamento (100mM Tris pH 6,8; 5% SDS; 20% glicerol; 0,1% azul bromofenol) numa proporção de 1:1 (v/v) e incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente. Por fim, procedeu-se à eletroforese em tampão de corrida (100mM Tris; 100mM Bicina; 0,1% SDS), a 180V durante 40-45 minutos. Após a eletroforese, lavaram-se os géis com tampão de renaturação (2,5% Triton X-100) durante 30 minutos à temperatura ambiente com agitação suave. Posteriormente, incubaram-se os géis em tampão de desenvolvimento (50mM Tris, pH 7,4; 5mM NaCl; 10mM CaCl₂; 1µM ZnCl₂) durante 30 minutos à temperatura ambiente em agitação suave. Após esta incubação adicionou-se novo tampão de desenvolvimento e incubou-se a 37°C *overnight*. Seguidamente, coraram-se os géis com *Coomassie Brilliant Blue G250* (0,4% *Coomassie Brilliant Blue* em 50% etanol; 10% ácido acético) durante 4 horas sob agitação suave. Por fim, descoraram-se com 20% metanol até haver um contraste entre as bandas claras e o *background* azul. Utilizou-se o sistema *GelDoc XR+* (*Bio-Rad Hercules*, USA) para a aquisição das imagens do zimograma e o *software ImageLab® Versão 3.0* (*Bio-Rad Hercules*, USA) para a sua análise quantitativa.

Estatística

Os cálculos estatísticos realizaram-se com recurso ao programa estatístico *GraphPad Prism* versão 5.0 para *Windows* (*GraphPad Software*, *San Diego*, *California*, *USA*). Os valores apresentam-se como média ± desvio padrão e os valores de D.O. estão expressos em unidades arbitrárias. As diferenças dos valores de D.O. entre os grupos da amostra determinaram-se utilizando o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. A correlação entre as variáveis avaliou-se através do coeficiente de correlação *Rho de Spearman* de acordo com a normalidade dos resultados obtidos. Recorreu-se a uma tabela e a um diagrama de barras para a apresentação de resultados. Para a inferência estatística teve-se em conta um nível de confiança de 95% para um grau de erro de 5%.

Resultados

Considerando que a MMP-2 e a MMP-9 têm um papel ativo nos processos inflamatórios que advêm da DM (17, 24-27), procedeu-se à determinação da atividade enzimática destas enzimas e dos seus respetivos zimogénios. As pró-MMPs, *in vitro*, adquiriram atividade enzimática devido aos procedimentos de renaturação utilizados durante o método de zimografia.

A análise da atividade gelatinolítica das enzimas presentes nas amostras de soro revelou no gel a presença das bandas correspondentes à pró-MMP-2, à MMP-9 e à pró-MMP-9, com pesos moleculares de aproximadamente 72 kDa, 86 kDa e 92 kDa respetivamente. Atribuiu-se o peso molecular a cada enzima de acordo com Caseiro *et al.* (10).

Nas amostras de soro analisadas, determinou-se a atividade enzimática do zimogénio da MMP-2. A pró-MMP-2 apresentou-se tendencialmente mais elevada no grupo de indivíduos com DM (664000±206100) comparativamente ao grupo controlo (609700±171800), apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Avaliação da atividade proteolítica da pró-MMP-2, *in vitro*, da MMP-9 e dos níveis séricos de TIMP-1

	Grupo DM	Grupo Controlo
Atividade proteolítica		
Pró-MMP-2	664000±206100	609700±171800
MMP-9	961900±603900	530100±156000
Níveis séricos		
TIMP-1	0,2026±0,1454	0,2660±0,1334

Os dados da caracterização da população estão apresentados sob a forma de média ± desvio padrão; $p > 0,05$ (Grupo DM vs Grupo Controlo)

A atividade enzimática da pró-MMP-9 demonstrou ser superior no grupo de indivíduos com DM (162199 ±209328) comparativamente ao grupo controlo (36471±4548), apesar desta diferença não apresentar significado estatístico.

A atividade proteolítica da MMP-9 apresentou-se tendencialmente mais elevada no grupo de indivíduos com DM (961900 ± 603900) comparativamente ao grupo controlo (530100 ± 156000). No entanto, não se observaram diferenças estatisticamente significativas (**Tabela 2**).

Sendo a pró-MMP-9 a forma inativa da MMP-9, avaliou-se a razão entre os níveis séricos de MMP-9 e pró-MMP-9, para verificar a existência de uma possível relação entre alteração destas enzimas e a progressão da DM.

A razão entre os níveis de MMP-9 e pró-MMP-9 apresentou valores tendencialmente mais elevados no grupo de indivíduos com DM ($16,27 \pm 17,71$) em comparação com o grupo controlo ($12,51 \pm 5,920$), apesar das diferenças observadas não serem significativas.

O TIMP-1 regulada endogenamente a atividade das MMPs, tendo maior afinidade pela MMP-9 (18, 19, 24). Desta forma, procedeu-se à avaliação dos níveis séricos de TIMP-1 por *slot blot*.

Os níveis de TIMP-1 nas amostras de soro apresentaram-se tendencialmente mais baixos no grupo de indivíduos com DM ($0,2026 \pm 0,1454$) em comparação ao grupo controlo ($0,2660 \pm 0,1334$). Contudo, as diferenças não foram estatisticamente significativas (**Tabela 2**).

Considerando o TIMP-1 o inibidor natural da MMP-9 avaliou-se a razão entre os níveis séricos de MMP-9 e TIMP-1, que apresentou valores tendencialmente mais elevados no grupo de indivíduos com DM (8330000 ± 1007000) em comparação com o grupo controlo (3522000 ± 1637000), apesar das diferenças observadas não terem significado estatístico (**Figura 1**).

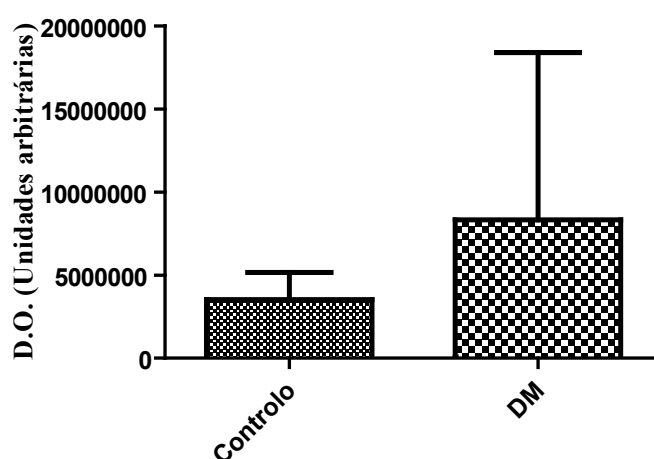


Figura 1 – Avaliação da razão entre os níveis séricos de MMP-9 e TIMP-1

Relativamente à correlação entre os níveis séricos de MMP-9 e TIMP-1 não se observou um padrão de variação entre os níveis de TIMP-1 e MMP-9 ajustado ao grupo de doentes com DM ($r=0,2143$; $p=0,6191$).

Alterações na concentração de HbA1c permitem averiguar a longo prazo que um indivíduo diabético sofreu episódios de hiperglicemia (3). Reconhecendo que a hiperglicemia crónica se relaciona com a progressão da DM e com as consequências que dela advêm, correlacionaram-se os níveis séricos de pró-MMP-2, pró-MMP-9, MMP-9 e TIMP-1 com os níveis de HbA1c (%) ajustada ao grupo de doentes com DM.

Não se observou um padrão de variação entre os níveis de pró-MMP-2, pró-MMP-9, MMP-9 e TIMP-1 e os níveis de HbA1c (%) ($r=0,3095$; $p=0,4618$), ($r=0,5238$; $p=0,1966$), ($r=0,2857$; $p=0,5008$), ($r=-0,2242$; $p=0,5367$).

Discussão

Apesar de ainda não se ter esclarecido completamente quais os mecanismos que originam as complicações vasculares na DM tipo 1, desregulações na remodelação da MEC pelas MMPs contribuem para o aparecimento das lesões microvasculares (25, 29-31). A ligação dos TIMPs ao local ativo das MMPs permite bloquear o acesso aos

substratos da MEC, tornando-se fundamental uma relação adequada entre as MMPs e os seus inibidores para a manutenção da integridade da MEC (27, 32, 33).

No presente estudo averiguou-se que a atividade enzimática da MMP-9 e da pró-MMP-2, *in vitro*, foi tendencialmente maior e os níveis de TIMP-1 diminuíram tendencialmente no grupo de DM (**Tabela 2**). A razão MMP-9/TIMP-1 revelou valores tendencialmente mais elevados nos doentes (**Figura 1**). Não se observaram correlações entre a MMP-9 e TIMP-1, nem entre os níveis de pró-MMP-2, pró-MMP-9, MMP-9 e TIMP-1 e os níveis de HbA1c.

Analisaram-se as amostras de soro de indivíduos com DM tipo I pela técnica de zimografia no sentido de avaliar a atividade proteolítica da MMP-2 e da MMP-9. Utilizaram-se dois padrões de peso molecular que demonstraram a presença das bandas correspondentes à pró-MMP-2, à MMP-9 e à MMP-9, com pesos moleculares de aproximadamente 72 kDa, 86 kDa e 92 kDa respetivamente (10).

Para a análise dos níveis de TIMP-1 por *slot-blot*, recorreu-se a um anticorpo primário anti-TIMP-1 e a um anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina que permitiu a deteção das ligações do anticorpo primário às moléculas de TIMP-1 (10). Neste estudo, a atividade enzimática da pró-MMP-2, que reflete a quantidade de pró-MMP-2 presente no soro de cada indivíduo, verificou um aumento tendencial nos doentes diabéticos comparativamente ao grupo controlo (**Tabela 2**). Não foi possível identificar a banda de D.O. correspondente à atividade enzimática da MMP-2 na sua forma ativa, o que terá elevada importância em estudos futuros, uma vez que num estudo de Derosa *et al.* (27), sugere-se que o aumento dos níveis de MMP-2 em crianças e adolescentes com DM tipo 1 possa servir de biomarcador para o desenvolvimento de lesões microvasculares. Ainda, de acordo com Yang *et al.* (4) o aumento da expressão de MMP-2 promove a degradação do colagénio tipo IV, acelerando o aparecimento das complicações vasculares da diabetes, como a retinopatia. Apesar de não se ter averiguado na presente investigação, outros estudos referem a existência de uma regulação positiva dos níveis de MMP-2 induzida pela hiperglicemia em doentes diabéticos (19, 25).

Os níveis séricos de pró-MMP-9 e MMP-9, avaliados pela atividade gelatinolítica destas enzimas, observaram-se superiores nos indivíduos diabéticos (**Tabela 2**). Apesar das diferenças obtidas neste estudo não serem estatisticamente significativas, a literatura corrobora com os resultados, referindo que a expressão de MMP-9 aumenta com a inflamação que é induzida por elevados índices glicémicos na DM (*stress oxidativo* ou produtos finais de glicação avançada) (15, 32). Neste estudo não se fez esta correlação, mas seria importante averiguar se os níveis elevados de MMP-2 e MMP-9 estão associados ao desenvolvimento de retinopatia em indivíduos diabéticos, como sugere Peeters *et al.* (30) e segundo um estudo animal onde se encontraram níveis de MMP-9 elevados nas retinas de ratos com DM (24). Outros estudos também mencionam um aumento da expressão das MMPs, nomeadamente a MMP-2 e MMP-9 em doentes com DM (13, 18, 28, 31).

Houve um aumento tendencial da razão MMP-9/pró-MMP-9, que mesmo não tendo significado estatístico, não se conseguindo, por isso, retirar uma conclusão, provavelmente este resultado pode indicar que nos doentes diabéticos existem quantidades superiores de MMP-9 na forma ativa, sendo esta possivelmente responsável pela degradação da MEC em diversos tecidos e pelo consequente desenvolvimento de lesões vasculares, tal como é referido em diversos estudos anteriores (17, 19, 34).

Os níveis séricos de TIMP-1 avaliados por *slot blot* mostraram-se tendencialmente inferiores no grupo dos doentes diabéticos em comparação com o grupo controlo de população saudável (**Tabela 2**). O TIMP-1 é o inibidor tecidual capaz de inativar todas as MMPs e tem maior afinidade para a MMP-9 (18, 24, 33). De acordo com Maxwell *et al.* (18), o aumento de TIMP-1 permite a inibição da atividade das MMPs, reduzindo a degradação da MEC e evitando, consequentemente, a progressão das complicações que advêm da DM. Segundo o mesmo autor a relação entre as MMPs e o inibidor é complexa e provavelmente varia com o tempo e com o tipo de complicação vascular que afeta o indivíduo diabético, dado que alguns tecidos são mais suscetíveis aos efeitos que advêm da DM (18). Desta forma, no presente estudo analisou-se a razão MMP-9/TIMP-1, que se demonstrou superior no grupo de doentes com DM (**Figura 1**). No entanto as diferenças obtidas não foram significativas ($p > 0,05$). Não se evidenciou nenhuma correlação entre os níveis séricos de MMP-9 e TIMP-1 no grupo de indivíduos diabéticos.

Não se fez esta correlação neste estudo, mas seria importante averiguar em investigações futuras, a existência de uma associação entre a retinopatia e um aumento da razão MMP-9/TIMP-1, como se refere no estudo de Peeters *et al.* (30) e no estudo de Mohammad *et al.* (24), que verificou uma diminuição de TIMP-1 nas retinas de ratos diabéticos. Por outro lado, Maxwell *et al.* (18) apresenta resultados que comprovam que o TIMP-1 desempenha um papel significativo na regulação da progressão da doença renal, uma vez que para além de se evidenciarem níveis elevados de MMP-9, também se observaram níveis elevados de TIMP-1 nos rins de ratos diabéticos e numa cultura de células mesangiais, em ambiente propício à DM, verificou-se uma produção elevada de TIMP-1 por estas células. No presente estudo também não se averiguou esta associação, que terá grande relevância em ser avaliada em investigações futuras.

