

HIGIEIA-REVISTA GENTÍFICA
DA ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DR. LOPES DIAS
DO INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO
ANO III. VOL VI. NIII. DEZEMBRO. 2021
ISSN 284-5565

Prevenção

Diagnóstico

Intervenção



Edições
IPCB



EQUIPA EDITORIAL

Diretor

Francisco Rodrigues, *PhD*

Diretor associado

Patrícia Coelho, *PhD*

Comissão de Editores

Carlos Maia, *PhD*

Lucinda Carvalho, *PhD*

Marisa Barbeira, *PhD*

Rute Crisóstomo, *PhD*

Sara Ferreira, *PhD*

Conselho Editorial

Alexandre Pereira, Especialista

Ana Cravo Sá, *PhD*

Ana Maria Vaz, *PhD*

Anália Clérigo, Especialista

Ângela Simões, *PhD*

Carlos Alcaface, Especialista

Cláudia Marcos, *PhD*

Cláudia Santos, Especialista

Cristina Baeta, Especialista

Cristina Carrondo *PhD*

Daniel Borges, *PhD*

Edgar Pereira, Especialista

Fernando Mendes, *PhD*

Filipa Vieira, *PhD*

Gil Nunes, Especialista

Helder Santos, *PhD*

Iola Cardoso, Especialista

Joana Belo, *PhD*

Joana Soares, *PhD*

Joana Liberal, *PhD*

Joana Rita Pires, Especialista

Jorge Almeida, *PhD*

Lídia Maria Videira, *PhD*

Lígia Ferreira, Especialista

Liliana Silva, *PhD*

Lina Oliveira Vieira, *PhD*

Luís Taborda Barata, *PhD*

Marco Caetano, Especialista

Maria da Conceição Graça, *PhD*

Maria Emília Duarte, *PhD*

Maria Fátima Monsanto, Especialista

Maria Filomena Botelho, *PhD*

Maria Helena Brandão, Especialista

Miguel Castelo Branco, *PhD*

Nuno Cordeiro, *PhD*

Óscar Manuel Tavares, *PhD*

Paula Elisabete Rodrigues, Especialista

Paulo Batista, Especialista

Paulo Caseiro, *PhD*

Paulo Fernandes, Especialista

Pedro Costa, *PhD*

Regina Silva, *PhD*

Renato Abreu, *PhD*

Salvador Postigo Mota, *PhD*

Sónia Mateus, *PhD*

Sónia Vicente, *PhD*

Telmo Pereira, *PhD*

Teresa Silveira Lopes, *PhD*

Vítor Pinheira, Especialista

Equipa Técnica

Cândida Tavares, *MSc* - Secretariado

Helder Milhano - Design Gráfico

Propriedade, Edição e Administração

Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias

Campus da Talagueira

Avenida do Empresário

6000-767

Castelo Branco

Correio Eletrónico: revistahigeia@ipcb.pt

ISSN: 2184-5565

Número de exemplares: 35

Periodicidade: semestral (junho e dezembro)

Imagem de Capa: Egon Schiele creator QS:P170,Q44032
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Egon_Schiele_046.jpg),
„Egon Schiele 046“, colour by no, [https://creativecommons.org/
publicdomain/zero/1.0/legalcode](https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/legalcode)

ÍNDICE

A IMPORTÂNCIA DO HUMOR VÍTREO EM ANÁLISES POST-MORTEM THE IMPORTANCE OF VITREOUS HUMOR IN POST-MORTEM ANALYSIS	9
TOXOPLASMOSE NA GRAVIDEZ: DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-TOXOPLASMA GONDII EM GRAVIDAS SEGUIDAS NO CHL TOXOPLASMOSIS IN PREGNANCY: DETERMINATION OF THE PREVALENCE OF ANTI-TOXOPLASMA GONDII ANTIBODIES IN PREGNANT WOMEN FOLLOWED IN CHL	21
A INFLUENCIA DA DIETA NA FLORA MICROBIANA INTESTINAL THE INFLUENCE OF DIET ON INTESTINAL MICROBIAL FLORA	31
LAVADO BRONCOALVEOLAR: ANÁLISE DE PERFIS CELULARES EM DOENÇAS DO INTERSTÍCIO PULMONAR BRONCHOALVEOLAR LAVAGE: ANALYSIS OF CELL PROFILES IN INTERSTITIAL LUNG DISEASES	41
O TRANSPLANTE CARDÍACO COMO TERAPIA NA MIOCARDIOPATIA HIPERTRÓFICA HEART TRANSPLANTATION AS THERAPY IN HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY	51
TETRALOGIA DE FALLOT E COMORBIDADES ASSOCIADAS - DETEÇÃO E ABORDAGEM TERAPÉUTICA TETRALOGY OF FALLOT AND ASSOCIATED COMORBIDITIES - DETECTION AND THERAPEUTIC APPROACH	57
LOSS OF MOTHERS AGAINST DECAPENTAPLEGI HOMOLOG 4 (SMAD4) EXPRESSION AND ITS CORRELATION WITH CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS IN PANCREATIC CARCINOMA	65

EDITORIAL

Entre a transição digital e a formação humanista

A crescente 'digitalização' do mundo em todas as suas vertentes materiais e da humanidade que o habita e dele faz parte, tem vindo a assumir-se progressivamente como uma realidade incontornável e imparável. Cada vez mais, a sociedade global se vai movendo e evoluindo segundo um paradigma assente no conhecimento científico, no desenvolvimento tecnológico e na inovação criativa. De forma a aproveitar o potencial transformador do digital para a afirmação de uma nova era já emergente, também em Portugal está a ser feito um forte investimento ao nível do digital com a pretensão de tornar o país mais *digitalizado*. E em função disso, mais preparado para a criação de mais e melhor emprego e para se tornar mais competitivo a nível internacional.

A transição digital já se vinha anunciando há algum tempo, como uma tendência inexorável, resultante da revolução tecnológica e conceptual em curso a nível mundial. As vantagens decorrentes da digitalização parecem ser por demais evidentes e transversais a vários sectores, unindo-os como uma tessitura virtual e invisível. Vantagens que parece não terem sido atingidas pela gigantesca força destrutiva e desmobilizadora da crise pandémica que sobre todos se abateu. A transformação dos setores tecnológicos veio destacar a necessidade fundamental de se ter de atuar também ao nível das pessoas, criando condições para que todos possam estar equipadas com as ferramentas que lhes permitam lidar com estes desafios, mas também com os dispositivos que as protejam dos novos riscos que vão ter de enfrentar.

O ensino superior, um dos agentes deste processo transformador, apresenta-se também e simultaneamente como um dos seus alvos preferenciais. A transição digital nesta dupla perspetiva, deve ser encarada como um motor de transformação das próprias instituições (transformadoras) de ensino superior. Desta mudança resultarão com toda a certeza, efetivos contributos para a sua consolidação em território nacional e para a sua afirmação no plano internacional.

As instituições de ensino superior sentiram nos últimos anos a necessidade de acelerarem o seu plano de transformação digital e de se reinventarem. O ensino à distância, com uma longa tradição de excelente desempenho em Portugal (da Telescola à Universidade Aberta), tornou-se o principal rosto da resposta digital ao desafio de possibilitar e melhorar o acesso à escola. Mas, apesar do apoio tecnológico disponível para suporte a esta modalidade de ensino, muitas das instituições não estavam nem estão ainda preparadas para 'lecionar' neste formato, nem têm recursos educativos digitais de qualidade, que permitam que este seja um sucesso. O recurso à videoconferência e a sistemas de gestão de conteúdos para suporte ao ensino tornou-se o único padrão de prática em muitas instituições, nos últimos anos.

Mas por muito avançadas que sejam, as tecnologias, as plataformas digitais e o ensino à distância, nunca substituirão a interação física, cognitiva, psico-motora, emocional e social nas relações professor-estudante. O diálogo, a entreaajuda, a empatia que se estabelecem numa sala de aula favorecem claramente o processo de ensino-aprendizagem e a construção de um quadro de princípios e valores. Particularmente em cursos orientados para a formação de profissionais de saúde em que a relação e a comunicação interpessoais desempenham um papel de destaque nos processos terapêuticos. Que os meios tecnológicos, ainda que excelentes auxiliares para o professor e muito sedutores para os alunos, não deixem de ser isso mesmo. Apenas meios.

Ana Maria Baptista Oliveira Dias Malva Vaz

A IMPORTÂNCIA DO HUMOR VÍTREO EM ANÁLISES POST-MORTEM

THE IMPORTANCE OF VITREOUS HUMOR IN POST-MORTEM ANALYSIS

Autores

Angela Carapito - Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias – Instituto Politécnico de Castelo Branco, *MSc*

Francisco Rodrigues - Qualidade de Vida no Mundo Rural (QRural) | Sport, Health & Exercise Unit (SHERU), Instituto Politécnico de Castelo Branco, *PhD*

Patrícia Coelho - Sport, Health & Exercise Unit (SHERU) | Qualidade de Vida no Mundo Rural (QRural), Instituto Politécnico de Castelo Branco, *PhD*

Centro de execução do trabalho

Escola Superior de Saúde
Centro Hospitalar de Leiria

Conflitos de interesse

A equipa de investigação declara a não existência de conflitos de interesse na realização do estudo.

Fontes de Financiamento

Sem fonte de financiamento

Contacto do autor responsável

Angela_c_carapito@hotmail.com

Tipo de artigo

Artigo de Revisão

Resumo

Introdução

As análises bioquímicas realizadas ao humor vítreo constituem hoje uma mais valia para a toxicologia forense e em análises *post-mortem* ajudando a determinar a causa de morte e a estimar o intervalo *post-mortem*, assim como a elucidar casos forenses. O humor vítreo é uma substância gelatinosa contida na parte posterior do olho, constituído por 99% de água. Devido à sua composição e às suas características, é utilizado como matriz para diversas determinações analíticas *post-mortem* sendo considerada bastante útil em casos em que outros tipos de amostras não se encontram acessíveis, como é o caso do sangue ou da urina.

Objetivo

Os objetivos desta revisão consistiram em realizar um levantamento dos conhecimentos presentes na literatura relativos às análises *post-mortem* realizadas ao humor vítreo; comparar o tipo de análises realizadas ao humor vítreo em relação a outros fluidos corporais e; determinar para quais os analitos as quantificações poderão ou não ser vantajosas.

Materiais e Métodos

A pesquisa e recolha de informação foi realizada a partir de bases de dados como a *PubMed*, *b-on* e *ResearchGate* e a análise baseada em diversos artigos originais, de revisão e casos clínicos publicados entre 2000 e 2020.

Discussão e Conclusão

As determinações analíticas efetuadas ao humor vítreo *post-mortem* têm demonstrado inúmeras vantagens em toxicologia forense. Estudos realizados neste âmbito têm mostrado que através de uma abordagem mais detalhada será possível obter um maior conhecimento acerca do intervalo *post-mortem*, determinar causas de morte ou ainda, identificar marcadores associados a determinadas patologias oculares. Diversos desafios ainda existem relativamente à interpretação das concentrações no humor vítreo, técnicas de amostragem e redistribuição *post-mortem* dos compostos a analisar. Mais estudos devem ser desenvolvidos tendo em vista análises comparativas entre técnicas, analitos, fluidos corporais e outras variáveis que possam influenciar os resultados das determinações analíticas.

Palavras chave

humor vítreo (A09.371.714.500), *post-mortem* (C23.550.260.224.617), toxicologia forense (H01.158.891.424), análise quantitativa (SP4.016.172.893).

Abstract

Introduction

Biochemical analyses performed on vitreous humor are today an asset for forensic toxicology and in *post-mortem* analyses, helping to determine the cause of death and to estimate the *post-mortem* interval, as well as elucidating forensic cases. The vitreous humor is a gelatinous substance contained in the posterior part of the eye, consisting of 99% water. Due to its composition and characteristics, it is used as a matrix for several *post-mortem* analytical determinations and is considered quite useful in cases where other types of samples are not accessible, such as blood or urine.

Aim

The aims of this review were to carry out a survey of the knowledge present in the literature regarding *post-mortem* analyses performed on vitreous humor; compare the type of analyses performed on the vitreous humor in relation to other body fluids and; determine for which analytes the quantifications may or may not be advantageous.

Materials and Methods

The search and collect of information was performed from data bases like *PubMed*, *b-on* and *ResearchGate* and the analyses based on several original and review articles and case reports published from 2000 to 2020.

Discussion/Conclusion

Analytical determinations performed on the *post-mortem* vitreous humor have demonstrated numerous advantages in forensic toxicology. Studies carried out in this context have shown that through a more detailed approach it will be possible to obtain greater knowledge about the *post-mortem* interval, determine causes of death or even identify markers associated with certain ocular pathologies. Several challenges still exist regarding the interpretation of vitreous humor concentrations, sampling techniques and *post-mortem* redistribution of the compounds to be analysed. More studies should be developed with a view to comparative analysis between techniques, analytes, body fluids and other variables that may influence the results of analytical determinations.

Keywords

vitreous humor (A09.371.714.500), *post-mortem* (E01.370.060), forensic toxicology (H01.158.891.424), quantitative analysis (Q000032).

Introdução

As análises bioquímicas realizadas ao humor vítreo (HV) têm revelado ser uma mais valia para a toxicologia forense e em análises post-mortem ajudando a determinar a causa de morte e a estimar o intervalo *post-mortem* (IPM), assim como a elucidar casos forenses ⁽¹⁾.

O HV é uma substância gelatinosa que preenche a cavidade posterior do globo ocular, tendo como função manter a estrutura e estabilidade do olho, tal como apoiar a retina, mantendo-se assim transparente de forma à luz poder difundir-se livremente atravessando-a⁽²⁾.

O volume total de HV no interior do globo ocular compreende aproximadamente 4 a 5 ml podendo variar consoante a idade do indivíduo e o tamanho do olho^(2,3). É constituído por 99% de água sendo que os restantes 1% dizem respeito a constituintes de alto e baixo peso molecular como por exemplo, alguns componentes glucídicos, colagénio, ureia, creatinina, ácido hialurónico e eletrólitos (cálcio, potássio, magnésio, cloro e sódio)⁽¹⁾.

Apesar das diversas vantagens na utilização deste tipo de amostra é necessário ter em conta algumas das suas limitações. Em situações *post-mortem*, é possível que tanto o sangue como outros fluidos corporais possam não estar disponíveis, estar contaminados ou suscetíveis a alterações *post-mortem*, sendo por isso necessário que existam outras amostras alternativas para as análises toxicológicas. Tal como referido, as determinações analíticas ao HV são especialmente importantes quando o sangue e/ou a urina não estão disponíveis, quando o cadáver apresente sinais de desidratação, tenha sofrido um trauma e/ou tenha sido sujeito a exsanguinação ou a embalsamento⁽⁴⁻⁶⁾.

Embora o etanol represente a principal substância analisada em toxicologia *post-mortem*, existem outras substâncias que são quantificadas no HV, como é o caso de inúmeras drogas como cocaína, opiáceos, benzodiazepinas, entre outras^(4,7).

Este artigo tem como objetivo esclarecer, em que medida é que as análises realizadas ao HV podem ser efetivamente mais promissoras do que as realizadas a outros tipos de fluidos corporais e para

quais analitos as quantificações serão ou não mais vantajosas. Desta forma, será possível providenciar um melhor esclarecimento acerca das razões pelas quais se torna essencial estabelecer maior conhecimento acerca das vantagens e desvantagens das determinações ao HV após a morte e relacioná-lo com outros fluidos utilizados em análises forenses, como é o caso do sangue, da urina ou do fluido cerebrospinal na quantificação de diversas substâncias.

Materiais e Métodos

Este trabalho teve por base a avaliação de diversos artigos de revisão, investigação e casos clínicos, publicados no período entre 2000 e 2020 (artigos publicados em 1969 e entre 1989-1999 foram utilizados para a contextualização da revisão), que se consideraram relevantes para uma melhor abordagem do tema e cumprimento dos objetivos propostos. O critério de inclusão dos artigos foi a abordagem sobre os diversos analitos quantificados no HV *post-mortem*, técnicas para a sua quantificação e variáveis que influenciam nos resultados.

A pesquisa e recolha de informação foi realizada a partir de bases de dados como a *PubMed*, *B-on* e *ResearchGate*. A pesquisa incluiu a combinação de palavras-chave como “vitreous humor”, “*post-mortem*”, “forensic toxicology” e “quantitative analysis”.

O humor vítreo

As primeiras análises ao HV começaram a ser desenvolvidas em 1959 por Naumann, relativamente às quantificações de potássio *post-mortem*, gerando desta forma um aumento do interesse acerca das diversas aplicações e potenciais deste fluido na toxicologia forense^(1,8).