A HbA1c é o principal parâmetro utilizado para avaliar os níveis de glicemia a longo prazo (3, 17). Um adequado controlo da glicemia retarda o desenvolvimento e a progressão das complicações vasculares induzidas pela DM (17, 27). No entanto, neste estudo não se verificou qualquer padrão de variação, nos indivíduos diabéticos, entre os níveis séricos de pró-MMP-2, pró-MMP-9, MMP-9 e TIMP-1 e os níveis de HbA1c. Contudo, segundo Lewandowski *et al.* (13), existe uma correlação positiva entre as concentrações de MMP-9 e HbA1c, corroborando com o facto da hiperglicemia crónica aumentar a atividade das MMPs em diversos tecidos (32).

Os resultados obtidos não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) e dado que o tamanho da população de estudo foi reduzido, não permitindo a subdivisão da população diabética em grupos que apresentassem as diferentes complicações da doença, como retinopatia e nefropatia, este fator limitou a deteção de correlações significativas, impossibilitando a formulação de uma conclusão.

Os níveis de colesterol não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo e o grupo de doentes com DM, indicando que nenhuma patologia associada a um estado de hipercolesterolemia influenciou os níveis séricos de pró-MMP-2, pró-MMP-9, MMP-9 e TIMP-1.

Conclusão

Neste estudo obtiveram-se níveis tendencialmente mais elevados de pró-MMP-2, pró-MMP-9 e de MMP-9 e níveis tendencialmente mais baixos de TIMP-1, apesar das diferenças observadas não serem estatisticamente significativas. Como os resultados obtidos foram limitados pelo reduzido número de doentes com DM tipo 1, também não se pode excluir a possibilidade da existência de uma relação significativa entre o aumento das MMPs e a progressão da DM e das complicações que dela advêm. Assim, para futuras investigações é necessário um maior número de doentes com DM tipo 1 e estratificar a população diabética de acordo com as diferentes complicações inerentes à doença de forma a possibilitar a correlação dos dados clínico-patológicos com os resultados obtidos do ensaio experimental. A investigação no sentido de identificar biomoléculas envolvidas nos mecanismos que causam alterações patogénicas vasculares, iniciadoras das complicações que ocorrem nos indivíduos com DM tipo I, como da retinopatia e da nefropatia poderá possibilitar o desenvolvimento de terapêuticas que inibam estes mecanismos, retardando a degradação dos vasos sanguíneos consequente da DM tipo I.

Referências Bibliográficas

1. Barbosa JHP, Oliveira SLd, Seara LTe. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. *Revista de Nutrição*. 2009;22(1):113 -24.
2. Caseiro A, Barros A, Ferreira R, Padrao A, Aroso M, Quintaneiro C, *et al.* Pursuing type 1 diabetes mellitus and related complications through urinary proteomics. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2014;163(3):188-99.
3. Marcovecchio ML, Lucantoni M, Chiarelli F. Role of chronic and acute hyperglycemia in the development of diabetes complications. *Diabetes technology & therapeutics*. 2011;13(3):389-94.
4. Yang J, Fan XH, Guan YQ, Li Y, Sun W, Yang XZ, *et al.* MMP-2 gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus diabetic retinopathy. *International journal of ophthalmology*. 2010;3(2):137-40.
5. Moses CR, Seshiah V, Sahay BK, Kumar A, Asirvatham AJ, Balaji V, *et al.* Baseline results indicate poor glycaemic control and delay in initiation and optimization of insulin therapy: results from the improving management practices and clinical outcomes in type 2 diabetes study. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2012;16(Suppl 2):S432-3.
6. Ndisang JF, Rastogi S, Vannacci A. Insulin Resistance, Type 1 and Type 2 Diabetes, and Related Complications 2015. *Journal of diabetes research*. 2015;2015:234135.
7. Wang P, Fiaschi-Taesch NM, Vasavada RC, Scott DK, Garcia-Ocana A, Stewart AF. Diabetes mellitus--advances and challenges in human beta-cell proliferation. *Nature reviews Endocrinology*. 2015;11(4):201-12.
8. Stitt AW, Lois N, Medina RJ, Adamson P, Curtis TM. Advances in our understanding of diabetic retinopathy. *Clin Sci (Lond)*. 2013;125(1):1-17.
9. Caseiro A, Vitorino R, Barros AS, Ferreira R, Calheiros-Lobo MJ, Carvalho D, *et al.* Salivary peptidome in type 1 diabetes mellitus. *Biomedical chromatography : BMC*. 2012;26(5):571-82.
10. Caseiro A, Ferreira R, Quintaneiro C, Pereira A, Marinheiro R, Vitorino R, *et al.* Protease profiling of different biofluids in type 1 diabetes mellitus. *Clinical biochemistry*. 2012;45(18):1613-9.
11. Song W, Ergul A. Type-2 diabetes-induced changes in vascular extracellular matrix gene expression: relation to vessel size. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5:3.
12. Koromantzou PA, Makrilakis K, Dereka X, Offenbacher S, Katsilambros N, Vrotsos IA, *et al.* Effect of non-surgical periodontal therapy on C-reactive protein, oxidative stress, and matrix metalloproteinase (MMP)-9 and

- MMP-2 levels in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled study. *Journal of periodontology*. 2012;83(1):3-10.
13. Lewandowski KC, Banach E, Bienkiewicz M, Lewinski A. Matrix metalloproteinases in type 2 diabetes and non-diabetic controls: effects of short-term and chronic hyperglycaemia. *Archives of medical science : AMS*. 2011;7(2):294-303.
 14. Papazafiropoulou A, Perrea D, Moysakis I, Kokkinos A, Katsilambros N, Tentolouris N. Plasma levels of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 are not associated with arterial stiffness in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Journal of diabetes and its complications*. 2010;24(1):20-7.
 15. Nascimento Dda C, Durigan Rde C, Tibana RA, Durigan JL, Navalta JW, Prestes J. The response of matrix metalloproteinase-9 and -2 to exercise. *Sports Med*. 2015;45(2):269-78.
 16. Collin HL, Sorsa T, Meurman JH, Niskanen L, Salo T, Ronka H, *et al*. Salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) levels and gelatinase (MMP-9) activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of periodontal research*. 2000;35(5):259-65.
 17. Symeonidis C, Papakonstantinou E, Galli A, Tsinopoulos I, Mataftsi A, Batzios S, *et al*. Matrix metalloproteinase (MMP-2, -9) and tissue inhibitor (TIMP-1, -2) activity in tear samples of pediatric type 1 diabetic patients: MMPs in tear samples from type 1 diabetes. *Graefes's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2013;251(3):741-9.
 18. Maxwell PR, Timms PM, Chandran S, Gordon D. Peripheral blood level alterations of TIMP-1, MMP-2 and MMP-9 in patients with type 1 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2001;18(10):777-80.
 19. Lee SW, Song KE, Shin DS, Ahn SM, Ha ES, Kim DJ, *et al*. Alterations in peripheral blood levels of TIMP-1, MMP-2, and MMP-9 in patients with type-2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2005;69(2):175-9.
 20. Death AK, Fisher EJ, McGrath KC, Yue DK. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis*. 2003;168(2):263-9.
 21. Kumar MS, Vamsi G, Sripriya R, Sehgal PK. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *Journal of periodontology*. 2006;77(11):1803-8.
 22. Buraczynska M, Dragan M, Buraczynska K, Orlowska-Kowalik G, Ksiazek A. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) gene polymorphism and cardiovascular comorbidity in type 2 diabetes patients. *Journal of diabetes and its complications*. 2015;29(6):829-33.
 23. Florys B, Glowinska B, Urban M, Peczynska J. [Metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 levels in children and adolescents with type 1 diabetes]. *Endokrynologia, diabetologia i choroby przemiany materii wieku rozwojowego : organ Polskiego Towarzystwa Endokrynologow Dzieciacych*. 2006;12(3):184-9.
 24. Mohammad G, Mairaj Siddiquei M, Imtiaz Nawaz M, Abu El-Asrar AM. The ERK1/2 Inhibitor U0126 Attenuates Diabetes-Induced Upregulation of MMP-9 and Biomarkers of Inflammation in the Retina. *Journal of diabetes research*. 2013;2013:658548.
 25. Thraikill KM, Clay Bunn R, Fowlkes JL. Matrix metalloproteinases: their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Endocrine*. 2009;35(1):1-10.
 26. Thraikill KM, Bunn RC, Moreau CS, Cockrell GE, Simpson PM, Coleman HN, *et al*. Matrix metalloproteinase-2 dysregulation in type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2007;30(9):2321-6.
 27. Derosa G, Avanzini MA, Geroldi D, Fogari R, Lorini R, De Silvestri A, *et al*. Matrix metalloproteinase 2 may be a marker of microangiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*. 2005;70(2):119-25.
 28. Gharagozlian S, Svennevig K, Bangstad HJ, Winberg JO, Kolset SO. Matrix metalloproteinases in subjects with type 1 diabetes. *BMC clinical pathology*. 2009;9:7.
 29. Snell-Bergeon JK, Nadeau K. Cardiovascular disease risk in young people with type 1 diabetes. *Journal of cardiovascular translational research*. 2012;5(4):446-62.
 30. Peeters SA, Engelen L, Buijs J, Chaturvedi N, Fuller JH, Schalkwijk CG, *et al*. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2, -3, -10, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are associated with vascular complications in patients with type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14:31.
 31. Derosa G, D'Angelo A, Scalise F, Avanzini MA, Tinelli C, Peros E, *et al*. Comparison between metalloproteinases-2 and -9 in healthy subjects, diabetics, and subjects with acute coronary syndrome. *Heart and vessels*. 2007;22(6):361-70.
 32. Bastos MF, Tucci MA, de Siqueira A, de Faveri M, Figueiredo LC, Vallim PC, *et al*. Diabetes may affect the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors more than smoking in chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2016.
 33. Jakubowska K, Poczynicz A, Iwanowicz P, Niewinski A, Maciorkowska E, Hapanowicz J, *et al*. Expressions of Matrix Metalloproteinases (MMP-2, MMP-7, and MMP-9) and Their Inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology research and practice*. 2016;2016:2456179.
 34. Thraikill KM, Moreau CS, Cockrell GE, Jo CH, Bunn RC, Morales-Pozzo AE, *et al*. Disease and gender-specific dysregulation of NGAL and MMP-9 in type 1 diabetes mellitus. *Endocrine*. 2010;37(2):336-43.

Agradecimento

Labinsaúde. Projeto co-financiado pelo QREN, no âmbito do Programa Mais Centro, da Comissão de Coordenação da Região Centro e da União Europeia através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional.

Conteúdo de hemoglobina dos reticulócitos vs ferritina sérica, na avaliação da deficiência de ferro em doentes oncológicos

Machado, A.¹ Serra, C.^{1,2} Mendes, C.²

Escola Superior de Saúde – Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto
Serviço de Hematologia Laboratorial, Instituto Português de Oncologia FG-EPE, Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto

Email: anacatarina1518@gmail.com; carlaspsserra@gmail.com; carlos3mendes@gmail.com

Resumo

Introdução: A deficiência de ferro afeta mundialmente 2 milhões de pessoas. A ferritina e o Conteúdo de Hemoglobina dos Reticulócitos (RET-He) são parâmetros que permitem detetar esta alteração. Sendo a ferritina considerada o marcador mais sensível do metabolismo do ferro, o RET-He é o primeiro marcador analisado em sangue periférico a sofrer alterações devido à deficiência de ferro. No entanto, existem condições paralelas que levam ao aumento da concentração de ferritina sérica, tornando mais confiável a aplicabilidade do RET-He face à ferritina. **Objetivo:** Verificar a existência de relação entre os parâmetros RET-He e ferritina sérica, numa população de indivíduos com patologia oncológica. **Material e métodos:** Realizou-se um estudo observacional analítico transversal com os resultados das determinações de RET-He e ferritina obtidas pela base de dados do Instituto Português de Oncologia FG – EPE, Porto entre Setembro de 2015 e Janeiro de 2016. **Resultados:** Através do programa Microsoft Excel 2007 obteve-se a média de RET-He de 32,22pg e de ferritina de 600,95 µg/L. O coeficiente de determinação (r^2) obtido pela realização da regressão linear foi de 0,201. **Conclusão:** Verificou-se uma fraca relação entre as variáveis RET-He e ferritina. Desta forma, não é possível inferir sobre a aplicabilidade do RET-He no diagnóstico de deficiência de ferro em doentes oncológicos, que permitiria a deteção precoce da deficiência de ferro. No futuro, poderá ser estudada a influência das diferentes patologias oncológicas nas variáveis em estudo.

Palavras-chave: Conteúdo de Hemoglobina dos Reticulócitos, Ferritina, Deficiência de ferro, Diagnóstico

Introdução

A deficiência de ferro é uma alteração que afeta mundialmente mais de 2 milhões de pessoas e é responsável por 0,8 milhões de óbitos. Desta forma, na tentativa de diminuir o número de novos casos é importante identificar os fatores de risco e os parâmetros que permitem detetar o défice de ferro.^{1,2} A nutrição deficiente em ferro é a principal causa desta alteração, afetando principalmente as crianças, seguida de hemorragias.³⁻⁷ Os fatores de risco associados a esta patologia incluem infeções parasitárias, idade, sexo e perfil socioeconómico.⁸

A deficiência de ferro é responsável por 50% das anemias desenvolvidas mundialmente, e, em Portugal, estudos verificam que 10,9% da população desenvolve anemia causada por este tipo de deficiência.^{2,9,10}

O ferro é essencial na síntese da hemoglobina, encontrando-se incorporado maioritariamente no grupo heme dos eritroblastos e da mioglobina presente nos músculos. A presença do ferro no grupo heme assegura o transporte de oxigénio pela corrente sanguínea, visto que este se liga às moléculas de oxigénio, contribuindo também para a regulação da quantidade de eritropoietina produzida pelo fígado influenciando assim a eritropoiese.^{3,11,12,13}

O ferro existente no organismo resulta da alimentação e da reciclagem dos eritrócitos senescentes.¹⁴ A deficiência funcional do ferro é caracterizada por um desequilíbrio entre o ferro necessário para a eritropoiese e a biodisponibilidade deste.^{15,16} Esta alteração ocorre quando o ferro é retido pelos macrófagos no sistema reticuloendotelial, ficando os hepatócitos com baixas concentrações de ferro. Desta forma não ocorre mobilização suficiente de ferro para a eritropoiese tendo como consequência o desenvolvimento de anemia.^{5,12,14,17} Esta é verificada em processos inflamatórios, infeções e em anemias provocadas por quimioterapia, caracterizando-se por elevadas concentrações de ferritina entre 100 e 800µg/L.¹⁵

O diagnóstico de deficiência de ferro é realizado com base na coloração citoquímica de ferro em esfregaços de

medula óssea, sendo esta a metodologia de referência. A coloração de ferro ou *Perl's* permite visualizar a presença de grânulos de ferro nos sideroblastos existentes na medula óssea. Na deficiência de ferro é previsto a ausência de depósitos de ferro.^{5,7,15,18-20} No entanto, uma vez que o aspirado de medula óssea é um método invasivo, poder-se-á realizar a determinação de parâmetros bioquímicos, sendo a ferritina sérica o parâmetro de maior interesse clínico.²¹

A ferritina é constituída por 24 subunidades de dois tipos de cadeias: *Heavy* (H) e *Light* (L).^{11,22,23} É considerada o marcador mais sensível do metabolismo do ferro uma vez que é responsável pelo armazenamento deste nas células.^{3,11} Assim a determinação quantitativa desta metaloproteína no soro ou plasma permite inferir a concentração de ferro no organismo uma vez que o valor da sua concentração é proporcional às reservas de ferro.²⁴

No entanto, existem condições que levam ao aumento da concentração de ferritina sérica, tais como doenças crónicas, diabetes, alcoolismo, síndromes metabólicas e inflamações.^{10,12,25,26} Um valor de ferritina inferior a 10µg/L é sugestivo de anemia por deficiência de ferro, embora este parâmetro bioquímico não seja indicador da biodisponibilidade do ferro.²⁴

Em indivíduos oncológicos que apresentam deficiência de ferro, a ferritina pode encontrar-se em concentrações consideradas normais, devido à elevação da sua concentração em quadros clínicos inflamatórios e/ou crónicos. Nestas situações verifica-se que existe um aumento do armazenamento do ferro, no entanto este encontra-se retido no complexo de Golgi, não estando disponível para a eritropoiese.^{6,16,22,24}

Adicionalmente, em complemento do diagnóstico de anemia por deficiência de ferro, pode determinar-se Volume Corpuscular Médio (MCV), Hemoglobina Corpuscular Média (MCH), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC), transferrina e saturação da transferrina, embora estes apresentem baixa sensibilidade.^{10,12,18,21,25,27,28}

Recentemente foi desenvolvido um método que determina o Conteúdo de Hemoglobina dos Reticulócitos (RET-He), sendo este o primeiro marcador analisado em sangue periférico que sofre alterações devido à deficiência de ferro.^{4,21} A concentração de RET-He é determinada em amostras de sangue total colhidas em tubo com anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (EDTA) no autoanalisador hematológico XN9000 da Sysmex[®] por citometria de fluxo e fluorescência, sendo este um dos autoanalisadores utilizados para detetar a concentração de RET-He. A sua determinação é importante em várias situações como no diagnóstico de anemia, na eritropoiese restrita de ferro e na deficiência funcional de ferro, direcionando para a melhor terapêutica.^{2,5,17,18,29-31} De forma a auxiliar a diferenciação entre um défice funcional de ferro ou uma deficiência de ferro clássica o resultado obtido com a determinação do RET-He deve ser avaliado simultaneamente com o valor de ferritina sérica.²⁴

O RET-He permite avaliar em tempo real a biodisponibilidade do ferro pela determinação da concentração de hemoglobina presente nos reticulócitos, indicando assim a quantidade de ferro disponível nos últimos 3 a 4 dias para a eritropoiese.^{10,21,32,33-35} A carência de ferro ou a indisponibilidade deste para a eritropoiese provoca a diminuição da concentração de RET-He, sendo por isso considerado um marcador precoce de deficiência de ferro.⁴ O diagnóstico de deficiência de ferro conclui-se em casos cujo valor de RET-He é inferior a 28 pg. Este parâmetro não sofre alterações significativas com o aumento da idade nem é afetado por interferências fisiológicas, representando mais vantagens em relação à ferritina. Desta forma, torna-se confiável a sua aplicabilidade em todas as populações, incluindo crianças, grávidas, idosos e indivíduos com patologias crónicas.^{2,13,17,28} No entanto, a concentração de RET-He também apresenta-se diminuída em indivíduos com talassemia.^{2,4,24,27,32} Como o RET-He é um marcador de biodisponibilidade do ferro, a sua utilização permite monitorizar a terapêutica do ferro. Por este motivo, a sua determinação é útil em indivíduos com deficiência de ferro, uma vez que, reflete a biodisponibilidade atual de ferro nestes indivíduos. O sucesso da terapêutica pode ser verificado após 2 a 3 dias do início desta pelo aumento da concentração de RET-He.^{2,4,35}

Este estudo tem como objetivo verificar a existência de relação entre os valores obtidos com a determinação do RET-He e os valores de ferritina sérica, numa população de amostras provenientes de indivíduos com doença oncológica.

Material e métodos

Foi realizado um estudo observacional analítico transversal com os resultados das determinações de RET-He, por citometria de fluxo fluorescente e ferritina, por ensaio imuno-turbidimétrico, obtidas através da base de dados do sistema informático e-deiaLab do Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, EPE-Porto, entre Setembro de 2015 e Janeiro de 2016. Para o tratamento de dados foi elaborado, através do programa Microsoft Excel 2007, uma reta de regressão linear para analisar a relação entre as variáveis “Ferritina sérica” e “RET-He”.

Resultados

Com a base de dados construída pelo sistema informático e-deia-Lab foram estudadas 270 determinações de RET-He e ferritina sérica, pertencentes a 225 indivíduos com patologia oncológica. Destes 225 indivíduos 52,44% (n=118) eram do sexo masculino e 47,56% (n=107) do sexo feminino. A análise da distribuição dos indivíduos por grupos etários permitiu verificar que o grupo etário [65-72] foi o mais frequente. A média de idades foi de $47,28 \pm 25,39$ anos e mediana de 49, variando de 1 ano a 92 anos.

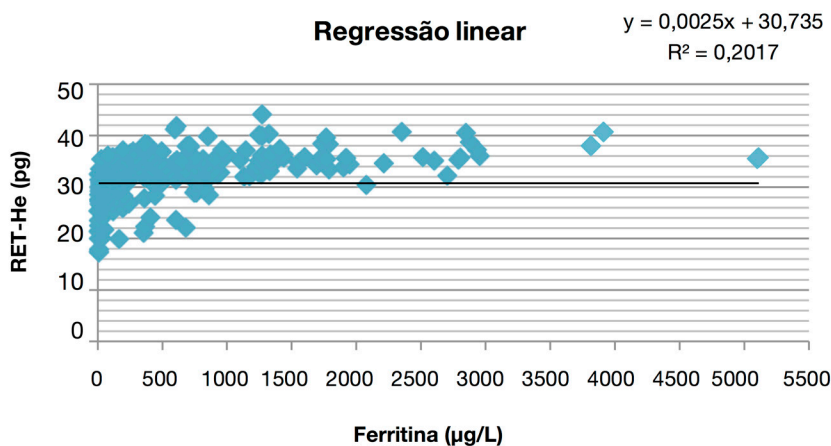
Da população de 225 indivíduos foram obtidas 270 determinações de Eritrócitos (RBC), HGB, Hematócrito (HCT), Volume Corpuscular Médio (MCV), Hemoglobina Corpuscular Média (MCH), RET-He, Reticulócitos (Ret) e Ferritina (Tabela 1). A média de HGB foi de $11,27 \pm 2,12$ g/dL variando de 6 a 16,2 g/dL; a média de RET-He foi de $32,22 \pm 4,52$ pg variando de 17,3 a 44,1 pg e a média da ferritina foi de $600,95 \pm 815,46$ µg/L e os seus valores variam entre 7 a 5111 µg/L.

Tabela 1 - Resultados das determinações laboratoriais recolhidas

	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	Ret-He (pg)	Ret (%)	Ferritina (µg/L)
Média	3,74	11,27	34,21	92,25	30,4	32,22	2,11	600,95
Erro-padrão	0,04	0,13	0,37	0,53	0,22	0,28	0,09	49,63
Mediana	3,77	11,3	34,4	93,1	30,8	32,9	1,7	298
Moda	3,77	11,2	32,2	94,7	29,1	33	1,4	9
Desvio-padrão	0,74	2,12	6,06	8,64	3,59	4,52	1,42	815,46
Variância da amostra	0,54	4,51	36,7	74,6	12,92	20,45	2,01	664969,76
Intervalo	3,49	10,2	28,5	47,6	20,6	26,8	8,2	5104
Mínimo	1,82	6	17,9	64,5	18,4	17,3	0,3	7
Máximo	5,31	16,2	46,4	112,1	39	44,1	8,5	5111
Contagem	270	270	270	270	270	270	270	270

Da totalidade dos dados das variáveis RET-He e ferritina sérica (n=270) obtidos pelo programa informático e-deiaLab realizou-se a regressão linear, cujo coeficiente de determinação (r^2) foi de 0,201 (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Regressão linear



Discussão

Este estudo foi efetuado numa população de doentes oncológicos, representando esta condição uma limitação não só devido às neoplasias, mas também ao processo de cronicidade e/ou inflamatório que poderá decorrer nesta população, bem como os tratamentos a que estão sujeitos, como a quimioterapia.

Pela análise da tabela 1, relativa aos parâmetros hematológicos e bioquímicos recolhidos, verifica-se que a amostra em estudo apresenta uma média de HGB de 11,27 g/dL. Para o género feminino considera-se anemia um valor de HGB inferior a 11 g/dL e para o género masculino um valor de HGB inferior a 12 g/dL.² Desta forma, pode concluir-se que o valor médio de HGB é baixo, podendo a maioria dos indivíduos em estudo apresentar anemia. No estudo de Peerschke et al também se verifica uma população de indivíduos com patologia oncológica anémica. O valor médio de ferritina sérica obtido na amostra em estudo é elevado (600,95 µg/L) uma vez que valores de ferritina entre 10 a 250 µg/L são os valores de referência, sendo o valor obtido esperado numa população de amostras de doentes oncológicos. Estes poderão encontrar-se elevados devido à neoplasia ou ao tratamento, não refletindo o valor real de ferro armazenado. De forma a verificar se o valor de ferritina sérica elevado é devido a um processo inflamatório ou a uma sobrecarga de ferro, poder-se-á determinar parâmetros auxiliares como a Proteína C Reativa (PCR) e a saturação da transferrina. Numa situação de inflamação é esperada uma elevada concentração da PCR, enquanto numa sobrecarga de ferro é esperado um aumento da saturação da transferrina.

A média de RET-He obtida nas determinações dos indivíduos incluídos no estudo foi de 32,22 pg, considerado normal relativamente aos valores de referência, que se encontram entre 28 a 36 pg.² Este resultado permite afirmar que os indivíduos em estudo, em média, não têm deficiência de ferro, encontrando-se este biodisponível para a eritropoiese, podendo concluir-se que a deficiência de ferro não é a causa do valor obtido de HGB diminuído. Sendo o valor de RET-He específico da determinação da biodisponibilidade do ferro e, como não sofre alterações em processos de fase aguda demonstra uma maior especificidade relativamente à ferritina.¹⁰ O estudo do RET-He também apresenta vantagens em relação à determinação da HGB, na medida em que o seu resultado diminui num período de 2 a 3 dias como consequência da deficiência de ferro, enquanto a deteção da diminuição da HGB só é verificável após 1 semana deste desequilíbrio dos níveis de ferro.^{4,36}

A regressão linear possibilita identificar e estimar uma função que descreva, o mais próximo possível, a relação entre as variáveis, que permitirá prever o valor que a variável dependente y (RET-HE) irá assumir para um determinado valor da variável independente x (ferritina sérica). A relação é determinada pelo valor do r^2 que avalia a qualidade do ajustamento do modelo aos dados. Com a realização da regressão linear (gráfico 1) obteve-se a equação da reta $y=0,002x-30,73$ e r^2 de 0,201. No gráfico 1 visualiza-se uma concentração de pontos, não existindo um padrão linear. Estatisticamente verifica-se que o r^2 obtido é baixo não permitindo inferir relação entre as variáveis em estudo, RET-He e ferritina sérica, sendo este resultado já verificado nos estudos de Peerschke *et al.* e Lorenz L. *et al.* A inexistência de relação entre as variáveis não permite inferir sobre a aplicabilidade do RET-He no diagnóstico de deficiência de ferro, que possibilitaria a deteção precoce da deficiência de ferro, a principal vantagem da determinação do RET-He. Esta vantagem permite iniciar a terapêutica de ferro mais precocemente, possibilitando evitar possíveis consequências resultantes deste défice, como a anemia.

Este estudo encontra-se também limitado pelo baixo tamanho amostral, não permitindo extrapolar os resultados para a população oncológica em geral. Os diferentes diagnósticos entre os indivíduos da amostra em estudo, que podem ser influenciados pela anamnese dos doentes, como exposição ambiental, alimentação, hábitos tabágicos e consumo de álcool, foram também fatores limitantes para o referido estudo.

Conclusão

O parâmetro RET-He é considerado um indicador precoce da deficiência de ferro, evitando possíveis consequências resultantes deste défice pelo início precoce da terapêutica. Este apresenta diversas vantagens em relação à determinação da ferritina e da HGB, cujo número de determinações podem ser reduzidas no diagnóstico de deficiência de ferro.

No entanto, este estudo constatou a fraca relação entre as variáveis RET-He e ferritina sérica, devido às patologias/quadros clínicos dos doentes envolvidos que podem ter influenciado as variáveis analisadas, nomeadamente na determinação do parâmetro ferritina sérica.

No futuro, de modo a atingir a finalidade do estudo, deverá ser estudada a influência das diferentes patologias oncológicas nas variáveis RET-He e ferritina, de forma a verificar se poderá existir relação entre ambas as variáveis

consoante o diagnóstico. A inclusão dos parâmetros bioquímicos transferrina e saturação da transferrina também poderá ser vantajosa, permitindo auxiliar o diagnóstico de deficiência de ferro.