As vantagens da utilização do HV na toxicologia forense assentam nomeadamente no facto de: 1) Ser uma amostra que cuja obtenção não necessita da realização de uma necropsia completa; 2) O risco de contaminação da mesma é menor uma vez que se encontra mais isolado anatomicamente relativamente a outras amostras (como é o caso do sangue ou o do fluido cerebrospinal); 3) A distância relativamente ao intestino ser maior, diminuindo o risco de contaminação^(1,5). Desta

forma, a própria composição deste fluido biológico torna-o menos suscetível a alterações *post-mortem* relativamente aos restantes tipos de amostras⁽¹⁾. Por outro lado, não é aconselhável ser utilizado em casos em que o corpo tenha sido incinerado ou apresente uma má decomposição, que tenha sofrido de alguma patologia ocular ou sido submetido a uma cirurgia oftalmológica, uma vez que existe uma elevada probabilidade de alterações na composição bioquímica e celular podendo assim conduzir a resultados erróneos^(4,9).

Colheita, preparação e processamento da amostra

Para a recolha de HV na autópsia, o líquido deve ser aspirado com uma agulha hipodérmica fina e colhido do canto externo do olho afastando as pálpebras^(1,2,7). O processo deve ser realizado de forma lenta e a recolha deve ser feita de ambos os olhos podendo ou não, ser combinado numa única amostra⁽¹⁰⁾. A inserção da agulha no globo ocular deve ser o mais central possível, de forma a evitar que haja aspiração de material proveniente da retina ou da íris, cuja composição é muito variável em comparação com o HV^(1,2,7). Estudos em que foi realizado o doseamento de meprobamato, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), fenitoína, barbitúricos e cocaína mostraram que o teor destes compostos é semelhante em ambos os olhos, podendo ser misturado o HV proveniente de ambos os olhos para constituição de uma amostra única⁽¹¹⁻¹⁴⁾. No entanto, para outros compostos, como os glicosídeos cardiotónicos (ex: digoxina e digitoxina), cuja acumulação tende a ser elevada na retina, o processo de aspiração do HV pode afetar as concentrações, sendo aconselhado que as amostras sejam recolhidas dos dois olhos em separado^(15,16). Após a recolha, os olhos devem ser preenchidos com água ou solução salina de forma a manter a estrutura e melhorar a aparência dos mesmos^(2,7).

Para determinações de etanol e outras drogas, o HV retirado na colheita deve ser colocado num recipiente contendo um anticoagulante (fluoreto de sódio), por forma a evitar a coagulação do mesmo. Contudo é importante esclarecer o impacto do anticoagulante na determinação de analitos, uma vez que alguns estudos mostraram que a presença de diferentes anticoagulantes podem levar à formação ou degradação de certos xenobióticos^(2,7,17). O tubo/frasco em que se recolhe e armazena a amostra deve ter uma capacidade semelhante ao volume de amostra recolhida por forma a evitar a presença de ar no interior, facto que permite uma evaporação mais rápida de analitos voláteis, como o etanol⁽⁷⁾.

Quando se pretende realizar quantificações analíticas nas diferentes técnicas é necessário realizar um pré-tratamento da amostra para eliminar a natureza viscosa do HV, como por exemplo hidrólise enzimática (hialuronidase), aquecimento, diluição, microfiltração e/ou centrifugação⁽⁷⁾.

Após o pré-tratamento da amostra, existe uma variedade de técnicas aplicadas nas determinações analíticas ao HV entre as quais a cromatografia gasosa e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (GC-MS e LC-MS), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detetores de arranjo de díodos (HPLC-DAD), eletroforese capilar, entre outras^(2,7). No entanto, existem poucas técnicas validadas para a quantificação de determinados analitos (ex: xenobióticos) quando comparado, por exemplo, com quantificações realizadas em amostras de sangue periférico ou urina⁽²⁾.

Determinações analíticas

Etanol

As determinações de etanol *post-mortem* constituem as análises mais frequentemente realizadas em toxicologia forense, especialmente em casos criminais em que os limites legais se demonstram altamente relevantes⁽¹⁸⁾.

As determinações de etanol são realizadas na maior parte das vezes no sangue. No entanto, determinados estudos mostraram que cerca de metade dos indivíduos alcoólicos morrem com concentrações negativas de álcool no sangue, enquanto os restantes apresentam níveis baixos dessas concentrações⁽¹⁾. Por este motivo, diversos estudos têm utilizado biomarcadores de consumo de etanol como etil-glucoronídeo (EtG) como foi o caso de um estudo desenvolvido por Vezzoli et al. no qual, através da análise comparativa entre o sangue e o HV, os autores concluíram que existia a possibilidade de usar o HV para estimar o consumo de etanol⁽¹⁹⁾. Assim, estas análises demonstraram que a quantificação de EtG no HV representa um excelente parâmetro para diferenciar entre o consumo de etanol antes da morte e a sua formação *post-mortem* devido a fenómenos putrefativos⁽¹⁹⁾. Uma vez que o HV se trata de um espaço anatómico relativamente protegido de bactérias, a determinação de álcool no sangue e a sua ausência no HV é indicativo de

produção de etanol *post-mortem*. Se por outro lado, os níveis de álcool no HV e no sangue forem ambos elevados, então estes serão indicativos de uma ingestão *ante-mortem*⁽²⁰⁾.

Relativamente às quantificações dos níveis de etanol no sangue, considera-se que o local da colheita deve ser feito da veia femoral, existindo estudos que demonstraram que as concentrações de etanol no sangue cardíaco são mais altas relativamente a veias periféricas⁽⁴⁾. Estas variações podem também existir em casos de inalação do conteúdo gástrico⁽²¹⁾.

Segundo diversos autores, o método mais aceite e utilizado para determinações quantitativas e qualitativas de etanol nos fluidos corporais e/ou tecidos é a cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama, usando técnicas de injeção direta ou por amostragem *headspace*^(4,22,23).

Algumas discrepâncias entre estudos baseiam-se essencialmente no rácio HV/sangue do etanol, apresentando valores de 1,15-1,20:1 de acordo com Kugelberg e Jones, ou ainda de 1,1 a 1,3 num estudo de Singer et al., de 1,2: 1 num outro de Ioan et al., mas também de 1,19 segundo Jones e Holmgren^(4-6,24). Embora estas avaliações não sejam sempre concordantes, através da comparação entre a concentração de álcool no HV e a concentração de álcool no sangue, é possível estimar em que fase da absorção se encontra o indivíduo aquando da morte. Para isto, e sabendo que o HV tem uma quantidade de água superior ao sangue (1,3:1), após absorção e chegando ao estado de equilíbrio, essa razão mantém-se. Contudo, se a concentração de álcool no sangue for igual ou superior à concentração de álcool no HV, isto será indicativo de que o indivíduo ainda se encontra na fase de absorção⁽²⁰⁾.

Em mortes em que o corpo esteve imerso em água, as concentrações de etanol podem variar⁽⁴⁾. Alguns autores concluíram que, durante os meses mais quentes, a produção de etanol pode iniciar-se após 12 a 24 horas após a imersão do mesmo em água⁽⁴⁾. Para além disso, tempos de imersão mais longos foram associados a maiores concentrações de etanol no sangue⁽⁴⁾. Outros estudos reportaram ainda que o etanol pode atravessar para o interior do olho por difusão através da esclerótica, levando

ao aumento dos níveis de etanol. Foi ainda concluído que períodos de imersão de 6 semanas resultaram em valores de etanol no HV mais baixos quando comparados com os do sangue⁽²⁴⁾.

O HV pode ainda apresentar vantagens relativamente ao sangue em situações em que existiu perfuração do estômago (ex: enforcamentos, ferimentos por bala, acidentes de aviação), no qual o líquido gástrico, altamente concentrado em álcool, se mistura com o sangue⁽²¹⁾.

Drogas

As determinações de drogas no HV têm sido menos estudadas devido, em parte, à dificuldade no estabelecimento e interpretação de resultados quantitativos pela barreira hemato-retiniana⁽⁷⁾.

A urina apresenta-se como a principal amostra na quantificação de drogas devido à janela temporal ser mais ampla para a deteção de compostos exógenos em relação a outras amostras. No entanto, esta nem sempre se encontra disponível, como é descrito por Pelander et al. no qual a urina se encontra acessível apenas em 15% dos casos⁽²⁵⁾.

Num estudo realizado por Scott e Oliver, com base em 20 casos mortais causados por heroína, os autores reportaram concentrações de morfina (proveniente da metabolização da heroína no fígado) mais baixos no HV do que no sangue. Posto isto, os autores consideraram o HV uma matriz de grande importância para as determinações de morfina quando não existe presença de sangue^(7,26). Num outro estudo desenvolvido por Rees et al., os autores salientaram que embora exista efetivamente níveis mais baixos no HV do que no sangue, é importante ter em consideração que esses valores podem sofrer alterações dependendo do intervalo de tempo entre a toma de morfina e o momento da morte, assim como das diferentes formas de consumo/administração (ex: injetável ou administração oral)⁽²⁷⁾. Ainda no mesmo estudo, os autores sugeriram que a maior lipofília da codeína (proveniente da metilação da morfina), habitualmente utilizada para fins terapêuticos, pode levar a que, contrariamente à morfina, as concentrações de codeína no HV sejam mais elevadas do que no sangue⁽²⁷⁾. Pelo contrário, num outro estudo desenvolvido por Wyman e Bultman, os autores demonstraram que

as concentrações de codeína parecem apresentar valores equivalentes nos dois locais^(7,28).

Diversos estudos têm-se focado no doseamento de 6-monoacetilmorfina (6-MAM) (metabolito da heroína) em diferentes matrizes biológicas como o sangue, urina e HV, por forma a detetar um consumo de heroína⁽²⁶⁻³⁰⁾. Para além disso, estes estudos demonstram que a heroína é mais facilmente detetada no HV do que no sangue, sendo que existem casos em que é apenas identificada no HV⁽²⁶⁻³⁰⁾.

Certos autores utilizaram também o rácio de concentrações codeína/morfina no HV por forma a distinguir uma toma de codeína ou de morfina⁽²¹⁾. Num estudo de Wyman e Bultman, todos os casos estudados apresentaram valores significativamente mais elevados no HV do que no sangue femoral podendo este fator estar associado às diferenças lipofílicas da codeína e da morfina⁽²⁸⁾.

No que diz respeito ao estudo da cocaína, Antonides *et al.* detetaram que em 72% dos casos analisados, as concentrações de cocaína no HV eram mais elevadas do que no sangue, ao contrário das concentrações de benzoilecgonina (metabolito da cocaína), que apresentaram valores mais elevados no sangue do que no HV em 78% dos casos analisados, o que pode ser justificado através da existência de uma atividade enzimática mais baixa do que no sangue, levando a que a cocaína sofra uma degradação mais gradual^(1,30). Contrariamente a este, Metushi *et al.* avaliaram 51 casos, no qual puderam identificar 71 compostos no sangue total e 60 no HV, concluindo assim que algumas drogas são mais difíceis de identificar no HV do que no sangue total (trazodona no sangue: 42 ± 0.57 ; trazodona no HV: 0.15 ± 0.05 mg/L)⁽³¹⁾.

No estudo de Carvalho *et al.* os autores sugerem que o rácio cocaína/benzoilecgonina pode ajudar a determinar se a morte foi acidental ou devido a uma overdose, uma vez que este rácio tende a ser mais elevado em casos de overdose (na maioria dos casos maior que 1) nas várias matrizes biológicas como HV, sangue total e tecido cerebral⁽³²⁾. No entanto, foi observado que o rácio cocaína/benzoilecgonina tende a ser mais elevado no HV do que no sangue total, uma vez que existe uma atividade enzimática mais diminuída no HV comparativamente ao sangue e consequentemente uma menor degradação de cocaína nesta matriz⁽³²⁾.

O tetra-hidrocanabinol (THC), principal componente psicoativo da cannabis, é uma molécula altamente lipofílica e que se liga a proteínas plasmáticas, o que limita bastante a sua difusão no HV. Por este motivo, foi demonstrado em diversos estudos que esta amostra não é recomendada para a pesquisa de cannabis e seus derivados^(21,33).

Glucose e lactato

Após a morte os níveis de glucose no organismo diminuem, levando a um processo de glicólise anaeróbia *post-mortem*. Este processo origina a formação de piruvato e consequentemente a produção de lactato que tende a sofrer um aumento⁽³⁴⁾.

As concentrações de glucose e lactato no HV têm sido estudadas e utilizadas como indicadores de hiperglicemia *ante-mortem* podendo até indicar se o indivíduo sofria de diabetes, condição que pode não ter sido detetada em vida^(1,3). Esta hipótese foi formulada em 1969 por Traub que estabeleceu uma fórmula a partir da qual uma molécula de glucose daria origem a duas moléculas de ácido láctico através do processo de glicólise *post-mortem*⁽³⁵⁾. Posteriormente, outros autores desenvolveram estudos combinando as determinações de lactato e glucose em simultâneo⁽³⁶⁻³⁸⁾.

Num trabalho realizado por Zilg, 76 casos apresentavam valores de glucose no HV superiores a 10 mmol/L, sendo que em muitos destes casos estes valores elevados estavam presentes em indivíduos sem histórico de diabetes (ex: morte por asfixia, hemorragia cerebral, hipotermia, após reanimação cardiorrespiratória)⁽³⁹⁾. Noutros casos, valores moderadamente elevados foram verificados em indivíduos sujeitos a alto stress fisiológico, como é o caso de situações de morte por hipotermia^(3,40). Para além disso, foi demonstrado que os níveis de glucose no HV decrescem numa primeira fase após a morte (cerca de 24 horas), mantendo-se estáveis após outras 24 horas. A razão associada a esta diminuição deve-se ao facto de que após a morte o corpo passa a estar privado de oxigénio, fazendo com que as células realizem um processo de glicólise anaeróbia convertendo desta forma a glucose a lactato^(3,40). Por isto, alguns estudos aconselham a que a determinação de lactato seja realizada simultaneamente com a de glucose. No entanto, este estudo veio demonstrar que a quantificação de glucose isoladamente aparenta ser o marcador mais apropriado para determinar hiperglicemia *ante-mortem*^(3,40).

Para além disso, é essencial que se tenha em conta outros processos metabólicos naturais que ocorrem após a morte, nomeadamente o processo de glucogenólise que acontece no fígado e que tende a aumentar a difusão de glucose na veia cava e no ventrículo direito do coração⁽²⁾. Para além disso, a presença de glucose em determinados fluidos intravenosos utilizados na reanimação também pode elevar as concentrações da mesma no sangue. Neste sentido, concentrações elevadas de glucose no sangue podem não corresponder à concentração real aquando da morte⁽²⁾.

No HV, a glucose também tende a diminuir nos primeiros instantes após a morte, contudo, a diminuição é menos acentuada, nunca chegando a exceder os 200 mg/dL. Deste modo, casos de cetoacidose metabólica podem ser detetados num curto período de tempo após a morte (em média 16 horas) através da deteção de níveis elevados de glucose e cetonas no HV^(2,20).

Contudo, num trabalho de revisão elaborado em 2011 por Hess et al. os autores restabeleceram o interesse em avaliar o metabolismo da glucose através da combinação entre as somas das concentrações de glucose e lactato (mg/dL) no HV ou no fluido cerebrospinal^(38,41).

Sódio e cloro

Num estudo de Zilg, foi demonstrado que os níveis de cloro e sódio sofrem um ligeiro decréscimo com o aumento do IPM. Este decréscimo dos níveis de cloro e sódio no HV *post-mortem* estão associados à difusão destes eletrólitos para as células circundantes da retina e da coróide⁽³⁾. Quando avaliados 46 casos, os níveis séricos de sódio *ante-mortem* apresentaram uma correlação muito concordante com os níveis de sódio no HV *post-mortem*, especialmente em casos com IPMs curtos⁽³⁾. Uma vez que os níveis de sódio tendem a diminuir após a morte, é possível deduzir que níveis elevados deste eletrólito podem ser mais significativos, auxiliando a determinar casos de desidratação⁽¹⁾.

Para além disso, quando foram estudados casos de morte por afogamento, verificou-se que nos casos em que ocorreu em água doce, apresentavam níveis significativamente mais baixos do que os encontrados em afogamentos ocorridos no Mar Báltico (baixas concentrações de sal) ou casos de morte não relacionados a afogamentos⁽³⁾. Este estudo demonstrou ainda que os níveis reduzidos

de sódio encontrados nos casos de afogamento em água doce estavam claramente ligados com o tempo de imersão⁽³⁾. Outros estudos anteriores verificaram que os níveis de sódio e cloro estão aumentados em casos de afogamentos em água salgada e reduzidos em afogamentos em água doce⁽⁴²⁾. Contudo, existem diferentes opiniões sobre se este fenómeno é resultante do próprio processo de afogamento ou do mecanismo de difusão *post-mortem* para o interior do olho através da água envolvente⁽³⁾.

Num estudo de Garland *et al.* os autores demonstraram que os níveis elevados de sódio e cloro podem também ajudar a distinguir entre afogamentos em água salgada e mortes cujo corpo esteve imerso em água mas não associado a afogamento⁽⁴³⁾. Através da comparação da permeabilidade entre olhos humanos e de bovinos, concluíram que a elevação dos níveis de sódio e cloro *post-mortem* em mortes em água salgada, com tempos de imersão inferiores a uma hora, estariam associados a situações de imersão e não de afogamento⁽⁴³⁾.

Potássio

Diversos estudos desenvolvidos ao longo dos anos têm trabalhado no estudo da determinação do IPM através da quantificação de potássio. Vários modelos estatísticos e equações para estimar o IPM são baseados no facto de que, o aumento do potássio no HV segue um crescimento linear ao longo do tempo⁽¹⁾. Porém, num estudo de Zilg, este crescimento seguiu uma curva exponencial que eventualmente tende a equilibrar após aproximadamente uma semana⁽³⁾.

Outro dos fatores estudados por alguns autores como podendo ter influência nos níveis de potássio no HV é a idade do indivíduo, sendo que, estas alterações podem estar associadas ao tamanho do globo ocular e à composição bioquímica e celular do HV, levando à hipótese de que, quanto mais jovem for o indivíduo maior será o aumento^(3,10). Estes resultados parecem estar em desacordo com os de Ahi e Garg, no qual a idade não apresentou qualquer influência nos níveis de potássio no HV⁽⁴⁴⁾. Num estudo de Tumram *et al.*, os autores verificaram que climas mais quentes parecem influenciar nas concentrações de potássio, uma vez que os corpos estão mais sujeitos a deterioração⁽⁴⁵⁾. Estas afirmações estão em concordância com os de Zilg, demonstrando que, quanto maior a temperatura ambiente, mais acentuado é o aumento das

concentrações de potássio⁽³⁾. Por outro lado, no estudo de Ahi e Garg, tanto a temperatura como a humidade não apresentaram qualquer tipo de efeito nos níveis de potássio⁽⁴⁴⁾. De acordo com inúmeros investigadores, a utilização de um eléctrodo seletivo de iões com auxílio de fotometria de chama, é o método de escolha para reduzir erros analíticos⁽⁴⁵⁾.

Ácido desoxirribonucleico

Poucos estudos têm sido desenvolvidos acerca da deteção de ácido desoxirribonucleico (DNA) no HV como forma de identificação de cadáver. Baseado nisto, Soltyszewski *et al.* afirmam que os resultados obtidos apenas do HV não são suficientes como fonte de DNA. Para além disso, reconhecem que a fiabilidade destes resultados variam muito consoante a técnica de deteção utilizada, sendo que o DNA encontrado pode resultar apenas de contaminação microbiana⁽⁴⁶⁾.

Discussão

Embora existam diversas vantagens na utilização do HV, como ficou patente e demonstrado ao longo do ponto anterior deste trabalho, existem ainda algumas discordâncias entre estudos, quando considerado por exemplo a tendência de crescimento dos níveis de potássio *post-mortem*, o doseamento de glucose e lactato em conjunto ou separadamente, ou ainda na capacidade de estabelecer correlações entre os níveis de determinados analitos (ex: fármacos que se ligam facilmente a proteínas plasmáticas ou que são mais lipofílicas) comparativamente a outros fluidos biológicos (ex: sangue ou urina)^(1,2).

Uma das dificuldades na utilização do HV deve-se ao facto das técnicas atualmente utilizadas apenas estarem validadas e calibradas para amostras como urina e sangue⁽²⁾. Outro fator deve-se à própria consistência viscosa do líquido, o que apresenta pouca repetibilidade para o mesmo analito⁽²⁾. Algumas diferenças podem estar associadas a métodos e técnicas de instrumentação distintas entre estudos, assim como da própria aspiração e manuseamento da amostra⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾. Num dos exemplos referido numa revisão de Baniak *et al.*, os autores referem que o líquido deve ser aspirado no seu todo para que haja uma representação mais precisa das concentrações de todos os solutos. Outros

autores mencionados num trabalho de Bévalot *et al.*, pelo contrário, afirmam que deve ser aspirado apenas 2 mL de HV por cada olho por forma a evitar a aspiração de células epiteliais da retina e da íris^(1,7). Para além disso, Milló *et al.*, referem que o mesmo deve ser colhido de ambos os olhos e posteriormente separado em tubos/frascos de 10 mL, comparativamente a Hilal *et al.* que, embora assumam existirem opiniões divergentes entre estudos, afirmam que as amostras recolhidas dos dois olhos possam ser combinadas num mesmo tubo^(50,51).

Outra controvérsia está associada à determinação de glucose em simultâneo ou não, com lactato. Num estudo de Zilg, esta afirma que a quantificação de glucose, deve ser realizada isoladamente para diagnosticar quadros de hiperglicemia *ante-mortem*, uma vez que a formação de lactato pode ocorrer por outros processos para além da glicólise *post-mortem* (ex: processos de autólise, derivados do metabolismo bacteriano, alcoolismo, existência de tumores malignos, entre outros), o que pode conduzir a falsas conclusões^(3,52,53). Por outro lado, autores como Hess *et al.*, salientaram a importância de realizar estas quantificações tendo em conta a soma conjunta entre os níveis de glucose e de lactato no HV ou no fluido cerebrospinal^(38,41).

O estabelecimento de métodos para correlacionar os valores das concentrações dos analitos no sangue e no HV, pode afigurar-se relevante quando se suspeita de alterações *post-mortem* no sangue ou quando o HV não pode ser recolhido⁽⁶⁾.

Num estudo de Tumram *et al.* os autores afirmam que os corpos expostos a temperaturas mais baixas estão menos sujeitos a deterioração do que aqueles expostos a temperaturas superiores, podendo desta forma afetar as determinações de potássio⁽⁴⁵⁾. Em contrapartida, um outro estudo realizado por Ahi e Garg comprovou que entre os 21-35°C as variações nos níveis de potássio não foram significativas tendo assim concluído que a humidade e a temperatura entre os mesmos valores não têm influência significativa nos níveis de potássio no HV⁽⁴⁴⁾.

Conclusão e perspectivas futuras

Desta forma é possível concluir que a utilização do HV pode contribuir positivamente na elucidação de casos forenses nomeadamente na estimativa do IPM, hiperglicemia/cetoacidose diabética, afogamentos, ou ainda em casos judiciais para determinações de álcool ou drogas. O HV apresenta uma ampla variedade de vantagens quanto à sua composição e propriedades bioquímicas, uma vez que se encontra anatomicamente preservado dos processos de decomposição e contaminação bacteriana quando comparado a outros fluidos corporais como sangue ou urina. No entanto é necessário ter sempre em consideração todas as variáveis que possam desta forma afetar a obtenção de resultados fiáveis e rigorosos de modo a minimizar a ocorrência de erros analíticos e pós-analíticos.

Relativamente às drogas/fármacos, as moléculas mais lipofílicas ou fortemente ligadas a proteínas plasmáticas podem estar quase ausentes no HV pelo que a sua determinação/análise neste tipo de amostra deve ser realizada com precaução.

Ao longo dos anos, têm sido desenvolvidos uma série de algoritmos e análises estatísticas para estimar o IPM. Estas equações têm sido aplicadas por forma a perceber por exemplo, o aumento do potássio *post-mortem* ou ainda a relação entre os níveis de etanol no sangue e o HV, no entanto, é importante que se estabeleçam correlações e algoritmos mais consensuais de maneira a proceder a uma correta realização e interpretação dos achados laboratoriais.

Futuramente, é importante que sejam realizados mais estudos acerca dos fenómenos de redistribuição e biotransformação *post-mortem* de variados analitos (ex: benzodiazepinas, antidepressores cíclicos, drogas de abuso, entre outros), nomeadamente em relação aos diferentes compartimentos oculares considerando estudos com um maior número de casos.

Para além disso é essencial que haja um desenvolvimento de métodos de validação e uniformização para técnicas como GC ou LC para a utilização de HV, assim como a otimização dos métodos de colheita e extração.

Apesar das possíveis desvantagens e/ou limitações das determinações analíticas ao HV *post-mortem*, esta amostra apresenta diversas oportunidades no futuro da toxicologia forense e na elucidação de casos *post-mortem*.

Referências Bibliográficas

1. Baniak N, Campos-Baniak G, Kalra J. Vitreous Humor: A Short Review on Post-mortem Applications. *J Clin Exp Pathol.* 2015;05(01):1-7.
2. Montefusco-Pereira CV, Pinto L de MA. El humor vítreo como fluido biológico de importancia clínica en ciencias forenses. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2016;50(1):17-35.
3. Zilg B. Postmortem analyses of vitreous fluid [Internet]. Karolinska Institutet; 2015. Available from: <https://openarchive.ki.se/xmlui/handle/10616/44849>
4. Kugelberg FC, Jones AW. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of the literature. *Forensic Sci Int.* 2007;165(1):10-29.
5. Jones AW, Holmgren P. Uncertainty in estimating blood ethanol concentrations by analysis of vitreous humour. *J Clin Pathol.* 2001;54(9):699-702.
6. Ioan BG, Jitaru V, Damian R, Damian SI. Study on the relationship between the concentration of ethanol in the blood, urine and the vitreous humour. *Rom J Leg Med.* 2015;23(3):211-6.
7. Bévalot F, Cartiser N, Bottinelli C, Fanton L, Guitton J. Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review. *Forensic Toxicol.* 2016;34(1):12-40.
8. Hayman J, Marc O. Human body decomposition. 1st ed. Press A, editor. 2016.
9. Parsons MA, Start RD, Forrest ARW. Concurrent vitreous disease may produce abnormal vitreous humour biochemistry and toxicology. *J Clin Pathol.* 2003;56(9):720.
10. McCleskey BC, Dye DW, Davis GG. Review of Postmortem Interval Estimation Using Vitreous Humor: Past, Present, and Future. *Acad Forensic Pathol.* 2016;6(1):12-8.
11. Bévalot F, Gustin MP, Cartiser N, Le Meur C, Malicier D, Fanton L. Interpretation of drug concentrations in an alternative matrix: The case of meprobamate in vitreous humor. *Int J Legal Med.* 2011;125(3):463-8.
12. De Letter EA, De Paepe P, Clauwaert KM, Belpaire FM, Lambert WE, Van Bocxlaer JF, et al. Is vitreous humour useful for the interpretation of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) blood levels? Experimental approach with rabbits. *Int J Legal Med.* 2000;114(1-2):29-35.
13. Logan BK, Stafford DT. Direct analysis of anticonvulsant drugs in vitreous humour by HPLC using a column switching technique. *Forensic Sci Int.* 1989;41(1-2):125-34.
14. Rees KA, Seulin S, Yonamine M, Leyton V, Munoz DR, Gianvecchio VAP, et al. Analysis of skeletal muscle has potential value in the assessment of cocaine-related deaths. *Forensic Sci Int [Internet].* 2013;226(1-3):46-53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.12.005>
15. Ritz S, Harding P, Martz W, Schütz HW, Kaatsch HJ. Measurement of digitalis-glycoside levels in ocular tissues: -A way to improve postmortem diagnosis of lethal digitalis-glycoside poisoning? I. Digoxin. *Int J Legal Med.* 1992;105(3):149-54.
16. Dinis-Oliveira RJ, Carvalho FD, Bastos M de L. *Toxicologia Fundamental.* Iidel, editor. 2018.
17. Holmgren P, Druid H, Holmgren A, Ahlner J. Stability of drugs in stored postmortem femoral blood and vitreous humor. *J Forensic Sci.* 2004;49(4):820-5.
18. Athanaselis S, Stefanidou M, Koutselinis A. Interpretation of postmortem alcohol concentrations. *Forensic Sci Int.* 2005;149(2-3):289-91.
19. Vezzoli S, Bernini M, Ferrari F De. Ethyl glucuronide in vitreous humor and blood postmortem specimens: analysis by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and interpreting results of neo-formation of ethanol. *Ann Ist Super Sanità.* 2015;51(1):17-27.
20. Gill JR. From Death to Death Certificate: What do the Dead say? *J Med Toxicol.* 2017;13(1):111-6.
21. Brunet B, Mura P. L'humeur vitrée en toxicologie médico-légale: Revue de la littérature et applications. *Ann Toxicol Anal.* 2012;24(1):9-15.
22. Chun HJ, Poklis JL, Poklis A, Wolf CE. Development and validation of a method for alcohol analysis in brain tissue by headspace gas chromatography with flame ionization detector. *J Anal Toxicol.* 2016;40(8):653-8.
23. Iskierka M, Zawadzki M, Szpot P, Jurek T. Comparison of post-mortem ethanol level in blood and bone marrow. *J Forensic Leg Med [Internet].* 2019;61:65-8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2018.11.003>
24. Singer PP, Jones GR, Lewis R, Johnson R. Loss of ethanol from vitreous humor in drowning deaths. *J Anal Toxicol.* 2007;31(8):522-5.
25. Pelander A, Ristimaa J, Ojanperä I. Vitreous humor as an alternative matrix for comprehensive drug screening in postmortem toxicology by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2010;34(6):312-8.
26. Scott KS, Oliver JS. Vitreous humor as an alternative sample to blood for the supercritical fluid extraction of morphine and 6-monoacetylmorphine. *Med Sci Law.* 1999;39(1):77-81.
27. Rees KA, Pounder DJ, Osselson MD. Distribution of opiates in femoral blood and vitreous humour in heroin/morphine-related deaths. *Forensic Sci Int [Internet].* 2013;226(1-3):152-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.01.002>
28. Wyman J, Bultman S. Postmortem Distribution of Heroin Metabolites in Femoral Blood, Liver, Cerebrospinal Fluid, and Vitreous Humor. *J Anal Toxicol.* 2004;28(4):260-3.
29. Pragst F, Spiegel K, Leuschner U, Hager A. Detection of 6-acetylmorphine in vitreous humor and cerebrospinal fluid - Comparison with urinary analysis for proving heroin administration in opiate fatalities. *J Anal Toxicol.* 1999;23(3):168-72.
30. Antonides HM, Kiely ER, Marinetti LJ. Vitreous fluid quantification of opiates, cocaine, and benzoyllecgonine: Comparison of calibration curves in both blood and vitreous matrices with corresponding concentrations in blood. *J Anal Toxicol.* 2007;31(8):469-76.