Referências bibliográficas

1. Report T world health. The world health report. WHO Disponível em: <http://www.who.int/whr/2002/chapter4/en/index3.html> (2010, accessed 15 June 2016).
2. Peerschke EIB, Pessin MS, Maslak P. Using the hemoglobin content of reticulocytes (RET-He) to evaluate anemia in patients with cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 2014, pp. 506–512.
3. Bishop M, Fody E, Schoeff L. *Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations*. 6th ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
4. Powers JM, Buchanan GR. Diagnosis and management of iron deficiency anemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2014, pp. 729–745.
5. Camaschella C. Iron-Deficiency Anemia. *New England Journal of Medicine*, 2015, pp. 1832–1843.
6. Uijterschout L, Domellöf M, Vloemans J, *et al.* The value of Ret-Hb and sTfR in the diagnosis of iron depletion in healthy, young children. *European journal of clinical nutrition*, 2014, pp. 882–886.
7. Gualandro SFM, Hojaij NHSL, Filho WJ. Deficiência de ferro no idoso. *Rev Bras Hematol Hemoter*. Epub ahead of print 2010. DOI: 10.1590/S1516-84842010005000058.
8. Brito LL, Barreto ML, Silva RDCR, *et al.* Risk factors for iron-deficiency anemia in children and adolescents with intestinal helminthic infections. *Rev Panam salud pública* 2003; 14: 422–31.
9. Goddard AF, McIntyre AS, Scott BB. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *Gut*, 2013, pp. iv1–iv5.
10. Davidkova S, Prestidge TD, Reed PW, *et al.* Comparison of reticulocyte hemoglobin equivalent with traditional markers of iron and erythropoiesis in pediatric dialysis. *Pediatr Nephrol*. Epub ahead of print 14 December 2015. DOI: 10.1007/s00467-015-3284-2.
11. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6th ed. Filadélfia: W. B. Saunders, 2008.
12. Clenin GE, Cordes M, Huber A, *et al.* Iron deficiency in sports – definition, influence on performance and therapy. *Swiss Medical Weekly*, 2015, pp. 1–15. Camaschella C, Pagani A, Nai A, *et al.* The mutual control of iron and erythropoiesis. 2016; 1–7.
13. Camaschella C, Pagani A, Nai A, *et al.* The mutual control of iron and erythropoiesis. 2016; 1–7.
14. Grotto HZW. Metabolismo do ferro : uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2008; 5: 390–397.
15. Peyrin-biroulet L, Williet N, Cacoub P. Guidelines on the diagnosis and treatment of iron deficiency across indications : a systematic review 1. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.3945/ajcn.114.103366.
16. Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Erythrocyte and reticulocyte indices in the assessment of erythropoiesis activity and iron availability. 2013; 144–149.
17. Miwa N, Akiba T, Kimata N, *et al.* Usefulness of measuring reticulocyte hemoglobin equivalent in the management of haemodialysis patients with iron deficiency. 2010; 248–255.
18. Schapkaitz E, Buldeo S, Mahlangu JN. Diagnosis of iron deficiency anaemia in hospital patients : Use of the reticulocyte haemoglobin content to differentiate iron deficiency anaemia from anaemia of chronic disease. 2016; 106: 53–54.
19. Hughes D a, Stuart-Smith SE, Bain BJ. How should stainable iron in bone marrow films be assessed? *J Clin Pathol* 2004; 57: 1038–1040. 26
20. Loffler H, Rastetter J, Haferlach T. *Atlas of Clinical Hematology*. 6th ed. Springer, 2010. Epub ahead of print 2010. DOI: 10.1136/jcp.43.6.523-d.
21. Lorenz L, Arand J, Buchner K, *et al.* Reticulocyte haemoglobin content as a marker of iron deficiency. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2015, pp. F198–202.
22. Wang W, Knovich M, Coffman L. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800: 760–769.
23. Li L, Zhang L, Knez M. Comparison of two endogenous delivery agents in cancer therapy: Exosomes and ferritin. *Pharmacol Res* 2016; 110: 1–9.
24. Beckman Coulter I. AU ® Instruções de utilização Ferritin. 2015, pp. 1–7.
25. Karagülle M, Gündüz E, Mutlu FŞ, *et al.* Clinical Significance of Reticulocyte Hemoglobin Content in the Diagnosis of Iron Deficiency Anemia.
26. Brugnara C, Schiller B, Moran J. Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret He) and assessment of iron-deficient states. 2006; 303–308.
27. Karlsson T. Comparative Evaluation of the Reticulocyte Hemoglobin Content Assay When Screening for Iron Deficiency in Elderly Anemic Patients. 2011; 10–12.
28. Semmelrock MJ, Raggam RB, Amrein K, *et al.* Reticulocyte hemoglobin content allows early and reliable detec-

- tion of functional iron deficiency in blood donors. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 678–682.
29. Urrechaga E, Boveda O, Aguayo FJ, *et al.* Percentage of hypochromic erythrocytes and reticulocyte hemoglobin equivalent predictors of response to intravenous iron in hemodialysis patients. 2016; 1–6.
 30. Stopper B. *Tecnologia e Parâmetros Clínicos Avançados*. Sysmex.
 31. Canals C, Remacha A, Sardá M, *et al.* Clinical utility of the new Sysmex XE 2100 parameter - reticulocyte hemoglobin equivalent - in the diagnosis of anemia. 90.
 32. Bain BJ, Bates I, Laffan M, *et al.* *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11th ed. Elsevier, 2011.
 33. Mast AE, Blinder MA, Dietzen DJ. Reticulocyte hemoglobin content. 2008; 307–310.
 34. Sudmann-Day ÅA, Piehler A, Klingenberg O, *et al.* Six-day stability of erythrocyte and reticulocyte parameters in-vitro: a comparison of blood samples from healthy, iron-deficient, and thalassemic individuals. *Scand J Clin Lab Invest* 2015; 75: 247–53.
 35. Parodi E, Giraudo MT, Ricceri F, *et al.* Absolute Reticulocyte Count and Reticulocyte Hemoglobin Content as Predictors of Early Response to Exclusive Oral Iron in Children with Iron Deficiency Anemia. 2016.
 36. Parodi E, Giraudo M, Davitto M. Reticulocyte parameters: markers of early response to oral treatment in children with severe iron-deficiency anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2012.

Atividade Física e Impacto em Marcadores Bioquímicos em Diabéticos: Revisão Sistemática da Literatura

Eduarda Barreira¹, André Novo¹, Josiana Vaz^{1,2} Ana Pereira¹

¹ Escola Superior de Saúde de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, Av. D. Afonso V, 5300-121 Bragança, Portugal. edubarreira4@hotmail.com

² CIMO- Centro de Investigação de Montanha, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal.

Resumo

A diabetes *mellitus* é uma patologia crónica com grande expansão a nível mundial. Estima-se que o número de portadores de diabetes aumente rapidamente nas próximas décadas devido ao envelhecimento da população, obesidade, alimentação inadequada e inatividade física. A implementação de programas de intervenção com ênfase na promoção da atividade física tem demonstrado ser um ponto importante no tratamento desta patologia já que permitem um melhor controlo da glicémia e perfil lipídico. Verificar qual a efetividade da implementação de um programa de atividade física nos valores de glicémia e perfil lipídico em portadores de diabetes *mellitus* tipo 2, incluindo pessoas com 60 ou mais anos. Revisão sistemática da literatura publicada no período 2010-2015 na base de dados PubMed/Medline de acordo com as orientações da Recomendação PRISMA e Colaboração Cochrane. Após a aplicação dos critérios de inclusão foram selecionados 14 artigos de um total de 6600. Neles é evidente a influência positiva que a implementação de programas de atividade física supervisionados baseados em exercícios aeróbios, resistência, flexibilidade e combinados têm no controlo da glicémia e perfil lipídico em portadores de diabetes *mellitus* tipo 2. De uma forma geral, os resultados obtidos permitem-nos verificar que a implementação de programas de atividade física, que visem a prática regular desta de acordo com informações cientificamente válidas são pilares fundamentais no tratamento e controlo metabólico da diabetes *mellitus* tipo 2.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus* tipo 2; Controlo glicémico; Dislipidémia; Treino Físico.

Abstract

Diabetes *mellitus* is a chronic disease with great impact worldwide, particularly in the elderly population. It is estimated that the number of type 2 diabetics increase considerably in the coming decades due to the aging population, obesity, unhealthy diet and physical inactivity. The implementation of intervention programs with emphasis on the promotion of physical activity has been shown to be an important point in the treatment of this pathology since they allow a better control of glycemia and lipid profile. To verify the effectiveness of the implementation of physical activity programs in the values of glucose and the lipid profile in patients with type 2 diabetes *mellitus*, including people aged 60 and over. Systematic review of the literature published in the period 2010-2016 in PubMed/Medline database according to the guidelines of the PRISMA and Cochrane Collaboration Recommendation. After applying the inclusion criteria, 14 articles were selected from a total of 6.600. In them it is evident the positive influence that the implementation of supervised physical activity programs based on aerobic, resistance, flexibility and combined exercises has in controlling glycemic and lipid profile in patients with type 2 diabetes *mellitus*. In general, the results obtained allow us to verify that the implementation of physical activity programs aimed regular practice of this according to scientifically valid information are fundamental pillars in the treatment and metabolic control of type 2 diabetes *mellitus*.

Keywords: Type 2 diabetes *mellitus*; Glycemic control; Dyslipidemia; Physical training.

Introdução

A diabetes *mellitus* é uma doença crónica com grande expansão a nível mundial. O aumento global da prevalência desta patologia, nos últimos anos, nomeadamente da diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) tem sido atribuído principalmente

ao envelhecimento da população, obesidade, alimentação inadequada e inatividade física (1-7). Mundialmente, em 2015, estimava-se que havia 415 milhões de pessoas com diabetes *mellitus*, sendo que este número deverá atingir os 642 milhões em 2040. Neste mesmo ano, esta patologia foi responsável por 5 milhões de mortes. As projeções da Organização Mundial de Saúde estimam que a diabetes *mellitus* seja a sétima principal causa de morte em 2030 (6, 8). A International Diabetes Federation refere que Portugal é dos países da União Europeia que apresenta uma taxa de prevalência da diabetes *mellitus* mais elevada (13.6 %) (6). Em 2015 mais de um milhão de portugueses com idades compreendidas entre 20 e os 79 anos eram portadores de diabetes *mellitus*. Mais de um quarto dos portugueses na faixa etária 60-79 anos sofria desta patologia (9). De acordo com a mesma fonte, haverá uma taxa de prevalência de diabetes *mellitus* não diagnosticada de aproximadamente 44%. Dada a posição epidemiológica que ocupa e as repercussões associadas é considerada um problema mundial de saúde pública (10-13). A Organização Geral das Nações Unidas reconheceu que a diabetes *mellitus* é uma doença crónica, debilitante, que leva a complicações graves. A deteção precoce e um tratamento adequado são basilares para o seu controlo e/ou progressão (12-15). Os efeitos benéficos da prática regular de atividade física (AF) no controlo da glicémia e perfil lipídico têm vindo a ser documentados na literatura. Esta é considerada por várias as evidências científicas uma estratégia de intervenção não farmacológica essencial na prevenção e controlo metabólico da DM2 (6, 16-22). O objetivo desta revisão sistemática foi verificar qual a efetividade da implementação de um programa de atividade física nos valores de glicémia e perfil lipídico em portadores de diabetes *mellitus* tipo 2, incluindo pessoas com 60 ou mais anos.

Metodologia

Fontes de dados

Pesquisa na base de dados científica internacional PubMed/Medline no horizonte temporal 2010-2016, utilizando os descritores: “*Type 2 diabetes mellitus AND (BMI OR obesity OR (physical activity) OR exercise OR glucose OR HbA1c OR (total cholesterol) OR HDL OR LDL OR VLDL OR triglycerides OR apoA OR apoB OR apoC OR apoD OR apoE OR)*”.




Colheita de dados e avaliação da qualidade

Com o intuito de obter artigos adequados ao objetivo do estudo, estabeleceu-se um conjunto de critérios de inclusão: artigos com foco em intervenções de AF em portadores de DM2 que incluam participantes com idade igual ou superior a 60 anos, com avaliação da intervenção proposta, tipo de estudo randomizado controlado, publicados entre 2010 e 2016, disponíveis em texto integral e publicados em português, espanhol, inglês ou francês. Avaliou-se o risco de viés de cada estudo selecionado de acordo com as recomendações da Colaboração Cochrane, uma vez que os estudos randomizado controlado são muito propensos a vieses, devido à arbitrariedade dos investigadores na seleção da amostra, avaliação das variáveis analisadas e dificuldade no controle de variáveis externas que podem influenciar os resultados (23).

No quadro 1 foi feita a classificação do risco de viés dos estudos selecionados, tendo como linha orientadora as recomendações da Colaboração Cochrane.

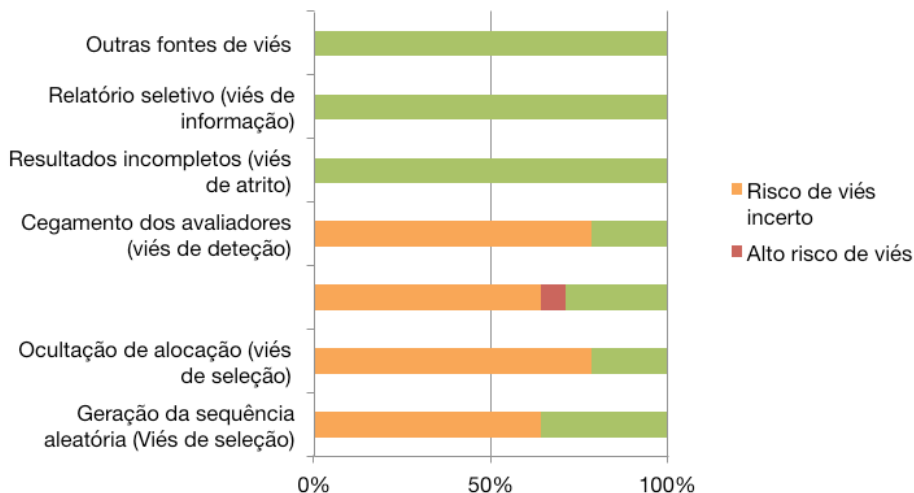
Quadro 1 – Risco de viés para cada estudo incluído nesta revisão

	VIÉS						
	Seleção (Sequência)	Seleção (Ocultação)	Desempenho	Deteção	Atrito	Informação	Outras
Gavin et al. 2010 ⁽³⁷⁾	●	●	●	●	●	●	●
Okada et al. 2010 ⁽³⁸⁾	●	●	●	●	●	●	●
Church et al. 2010 ⁽³³⁾	●	●	●	●	●	●	●
De Greef et al. 2011 ⁽³⁹⁾	●	●	●	●	●	●	●
Ariza Copado et al. 2011 ⁽³⁹⁾	●	●	●	●	●	●	●
Jorge et al. 2011 ⁽²⁵⁾	●	●	●	●	●	●	●
Larose et al. 2011 ⁽³⁴⁾	●	●	●	●	●	●	●
Ferrer-Garcia et al. 2011 ⁽²⁶⁾	●	●	●	●	●	●	●
Balducci, et al., 2012 ⁽²⁷⁾	●	●	●	●	●	●	●
Balducci, et al., 2012 ⁽³²⁾	●	●	●	●	●	●	●
Swift et al. 2012 ⁽³²⁾	●	●	●	●	●	●	●
Yuan et al., 2014 ⁽³⁸⁾	●	●	●	●	●	●	●
Vinetti et al., 2015 ⁽³⁹⁾	●	●	●	●	●	●	●
Motahari-Tabari et al., 2015 ⁽³³⁾	●	●	●	●	●	●	●

 Baixo risco de viés
 Alto risco de viés
 Risco de viés incerto

A avaliação é composta por duas partes, em que o risco de viés é avaliado em sete domínios: geração da sequência aleatória, ocultação da alocação, cegamento de participantes e profissionais, cegamento dos avaliadores finais, conclusões incompletas, relato de desfecho seletivo e outras fontes de viés. Na primeira parte faz-se uma análise ao que está descrito no artigo de forma a poder classificar o risco de viés. Na segunda parte é feita a classificação do risco de viés numa das três categorias a seguir mencionadas: baixo risco de viés, alto risco de viés ou risco de viés incerto para cada um dos domínios analisados (24). No gráfico 1 está representada a avaliação global do risco de viés.