31. Metushi IG, Fitzgerald RL, McIntyre IM. Assessment and comparison of vitreous humor as an alternative matrix for forensic toxicology screening by GC-MS. *J Anal Toxicol*. 2016;40(4):243–7.
32. Carvalho VM, Fukushima AR, Fontes LR, Fuzinato D V., Florio JC, Chasin AAM. Cocaine postmortem distribution in three brain structures: A comparison with whole blood and vitreous humor. *J Forensic Leg Med* [Internet]. 2013;20(3):143–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jflm.2012.06.006>
33. Saenz SR, Lewis RJ, Angier MK, Wagner JR. Postmortem fluid and tissue concentrations of THC, 11-OH-THC and THC-COOH. *J Anal Toxicol*. 2017;41(6):508–16.
34. Kumari A. Chapter 1 – Glycolysis. *Sweet Biochem*. 2018;1–5.
35. F. T. Methode zur Erkennung von tödlichen Zuckerstoffwechselstörungen an der Leiche (Diabetes mellitus und Hypoglykämie). *Zentrabl Allg Pathol*. 1969;112:390–9.
36. Osuna E, García-Víllora A, Pérez-Cárceles M, Conejero J, Abenza JM, Martínez P, et al. Glucose and lactate in vitreous humor compared with the determination of fructosamine for the postmortem diagnosis of diabetes mellitus. *Am J Forensic Med Pathol*. 2001;22(3):244–9.
37. De Letter EA, Piette MHA. Can routinely combined analysis of glucose and lactate in vitreous humor be useful in current forensic practice? *Am J Forensic Med Pathol*. 1998;19(4):335–42.
38. Palmiere C, Sporkert F, Vaucher P, Werner D, Bardy D, Rey F, et al. Is the formula of Traub still up to date in antemortem blood glucose level estimation? *Int J Legal Med*. 2012;126(3):407–13.
39. Pigaiani N, Bertaso A, De Palo EF, Bortolotti F, Tagliaro F. Vitreous humor endogenous compounds analysis for post-mortem forensic investigation. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2020;310:110235. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110235>
40. Zilg B, Alkass K, Berg S, Druid H. Postmortem identification of hyperglycemia. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2009;185(1–3):89–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.12.017>
41. Hess C, Musshoff F, Madea B. Disorders of glucose metabolism-post mortem analyses in forensic cases: Part I. *Int J Legal Med*. 2011;125(2):163–70.
42. Byard RW, Summersides G. Vitreous humor sodium levels in immersion deaths. *J Forensic Sci*. 2011;56(3):643–4.
43. Garland J, Tse R, Oldmeadow C, Attia J, Anne S, Cala AD. Elevation of post mortem vitreous humor sodium and chloride levels can be used as a reliable test in cases of suspected salt water drowning when the immersion times are less than one hour. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2016;266:338–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.06.001>
44. Ahi RS, Garg V. Role of vitreous potassium level in estimating postmortem interval and the factors affecting it. *J Clin Diagnostic Res*. 2011;5(1):13–5.
45. Tumram NK, Ambade VN, Dongre AP. Thanatochemistry: Study of vitreous humor potassium. *Alexandria J Med* [Internet]. 2014;50(4):365–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajme.2013.12.002>
46. Soltyszewski I, Niemcunowicz-Janica A, Pepinski W, Spólnicka M, Zbiec R, Janica J. Vitreous humor as a potential DNA source for postmortem human identification. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45(2):135–6.
47. Blana SA, Mußhoff F, Hoeller T, Fimmers R, Madea B. Variations in vitreous humor chemical values as a result of pre-analytical treatment. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2011;210(1–3):263–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.03.023>
48. Mulla A, Massey KL, Kalra J. Vitreous humor biochemical constituents: Evaluation of between-eye differences. *Am J Forensic Med Pathol*. 2005;26(2):146–9.
49. Madea B, Musshoff F. Postmortem biochemistry. *Forensic Sci Int*. 2007;165(2–3):165–71.
50. Millo T, Jaiswa A, Behera C. Collection, preservation and forwarding of biological samples for toxicological analysis in medicolegal autopsy cases: A review. *J Indian Acad Forensic Med*. 2008;30(2):96–100.
51. Hilal M, Abdullah E, El Sayed R, Salman H. Review on Collection , Preservation and Forwarding of Biological Samples for Toxicological Analysis. *Sohag Med J*. 2018;22(1):431–8.
52. Keltanen T, Nenonen T, Ketola RA, Ojanperä I, Sajantila A, Lindroos K. Post-mortem analysis of lactate concentration in diabetics and metformin poisonings. *Int J Legal Med*. 2015;129(6):1225–31.
53. Holstein A, Titze U, Hess C. Postmortem Analysis of Vitreous Humor For Detection of Antemortem Disorders in Glucose Metabolism. An Old Method Revisited. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2018;

TOXOPLASMOSE NA GRAVIDEZ: DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-TOXOPLASMA GONDII EM GRÁVIDAS SEGUIDAS NO CHL

TOXOPLASMOSIS IN PREGNANCY: DETERMINATION OF THE PREVALENCE OF ANTI-TOXOPLASMA GONDII ANTIBODIES IN PREGNANT WOMEN FOLLOWED IN CHL

Autores

Vera Botas - Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, *BSc*

Francisco Rodrigues - Qualidade de Vida no Mundo Rural (QRural) | Sport, Health & Exercise Unit (SHERU), Instituto Politécnico de Castelo Branco, *PhD*

Patrícia Coelho - Sport, Health & Exercise Unit (SHERU) | Qualidade de Vida no Mundo Rural (QRural), Instituto Politécnico de Castelo Branco, *PhD*

Centro de execução do trabalho

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

Centro Hospitalar de Leiria

Conflitos de interesse

A equipa de investigação declara a não existência de conflitos de interesse na realização do estudo

Fontes de Financiamento

Não existiu qualquer fonte de financiamento de contribuição para a realização do estudo

E-mail do autor responsável

verabotas@hotmail.com

Tipo de artigo

Artigo de Investigação

Resumo

A toxoplasmose é uma doença infecciosa provocada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. Pode ser adquirida através da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos presentes no solo ou a partir da ingestão de quistos tecidulares presentes em carne crua ou mal cozinhada. A maioria das Pessoas apresenta-se assintomática e não necessita de tratamento. Contudo, quando adquirida durante a gravidez, pode provocar graves consequências no feto e a sua gravidade vai depender do momento da exposição ao parasita. Com este trabalho pretendeu-se determinar a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em grávidas seguidas no Centro Hospitalar de Leiria como evidência serológica de exposição à toxoplasmose e verificar se um maior conhecimento sobre infeção por este protozoário se traduz numa menor incidência da doença e consequente redução dos riscos de transmissão ao feto e prevalência das doenças associadas. Para testar a associação entre as variáveis utilizou-se o teste t-student (IC 5% $p \leq 0,05$).

A prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* no presente estudo foi de 28%, no qual 24% eram positivas para IgG e negativas para IgM, 2% eram positivas para as duas classes de anticorpos e 2% eram positivas apenas para IgM. 72% das grávidas apresentaram-se suscetíveis para a infeção. Os resultados estatísticos revelam uma diferença significativa entre o estado serológico positivo e o estado serológico negativo e o nível de conhecimento das grávidas em relação à toxoplasmose e o grau de exposição a fatores de risco. É importante que estas estejam cientes da doença e reconheçam os fatores de risco a que podem estar expostas. Um diagnóstico precoce e um tratamento atempado conduz a uma redução no risco de complicações na vida futura do bebé.

Palavras-chaves

Toxoplasma gondii (C01.610.752.250.800);
Toxoplasmose Congênita (C01.207.205.300.900)

Abstract

Toxoplasmosis is an infectious disease caused by the obligatory intracellular protozoan *Toxoplasma gondii*. It can be acquired through the ingestion of water or food contaminated with oocysts present in the soil or from the ingestion of tissue cysts present in raw or undercooked meat. Most healthy people who are infected with toxoplasmosis have no signs or symptoms and are not aware that they are infected. However, when acquired during pregnancy, it can have serious consequences on the fetus and its severity will depend on the moment when the pregnant woman was exposed to the parasite. The aim of this work study was to determine the prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies among pregnant women followed in "Centro Hospitalar de Leiria", and estimate the seroprevalence of this infection in order to reduce the risk of transmission to the child or the possible risk factors and disease associated. In order to test the association between variables, was considered the t-student test (IC 5% $p \leq 0,05$).

The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in the present study was 28%, in which 24% were positive for IgG and negative for IgM, 2% were positive for both classes of antibodies and 2% were positive only for IgM. The remaining 72% of pregnant women were susceptible to infection. Statistical tests reveal a significant difference between seroprevalence positive and seroprevalence negative and the level of knowledge in pregnant women regarding toxoplasmosis and the exposure to risk factors. It is important during gestation to be aware of *Toxoplasma* infection and their risk factors in order to prevent measures to avoid exposure of pregnant women to the infection. An early diagnosis and timely treatment leads to a reduction in the risk of complications in the baby's future life.

Keywords

Toxoplasma gondii (C01.610.752.250.800);
congenital toxoplasmosis (C01.207.205.300.900)

Introdução

A toxoplasmose é uma doença infecciosa provocada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, capaz de infetar praticamente todos os animais de sangue quente. Estima-se que um terço da população Humana mundial já tenha sido exposta ao parasita e a sua prevalência está dependente de fatores como o clima, a cultura e os hábitos alimentares (Tenter, Heckerth, & Weiss, 2000). A toxoplasmose pode ser adquirida através da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos presentes no solo ou a partir da ingestão de quistos tecidulares presentes em carne crua ou mal cozinhada (Abdi, Shojaee, Mirzaee, & Keshavarz, 2008). A maioria das pessoas com toxoplasmose são assintomáticas e recuperam de forma espontânea. No entanto, se a infecção primária ocorrer durante a gravidez, o parasita pode atravessar a placenta e provocar aborto ou doença congênita. A taxa de transmissão vertical vai depender da idade gestacional, uma vez que existe maior risco de infecção durante o terceiro trimestre da gravidez. Contudo, a sua gravidade diminui ao longo da gestação. No caso de doentes imunodeprimidos, a toxoplasmose ocorre na maioria das vezes devido à reativação de uma infecção latente e pode levar à morte se não tratada atempadamente (Lappalainen & Hedman, 2004).

A toxoplasmose é uma das principais causas de coriorretinite nos EUA e na Europa, tendo sido associada na maioria das vezes a infecção congênita (Fernandes, Valente, Albuquerque, & Oliveira, 2007). Nos países Europeus, segundo um trabalho realizado em 2017, estima-se uma prevalência de *Toxoplasma gondii* entre 23% a 73% em mulheres de idade fértil; apresenta-se como um intervalo bastante grande, o que revela diferenças entre os vários pontos geográficos, tendo sido observadas taxas de seroprevalência mais baixas em países que apresentam um clima mais frio, nomeadamente, Finlândia (20%), Suécia (20%) e Noruega (11%), embora estudos recentes indiquem uma diminuição de toxoplasmose em alguns outros países Europeus (Lobo, Patrocínio, Sevivas, De Sousa, & Matos, 2017).

Em Portugal, não existe legislação que exija o rastreio de toxoplasmose em grávidas. A Direção Geral de Saúde disponibiliza diretrizes sobre a

prevenção da toxoplasmose (Lopes, Dubey, Dardé, & Cardoso, 2014). Relativamente à prevalência de toxoplasmose no nosso país, os dados disponíveis são escassos e estes revelam valores entre 30 a 60% em mulheres em idade fértil, principalmente no norte do País. Estima-se uma incidência de, aproximadamente, 11/10000 nascimentos, que equivale a 124 casos por ano (Fernandes et al., 2007). Importa que os profissionais da área de obstetria estejam cientes desta doença, que a reconheçam como diagnóstico diferencial nas situações clinicamente suspeitas e que dominem os meios para o seu diagnóstico e tratamento. Um diagnóstico precoce e um tratamento atempado conduz a uma redução no risco de complicações na vida futura do bebé (Kaye, 2011).

Objetivos

- Determinar a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em grávidas seguidas no Centro Hospitalar de Leiria como evidência serológica de exposição à toxoplasmose;
- Determinar o nível de conhecimento sobre a toxoplasmose em grávidas seguidas no Centro Hospitalar de Leiria;
- Determinar o grau de exposição a fatores de risco para a toxoplasmose em grávidas seguidas no Centro Hospitalar de Leiria.
- Explorar a relação entre o nível de conhecimento sobre a toxoplasmose e a presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*;
- Explorar a relação entre o grau de exposição a fatores de risco para a toxoplasmose e a presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

Materiais e métodos

Amostra

A amostra foi constituída 100 grávidas seguidas no Centro Hospitalar de Leiria, que se apresentaram na primeira consulta do Serviço de Obstetria e que responderam ao instrumento de colheita de dados durante o período de janeiro de 2020 a abril de 2020 (primeiras 100 Pessoas que cumpram os critérios). Os critérios de inclusão inerentes ao preenchimento do instrumento de colheita de dados foram:

- Mulheres grávidas com idade compreendida entre os 18 e os 45 anos;
- Mulheres grávidas que tenham realizado análises serológicas à toxoplasmose (pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*).

Procedimentos formais e éticos

Considerando a população-alvo do estudo, foi necessária a aprovação do mesmo pela comissão de ética e pelo diretor do Centro Hospitalar de Leiria, tendo sido apresentados os objetivos, o questionário a aplicar e os critérios de inclusão.

Antes da aplicação do questionário, cada participante preencheu o consentimento informado, no qual estão descritos os objetivos do estudo e as garantias de confidencialidade e de anonimato dos dados fornecidos.

Instrumentos de colheitas de dados

Neste estudo, de natureza quantitativa, utilizou-se o questionário como instrumento de colheita de dados (Marconi & Lakatos, 2002). O questionário utilizado comporta três secções destinadas ao autopreenchimento pelas grávidas e uma secção destinada ao preenchimento pelo profissional de saúde.

Com o primeiro grupo de questões (“dados pessoais”) pretende-se caracterizar os fatores sociodemográficos da amostra, (idade da grávida, idade gestacional, o número de gestações, escolaridade e profissão); o segundo grupo de questões (“conhecimento da infeção”) destina-se à avaliação do grau de conhecimento da participante em relação à toxoplasmose. A terceira secção (“fatores de risco”) compreende um conjunto de questões que permite avaliar o grau de exposição a fatores de risco associados à infeção por *Toxoplasma gondii*. Na última secção (“imunologia”), o profissional de saúde indica o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* IgG e IgM.

Escala de avaliação do questionário

Na secção sobre o conhecimento da infeção, para cada uma das opções de resposta, pontuou-se com “1” se a resposta foi correta ou reveladora de conhecimento sobre a toxoplasmose ou com “0”, caso contrário. Na questão 2, consideraram-se como corretas as opções consistentes com os resultados dos testes imunológicos. Quem respondeu “não” à questão 1, automaticamente teve “0” em todas as variáveis deste grupo. Por fim, para cada participante, estes pontos foram somados para que fosse obtida a pontuação do nível de conhecimento sobre a toxoplasmose, de 0 até 10.

Na secção sobre os fatores de risco, valorizou-se o uso de água de poço, o contacto com gatos (e fezes), a coexistência de gatos e de roedores perto de casa, o consumo de carne proveniente de animais de criação própria e os restantes fatores de risco. Para cada um destes fatores, pontuou-se com “1” caso se tenha observado exposição ao fator de risco ou com “0”, caso contrário. Por fim, para cada participante foi obtida a pontuação dos fatores de risco, de 0 até 12.

Relativamente aos resultados dos testes serológicos, criou-se uma variável nominal com duas categorias, classificada em “0” (negativo), para ausência de evidência serológica de infeção pelo *Toxoplasma gondii* (IgG e IgM negativas) e “1”, (positivo) nos restantes casos.

Tratamento estatístico

Para o tratamento dos dados recorreu-se à linguagem informática R, versão 3.4.1 (2017-06-30). Depois da análise exploratória dos dados e tendo por base os principais fatores de risco para a infeção Humana por *Toxoplasma gondii* segundo a literatura consultada, algumas variáveis foram reclassificadas e categorizadas por forma a viabilizar o respetivo processamento estatístico e calcularam-se duas pontuações: a do nível de conhecimento e a dos fatores de risco. Relativamente ao estudo estatístico para as hipóteses de investigação, usou-se o teste t de Student unilaterial, com um nível de significância estatística de 0,05, que corresponde a um intervalo de confiança de 5%.

Hipóteses de investigação

Para este estudo, definiram-se as seguintes hipóteses de investigação:

- Existe relação entre o nível de conhecimento da grávida sobre a toxoplasmose e a presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.
- Existe relação entre o grau de exposição a fatores de risco para a toxoplasmose e a presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

Resultados

A amostra variou entre os 19 e os 45 anos com uma média de 31,8 anos e mediana de 32 anos.

No estudo serológico, observa-se que 72% (72% \pm 8,8% para um intervalo de confiança de 95%) das grávidas eram negativas para IgG e IgM anti-*Toxoplasma gondii*. Das restantes 28%, 24% eram positivas para IgG e negativas para IgM; 2% eram positivas para as duas classes de anticorpos e 2% eram positivas apenas para IgM, ou seja, 4% dos casos eram positivos para IgM (Figura 1).

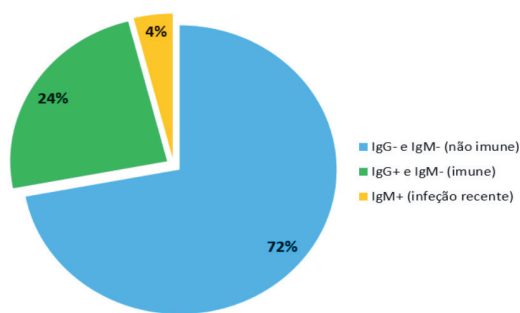


Figura 1. Representação gráfica das proporções de casos, em percentagem, em relação ao estado serológico.

De acordo com o nível de conhecimento sobre a toxoplasmose, numa escala entre 0 e 10 a pontuação máxima foi 8 (um caso), observaram-se 6% de casos com pontuação nula, a moda foi 4, com 20% dos casos, a mediana foi 5, a média foi 5,16 e o desvio padrão 2,01.

A figura 2 expõe a distribuição dos resultados obtidos.

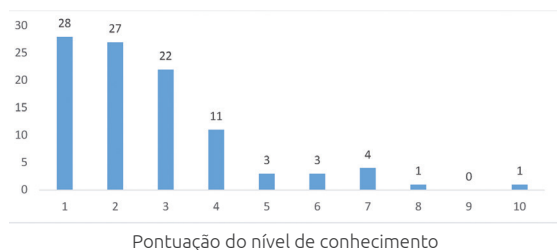


Figura 2. Representação gráfica da distribuição da pontuação do nível de conhecimento.

Quanto à análise estatística da correlação entre o nível de conhecimento e o estado serológico, a tabela 1 e a figura 3 resumem as principais estatísticas descritivas da pontuação nos dois grupos, segundo o estado serológico.

Tabela 1. Análise do conhecimento da infeção em relação à serologia.

Estado serológico	Pontuação do nível de conhecimento		
	Média	Desvio padrão	N
Positivo	4,11	2,01	28
Negativo	5,57	1,87	72

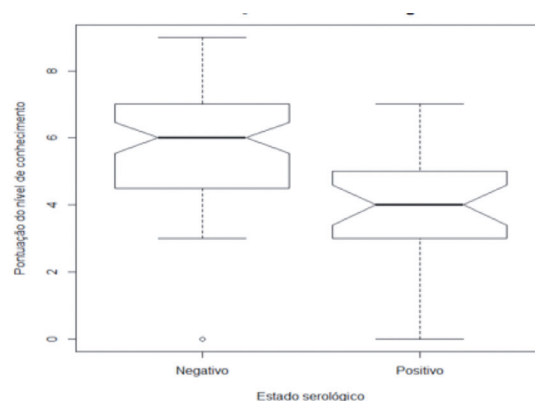


Figura 3. Diagramas de caixa para a pontuação do nível de conhecimento em relação ao estado serológico.

A análise estatística revela que a diferença observada entre as médias dos dois grupos é estatisticamente significativa, com um valor-P de 0.00084.

Relativamente ao grau de exposição aos fatores de risco, numa escala entre 0 e 12, a pontuação máxima foi 9 (um caso), observando-se 28% de casos com pontuação nula, que corresponde também à moda, a mediana foi 2, a média foi 2,59 e o desvio padrão 1,93. A figura 4 expõe a distribuição dos resultados.

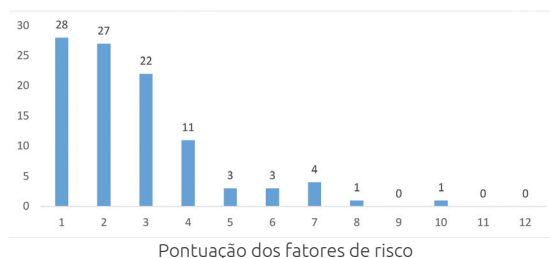


Figura 4. Histograma da pontuação dos fatores de risco.

Quanto aos fatores de risco e ao estado serológico, a tabela 2 e a figura 5 resumem as principais estatísticas descritivas da pontuação.

Tabela 2. Análise dos fatores de risco em relação à serologia.

Estado serológico	Fatores de risco		
	Média	Desvio padrão	N
Positivo	3,46	2,25	28
Negativo	2,25	1,69	72

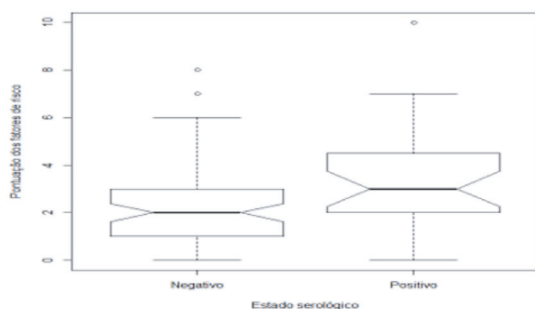


Figura 5. Diagrama de caixa para a pontuação dos fatores de risco em relação ao estado serológico. A análise estatística revela que a diferença observada entre as médias dos dois grupos é estatisticamente significativa, com um valor-P de 0.0068.

Discussão

O estudo das características sociodemográficas das grávidas permite ter uma percepção da população que necessita de ser informada com maior cuidado. No presente estudo verifica-se que a amostra variou entre os 19 e os 45 anos com uma média de 31,8 anos e mediana de 32 anos. Segundo Gargaté et al., 2016 a idade da grávida é diretamente proporcional à prevalência de anticorpos específicos para a Toxoplasmose, uma vez que ao longo da vida a probabilidade do indivíduo ser exposto ao parasita também aumenta. Estes resultados foram consistentes com um estudo realizado por Lito et al., 2013, numa maternidade em Portugal no qual foi possível observar que, as mulheres com idade inferior a 30 anos apresentaram uma seropositividade de 23% e as mulheres com mais de 30 anos a seropositividade foi de 30%.

A transmissão vertical ocorre em casos de infeção primária pelo *Toxoplasma gondii* durante a gravidez ou através da reativação de infeções latentes em gestantes (Kaye, 2011). O risco de infeção é cerca de 14% no primeiro trimestre e cerca de 59% no último trimestre. No entanto, os efeitos sobre o feto são mais graves se a transmissão ocorrer num estadio inicial da gravidez (Tenter et al., 2000). No presente estudo verificou-se que a maioria das grávidas apresentava-se no segundo trimestre de gravidez (40%), 35% no terceiro trimestre e apenas 25% no primeiro trimestre. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados no Hospital Garcia de Orta, no qual foi possível observar que das 121 grávidas que responderam a este parâmetro, 59 (48,76%) encontravam-se no último trimestre de gravidez, 51 (42,15%) no segundo trimestre e apenas 11 (9,09%) estavam no primeiro trimestre.

Relativamente ao número de gestações da amostra, pode constatar-se que 45% das grávidas se encontravam na primeira gravidez. É de esperar que as grávidas multiparas apresentem um maior conhecimento da toxoplasmose, devido a experiências anteriores, nomeadamente de informação e estudo de patologias ou mesmo consultas de planeamento. Além disso, também poderão apresentar uma seroprevalência mais elevada, pelo facto de um maior número de gravidezes estar relacionado com uma idade mais avançada da grávida.

Relativamente às habilitações literárias, pode verificar-se ainda que a maioria das participantes já tinha concluído o ensino secundário (46%), 38% tinha acedido ao ensino superior e que apenas 2% apresentavam escolaridade inferior ao 3º ciclo. Apenas 10% das grávidas apresentavam profissões relacionados com a da área da saúde. Estes dados sugerem que a maioria da amostra apresentasse com literacia e com nível socioeconómico superior. Seria de esperar que a amostra inquerida (com uma mediana de 32 anos) e habilitações literárias consideradas altas, apresentassem mais conhecimento sobre a infeção, visto que apresentam uma proximidade temporal da formação escolar relativamente curta, bem como o acesso aos novos meios de comunicação. No entanto, o estudo revelou que apenas 12% tinham maior conhecimento da infeção e dos seus fatores de risco, correspondendo

maioritariamente a grávidas com profissões relacionadas com a área da saúde (10%).

A toxoplasmose é considerada uma zoonose de origem alimentar, adquirida pela ingestão de carne, de água ou alimentos contaminados com oocistos presentes no solo ou a partir da ingestão de quistos tecidulares presentes em carne crua ou mal cozinhada (Abdi et al., 2008). A prevalência de *Toxoplasma gondii* depende de fatores como o clima, a cultura e os hábitos alimentares de uma determinada população.

Neste estudo, 72% das grávidas não estavam imunes à toxoplasmose. Das restantes 28%, 4% dos casos apresentavam resultados de análises serológicas compatíveis com infeção recente. Contudo, estes casos carecem de estudos adicionais confirmatórios, nomeadamente do teste de avidéz das IgG, se houver concentração suficiente destas imunoglobulinas e testes confirmatórios para excluir falsos positivos de IgM. Os resultados obtidos neste estudo são sobreponíveis aos observados num estudo realizado em 2011 no Hospital Garcia de Orta em Lisboa, segundo o qual, das 155 grávidas incluídas na investigação, 121 (78,06%) não estavam imunes, 17 (10,97%) eram positivas para anticorpos IgG e 17 (10,97%) eram positivas para ambas as classes de anticorpos. Em 2016, Gargaté *et al.*, utilizou dados de um estudo realizado em 2013 a 1440 grávidas, em Portugal, e observou diferenças regionais na seroprevalência. No norte do país, a seroprevalência foi de 13%; na região centro, de 29%; na região de Lisboa de 23% e no sul, de 33%. O autor comparou ainda estes resultados com outros obtidos em 1979/1980 e 2001/2002, tendo-se verificado uma diminuição da seroprevalência ao longo do período em estudo, exceto na região sul que apresentava em 1979/1980 uma seroprevalência de 43%, que reduziu para 25% em 2001/2002 e registou um aumento para 33% em 2013. Em 1984 tinha sido realizado outro estudo, também em Lisboa, que revelou uma seroprevalência de *Toxoplasma gondii* em 64,3% das mulheres grávidas (Lobo *et al.*, 2017). Da análise dos resultados obtidos no CHL e dos outros trabalhos consultados com dados relativos a Portugal, verifica-se uma diminuição significativa da prevalência da infeção por *Toxoplasma gondii* nas últimas décadas. A mesma evolução da infeção tem sido registada na Europa e foi referida no artigo de Cook *et al.*, 2000.

Neste estudo, o grau de exposição a fatores de risco foi avaliado numa escala entre 0 e 12 pontos, tendo sido considerados os principais fatores de risco conhecidos para a infeção humana por *Toxoplasma gondii*. Os resultados mostram que, de forma preocupante, a maioria das participantes (72%) estavam expostas a pelo menos um fator de risco durante a gestação. Observou-se também uma associação estatisticamente significativa entre a seroprevalência e um maior grau de exposição aos fatores de risco (3,46 pontos nos casos positivos contra 2,25 pontos nos casos negativos). O mesmo foi referido por Sevivas, no estudo de 2011 realizado no Hospital Garcia de Orta. Segundo este, as grávidas seropositivas apresentavam maior exposição a gatos (24,1%), roedores (22%) e a animais de criação para consumo próprio (18,5%) em relação às grávidas seronegativas (7%, 11% e 2,1% respetivamente).

Uma das limitações do presente estudo resultou de uma baixa amostragem de casos com IgM+ (possível infeção recente), falta de acesso a testes de avidéz e testes confirmatórios. Além disso, o questionário não permitiu avaliar o período de exposição da grávida aos fatores de risco. Os fatores de risco ou a sua ausência podem ter começado muito antes da gravidez. No entanto, existem vários estudos que permitem comprovar essas evidências tais como os referidos por Cook *et al.*, de 2000 e Lopes *et al.*, de 2012. Segundo Lopes *et al.*, 2012, no estudo realizado em gestantes do norte de Portugal, as mulheres que comiam carnes cruas ou mal cozinhadas tinham seroprevalência significativamente diferente em comparação às mulheres sem esses hábitos. O referido estudo permitiu verificar uma seroprevalência consideravelmente maior de infeção em mulheres que consumiam produtos de porco curados ou defumados e não cozidos em comparação com o grupo que não consumia carne de porco e o grupo que consumia apenas produtos cozidos. Estes resultados podem ser explicados pelo facto da atividade infetante dos quistos apenas ser inviabilizada através de processos de cozedura a 67°C ou congelamento profundo da carne a -12oC por 3 dias (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). Relativamente aos produtos cárneos e carnes curadas com sal, sacarose ou fumo, pensa-se que estes processos também possam ajudar na sua eliminação. Contudo, a sua sobrevivência vai depender das concentrações utilizadas e a temperatura de armazenamento aplicada (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). O estudo referiu ainda que

mulheres que praticavam atividades relacionadas com o solo, por exemplo jardinagem ou agricultura, sem usarem luvas, tiveram uma seroprevalência maior em comparação com as que usavam luvas ou não tinham esses tipos de atividades. Assim, o facto de não usar luvas e de não lavar adequadamente as mãos antes de comer ou tocar no rosto pode levar a uma ingestão ou inalação de oocistos esporulados.

De acordo com os resultados obtidos, Cook *et al.*, de 2000, não encontrou associações significativas entre a infeção e a presença de gatos, a sua dieta e a limpeza das caixas de areia. O aumento de risco de infeção foi mais associado ao contacto com o solo e animais, ao consumo de água não tratada e ao consumo de carne crua ou mal cozinhada provenientes de cordeiro ou de caça, durante a preparação das refeições. A prevalência da infeção não foi associada ao consumo de carne de porco mal cozinhada mas foi associada ao consumo de salames, carne de porco curada, secas, ou de linguiça crua. A prevalência da infeção foi também associada ao consumo de leite e de produtos lácteos não pasteurizados.

O conhecimento das grávidas sobre os fatores de risco para a infeção é muito importante na prevenção da toxoplasmose congénita. Nesta investigação, o nível de conhecimento foi avaliado numa escala entre 0 e 10 pontos para cada participante. Uma percentagem apreciável das participantes – 6% – não tinham qualquer conhecimento sobre esta doença. Ainda assim, estes resultados parecem ser positivos quando comparados aos de um estudo realizado no norte de Portugal por Lopes *et al.* (2012), segundo o qual, aproximadamente 50% das gestantes não apresentavam qualquer conhecimento sobre a infeção. Este estudo expressa também uma associação estatisticamente significativa entre a seroprevalência e um nível de conhecimento mais baixo sobre a toxoplasmose (4,11 pontos nos casos positivos contra 5,57 pontos nos casos negativos). Estes resultados são sobreponíveis aos do estudo de 2011 já referido, no Hospital Garcia de Orta, em Lisboa, cujos dados mostram um nível de conhecimento sobre toxoplasmose menor em grávidas seropositivas (48%) do que em grávidas seronegativas para *Toxoplasma gondii* (62,6%).

Conclusão

Os resultados deste estudo revelam uma seroprevalência baixa (28%) para a toxoplasmose nas gestantes da região de Leiria. Consequentemente, o risco de transmissão vertical é elevado se houver contacto com o *Toxoplasma gondii* durante a gestação. Concomitantemente, e de forma preocupante, os dados revelam também que a maioria das grávidas (72% ± 8,8%) estão expostas durante a gestação a pelo menos um dos fatores de risco conhecidos para a transmissão do parasita.

As ações de sensibilização e de informação sobre a toxoplasmose antes e durante a gravidez são instrumentos eficazes na prevenção e na transmissão vertical do *Toxoplasma gondii*. Estas devem ser reforçadas, porque se observam, não só insuficiências ao nível do conhecimento como também na exposição a fatores de risco para a transmissão do parasita durante a gestação, que devem ser minorados.

Este trabalho permitiu lançar bases para novas explorações de conhecimento dentro do tema abordado alertando para a necessidade intervenções temáticas junto das gestantes.

Referências Bibliográficas

- Abdi, J., Shojaee, S., Mirzaee, A., & Keshavarz, H. (2008). Seroprevalence of toxoplasmosis in pregnant women in Ilam Province, Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 3(2), 34–37.
- Fernandes, R., Valente, S., Albuquerque, M., & Oliveira, G. (2007). Toxoplasmose Congénita: Abordagem Diagnóstica e Terapêutica, 12(May 2016).
- Gargaté, M. J., Ferreira, I., Vilares, A., Martins, S., Cardoso, C., Silva, S., ... Gomes, J. P. (2016). *Toxoplasma gondii* seroprevalence in the Portuguese population: comparison of three cross-sectional studies spanning three decades. *BMJ Open*, 6(10), e011648.
- Kaye, A. (2011). Toxoplasmosis: Diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed Infants. *Journal of Pediatric Health Care*, 25(6), 355–364.
- Lappalainen, M., & Hedman, K. (2004). Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 40(1), 81–88.
- Lito, D., Francisco, T., Salva, I., Tavares, M. das N., Oliveira, R., & Neto, M. T. (2013). Análise das serologias para Infecções do grupo TORCH e do rastreio para *Streptococcus* do grupo B na população de grávidas de uma maternidade. *Acta Médica Portuguesa*, 26(5), 549–554.
- Lobo, M. L., Patrocinio, G., Sevivas, T., De Sousa, B., & Matos, O. (2017). Portugal and Angola: Similarities and differences in *Toxoplasma gondii* seroprevalence and risk factors in pregnant women. *Epidemiology and Infection*, 145(1), 30–40.
- Lopes, A. P., Dubey, J. P., Dardé, M.L., & Cardoso, I. (2014). Epidemiological review of *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in Portugal. *Parasitology*, 141(13), 1699–1708.
- Marconi, M. D. A., & Lakatos, E. M. (2002). *Técnicas de pesquisa* (Vol. 2, pp. 35-36). São Paulo: Atlas.
- Robert-Gangneux, F., & Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 264–296.
- Sevivas, T. (2011). Prevalência de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em grávidas da região de Lisboa e Vale do Tejo e estudo dos factores de risco. Universidade Nova de Lisboa
- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), 1217–1258.