Gráfico 1 – Percentagem do risco de viés dos estudos incluídos nesta revisão



Dados Obtidos

Como se pode verificar no fluxograma de seleção dos artigos (Fig.1), efetuado de acordo com as recomendações PRISMA (Principais Itens para Relatar Revisões Sistemáticas e Meta- análises), na nossa pesquisa inicial foram identificados na base de dados 6.660 estudos, dos quais 6.247 estudos foram excluídos devido à falta de relevância e 353 foram selecionados. Destas publicações, 295 foram excluídas e 58 foram inicialmente selecionadas com base no título e resumo. Após a leitura do texto integral foram excluídos 44 artigos e apenas 14 preencheram os critérios de inclusão, sendo considerados para esta revisão.

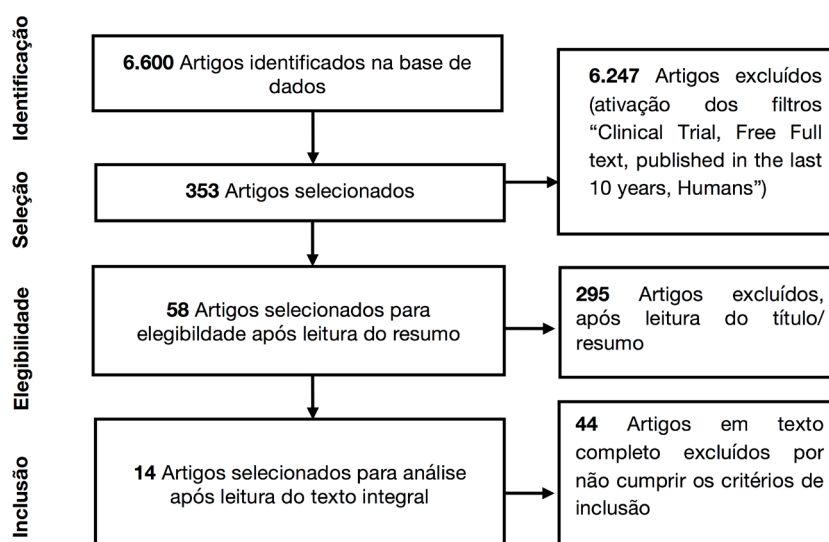


Figura 1 – Fluxograma de seleção dos artigos

De forma a facilitar a análise da informação contida em cada artigo, foi construído o quadro 2, com a síntese das informações recolhidas.

Quadro 2 – Descrição dos trabalhos científicos incluídos nesta revisão

EXERCÍCIO AERÓBIO	
Motahari-Tabari <i>et al.</i> , 2015, Irão	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Glicose ($p > 0,05$) ↓ Insulina ($p < 0,05$) ↓ Resistência à insulina ($p < 0,05$)
EXERCÍCIO AERÓBIO + RESISTÊNCIA	
Okada <i>et al.</i> , 2010, Japão	<ul style="list-style-type: none"> ↓ HbA1c ($p < 0,05$) ↓ CT ($p < 0,05$) ↓ C- LDL ($p < 0,05$) ↑ C- HDL ($p < 0,05$) ↓ TG ($p < 0,05$) ↑ Glicose ($p > 0,05$)
Balducci, Zanuso, Cardelli, Salerno, <i>et al.</i> , 2012, Itália	<ul style="list-style-type: none"> ↓ HbA1c ($p < 0,05$) ↓ CT ($p > 0,05$); ↓ C- LDL ($p < 0,05$) ↑ C- HDL ($p > 0,05$) ↑ TG ($p > 0,05$)
Balducci, Zanuso, Cardelli, Salvi <i>et al.</i> , 2012, Itália	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Glicose ($p < 0,05$) ↓ HbA1c ($p < 0,05$) ↓ Insulina ($p < 0,05$) ↓ Resistência à insulina ($p < 0,05$) ↓ CT ($p < 0,05$) ↓ C- LDL ($p < 0,05$) ↑ C- HDL ($p < 0,05$) ↓ TG ($p < 0,05$) INTENSIDADE MODERADA A ALTA ↑ TG ($p < 0,05$) INTENSIDADE MODERADA A BAIXA
EXERCÍCIO AERÓBIO + RESISTÊNCIA + FLEXIBILIDADE	
Vinetti <i>et al.</i> , 2015, Itália	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Glicose ($p > 0,05$) ↓ HbA1c ($p > 0,05$) ↓ Insulina ($p < 0,05$) ↓ Resistência à insulina ($p < 0,05$) ↓ CT ($p < 0,05$) ↓ C- LDL ($p < 0,05$) ↓ TG ($p > 0,05$) ↓ C- HDL ($p > 0,05$)

Quadro 2 (continuação)– Descrição dos trabalhos científicos incluídos nesta revisão

EXERCÍCIO AERÓBIO / RESISTÊNCIA / COMBINADO	
Church <i>et al.</i> , 2010, EUA	↓ HbA1c
Larose et al, 2011, Canadá	> ↓ no grupo exercício combinado ($p < 0,05$)
Swift <i>et al.</i> , 2012, EUA	↓ Insulina: > ↓ no grupo exercício combinado ($p > 0,05$) ↑ Glicose < ↑ no grupo exercício combinado ($p < 0,05$)
Gavin <i>et al.</i> , 2010, Canadá	↓ TG > ↓ no grupo exercício combinado ($p > 0,05$) ↓ Apo B-48 no grupo exercício combinado ($p > 0,05$) e resistência ($p < 0,05$) ↑ Apo B-48 no grupo exercício aeróbio ($p > 0,05$)
Jorge <i>et al.</i> , 2011, Brasil	↓ Glicose em jejum ↓ HbA1c ↓ TG ↓ Glicose pós prandial ↓ CT ↓ Resistência à insulina C- HDL: ↑ Grupo exercício combinado ($p > 0,05$) ↓ Grupo exercício aeróbio e resistência ($p < 0,05$)
SESSÕES EDUCATIVAS	
De Greef <i>et al.</i> , 2011, Bélgica	↓ HbA1c ($p < 0,05$) ↓ Glicose ($p > 0,05$) ↑ CT ($p > 0,05$)
Yuan <i>et al.</i> , 2014, Japão	↓ HbA1c ($p < 0,05$) ↓ Glicose ($p > 0,05$) ↓ CT ($p < 0,05$) ↓ C- LDL ($p > 0,05$) ↓ TG ($p > 0,05$) ↑ C- HDL ($p > 0,05$)
SESSÕES EDUCATIVAS + EXERCÍCIO AERÓBIO	
Ariza Copado <i>et al.</i> , 2011, Espanha	↓ HbA1c
Ferrer-García <i>et al.</i> , 2011, Espanha	↓ Glicose ↓ CT ↓ C- LDL ↓ TG ↑ C- HDL

Discussão dos Resultados

Vários autores têm focado as suas investigações na efetividade da prática de AF no controlo da glicémia e perfil lipídico de portadores de DM2. No que se refere às alterações a nível glicémico, verificou-se em vários estudos que o exercício físico aeróbio, flexibilidade, resistência ou combinado (aeróbio e resistência) supervisionado proporciona

uma diminuição da hemoglobina glicada (HbA1c) e glicose em jejum (25-32). Estes resultados vão de encontro aos do estudo de Church, *et al.* (2010), acrescentando ainda estes, que a prática de exercício aeróbio e resistência quando combinado, potencia uma maior redução da HbA1c do que quando praticados individualmente. Quando realizados em separado, o exercício aeróbio potencia uma maior redução em comparação com o exercício de resistência. O estudo de Larose *et al.* (2011) vem corroborar estes resultados, referindo que foram observados níveis mais baixos de HbA1c no grupo que praticou exercício combinado supervisionado, seguindo-se o exercício aeróbio e de resistência. Os resultados do estudo de Swift *et al.* (2012) também vão ao encontro do acima citado em relação ao exercício combinado. Porém, no que concerne ao exercício aeróbio e de resistência, constatou-se que foi este último que proporcionou menores valores de HbA1c. Tendo em conta a modalidade do exercício, no estudo de Jorge *et al.* (2011), verificou-se que o exercício de resistência é o que potencia uma maior redução da HbA1c e glicose em jejum, seguindo-se o exercício aeróbio e combinado. Em relação à glicose pós-prandial, o tipo de exercício que proporcionou maior redução foi o aeróbio, seguindo-se o combinado e resistência. No estudo de Okada *et al.* (2010) a prática de exercício aeróbio e de resistência supervisionado durante 3 meses não proporcionou benefícios a curto prazo no perfil glicémico, uma vez que os valores de glicose em jejum no plasma tiveram um ligeiro aumento (aproximadamente 0,3mmol/L). Resultados semelhantes verificaram-se no estudo de Swift *et al.* (2012), onde se constatou que o exercício combinado foi o que proporcionou um menor aumento da glicose em jejum, seguindo-se o exercício aeróbio e o de resistência. A prática de exercício também proporcionou uma menor resistência à insulina, (25, 27, 30, 31) sendo também o exercício combinado o que potenciou uma menor resistência, seguido do exercício de resistência e aeróbio supervisionados (25). Em relação aos níveis de insulina, verificou-se que estes são mais baixos quando se pratica exercício físico aeróbio, resistência e combinado supervisionado (27, 31, 35). O exercício combinado supervisionado foi o que potenciou uma maior redução, seguido do exercício de resistência e aeróbio (35). Tendo em conta a intensidade do exercício combinado, constatou-se que quando este é praticado com uma intensidade moderada a alta, verificam-se valores mais baixos de HbA1c e glicose do que quando a intensidade é baixa. Em relação à resistência à insulina, verificou-se uma menor resistência no grupo que praticou exercício aeróbio de intensidade moderada a baixa (27). De acordo com a maioria dos estudos analisados, a prática de exercício físico também demonstra ser uma ferramenta fundamental no controlo do perfil lipídico em portadores de DM2. Segundo o estudo de Okada *et al.* (2010), a prática de exercício aeróbio e de resistência supervisionado correlaciona-se com um melhor perfil lipídico pois proporciona valores mais baixos de CT, LDL, TG e o colesterol HDL é incrementado. Estes resultados são corroborados pelo estudo de Balducci, Zanuso, Cardelli, Salvi, *et al.* (2012) aquando da prática exercício aeróbico e de resistência de intensidade moderada a alta. Quando a intensidade do exercício é moderada a baixa apenas se verifica uma redução do CT e LDL, os TG aumentam, bem como o colesterol HDL. O mesmo resultado obteve o estudo de Balducci, Zanuso, Cardelli, Salerno *et al.* (2012), em que os participantes foram submetidos a um programa de exercícios aeróbios e resistência supervisionados durante 1 ano. No estudo de Gavin *et al.* (2010), onde foram avaliados 251 portadores de DM2, verificou-se que a prática de exercício aeróbio, de resistência e combinado supervisionado, traduz-se em valores mais baixos de TG. O exercício combinado foi o que proporcionou uma maior redução, seguindo-se o exercício de resistência e o aeróbio. Em relação à Apo B 48, esta diminuiu no grupo exercício de resistência e combinado, tendo tido um ligeiro aumento no grupo exercício aeróbio. Resultados semelhantes foram verificados no estudo de Jorge *et al.* (2011), referindo também que foram observados níveis mais baixos de TG, porém neste estudo o exercício que proporcionou uma maior redução foi o de resistência, seguindo-se o combinado e o aeróbio. O CT também sofreu uma redução. Neste caso o exercício aeróbio foi o que proporcionou maior redução, seguido do de resistência e combinado. Em relação ao colesterol HDL, este só aumentou no grupo que praticou exercício combinado, tendo-se verificado uma menor redução no grupo que praticou exercício aeróbio. Vinetti *et al.* (2015) analisaram a influência de um programa de exercício aeróbios, de resistência e flexibilidade supervisionados em contexto hospitalar, tendo-se verificado valores mais baixos de TG, CT, LDL e HDL.

A efetividade de sessões educativas que abordem a importância da prática de AF no controlo do perfil glicémico e lipídico também foi alvo de estudo em quatro dos artigos selecionados.

Em relação às sessões educativas e programas de auto gestão da diabetes *mellitus* que abordem a importância da AF e de uma alimentação saudável correlacionam-se com valores mais baixos de HbA1c, glicose, CT, LDL, TG e aumento do colesterol HDL (29, 38). Neste contexto, De Greef *et al.* (2011), constataram que ao contrário do que se verificou com os níveis de glicose e HbA1c, 12 semanas de sessões educativas individuais ou em grupo onde foi abordada a importância da prática de AF, não proporcionam uma redução do CT. O aumento foi maior quando as sessões foram realizadas em grupo e o formador (médico de clínica geral) tinha formação na área do comportamento. Em relação à HbA1c e glicose a diminuição foi maior quando as sessões se realizaram individualmente. Quando estas sessões se combinam com a prática de exercício aeróbio de intensidade moderada os efeitos benéficos são potenciados (29). A realização de um programa de exercício físico aeróbio ou anaeróbio em casa em conjunto com sessões educativas que abordem a prática de AF e de uma alimentação saudável durante 6 meses em 84 pacientes portadores de DM2 diminuiu os valores de TG, CT e LDL e o colesterol HDL aumentou (26). O nosso estudo apresenta, no entanto, algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados, tais como a heterogeneidade dos estudos incluídos, da população estudada e os estilos de vidas dos países onde foram

realizados os estudos. Uma vez que a maioria dos estudos não se realizou em laboratório, a prática de exercício e AF habitual podem estar subestimados. Existe também um desconhecimento do acompanhamento dos pacientes após a intervenção para avaliar a persistência dos potenciais efeitos benéficos a longo prazo. Outra das limitações é o risco de viés de seleção incerto nos estudos incluídos. O fato de nenhum dos estudos analisados ocorrer a nível nacional, não permite caracterizar a influência destes programas em portugueses portadores de DM2. Deste modo, fica provada a necessidade de continuar a investigar nesta temática para poder colmatar as lacunas apontadas. Assim, futuras investigações devem ser realizadas e publicadas para poder caracterizar com maior precisão a efetividade da prática de AF no perfil glicémico e lipídico em portadores de DM2, nomeadamente a nível nacional.

Conclusão

Dada a elevada prevalência da DM2 na população, particularmente na população idosa, e considerando que esta patologia tende a aumentar com a idade, torna-se crucial enraizar nas práticas diárias dos indivíduos mudanças de comportamentos, promovendo estilos de vida mais ativos e saudáveis ao longo da vida. Os programas de AF e a realização de sessões elucidativas junto das populações relativamente à importância da mudança de estilos de vida de acordo com informações cientificamente válidas revelam-se como estratégias terapêuticas complementares no tratamento e controlo metabólico da DM2.

Referências Bibliográficas

1. Basanta-Alario ML, Ferri J, Civera M, Martínez-Hervás S, Ascaso JF, Real JT. Diferencias en las características clínico-biológicas y prevalencia de complicaciones crónicas en relación con el envejecimiento de pacientes con diabetes tipo 2. *Endocrinología y Nutrición*. 2016;63(2):79-86.
2. Fernández MA. Tratamiento del anciano con diabetes. *SEMERGEN - Medicina de Familia*. 2014;40, Supplement 1:10-6.
3. Formiga F, Gómez-Huelgas R, Rodríguez Mañas L. Características diferenciales de la diabetes *mellitus* tipo 2 en el paciente anciano. Papel de los inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*. 2016;51(1):44-51.
4. Gómez Huelgas R, Díez-Espino J, Formiga F, Lafita Tejedor J, Rodríguez Mañas L, González-Sarmiento E, *et al*. Tratamiento de la diabetes tipo 2 en el paciente anciano. *Medicina Clínica*. 2013;140(3):134.e1-.e12.
5. Halter JB, Musi N, McFarland Horne F, Crandall JP, Goldberg A, Harkless L, *et al*. Diabetes and cardiovascular disease in older adults: current status and future directions. *Diabetes*. 2014;63(8):2578-89.
6. IDF. *DIABETES ATLAS*. 7ª ed. Karakas: International Diabetes Federation; 2015.
7. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27(5):1047-53.
8. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006;3(11):e442.
9. Diabetes: Factos e Números - O Ano de 2014- Relatório do Observatório Nacional da Diabetes. 2015.
10. Gao N, Yuan Z, Tang X, Zhou X, Zhao M, Liu L, *et al*. Prevalence of CHD-related metabolic comorbidity of diabetes *mellitus* in Northern Chinese adults: the REACTION study. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2016;30(2):199-205.
11. Machado MRC, Gomes Junior SC, Marinheiro LPF. Vitamina D e diabetes *mellitus*, suas epidemias e o envelhecimento. O que há de novo? *Reprodução & Climatério*. 2014;29(2):54-9.
12. Santos S, Beça H, Mota CL. Qualidade de vida e fatores associados na diabetes *mellitus* tipo 2: estudo observacional. *Rev Port Med Geral Fam*. 2015;31(3):186-96.
13. OMS. *Global Report On Diabetes*. Geneva: World Health Organization.; 2016.
14. DGS. Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Diabetes. Lisboa: Direção-Geral da Saúde; 2008.
15. Zoungas S, Woodward M, Li Q, Cooper ME, Hamet P, Harrap S, *et al*. Impact of age, age at diagnosis and duration of diabetes on the risk of macrovascular and microvascular complications and death in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2014;57(12):2465-74.
16. ADA. Standards of Medical Care in Diabetes - 2016. *Diabetes Care*. 2016;39(Suppl 1):S1-112.
17. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, *et al*. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2012;35(6):1364-79.
18. Mudaliar U, Zabetian A, Goodman M, Echouffo-Tcheugui JB, Albright AL, Gregg EW, *et al*. Cardiometabolic Risk Factor Changes Observed in Diabetes Prevention Programs in US Settings: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Med*. 2016;13(7):e1002095.
19. Aguiar EJ, Morgan PJ, Collins CE, Plotnikoff RC, Callister R. Efficacy of interventions that include diet, aerobic and resistance training components for type 2 diabetes prevention: a systematic review with meta-analysis. *Int J Behav Nutr Phys Act*. 2014;11:2.

20. Yang Z, Scott CA, Mao C, Tang J, Farmer AJ. Resistance exercise versus aerobic exercise for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med.* 2014;44(4):487-99.
21. Green LW, Brancati FL, Albright A, Group PPoDW. Primary prevention of type 2 diabetes: integrative public health and primary care opportunities, challenges and strategies. *Fam Pract.* 2012;29 Suppl 1:i13-23.
22. Greaves CJ, Sheppard KE, Abraham C, Hardeman W, Roden M, Evans PH, *et al.* Systematic review of reviews of intervention components associated with increased effectiveness in dietary and physical activity interventions. *BMC Public Health.* 2011;11:119.
23. Carvalho APV, Silva V, Grande AJ. Avaliação do Risco de Viés de Ensaios Clínicos Randomizados pela Ferramenta da Colaboração Cochrane. *Diagn Tratamento.* 2013;18(1):33-44.
24. Higgins J, Altman D. Assessing risk of bias in included studies. In: Higgins J, Green S, editors. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Intervention Version 5.10 (update March 2011): The Cochrane Collaboration;* 2011.
25. Jorge ML, de Oliveira VN, Resende NM, Paraiso LF, Calixto A, Diniz AL, *et al.* The effects of aerobic, resistance, and combined exercise on metabolic control, inflammatory markers, adipocytokines, and muscle insulin signaling in patients with type 2 diabetes *mellitus*. *Metabolism.* 2011;60(9):1244-52.
26. Ferrer-García JC, Sánchez López P, Pablos-Abella C, Albalat-Galera R, Elvira-Macagno L, Sánchez-Juan C, *et al.* [Benefits of a home-based physical exercise program in elderly subjects with type 2 diabetes *mellitus*]. *Endocrinol Nutr.* 2011;58(8):387-94.
27. Balducci S, Zanuso S, Cardelli P, Salvi L, Bazuro A, Pugliese L, *et al.* Effect of high- versus low-intensity supervised aerobic and resistance training on modifiable cardiovascular risk factors in type 2 diabetes; the Italian Diabetes and Exercise Study (IDES). *PLoS One.* 2012;7(11):e49297.
28. Balducci S, Sacchetti M, Haxhi J, Orlando G, Zanuso S, Cardelli P, *et al.* The Italian Diabetes and Exercise Study 2 (IDES-2): a long-term behavioral intervention for adoption and maintenance of a physically active lifestyle. *Trials.* 2015;16:569.
29. Ariza Copado C, Gavara Palomar V, Muñoz Ureña A, Aguera Mengual F, Soto Martínez M, Lorca Serralta JR. Mejora en el control de los diabéticos tipo 2 tras una intervención conjunta: educación diabetológica y ejercicio físico. *Atención Primaria.* 2011;43(8):398-406.
30. Vinetti G, Mozzini C, Desenzani P, Boni E, Bulla L, Lorenzetti I, *et al.* Supervised exercise training reduces oxidative stress and cardiometabolic risk in adults with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Sci Rep.* 2015;5:9238.
31. Motahari-Tabari N, Ahmad Shirvani M, Shirzad-E-Ahoodashty M, Yousefi-Abdolmaleki E, Teimourzadeh M. The effect of 8 weeks aerobic exercise on insulin resistance in type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Glob J Health Sci.* 2015;7(1):115-21.
32. Balducci S, Zanuso S, Cardelli P, Salerno G, Fallucca S, Nicolucci A, *et al.* Supervised exercise training counterbalances the adverse effects of insulin therapy in overweight/obese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2012;35(1):39-41.
33. Church TS, Blair SN, Cocroham S, Johannsen N, Johnson W, Kramer K, *et al.* Effects of aerobic and resistance training on hemoglobin A1c levels in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2010;304(20):2253-62.
34. Larose J, Sigal RJ, Khandwala F, Prud'homme D, Boulé NG, Kenny GP, *et al.* Associations between physical fitness and HbA_{1c} in type 2 diabetes *mellitus*. *Diabetologia.* 2011;54(1):93-102.
35. Swift DL, Johannsen NM, Earnest CP, Blair SN, Church TS. Effect of exercise training modality on C-reactive protein in type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc.* 2012;44(6):1028-34.
36. Okada S, Hiuge A, Makino H, Nagumo A, Takaki H, Konishi H, *et al.* Effect of exercise intervention on endothelial function and incidence of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb.* 2010;17(8):828-33.
37. Gavin C, Sigal RJ, Cousins M, Menard ML, Atkinson M, Khandwala F, *et al.* Resistance exercise but not aerobic exercise lowers remnant-like lipoprotein particle cholesterol in type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Atherosclerosis.* 2010;213(2):552-7.
38. Yuan C, Lai CW, Chan LW, Chow M, Law HK, Ying M. The effect of diabetes self-management education on body weight, glycemic control, and other metabolic markers in patients with type 2 diabetes *mellitus*. *J Diabetes Res.* 2014;2014:789761.
39. De Greef K, Deforche B, Tudor-Locke C, De Bourdeaudhuij I. Increasing physical activity in Belgian type 2 diabetes patients: a three-arm randomized controlled trial. *Int J Behav Med.* 2011;18(3):188-98.

Boas Práticas de Liderança em Ciências Biomédicas Laboratoriais

Amadeu Borges-Ferro[†]

Maria de Fátima Goulão[‡]

[†] Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

amadeuferro@gmail.com

[‡] Universidade Aberta/UIEDF-IE, UL

maria.goulao@uab.pt

Resumo

Tal como poucas tarefas importantes podem ser realizadas em trabalho individual, também são poucas as equipas laboratoriais que podem atingir grandes objetivos sem liderança. Liderar é o ato que enriquece o potencial da equipa, sabendo-se que a liderança está relacionada com motivação/produção/produktividade, o que torna relevante a identificação de estilos e estratégias que modelam a eficiência do líder.

É nosso objetivo caracterizar os estilos de liderança mais usuais e apresentar as estratégias mais adequadas para o líder se tornar mais eficiente no contexto da sua atividade, de acordo com a literatura científica.

Kurt Lewin definiu 3 estilos de liderança: autocracia, democracia e *laissez-faire*. No primeiro, o líder toma decisões e determina as metodologias de trabalho sem ouvir a equipa, sendo dominador/pessoal em elogios e críticas. O líder democrático acompanha reuniões de equipa para discutir objetivos, tendendo a comportar-se como um membro normal, aconselhando e sugerindo alternativas, mas mantendo a objetividade e apresentando factos nas críticas/elogios. O líder *laissez-faire* dá liberdade na realização dos trabalhos e definição de prazos, fazendo breves comentários sobre as atividades e participando pouco nos debates.

Estudos realizados concluem que a autocracia, centrada no líder, produz maior quantidade de trabalho e é apropriada para rápida tomada de decisão. A democracia, centrada em líder/equipa, apresenta maior qualidade no trabalho que progride mesmo na ausência do líder, garantindo satisfação no trabalho e produtividade elevada. No estilo *laissez-faire*, centrado no colaborador, as tarefas desenvolvem-se com oscilações e ocorrem discussões pessoais com perda de tempo, podendo verificar-se individualismo. Pode, no entanto, estar associado a elevada produtividade e satisfação profissional num contexto estável e com uma equipa muito eficiente.

As estratégias que tornam o líder mais eficiente passam por conhecer os seus variados papéis, conseguindo lidar com o desconforto da liderança e tratando assertivamente a equipa. É importante não fugir das suas responsabilidades, gerindo a toxicidade de eventuais colaboradores. É fundamental fazer formação robusta e seguir sempre as melhores estratégias de liderança.

No passado acreditou-se que o líder já nascia com essa personalidade. Atualmente, considera-se que existe vantagem na aprendizagem/treino dos diferentes estilos de liderança. A melhor liderança varia consoante a equipa e o contexto, o que implica que o líder tenha que se reinventar constantemente, aplicando, caso a caso, as mais eficientes estratégias de liderança.

Palavras-Chave: Liderança; Estilos de Liderança de Kurt Lewin.

Introdução

O Laboratório Biomédico é a base dos cuidados de saúde modernos, desde o rastreio do cancro até o diagnóstico do HIV, da transfusão de sangue à cirurgia, à intoxicação alimentar e ao controlo de infeções. Sem o Laboratório Biomédico, o diagnóstico, a avaliação da eficácia do tratamento e a investigação sobre as causas e terapêuticas das patologias não seria possível(1). A prática atual das Ciências Biomédicas Laboratoriais reúne ciência básica essencial com *insights* sobre a prática de laboratório para mostrar como uma compreensão biopatológica da doença deve ser acoplada às abordagens analíticas que levam ao diagnóstico nos campos mais diversos: microbiologia laboratorial, histopatologia, ciência transfusional ou hematologia(1). O Técnico do Laboratório Biomédico deverá assim estar habilitado com competências profissionais nas áreas do saber e saber-fazer adequadas ao nível de exigência que suporta diariamente no desempenho dos papéis complexos inerentes à prática das modernas ciências da saúde,

implicando necessidades de desenvolvimento e adequação permanentes associadas à rotatividade dos requisitos da entidade empregadora e da profissão.