A INFLUENCIA DA DIETA NA FLORA MICROBIANA INTESTINAL

THE INFLUENCE OF DIET ON INTESTINAL MICROBIAL FLORA

Autores

Luana Vieira - Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias - Instituto Politécnico de Castelo Branco, *BSc*

Francisco Rodrigues - Qualidade de Vida no Mundo Rural (QRural) | Sport, Health & Exercise Unit (SHERU), Instituto Politécnico de Castelo Branco, *PhD*

Patrícia Coelho - Sport, Health & Exercise Unit (SHERU) | Qualidade de Vida no Mundo Rural (QRural), Instituto Politécnico de Castelo Branco, *PhD*

Centro de execução do trabalho

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

Conflitos de interesse

A equipa de investigação declara a não existência de conflitos de interesse na realização do estudo

Fontes de Financiamento

Não existiu qualquer fonte de financiamento de contribuição para a realização do estudo

Contacto do autor responsável

luanamarisavieira@gmail.com

Tipo de artigo

Artigo de Revisão Bibliográfica

Resumo

A dieta tem vindo a ser estudada mais ao pormenor devido à sua possível influência na microbiota intestinal, que pode ser positiva ou negativa. O intestino é considerado o nosso segundo cérebro, daí a sua importância. Apesar das diversas dietas existentes, neste trabalho são realçadas a dieta vegan e vegetariana, a dieta mediterrânica e a dieta ocidental, devido às suas características distintas. A microbiota intestinal apresenta uma flora normal, com microrganismos considerados "normais", no entanto, diversos estudos têm vindo a demonstrar que esta microbiota pode ser influenciada pela dieta adotada e, conseqüentemente, pode acarretar problemas de saúde ou até mesmo agravar problemas que já existam. Apesar das discrepâncias dos diversos estudos apresentados, existe realmente uma ligação bastante complexa entre a dieta e a microbiota intestinal. As dietas vegan e vegetariana apresentam bastantes semelhanças entre si, e, apesar de serem conhecidas por trazerem benefícios, os microrganismos desenvolvidos na microbiota, devido à sua ingestão, ainda não são totalmente coerentes. Por outro lado, de um modo geral, os indivíduos que adotam uma dieta ocidental apresentam na composição da sua microbiota intestinal, microrganismos prejudiciais à saúde intestinal, que acabam por agravar patologias preexistentes e até cooperam no desenvolvimento de outras. No caso da dieta mediterrânica, caracterizada por ser a dieta mais saudável e equilibrada a todos os níveis, uma vez que aposta numa dieta rigorosa e defende a adoção de um estilo de vida saudável e, por isso, contribui para a redução de doenças bastante comuns, como as doenças inflamatórias intestinais, as doenças crónicas, as doenças cardiovasculares e a diabetes.

Palavras chave

Dieta (G07.203), dieta mediterrânica (G07.203.650.240.270), dieta vegetariana (G07.203.650.240.300), dieta ocidental (G07.203.650.240.310), flora microbiana intestinal (G06.591.375).

Abstract

The diet has been studied more in detail, due to its possible influence on the intestinal microbiota, which can be positive or negative, after all the intestine is considered our second brain, hence its importance. Despite the various diets in force, in this work only the vegan and vegetarian diet, the Mediterranean diet and the western diet are highlighted, due to their distinct characteristics. The intestinal microbiota has a normal flora, with microorganisms considered "normal", however, several studies have been showing that this microbiota can be influenced by the adopted diet and, consequently, can cause health problems or even aggravate problems that already exist. Despite the discrepancies in the various studies presented, there is indeed a very complex link between the diet and the intestinal microbiota. Vegan and vegetarian diets have a lot of similarities between them, and, although they are known to bring benefits, the microorganisms developed in the microbiota, due to their ingestion, are not yet fully consistent. On the other hand, in general, individuals who adopt a Western diet present in the composition of their intestinal microbiota, microorganisms harmful to intestinal health, which end up aggravating pre-existing pathologies and even cooperating in the development of other pathologies. In the case of the Mediterranean diet, which is characterized by being the healthiest and most balanced diet, at all levels, it not only bets on a strict diet, but defends the adoption of a healthy lifestyle at all levels and, therefore, contributes to the reduction of very common diseases, such as inflammatory bowel diseases, chronic diseases, cardiovascular diseases and diabetes.

Keywords

Diet (G07.203), mediterranean diet (G07.203.650.240.270), vegetarian diet (G07.203.650.240.300), western diet (G07.203.650.240.310), intestinal microbial flora (G06.591.375).

Introdução

A dieta é caracterizada por um regime alimentar que corresponde às necessidades de cada indivíduo. Existem diversos tipos, que incluem tanto alimentos como regimes alimentares diferentes e, apesar desta diversidade, este trabalho incide essencialmente nas dietas vegan, vegetariana, mediterrânica e ocidental. Os alimentos ingeridos e o valor nutricional em cada uma delas, apresentam algumas discrepâncias, como vai ser possível verificar adiante, o que permite comparar aspetos diferentes, no que diz respeito à influência na flora intestinal. (David et al., 2014; Singh et al., 2017).

A microbiota Humana caracteriza-se pelos diversos microrganismos que habitam no corpo Humano. No intestino estão presentes triliões de microrganismos comensais, não só bactérias, mas também vírus, protozoários e fungos, que são essenciais ao bom funcionamento intestinal, e que estão sujeitos a alterações ao longo do tempo. (Derovs, Laivacuma e Krumina, 2019).

A microbiota intestinal apresenta uma elevada importância, para além das diversas funções que desempenha, são os microrganismos comensais do intestino os principais responsáveis pela formação de uma “barreira”, que impede o alojamento de outros considerados patogénicos. Esta é estabelecida, inicialmente pelos microrganismos em maior abundância que se instalam nos recetores da mucosa intestinal e inibem a invasão de microrganismos patogénicos. Ocorre ainda a libertação de substâncias bacteriostáticas e microbicidas, que atuam no mesmo sentido diminuindo o crescimento de microrganismos patogénicos. E numa fase mais avançada ocorre, por parte dos microrganismos, a disputa pelos nutrientes, vitaminas e pelos fatores de crescimento, levando ao estabelecimento da “barreira”. Para além da dieta, da idade e do sexo de cada indivíduo serem os fatores mais evidentes na influência da flora microbiana intestinal, é necessário ter em atenção outros aspetos, como o facto dos alimentos percorrerem diferentes compartimentos do trato gastrointestinal, que, evidentemente, apresentam uma flora microbiana diferente em cada um deles e contribuindo para alterações da flora. Assim, a possibilidade de a dieta alterar a flora intestinal pode ainda desencadear ou agravar diversas patologias associadas. (Zimmer et al., 2012).

A identificação da flora microbiana intestinal é um processo complexo, podendo recorrer-se à cultura das fezes, que apesar de ser o processo mais simples e menos dispendioso, não permite resultados fidedignos em relação ao padrão encontrado na flora intestinal. São necessários métodos mais detalhados, que só são possíveis através de técnicas de PCR e FISH, o que torna este processo bastante dispendioso. O método selecionado pelos diferentes estudos apresentados adiante, pode inclusivamente influenciar os resultados que os mesmos obtiveram. (Derovs, Laivacuma e Krumina, 2019).

Objetivos

Estabelecer a relação entre os diferentes tipos de dietas e as alterações da flora microbiana intestinal. Avaliar as consequências das diferentes dietas na saúde intestinal e holística do Ser Humano.

Metodologia

Para a realização deste trabalho foi efetuada uma pesquisa sobre as dietas e a influência das mesmas na flora microbiana intestinal, nas bases de dados *PubMed* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *B-on* (<https://www.b-on.pt/>), através de palavras chave em português e inglês. As palavras chaves utilizadas foram dieta, dieta mediterrânica, dieta vegetariana, dieta ocidental e flora microbiana intestinal, com a utilização de descritores booleanos. As informações relativas às especificações de cada dieta foram recolhidas com base em informações da *American dietetic association* (<https://www.diet.com/>).

Todos os artigos científicos foram considerados para esta análise, tanto de revisão bibliográfica, como artigos originais e estudos clínicos. Dos artigos selecionados foram lidos os respetivos resumos, de forma a avaliar o seu enquadramento no trabalho e os artigos que não estavam diretamente relacionados com o tema, foram excluídos. Os artigos selecionados para o trabalho estão compreendidos entre 1973 e 2019. Artigos adicionais foram identificados através das referências dos artigos selecionados.

Desenvolvimento

Dieta

Uma dieta considerada equilibrada, deve conter diferentes alimentos dos vários grupos da conhecida roda dos alimentos e tem como objetivo fornecer ao organismo toda a energia e nutrientes que ele necessita. No entanto existem diversos fatores que podem influenciar a dieta adotada por cada um, como por exemplo, associados às crenças religiosas, ao estilo de vida, à localização geográfica, a fatores econômicos e até culturais. (Couceiro, Slywitch e Lenz, 2008).

A dieta vegetariana, no geral, restringe alimentos como a carne e o peixe, no entanto, podem ser adicionados alguns derivados e, consoante os mesmos, pode ser atribuída uma designação diferente. Assim, os ovolactovegetarianos, incluem o consumo de ovos, leites e outros laticínios, tal como os lacto-vegetarianos que apesar de não incluírem os ovos, incluem o leite e outros laticínios. Além destas derivações do vegetarianismo, existem outras, não tão abordadas, mas que podem ser também considerados estilos de vida como é o caso dos frutarianos, que apenas incluem alimentos como a fruta, as sementes e outros frutos provenientes de plantas, mas que sejam colhidos sem prejudicar a mesma e os flexitaristas, que, em ocasiões especiais, são flexíveis ao consumo de carne e peixe. A dieta vegan, é também uma dieta vegetariana e exclui todos os produtos de origem animal, os laticínios e os derivados, não só da alimentação, mas também do vestuário e outros consumíveis. A adoção deste tipo de dieta tem sido cada vez maior e os benefícios que esta pode ter em relação a outras patologias, como por exemplo as doenças cardiovasculares, a pressão arterial e a diabetes, parece ter influência na adesão. No entanto é necessário ter em atenção que este tipo de dietas não comportam o consumo de carne, peixe e por vezes ovos e laticínios, pelo que os nutrientes que estes fornecem necessitam de ser assegurados por outros alimentos, o que nem sempre acontece. (Couceiro, Slywitch e Lenz, 2008; Phillips, 2005).

A dieta mediterrânica tem como base alimentos típicos de países junto ao mediterrâneo e, por isso, podem existir diferentes tipos, consoante as religiões, as culturas e até a economia das

diferentes regiões do mediterrâneo. Apesar das possíveis discrepâncias, este estilo de vida incide essencialmente em produtos regionais e sazonais aliados a uma atividade física regular e com o devido descanso, assim, o principal objetivo é potenciar o bem-estar físico, social e mental. A principal aposta deste tipo de alimentação é o consumo de fruta, legumes, leguminosas e cereais, enquanto que os produtos lácteos, apenas estão presentes em consumo moderado e a principal gordura utilizada é o azeite. Já em relação a peixes, carnes brancas e ovos, apresentam um consumo mais reduzido. Com este padrão alimentar sugerido pela dieta mediterrânica, é possível obter os nutrientes essenciais, a fibra e as vitaminas ingeridas através dos cereais, leguminosas, da fruta e legumes; o cálcio e o fósforo dos laticínios e ainda a proteína presente na carne branca. (Associação Portuguesa dos Nutricionistas, [s.d.]; Del Chierico et al., 2014; Jin et al., 2019).

A dieta ocidental, com origem nos países ocidentais, como o próprio nome indica, tem sido alvo de várias mudanças ao longo dos anos. Os alimentos sofreram uma industrialização ao longo do tempo e, conseqüentemente, a complexidade dos mesmos diminuiu, os produtos refinados começaram a estar cada vez mais presentes na alimentação e a baixa qualidade dos alimentos diminuiu o custo dos mesmos. No entanto, todas estas alterações, tornaram este tipo de dieta mais prejudicial, não só à saúde humana, mas também ambiental. Esta alimentação inclui essencialmente proteína animal, a maioria das vezes processada, à semelhança da grande parte dos alimentos ingeridos e constitui-se como uma dieta com elevado consumo de açúcar e gorduras (*trans* e saturadas). Os legumes, a fruta, assim como os grãos integrais, são produtos que não são privilegiados neste tipo de dieta. (Singh et al., 2017).

Flora intestinal humana

A flora intestinal normal engloba diferentes microrganismos, não só bactérias, mas também fungos, vírus, entre outros, todos eles importantes para manter o equilíbrio e a integridade do epitélio intestinal. Assim, a flora normal apresenta uma série de funções essenciais, dentro das quais, a capacidade

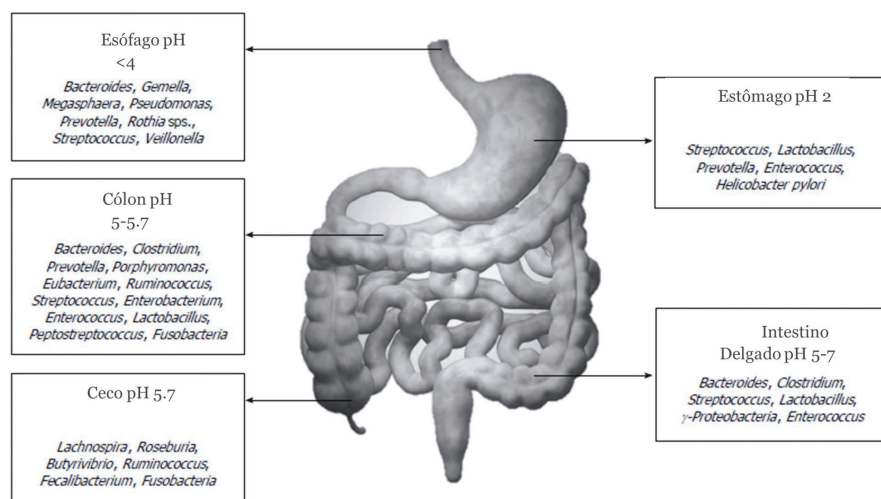
de digerir substratos passíveis de metabolização, neste caso, o trato gastrointestinal superior e o cólon são as principais fontes de nutrientes e fornecem substratos como os açúcares, os lípidos, as fibras, as proteínas, as mucinas e o colesterol, que são então metabolizados. A resistência a microrganismos patogénicos é essencial, na medida em que atua diretamente de forma a impedir a colonização dos mesmos no intestino, estabelecendo uma “barreira”. Um dos mecanismos utilizados pela flora normal é a produção de substâncias inibitórias, como as bacteriocinas, que têm capacidade de inibir tanto bactérias gram positivas como negativas e consequentemente manter a incorruptibilidade do epitélio. Os microrganismos comensais do intestino têm também a capacidade de produzir vitaminas, como a B12 e a riboflavina e ainda transformam outras, de forma a serem absorvidas no cólon, como a biotina e a piridoxina. A flora intestinal tem a capacidade de estimular a produção de mucinas, que se encontram no lúmen e atuam como lubrificante, controlam a absorção de água e eletrólitos e colaboram na fixação de bactérias, assim como protegem a mucosa de lesões. No que diz respeito ao sistema imunológico, as células GALT sofrem estimulação e têm capacidade para maturar o sistema linfóide ligado ao intestino induzindo a sua ação na presença de uma flora normal. A maturação e renovação das células epiteliais do cólon é ativada. Para além de todas as funções abordadas, existe uma que não está ainda claramente estudada, mas

que pode adicionar-se às anteriores - incentivar o peristaltismo do intestino e regular o trânsito intestinal. (Eckburg, 2005; Gubert *et al.*, 2020; McFarland, 2000; Simon e Gorbach, 1986).