Tal como poucas tarefas importantes podem ser realizadas em trabalho individual, também são poucas as equipas laboratoriais que podem atingir grandes objetivos sem liderança(2,3). Liderar é o exercício que permite reconhecer, orientar e fortalecer o potencial inerente a uma equipa e, conseqüentemente, à organização em que se insere. A liderança ocorre quando um membro do grupo modifica a motivação ou as competências de outrem no grupo. Assim, qualquer elemento num grupo pode exercer algum grau de liderança(4).

Invariavelmente, qualquer que seja o discurso acerca das características de personalidade e atributos de um líder eficiente, os recursos principais passam por ter competências comunicacionais para lidar com pessoas, ter capacidade de adaptação à mudança e possuir foco inovacional(3,5). Este último é fundamental pois alicerça a capacidade do líder para aprender a operar nas circunstâncias desafiadoras e, de certa forma, imprevisíveis da sociedade global em que sistemas, ferramentas e pensamentos inovadores são essenciais para garantir a saúde organizacional e a sua viabilidade futura(5).

Diversos estudos têm demonstrado que as mudanças na liderança estão relacionadas com modificações na motivação, na produção e na produtividade das equipas de trabalho (2,3,6,7). Os investigadores defendem ainda que quando se procede à análise dos meandros de uma excelente organização será encontrada, com grande probabilidade, uma liderança focada e eficiente, e que uma organização frágil, provavelmente, albergará uma liderança fraca (8).

Analisando a História da Humanidade verificamos, com relativa facilidade, que há tantas maneiras de liderar pessoas, como há líderes. Ao longo dos tempos têm surgido variadas matrizes que descrevem as principais formas de liderança existentes, que quando compreendidas, permitem desenvolver uma abordagem holística à liderança. A realidade pessoal de cada um abarcará possivelmente alguns dos estilos e modelos preconizados pelos diferentes autores, sendo modelada pelo contexto, espaço e temporalidade da ação de liderança que desenvolve(9).

Desta forma, conhecendo-se o impacto que a liderança possui nos diferentes prismas da atividade do laboratório biomédico, torna-se relevante refletir sobre a identificação de estilos e estratégias que modelam a eficiência do seu líder, nomeadamente sobre a conceptualização de Lewin pois é uma das mais antigas e úteis, demonstrando, de forma simples, que existem alternativas acessíveis relativamente à autocracia instintiva de muitos líderes(10,11).

Pretende-se com esta breve revisão da literatura, caracterizar os estilos de liderança mais usuais de acordo com o modelo de Lewin e apresentar as estratégias mais adequadas para o líder se tornar mais eficiente no contexto da sua atividade.

Revisão de Literatura

Estilos de Liderança de Lewin

Kurt Lewin (1890-1947) foi investigador em psicologia social e fundou o *Research Center for Group Dynamics* no *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) (12). Lewin foi forçado a sair da Alemanha nazi tendo visto desaparecer vários dos seus familiares no holocausto. Em consequência dessa história de vida, Lewin preconizou a mais-valia da diversidade e a aceitação desse conceito tornou-se no foco da sua reflexão global em liderança. As suas conceptualizações ainda hoje são influentes, mais de 60 anos após a sua morte.

É considerado um dos principais impulsionadores da psicologia social tendo desenvolvido diversos estudos na teoria de campo e na aplicação de experimentação nas ciências sociais. Contribuiu muito para as teorias de liderança, particularmente com a conceptualização da liderança democrática(13).

Em 1939, Lewin conduziu um estudo clássico no campo das teorias da liderança, envolvendo três estilos de liderança: autocrático, democrático e *laissez-faire*(10). A pesquisa experimental de Lewin implicou o treino de colaboradores nos referidos estilos de comportamento do líder, que depois seria aplicado em diferentes grupos. Os resultados revelaram que a liderança democrática era a mais eficaz para o desempenho do grupo, tendo-se destacado a importância do comportamento do líder, bem como o valor da participação do grupo(14). Lewin defendeu que o estilo de liderança democrática não pode ser imposto, mas sim aprendido através de um processo de participação voluntária e responsável. A mudança da autocracia para a democracia é um processo que leva mais tempo do que o inverso(15).

Os líderes autocráticos são associados ao termo popular: “chefe”. Têm tendência a definir procedimentos de forma unilateral, tomando decisões sem consultar os membros da sua equipa, mesmo que a sua participação fosse útil. Desta forma, a equipa não é envolvida no processo de tomada de decisão, recebendo as deliberações de forma imposta e obedecendo cegamente. Pode atuar sem uma estratégia bem definida, tomando decisões de forma extemporânea à medida que as situações vão ocorrendo e de forma, por vezes, inesperada para a equipa. Apesar desta forma isolada de agir, sente que tomou as decisões acertadas e não confia nos colaboradores para delegar. Foca a sua atuação nas tarefas em si e não valoriza as relações sociais nem a gestão dos recursos humanos. A sua liderança é frequentemente baseada no estatuto ou posição hierárquica que possui no laboratório, privilegiando o impacto do medo em detrimento do poder da respeitabilidade. O líder autoritário é centrado na sua autoridade e assume um papel coercivo com a equipa, sendo é orientado para a produção e preocupado com a tarefa direta. É ainda diretivo, socialmente distante e controlador. A equipa laboratorial revela frequentemente tensão, frustração, agressividade e ausência de espontaneidade e iniciativa. Não existe relacionamento e socialização entre os membros, apenas trabalho e execução de tarefas. Os Técnicos não revelam satisfação em relação à tarefa, embora aparentemente gostem do seu trabalho. A equipa atua na presença física do líder, mas quando este se ausenta, o grupo baixa de produção e há uma tendência à indisciplina. Apesar de tudo, este comportamento pode ser apropriado quando é necessário tomar decisões rapidamente, em situações em que não é premente a participação da equipa, uma vez que não é imprescindível para um bom resultado. No entanto, a constante predominância deste estilo pode ser desmoralizante e levar a altos níveis de absentismo e rotatividade de pessoal (11) - Figura 1.

Os líderes democráticos assumem ativamente as decisões finais, mas incluem os membros da equipa no processo de tomada de decisão, incentivando a criatividade e integrando todos os elementos nos projetos e decisões, tendo em conta as suas competências. Assim, o líder democrático está socialmente próximo da equipa laboratorial, desenvolvendo um comportamento consultivo e participativo, incrementando relações e partilhando o poder. Assume-se como delegativo e procura ser gerador de consensos, tendo consideração pelas ideias de todos e centrando-se em práticas igualitárias e de afiliação com os Técnicos. Sempre que se justifica apresentar uma crítica ou tecer um elogio é “objetivo” e apresenta “factos” que sustentem o seu raciocínio. Considera que o grupo é maior do que a soma de cada um individualmente e aceita as suas próprias imperfeições. Percebe que a riqueza do grupo está na sua diversidade, sabendo que todos possuem potencial para contribuir de alguma forma para o resultado final. Baseia a sua liderança no respeito adquirido junto da equipa, procurando reforçar esse respeito em todas as tarefas e intervenções que faz(4).

Como resultado dessa atitude, os membros da equipa tendem a ter alta satisfação no trabalho e produtividade elevada, fortalecendo-se os laços de amizade e de bom relacionamento entre os seus membros. A equipa desenvolve um ritmo de trabalho progressivo e seguro mesmo que o líder se ausente. Apesar de tudo este estilo nem sempre é eficaz quando é premente a tomada de uma decisão rápida (16). Apesar do termo “democrático” a tomada de decisão não implica necessariamente a colocação das decisões a votação, uma vez que serão sempre os líderes a carregar a responsabilidade de assegurar que as decisões alcançam os resultados desejados. A liderança democrática pode, assim, ser definida como um comportamento que influencia as pessoas de uma forma consistente e conducente a princípios e processos democráticos básicos, como a autodeterminação, a inclusão, a participação e deliberação igualitária(17) - Figura 1.

Os líderes *Laissez-faire* dão aos elementos da equipa absoluta liberdade na realização dos trabalhos e projetos, inclusive na definição de prazos. Pode ser fornecido suporte de cariz pessoal com recurso a conselhos e opiniões se necessário, mas caso contrário, o líder prefere não se envolver. É assumida sistematicamente uma postura passiva e de não envolvimento no trabalho, como se este não fosse preocupação do líder. Pode ser evidente o abdicar da tomada de decisão e da gestão dos projetos, cedendo-se lugar à equipa que pode apresentar um certo individualismo e pouco respeito pelo líder. Em situações de instabilidade no contexto laboratorial, as tarefas desenvolvem-se ao acaso com oscilações e ocorrem muitas discussões pessoais que resultam numa perda de tempo. Em situações muito estáveis e em que a equipa está altamente rotinada nas suas tarefas, esta autonomia concedida ao grupo pode levar a alta satisfação no trabalho, mas pode ser prejudicial se os membros da equipa não gerirem adequadamente o tempo ou se não possuírem conhecimentos, competências e auto-motivação suficientes para concluírem o seu trabalho de forma eficiente. Este tipo de liderança também pode surgir quando os gestores são forçados a assumir uma posição de liderança, mas não têm controlo sobre o seu trabalho e a sua equipa(16) - Figura 1.

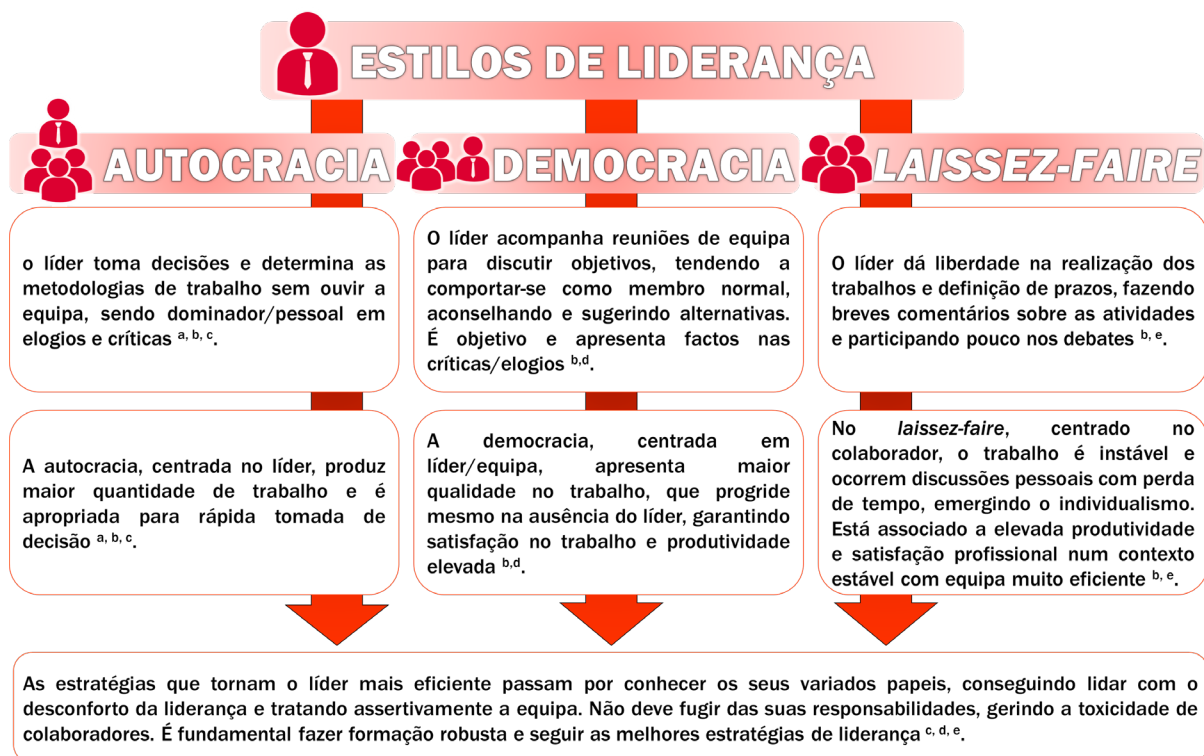


Figura 1 – Características gerais dos estilos de liderança descrito por Kurt Lewin.

- Lewin K, Lippitt R, White R. Patterns of aggressive behavior in experimentally created social climates. *Journal of Social Psychology*. 1939;(10):271-301.(10)
- Scheidlinger S. The Lewin, Lippitt and White study of leadership and “social climates” revisited. *Int J Group Psychother*. 1994;44(1):123-127.(11)
- De Hoogh AHB, Greer LL, Den Hartog DN. Diabolical dictators or capable commanders? An investigation of the differential effects of autocratic leadership on team performance. *The Leadership Quarterly*. 2015;26(5):687-701. doi:10.1016/j.leaqua.2015.01.001. (18)
- Lexa FJ. Chapter 12 - Leadership—Organizational Styles and Types. In: *Leadership Lessons for Health Care Providers*. Boston: Academic Press; 2017:78-85. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128018668000123>. Accessed October 18, 2016. (19)
- Chênevert D, Vandenberghe C, Doucet O, Ben Ayed AK. Passive leadership, role stressors, and affective organizational commitment: A time-lagged study among health care employees. *Revue Européenne de Psychologie Appliquée/European Review of Applied Psychology*. 2013;63(5):277-286. doi:10.1016/j.erap.2013.07.002. (20)overload, and ambiguity

O estilo autocrático é centrado na pessoa do líder, enquanto o estilo democrático é centrado no líder e na equipa. Por sua vez o estilo *laissez-faire* é centrado somente no colaborador. O estilo autocrático é focado na rapidez de resposta e no nível de produção, enquanto o estilo *laissez-faire* tendencialmente está mais associado à produtividade e ao *empowerment* (17,21) - Figura 2.

Na globalidade, a matriz de Lewin é popular e útil, porque incentiva os líderes a serem menos autocráticos do que poderiam instintivamente ser (21).

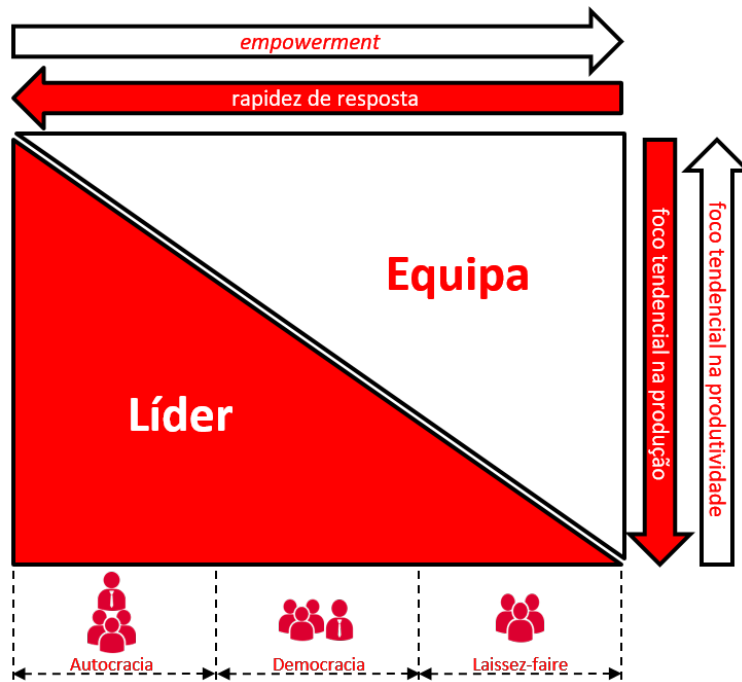


Figura 2 – Estilos de liderança de Kurt Lewin e enfoque no líder e na equipa.

Considera-se que todos os tipos de liderança poderão estar presentes no perfil da maioria dos líderes, existindo, no entanto, a predominância de um deles. Logo, os estilos não são mutuamente exclusivos e podem estar presentes num certo grau no líder (22). O processo de liderança varia consoante a equipa e o contexto o que implica que o líder tenha que se reinventar constantemente, procurando adaptar-se às diferentes circunstâncias - Figura 3.

		EQUIPA		
		Equipa inexperiente	Equipa eficaz	Equipa eficiente
CONTEXTO	Contexto estável	Democrático	Democrático	Laissez-Faire
	Contexto em mudança	Autocrático	Democrático	Democrático
	Contexto em crise	Autocrático	Autocrático	Democrático

Figura 3 – Adequação do estilo de liderança à equipa de trabalho e contexto da atividade(23).

Uma das grandes forças da teoria de liderança de Kurt Lewin passa por procurar definir comportamentos, mas acaba por aceitar algum afastamento em relação às teorias do líder carismático de personalidade quase mítica que existiam previamente. Paralelamente, é uma teorização bastante acessível que permite a fácil construção de um leque de competências após reflexão pragmática e mudança comportamental, tornando-se assim numa ferramenta valiosa em atividades de *coaching* empresarial. Além disso, a sua simplicidade permitiu que servisse de matriz base para outras teorizações mais modernas e complexas. A sua principal fraqueza está relacionada com o facto de poder ser considerada um pouco desatualizada não possuindo a capacidade de competir com as teorias mais recentes que se adequam à complexidade intrincada da sociedade atual.

O Modelo de Lewin é de tal forma poderoso que serviu de base à conceptualização de um dos modelos mais utilizados atualmente em investigação em liderança: o Modelo de Liderança Transformacional desenvolvido por Bernard Bass no qual podem também ser descritos três principais estilos de liderança, mas, desta feita, cada um com seus próprios subtipos correspondentes (24).

Teoria de Liderança Transformacional

A literatura disponível sobre o tema liderança começa gradualmente nos tempos mais recentes a defender paradigmas diferentes que procuram responder à transição para modelos organizacionais mais modernos. Assim, surge também um novo líder que corresponde a um novo modelo de liderança, diferente daqueles do passado, acomodado na transição de modelos estratégicos do tradicional para o moderno, sustentando a transformação estratégica organizacional (25). Centrados num paradigma mais holístico e humanista, estes novos modelos de liderança organizacional centram-se nas pessoas, substituindo a liderança tradicional centrada nos processos de controlo ou controlo operacional e patrimonial, realçando hierarquia ou controle rígido (26). As funções desta nova liderança estão mais uniformemente distribuídas na equipa, razão pela qual é constantemente pedido o compromisso perante o grupo, destacando-se a possibilidade dos indivíduos poderem encetar e desenvolver as suas próprias fontes de *empowerment* (25). Surge assim um modelo que requer uma responsabilização conjunta, focando-se numa liderança inteligente, adquirida por mérito e não apenas por carisma, mais humana e preocupada com o bem-estar. A participação é importante, a fim de lidar efetivamente com a mudança e com a aceitação de responsabilidades conjuntas (25). É um tipo de liderança que está centrado na colaboração em vez de em torno do líder, inspirando e não apenas atuando, uma liderança centrada em modos mais integrais de interagir com colaboradores, que inspiram os outros profissionais, atraindo-os para um padrão moral mais elevado em vez de operar em um nível prático (27).

Um dos modelos que diretamente corresponde às novas formas de liderança é o Modelo de Liderança Transformacional desenvolvido por Bernard Bass (24). Este modelo inclui três estilos diferentes de liderança, cada um com seus próprios tipos correspondentes (28):

- I. Liderança transformacional:
 - a. Atributos idealizados - Construção de confiança;
 - b. Comportamentos idealizados - Atua com Integridade;
 - c. Motivação inspiracional - Incentiva os outros;
 - d. Estímulo Intelectual - Incentiva o pensamento inovador;
 - e. Consideração individualizada - Treina e desenvolve Pessoas.
- II. Liderança transacional
 - a. Recompensa contingencial - Recompensa do sucesso;
 - b. Gestão por exceção/Ativo - Monitoriza desvios e erros.
- III. Passivo/Fuga
 - a. Gestão por exceção/Passivo - “Apaga-incêndios”;
 - b. *Laissez-Faire* - Evita Envolvimento.

Estes estilos podem ser caracterizados através da aplicação de um instrumento padronizado denominado *Multifactor Leadership Questionnaire MLQ-5x* (28).

Conclusões

Os líderes no Laboratório Biomédico possuem uma esfera de ação extremamente complexa do ponto de vista tecnológico e científico a que acrescem as exigências correntes colocadas pelos problemas que surgem no quotidiano da vida profissional. Este contexto é de tal forma absorvente e consumidor de horas de trabalho que vários líderes se deparam com o obstáculo de possuírem conhecimentos limitados ou desatualizados sobre liderança que não conseguiram enriquecer atempadamente. Esta tendência deverá ser contrariada assumindo-se que a formação em liderança é tão importante como a formação nas restantes valências científicas e tecnológicas do laboratório.

Os líderes atuam impulsionados pelas suas capacidades, experiências, valores e atitudes. Um percurso profissional rico irá incrementar a atuação futura, seguindo-se uma abordagem colaborativa e humanizada, o que irá facilitar todas as mudanças que for necessário implementar, no sentido de incrementar o capital humano do laboratório, principal salvaguarda de futuro e prosperidade institucional.

Nenhum estilo de liderança se encaixa em todas as situações, por isso é útil entender diferentes estruturas e estilos de liderança de modo a adaptar de forma dinâmica a abordagem para se adequar à situação. Os grandes

líderes são, quase sempre, simplificadores e facilitadores que desmontam argumentos e dúvidas criando, caso a caso, soluções exequíveis e inteligíveis por todos (29).

Em jeito de conclusão remetem-se algumas sugestões básicas para o líder no contexto do Laboratório Biomédico:

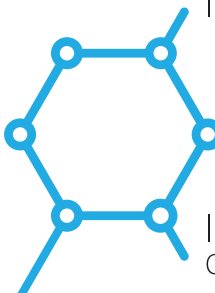
- O líder deverá conhecer os seus os seus diferentes papéis, selecionando os seus comportamentos em função do que é esperado dele numa determinada situação;
- É importante estar preparado para saber lidar com o desconforto da liderança, uma vez que, por vezes, é necessário tomar decisões difíceis e nem todas as tarefas são aliciantes por natureza.
- O líder deverá conhecer e assumir as suas responsabilidades, não deixando de estar presente nos bons e nos maus momentos.
- Uma estratégia interessante passa por conciliar imagem externa do laboratório com o seu ambiente interno, ou seja, se é importante demarcar a qualidade e polivalência do laboratório na captação e satisfação de clientes, então também toda a estrutura interna deverá estar adequada a essa imagem dinâmica e competitiva.
- A liderança eficiente pode ser aprendida, logo urge fazer formação robusta e seguir as melhores estratégias de liderança, mantendo uma atualização constante.
- Por vezes alguns colaboradores assumem um comportamento tóxico na equipa, pelo que se deverá ter uma elevada capacidade de lidar de forma rápida e assertiva com essas situações antes que toda a equipa fique comprometida.
- Criar o hábito de abraçar as mudanças de forma positiva, encarando-as como um desafio e não um obstáculo, principalmente quando são decisões *top-down* que não podem ser alteradas.
- A equipa é uma componente fundamental e indissociável da atuação do líder, logo é basilar cuidar dela com permanente assertividade, nomeadamente nos aspetos da formação, humanização e retribuição justa pelo trabalho prestado.

Referências

1. Orchard G, Nation B, editors. Histopathology. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2012. 396 p. (Fundamentals of biomedical science).
2. Wagner JA, Hollenbeck JR. Organizational behavior: securing competitive advantage. Second Edition. New York ; London: Routledge, Taylor & Francis Group; 2015. 244 p.
3. Araújo M, Silva L, Gois C, Sousa D, Mendonça P, Lima T, et al. Preference for leadership type: a study in a hospitality industry company from Sergipe. *Estud Psicol Natal*. 2013 Jun;18(2):203–11.
4. Bass BM, Stogdill RM. Bass & Stogdill's handbook of leadership: theory, research, and managerial applications. 3rd ed. New York : London: Free Press ; Collier Macmillan; 1990. 1182 p.
5. Horth D, Buchner D. Innovation Leadership: How to Use Innovation to Lead Effectively, Work Collaboratively and Drive Results. Greensborough, North Carolina: Center for Creative Leadership; 2014.
6. Burke CS, Stagi KC, Klein C, Goodwin GF, Salas E, Halpin SM. What type of leadership behaviors are functional in teams? A meta-analysis. *Leadersh Q*. 2006 Jun;17(3):288–307.
7. Hampton DR, Summer CE, Webber RA. Organizational behavior and the practice of management. 5th ed. Glenview, Ill: Scott Foresman; 1987. 876 p.
8. Leithwood K, Riehl C. What we know about successful school leadership. Philadelphia, PA: Laboratory for Student Success, Temple University; 2003.
9. Bolden R, Gosling J, Marturano A, Dennison P. A Review of Leadership Theory and Competency Frameworks. University of Exeter, UK: Centre for Leadership Studies; 2003. (Report for Chase Consulting and the Management Standards Centre).
10. Lewin K, Lippitt R, White R. Patterns of aggressive behavior in experimentally created social climates. *J Soc Psychol*. 1939;(10):271–301.
11. Scheidlinger S. The Lewin, Lippitt and White study of leadership and “social climates” revisited. *Int J Group Psychother*. 1994 Jan;44(1):123–7.
12. Kurt Lewin | American social psychologist | Britannica.com [Internet]. [cited 2017 Feb 10]. Available from: <https://www.britannica.com/biography/Kurt-Lewin>
13. Lewin K. Field Theory and Experiment in Social Psychology: Concepts and Methods. *Am J Sociol*. 1939 maio;44(6):868–96.
14. Manning G, Curtis K. The art of leadership. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2012. 503 p.
15. Lewin K. The consequences of an authoritarian and democratic leadership. In: Gouldner A, editor. *Studies in leadership: Leadership and democratic action*. New York: Russell & Russell; 1965. p. 409–17.
16. Liden RC, Antonakis J. Considering context in psychological leadership research. *Hum Relat*. 2009 Nov 1;62(11):1587–605.
17. Gastil J. A Definition and Illustration of Democratic Leadership. *Hum Relat*. 1994 agosto;47(8):953–75.

18. De Hoogh AHB, Greer LL, Den Hartog DN. Diabolical dictators or capable commanders? An investigation of the differential effects of autocratic leadership on team performance. *Leadersh Q.* 2015 Oct;26(5):687–701.
19. Lexa FJ. Chapter 12 - Leadership—Organizational Styles and Types. In: *Leadership Lessons for Health Care Providers* [Internet]. Boston: Academic Press; 2017 [cited 2016 Oct 18]. p. 78–85. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128018668000123>
20. Chênevert D, Vandenberghe C, Doucet O, Ben Ayed AK. Passive leadership, role stressors, and affective organizational commitment: A time-lagged study among health care employees. *Rev Eur Psychol AppliquéeEuropean Rev Appl Psychol.* 2013 Sep;63(5):277–86.
21. Day D, Antonakis J, editors. *The nature of leadership.* 2nd ed. Thousand Oaks, Calif: SAGE; 2012. 597 p.
22. Trapero F, Lozada V. Differences between the relationship of integrity and leadership styles according to the model of Bernard Bass. *Estud Gerenciales.* 2010 Mar;26(114):59–75.
23. Plant C. Leadership Style [Internet]. *Material Minds.* 2012 [cited 2017 Feb 14]. Available from: <http://material-minds.com/leadership-development/leadership-style/>
24. Bass B. *Leadership and performance beyond expectation.* New York: Free Press; 1985.
25. Vargas J, Guillén I. Los procesos de transformación estratégica en relación con la evolución de las organizaciones. *Estud Gerenciales.* 2005;(94):65–80.
26. Puga J, Martínez L. Competencias directivas en escenarios globales. *Estud Gerenciales.* 2008 Oct;87–103.
27. Molina H. El desarrollo organizacional como facilitador del cambio. *Estud Gerenciales.* 2000 Dec 31;0(77):13–26.
28. Bass B, Avolio B. *The Multifactor Leadership Questionnaire.* Palo Alto, CA: Mind Garden; 1995.
29. Herrick DF. *Media management in the age of giants: business dynamics of journalism.* 2nd ed. Albuquerque: University of New Mexico Press; 2012. 399 p.

28 a 30
de outubro
2016
Bragança
Portugal



I Congresso Nacional
**Ciências
Biomédicas
Laboratoriais**
I Encontro Nacional
de Estudantes

Reconhecimento Científico