A microbiota intestinal começa a desenvolver-se desde o momento em que nascemos e, logo aí, pode ser influenciada pela forma como ocorre o parto, sendo expectável que num parto normal exista maior exposição a diferentes microrganismos e, por isso uma maior resistência a infeções. Aos dois anos de idade já é esperado que a criança apresente uma microbiota intestinal idêntica à de um adulto. No entanto, existem outros fatores que podem influenciar a flora, ao longo do tempo, uma vez que esta não é estanque ao longo da vida. Estes fatores são então a localização geográfica, a idade, situações de stress, a administração de antibióticos e a dieta, que é o principal foco deste estudo. (McFarland, 2000)

Os microrganismos presentes numa flora intestinal normal são, maioritariamente, *Firmicutes* e *Bacteroides* em primeiro lugar e em segundo a *Actinobacteria* e a *Verrucomicrobia*. No entanto consoante a cavidade corporal, estes microrganismos podem sofrer algumas alterações, como é possível observar na figura 1, onde estão descritos mais ao pormenor, em cada órgão do aparelho gastrointestinal. (Jandhyala, 2015)

Figura 1 - Flora gastrointestinal normal. Adaptada de: Jandhyala, 2015.



Dados recolhidos

Diversos estudos têm sido realizados ao longo do tempo, de forma a comprovar a influência da dieta na flora microbiana intestinal, as tabelas seguintes demonstram alguns desses estudos, compreendidos entre 1973 e 2015.

Os estudos apresentados foram realizados por diferentes autores, em diferentes países e em condições também elas díspares, como é o caso do número de participantes e o controlo que é realizado aos mesmos, no sentido de cumprirem a dieta estipulada.

Tabela 1 - Flora microbiana intestinal na dieta vegan e vegetariana.

Dieta	Número de participantes	Idades	Ano	Local	Flora microbiana intestinal	Referências
Vegan	20	2-63	2014	Eslovénia	↑ <i>Bacteroides</i> ↑ <i>Prevotella</i>	(Matijašić <i>et al.</i> , 2014)
	105	22-85	2008	Alemanha	↓ <i>Bifidobacteria</i> ↓ <i>Bacteroides</i> ↓ <i>Enterobacteriaceae</i> ↓ <i>Escherichia coli</i>	(Zimmer <i>et al.</i> , 2012)
	12	20-27	1987	<i>American Society for Clinical Nutrition</i>	↓ <i>Lactobacilli</i> ↓ <i>Enterococci</i>	(Faassen, van <i>et al.</i> , 1987)
Vegetariana	11	30-67	2014	Eslovénia	↑ <i>Bacteroides</i> ↑ <i>Prevotella</i>	(Matijašić <i>et al.</i> , 2014)
	144	23-93	2008	Alemanha	↓ <i>Bifidobacteria</i> ↓ <i>Bacteroides</i> ↓ <i>Escherichia coli</i>	(Zimmer <i>et al.</i> , 2012)
	NE	NE	1973	Índia, Uganda, Japão	↑ <i>Enterococci</i> ↑ <i>Lactobacilli</i>	(Drasar <i>et al.</i> , 1973)

*NE: Não se encontra explícito.

Tabela 2 - Flora microbiana intestinal na dieta ocidental.

Dieta	Número de participantes	Idades	Ano	Local	Flora microbiana intestinal	Referências
Ocidental	108	NE	2011	<i>American Association for de Advancement of Science.</i>		(Wu <i>et al.</i> , 2011)
	8	30-50	1975	<i>Naylor Dana Institute for Disease Prevention, The American Health Foundation, New York.</i>	↓ <i>Bifidobacteria</i> ↓ <i>Lactobacillus</i> ↓ <i>Eubacteria</i> ↑ <i>Bacteroides</i> ↑ <i>Enterobacteria</i>	(Reddy, Weisburger e Wynder, 1975)
	NE	NE	1973	Uganda, Inglaterra, Escócia, USA.		(Drasar <i>et al.</i> , 1973)

*NE: Não se encontra explícito.

Tabela 3 - Flora microbiana intestinal na dieta mediterrânea.

Dieta	Número de participantes	Idades	Ano	Local	Flora microbiana intestinal	Referências
Mediterrânea	51	NE	2015	Itália.	↑ <i>Bifidobacteria</i> ↑ <i>Lactobacilli</i> ↑ <i>Eubacteria</i> ↑ <i>Bacteroides</i> ↑ <i>Prevotella</i> ↑ <i>Roseburia</i>	(De Filippis <i>et al.</i> , 2016)
	NE	NE	2014	<i>Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.</i>	↑ <i>Enterococcus</i>	(Patricia Lopez-Legarrea <i>et al.</i> , 2014)
	NE	NE	2014	<i>International Journal of Molecular Sciences.</i>	↓ <i>Clostridium</i>	(Del Chierico <i>et al.</i> , 2014)

*NE: Não se encontra explícito.

Discussão

Os dados apresentados são referentes a diferentes estudos, no entanto, podemos dividi-los em três grandes grupos, as dietas vegan/vegetariana, a dieta ocidental e a dieta mediterrânea, apesar das diferenças observadas nos artigos, fruto de várias influências como o controlo rigoroso da alimentação de cada participante.

A dieta vegan está diretamente ligada à dieta vegetariana, visto que se trata de uma variante da dieta vegetariana, assim como tantas outras e, daí a relação estabelecida entre as duas. É possível verificar que a flora microbiana intestinal referente a estas dietas apresenta bastantes semelhanças. Matijašić *et al.* estabeleceu uma comparação entre vegans, vegetarianos e omnívoros e apresentou resultados muito semelhantes tanto na dieta vegan como na vegetariana, em comparação com uma dieta omnívora. De forma mais significativa, revelou um aumento de *Bacteroides* e *Prevotella* tanto na dieta vegan como na vegetariana. Outro aspeto a salientar é o registo da diminuição do *Clostridium* (cluster XIVa), em comparação com os omnívoros. Facto que também está de acordo com um estudo realizado por Kabeerdoss *et al.*, na Índia e com Liszt *et al.*, que apesar de assumir um aumento de *Bacteroides*, assume que as diferenças não são significativas no que diz respeito ao *Clostridium* (cluster XIVa). Zimmer *et al.* apresentou um estudo mais detalhado em que para além dos indivíduos presentes no

estudo, foram selecionados aleatoriamente, mas com características específicas, um maior número de indivíduos, de forma a avaliar a flora normal de indivíduos vegans/vegetarianos, constituindo-os como um grupo de controlo. Posteriormente foram comparados esses mesmos grupos e concluiu-se que as diferenças mais significativas, tanto em indivíduos vegans como vegetarianos, eram a diminuição de microrganismos como *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *E. coli* e *Enterobacter*, já os restantes microrganismos analisados não apresentam diferenças significativas. Para além desta comparação, um segundo grupo de controlo foi estabelecido, mas com uma diminuição significativa de voluntários. Este grupo era constituído por indivíduos que não mantinham uma dieta vegan ou vegetariana. No caso da dieta vegetariana, as diferenças assentaram essencialmente na diminuição dos *Bacteroides*, da *Bifidobacterium* e da *E. coli*, já na dieta vegan, a diferença mais notável foi na diminuição da *Bifidobacterium*. Apesar das diferenças descritas com os grupos de controlo em estudo, segundo Zimmer *et al.*, as discrepâncias que existiam entre veganos e vegetarianos eram pouco significativas entre si. Assim, como é possível observar o estudo desenvolvido por Zimmer *et al.* entrou em contradição com o estudo desenvolvido posteriormente por Matijašić *et al.*, pelo menos no que diz respeito aos *Bacteroides*.

Outro estudo realizado por Wu *et al.*, em 2014, comparou indivíduos com uma dieta vegan e indivíduos com uma dieta omnívora e as diferenças

encontradas foram bastante ténues, enquanto que Zimmer *et al.* relatou diferenças bastante relevantes, como já foi referido anteriormente. Estudos anteriores incidiram o seu foco em microrganismos diferentes dos que foram referidos, talvez por serem os mais relevantes. Assim, Van Faassen *et al.*, em 1987, num estudo bastante reduzido e onde os indivíduos não tinham um estilo de vida baseado numa dieta vegetariana ou vegan, e, por isso, foi necessário um período de adaptação. Os voluntários passaram por uma dieta mista durante oito dias e posteriormente foram sujeitos à dieta vegetariana durante vinte dias e de seguida a dieta vegan durante o mesmo período. É expectável que os resultados não sejam idênticos aos indivíduos praticantes de uma dieta específica num período mais alargado. Posto isto, os resultados mais relevantes foram obtidos na dieta vegan, com uma diminuição dos microrganismos *Lactobacilli* e *Enterococci* em relação à dieta vegetariana e mista. Por outro lado, um estudo mais antigo, desenvolvido por Drasar *et al.*, aparentemente contraria estes resultados, no entanto é de salientar que, neste caso, a dieta vegetariana foi comparada com a dieta ocidental e, por isso, pode suscitar algumas dúvidas. Neste estudo, as diferenças não são tão acentuadas, mas realmente há um aumento de *Lactobacilli* e *Enterococci* em relação à dieta ocidental. É de salientar também que não são referidas as características mais específicas dos voluntários participantes neste estudo, assim como o tempo a que foram sujeitos à dieta e em que condições, pelo que dificulta comparar estes resultados com os já referidos. (Drasar *et al.*, 1973; Faassen, van *et al.*, 1987; Liszt *et al.*, 2009; Matijašić *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2011; Zimmer *et al.*, 2012)

Wu *et al.* contribuiu, não só para a descoberta da flora microbiana da dieta ocidental, como concordou também com Matijašić *et al.*, no estudo das dietas vegan e vegetariana, uma vez que associou a presença de microrganismos *Prevotella* às dietas ricas em hidratos de carbono e pobres em carne. Em relação à flora microbiana presente na dieta ocidental, retratada na tabela 2, não existem tantas contradições como nas anteriores. Vários estudos apontam para os malefícios deste tipo de dieta, não só na flora microbiana intestinal, como na saúde em geral. Na tabela 2 estão representados os resultados de alguns estudos, onde se observa a diminuição de microrganismos benéficos para a saúde, tais como *Bifidobacteria*, *Eubacteria* e *Lactobacillus*. Este facto apoia as consequências que a dieta ocidental pode acarretar para a saúde

Humana. De Filippo *et al.*, concordou parcialmente com os autores referidos na tabela 2, pois revelou o aumento de *Enterobacteria* e ainda a presença de *Firmicutes*, que apesar de algumas espécies serem benéficas, como por exemplo o *Clostridium*, outras podem ser responsáveis por desencadear um processo inflamatório. Outro estudo, realizado por Lecomte *et al.*, com uma incidência diferente dos anteriores, neste caso, realizado em ratos, também concordou com os resultados anteriores. Assim, os ratos que ingeriram uma dieta à base de gorduras, obtiveram uma predominância de *Bacteroides* e *Enterobacteria*, já os *Lactobacillus* reduziram substancialmente. De um modo geral, uma ingestão em excesso de gorduras, está associado não só a um aumento de *Bacteroides*, mas também ao aumento da diversidade de diferentes microrganismos na flora intestinal. (De Filippo *et al.*, 2010; Lecomte *et al.*, 2015; Matijašić *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2011)

A dieta mediterrânica é sem dúvida a dieta mais equilibrada em comparação com as referidas anteriormente. Este tipo de dieta estimula os microrganismos benéficos que potenciam a saúde sistémica do nosso organismo, podendo ser essenciais na redução do risco das doenças cardiovasculares, no controlo da diabetes tipo II e ainda no tratamento/controlo da obesidade. Em concordância com os estudos referidos na tabela 3, Ley *et al.*, em 2006, demonstrou que uma dieta mediterrânica equilibrada conforme referido no capítulo 4.1, aumenta a proporção de microrganismos benignos como *Bifidobacteria*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Prevotella*. Para além disso, este tipo de dieta tem a capacidade de reduzir espécies patogénicas, como é o caso do *Clostridium perfringens*. Outro estudo realizado por De Filippo *et al.*, em 2013, onde foram comparadas crianças do Burkina Faso, que consumiam uma dieta rica em plantas e fibras e crianças europeias, que consumiam uma dieta à base de gordura (dieta ocidental), concordou também com os resultados anteriores. O presente estudo demonstrou uma menor abundância de *Firmicutes* e um aumento de *Bacteroides*, nas crianças do Burkina Faso, enquanto que as crianças europeias apresentaram uma predominância de *Enterobacteria*. (De Filippo *et al.*, 2010; Ley *et al.*, 2006; Power *et al.*, 2014)

De modo geral, uma vez que existem alguns estudos pouco concordantes, é possível deduzir que as dietas ricas em vegetais e fibras, como é o caso das dietas vegan, vegetariana e mediterrânica, potenciam o aumento dos filos *Bacterioidetes* e *Actinobacteria*

(por exemplo, *Bifidobacterium spp.*) e diminuem os *Firmicutes*. Daí um dos maiores benefícios das dietas referidas, uma vez que as *Bifidobacteria* e os *Bacteroides* são capazes de metabolizar o ácido araquidónico, um ácido gordo fundamental. Através deste processo são produzidos prostaglandinas e leucotrienos, que conseguem modular a resposta imune e atuar no combate de doenças infecciosas. O acetato, produzido pelas bactérias *Bifidobacterium*, também contribui para a prevenção do “ataque” de microrganismos como a *E.coli*. O contrário acontece na dieta ocidental, rica em gordura e proteína animal, em que os *Firmicutes* prevalecem e estão diretamente relacionados com casos de obesidade. Isto acontece devido ao facto dos SCFA's, que são o resultado da fermentação dos hidratos de carbono e que se encontram preferencialmente nas dietas vegan, vegetariana e mediterrânica, atuarem diretamente na diminuição do pH do lúmen intestinal. Consequentemente a esta diminuição do pH, o desenvolvimento de microrganismos considerados patogénicos, como a *E.coli* e as Enterobactérias, é inibido. Em paralelo ocorre o crescimento de microrganismos favoráveis não só à saúde intestinal, mas também na saúde em geral. Nas dietas em que ocorre uma maior ingestão de proteína animal, como é o caso da dieta ocidental, naturalmente, o pH intestinal aumenta, devido à ação das bactérias putrefativas proteolíticas.

Conclusão

Ao longo do trabalho foi possível perceber, que, na realidade, a dieta pode apresentar um grande impacto na microbiota intestinal e consequentemente na saúde em geral. Assim, através de uma dieta saudável, todo o nosso organismo pode beneficiar, dependendo dos microrganismos presentes, principalmente ao nível da imunidade. Alguns microrganismos intestinais apresentam um papel bastante importante em determinadas doenças como a obesidade, o autismo e os transtornos de humor.

Como foi possível verificar, nem todos os estudos estão de acordo e mesmo que ainda sejam necessários muitos mais contributos, de forma a entender verdadeiramente as consequências de cada dieta, existem também algumas limitações que podem estar na causa das discrepâncias abordadas. O facto dos estudos microbiológicos realizados, na sua maioria, apenas conseguirem avaliar uma parte da microbiota intestinal e a questão se a microbiota

fecal, espelha a microbiota ao longo do trato gastrointestinal. Outro fator importante consiste nas dietas mistas, ou seja, os indivíduos são submetidos a dietas teste e não permanecem na mesma dieta a longo prazo, o que provoca uma maior alteração da flora intestinal e, conseqüentemente, influencia o objetivo dos estudos.

Em geral, as dietas vegan, vegetariana e mediterrânica estão associadas à produção de microrganismos benéficos, como é o caso dos *Lactobacillus* e *Bifidobacteria* que têm a capacidade de diminuir a inflamação sistémica, microrganismos esses que se encontram diminuídos no caso da dieta ocidental. Assim, as dietas mais vantajosas para a microbiota intestinal são as dietas à base de fibras e vegetais, principalmente a dieta mediterrânica, que é considerada uma dieta mais equilibrada, comparando com o vegetarianismo, que pode ser carente em alguns nutrientes essenciais. Isto acontece porque a dieta mediterrânica se caracteriza por um aumento de microrganismos benéficos, como as Bacteriodetes e as Actinobacteria e pela diminuição de bactérias prejudiciais como os Firmicutes, uma vez que as Bacteriodetes conseguem degradar e fermentar os polissacarídeos, a proporção de Bacteriodetes aumenta em relação aos Firmicutes. Em relação à dieta ocidental, frequentemente relacionada com casos de obesidade e onde os microrganismos com propriedades anti-inflamatórias estão claramente em baixas quantidades, existe uma maior propensão para a presença de situações inflamatórias. Para além disso, indivíduos que consomem este tipo de dieta, apresentam uma maior resistência à insulina. Assim, o conjunto destes factos, aumenta a predisposição dos indivíduos a distúrbios metabólicos e imunológicos.

Como é possível perceber ao longo do trabalho, existe ainda bastante controvérsia em relação ao tema da influência da dieta na flora microbiana intestinal e, por isso, há bastantes pontos que necessitam de uma investigação mais profunda e controlada, devido às limitações anteriormente referidas. A influência da dieta na flora microbiana, depende dos metabolitos microbianos, que consequentemente manipulam a composição da microbiota intestinal através da alteração do pH, que pode ser controlado pelos hábitos alimentares adotados, sempre tendo em atenção que, quanto mais benéficos forem os hábitos alimentares maiores os benefícios para a saúde intestinal e em geral do hospedeiro.

Referências Bibliográficas

- ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DOS NUTRICIONISTAS - Dieta Mediterrânica: um padrão de alimentação saudável, [s.d.]. Disponível em WWW:<URL:www.apn.org.pt>.
- COUCEIRO, Patrícia; SLYWITCH, Eric; LENZ, Franciele - Padrão alimentar da dieta vegetariana. 2008).
- DAVID, Lawrence A. et al. - Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. . ISSN 0028-0836, 1476-4687. 505:7484 (2014) 559–563. doi: 10.1038/nature12820.
- DE FILIPPIS, Francesca et al. - High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*. . ISSN 0017-5749, 1468-3288. 65:11 (2016) 1812–1821. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309957.
- DE FILIPPO, C. et al. - Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. . ISSN 0027-8424, 1091-6490. 107:33 (2010) 14691–14696. doi: 10.1073/pnas.1005963107.
- DEL CHIERICO, Federica et al. - Mediterranean Diet and Health: Food Effects on Gut Microbiota and Disease Control. *International Journal of Molecular Sciences*. . ISSN 1422-0067. 15:7 (2014) 11678–11699. doi: 10.3390/ijms150711678.
- DEROVŠ, Aleksej; LAIVACUMA, Sniedze; KRUMINA, Angelika - Targeting Microbiota: What Do We Know about It at Present? *Medicina*. . ISSN 1010-660X. 55:8 (2019) 459. doi: 10.3390/medicina55080459.
- DRASAR, B. S. et al. - The relation between diet and the gut microflora in man. *Proceedings of the Nutrition Society*. . ISSN 0029-6651, 1475-2719. 32:2 (1973) 49–52. doi: 10.1079/PNS19730014.
- ECKBURG, P. B. - Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*. . ISSN 0036-8075, 1095-9203. 308:5728 (2005) 1635–1638. doi: 10.1126/science.1110591.
- FAASSEN, A. VAN et al. - Bile acids, neutral steroids, and bacteria in feces as affected by a mixed, a lacto-ovo-vegetarian, and a vegan diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*. . ISSN 0002-9165, 1938-3207. 46:6 (1987) 962–967. doi: 10.1093/ajcn/46.6.962.
- GUBERT, Carolina et al. - Exercise, diet and stress as modulators of gut microbiota: Implications for neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease*. . ISSN 09699961. 134:2020) 104621. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104621.
- JANDHYALA, Sai Manasa - Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*. . ISSN 1007-9327. 21:29 (2015) 8787. doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8787.
- JIN, Qi et al. - Metabolomics and Microbiomes as Potential Tools to Evaluate the Effects of the Mediterranean Diet. *Nutrients*. . ISSN 2072-6643. 11:1 (2019) 207. doi: 10.3390/nu11010207.
- LECOMTE, Virginie et al. - Changes in Gut Microbiota in Rats Fed a High Fat Diet Correlate with Obesity-Associated Metabolic Parameters. *PLOS ONE*. . ISSN 1932-6203. 10:5 (2015) e0126931. doi: 10.1371/journal.pone.0126931.
- LEY, Ruth E. et al. - Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. . ISSN 0028-0836, 1476-4687. 444:7122 (2006) 1022–1023. doi: 10.1038/4441022a.
- LISZT, Kathrin et al. - Characterization of Bacteria, Clostridia and Bacteroides in Faeces of Vegetarians Using qPCR and PCR-DGGE Fingerprinting. *Annals of Nutrition and Metabolism*. . ISSN 0250-6807, 1421-9697. 54:4 (2009) 253–257. doi: 10.1159/000229505.
- MATIJAŠIĆ, Bojana Bogovič et al. - Association of dietary type with fecal microbiota in vegetarians and omnivores in Slovenia. *European Journal of Nutrition*. . ISSN 1436-6207, 1436-6215. 53:4 (2014) 1051–1064. doi: 10.1007/s00394-013-0607-6.
- MCFARLAND, Lynne V. - Normal flora: diversity and functions. *Microbial Ecology in Health and Disease*. . ISSN 1651-2235. 12:4 (2000) 193–207. doi: 10.1080/08910600050216183.
- PATRICIA LOPEZ-LEGARREA et al. - The Influence of Mediterranean, Carbohydrate and High Protein Diets on Gut Microbiota Composition in the Treatment of Obesity and Associated Inflammatory State. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 23:3 (2014). doi: 10.6133/apjcn.2014.23.3.16.
- PHILLIPS, F. - Vegetarian nutrition. *Nutrition Bulletin*. . ISSN 1471-9827, 1467-3010. 30:2 (2005) 132–167. doi: 10.1111/j.1467-3010.2005.00467.x.
- POWER, Susan E. et al. - Intestinal microbiota, diet and health. *British Journal of Nutrition*. . ISSN 0007-1145, 1475-2662. 111:3 (2014) 387–402. doi: 10.1017/S0007114513002560.
- REDDY, Bandaru S.; WEISBURGER, John H.; WYNDER, Ernst L. - Effects of High Risk and Low Risk Diets for Colon Carcinogenesis on Fecal Microflora and Steroids in Man. *The Journal of Nutrition*. . ISSN 0022-3166, 1541-6100. 105:7 (1975) 878–884. doi: 10.1093/jn/105.7.878.
- SIMON, Gary L.; GORBACH, Sherwood L. - The human intestinal microflora. *Digestive Diseases and Sciences*. . ISSN 0163-2116, 1573-2568. 31:S9 (1986) 147–162. doi: 10.1007/BF01295996.
- SINGH, Rasnik K. et al. - Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine*. . ISSN 1479-5876. 15:1 (2017). doi: 10.1186/s12967-017-1175-y.
- WU, G. D. et al. - Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science*. . ISSN 0036-8075, 1095-9203. 334:6052 (2011) 105–108. doi: 10.1126/science.1208344.
- ZIMMER, J. et al. - A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *European Journal of Clinical Nutrition*. . ISSN 0954-3007, 1476-5640. 66:1 (2012) 53–60. doi: 10.1038/ejcn.2011.141.

LAVADO BRONCOALVEOLAR: ANÁLISE DE PERFIS CELULARES EM DOENÇAS DO INTERSTÍCIO PULMONAR

BRONCHOALVEOLAR LAVAGE: ANALYSIS OF CELL PROFILES IN INTERSTITIAL LUNG DISEASES

Autor

Marisa Catarino, *MSc*

Centro de execução do trabalho

Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, E.P.E

Local de atividade na altura da execução do trabalho

Laboratório de Hematologia, Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, E.P.E – Hospital de Santa Maria

Conflitos de interesse

Declaro que não possuo conflito de interesses de ordem financeira, comercial, político, académico ou pessoal

Fontes de Financiamento

Não existiu qualquer fonte de financiamento para a realização do estudo

Contacto do autor responsável

marisa_catarino@hotmail.com

Tipo de estudo

Estudo retrospectivo não interventivo

Resumo

Introdução

A lavagem broncoalveolar é uma técnica aceita como meio complementar de diagnóstico em várias patologias do pulmão. Nas últimas três décadas, vários trabalhos confirmaram que ela reflete a celularidade existente no alvéolo e no interstício.

Objetivos

A fim de compreender melhor a composição dos diferentes perfis celulares, que podem ser encontrados no lavado broncoalveolar e tentar apurar o interesse preditivo deste teste, na evolução e prognóstico das doenças do interstício pulmonar, foram estudadas várias doenças tais como a sarcoidose, a pneumonia, a fibrose pulmonar, a tuberculose, a alveolite, as neoplasias e o lúpus eritematoso sistêmico.

Material e Métodos

Foi efetuada a determinação do número de células/mL, da % de linfócitos, da determinação da razão CD4/CD8 e da observação da morfologia celular, durante o período compreendido entre Março de 2010 e Março de 2011. A determinação dos perfis celulares e a observação da morfologia foram executados em citoesfregaços corados com a coloração de Leishman. A razão entre as subpopulações linfocitárias CD4/CD8 foi determinada por citometria de fluxo.

Resultados

Nos doentes com sarcoidose encontraram-se diferenças estatisticamente significativas relativamente ao número de células encontrados no lavado broncoalveolar ($296,4 \times 10^6/\text{mL}$) e nº de leucócitos no sangue periférico ($7,8 \times 10^6/\text{mL}$) quando comparados com os valores de referência. As patologias que recorreram ao estudo do lavado broncoalveolar, apresentaram todas um aumento do nº de células, sendo a pneumonia a que apresentou o valor mais elevado ($830 \times 10^6/\text{mL}$). A % de linfócitos (20,4%) e a razão CD4/CD8 (6,9) encontradas no grupo com diagnóstico de sarcoidose foram superiores aos valores normais (respetivamente 9,4% e 1,7). A fibrose pulmonar apresentou uma razão CD4/CD8 (0,8) inferior ao normal (6,9), com $p=0,002$. **Discussão/Conclusão:** Quando interpretado no contexto clínico e radiológico e associado a outros exames complementares de diagnóstico, o lavado broncoalveolar, acompanhado da correta informação clínica e dos dados fornecidos pela citometria de fluxo e pela análise morfológica, fornece uma informação valiosa para o estabelecimento do diagnóstico das doenças do interstício pulmonar.

Palavras-chave

Lavagem broncoalveolar. [E05.927.100]; Citometria de fluxo. [E05.200.500.386.350]; Contagem de células. [E01.370.225.500.195];

Abstract

Introduction

Bronchoalveolar lavage is a technique accepted as a complementary diagnostic in various diseases of the lung. In the last four decades, several studies confirmed that reflects the existing cellularity in alveolar and interstitial area.

Objectives

In order to better understand the composition of the different cellular profiles that can be found in bronchoalveolar lavage and to try to establish the predictive interest of this test in the evolution and prognosis of interstitial lung diseases, several diseases were studied, such as sarcoidosis, pneumonia, pulmonary fibrosis, tuberculosis, alveolitis, neoplasms and systemic lupus erythematosus.

Methods

Was performed the determination of the number of cells /ml, % of lymphocytes, determination of the CD4/CD8 ratio and the observation of cell morphology. The determination of cell profiles and observation of the morphology were performed on cytospin smear stained with Leishman stain. The ratio between the CD4/CD8 lymphocyte populations was determined by flow cytometry.

Results

The pathologies studied showed an increase in the number of cells, pneumonia being the one with the highest value ($830 \times 10^6/\text{mL}$). In the group of patients with sarcoidosis, statistically significant differences were found regarding the number of cells found in the bronchoalveolar lavage ($296,4 \times 10^6/\text{mL}$) and the number of leukocytes in the peripheral blood ($7,8 \times 10^6/\text{mL}$) when compared to the reference values. The % of lymphocytes (20,4%) and the CD4/CD8 ratio (6.9) found in the group with sarcoidosis were higher than the normal values (9,4% and 1.7). Pulmonary fibrosis had a CD4/CD8 ratio (0.8) lower than normal (6.9), with $p=0.002$.

Discussion/Conclusions

When interpreted in the clinical and radiological context and associated with other diagnostic exams, bronchoalveolar lavage, accompanied by the correct clinical information and data provided by flow cytometry and morphological analysis provides valuable information for establishing the diagnosis of interstitial lung diseases.

Keywords

Bronchoalveolar lavage. [E05.927.100]; Flow Cytometry. [E05.200.500.386.350]; Cell Count. [E01.370.225.500.195];

Introdução

A análise do lavado broncoalveolar (LBA) começou por ser desenvolvida como técnica de investigação, mas atualmente consiste num meio de diagnóstico valioso na recolha e pesquisa de células envolvidas nos mecanismos celulares e inflamatórios da patogénese das doenças do interstício pulmonar (DIP). Quando em 1967 Shigeto Ikeda introduziu pela primeira vez o uso do broncofibroscópio flexível o seu impacto na prática clínica foi imediato. Bem tolerado por humanos, este método seguro e pouco invasivo, permitiu que se realizasse de forma rotineira a análise de amostras do pulmão com instilação de pequenas quantidades de solução de lavagem permitindo diferenciar diferentes tipos de DIP¹. A análise citológica do LBA possibilita a investigação dos fenómenos imunológicos e inflamatórios do trato respiratório de indivíduos normais, bem como estabelecer o diagnóstico diferencial das diferentes DIP e ao mesmo tempo excluir infeções e malignidade com elevado grau de confiança². O objetivo da realização da contagem diferencial no LBA de um doente com suspeita de DIP é a identificação ou exclusão de um padrão celular, cujo predomínio de células inflamatórias específicas está correlacionado como o aumento da probabilidade de certos tipos de DIP³. A boa tolerância ao procedimento e a relativa ausência de complicações são fatores que contribuíram para a expansão da sua utilização, revelando ser um método vantajoso, em detrimento de métodos invasivos como a biópsia pulmonar e em situações em que estas estão contraindicadas (alterações da coagulação)⁴. Atualmente a análise citológica, em conjunto com os dados fornecidos pela citometria de fluxo contribui para o diagnóstico diferencial das DIP, monitoriza o percurso da doença, identifica fatores de prognóstico, avalia a eficácia terapêutica e complementa o diagnóstico feito por outros métodos desde que a clínica, os exames imagiológicos e funcionais também revelem alterações substanciais e compatíveis⁵⁻⁷. Com o objetivo de interpretar e compreender melhor os diferentes perfis celulares encontrados em patologias que recorrem à análise do LBA, estudamos esses perfis para avaliar o seu interesse preditivo na evolução e prognóstico das DIP.

Métodos

Foi obtido um parecer favorável pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, E.P.E para publicação deste trabalho.

Análise estatística

A análise estatística efetuou-se com o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows v. 17.0 e foram utilizados os testes de Wilcoxon e Mann-Whitney.

Receção e acondicionamento de amostras

As seringas de LBA foram transportadas em gelo e rececionadas pelo Serviço de Patologia Clínica num período máximo até 2h após a colheita.

Processamento de amostras para contagens celulares

O conteúdo das seringas foi homogeneizado, misturado e passado através de 2 gazes esterilizadas dentro de um funil de vidro, diretamente para uma proveta graduada. Anotou-se o volume em mL. Do volume total separou-se uma alíquota para um tubo de hemograma (2,7 mL aproximadamente) e procedeu-se à contagem celular total, em contador hematológico (Modelo Sysmex XE 2100™), registando-se o número de leucócitos / mL de LBA recuperado. Em seguida, realizaram-se dois citoesfregaços identificaram-se as lâminas e adaptaram-se ao suporte metálico para citofunil. Pipetaram-se 3 gotas de LBA para o citofunil e foi efetuada uma citocentrifugação a 800 rpm, durante 5 minutos. As células presentes na amostra ficaram concentradas numa zona circular. Após secagem breve, as lâminas foram coradas com corante de Leishman, durante 1 minuto e em seguida, cobertas com água tamponada (pH 6,6), durante 10 minutos. Os resultados da contagem dos diferentes tipos de células presentes efetuadas num total de 200 foram expressos em percentagem.

Processamento de amostras para aquisição por citometria de fluxo

Após a contagem total e diferencial das células do LBA homogeneizou-se o restante volume de amostra e distribuiu-se por vários tubos de plástico de fundo redondo (capacidade 10 mL) que foram tapados e centrifugados a 1800 rpm, durante 5 minutos. Após centrifugação decantaram-se os tubos por inversão ficando só o sedimento. Foi adicionado ao primeiro

tubo cerca de 1 a 2 mL de tampão de fosfato-salino (PBS) para ressuspender o pellet obtido, sendo esta suspensão transferida para o próximo tubo, repetindo este procedimento para os tubos seguintes até chegar ao último. Centrifugou-se o último tubo da suspensão contendo a totalidade do material, durante 5 minutos e a 1800 rpm. Após centrifugação, o sedimento celular obtido foi novamente ressuspensionado em 1 a 2 mL de PBS e transferiu-se para um tubo de hemograma, ficando desta forma disponível para processamento. Com as repetidas ressuspensões celulares, estima-se que ocorra perda de células durante o processamento (+/- 25%). Foram usados de tubos de plástico para evitar perda de células, uma vez que a utilização de material de vidro favorece a adsorção das mesmas à sua superfície⁸. O preparador automático PrepPlus™ pipetou 10µL do reagente monoclonal CD45-FITC/CD4- RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 para um tubo de plástico e 10µL de reagente monoclonal CD45- FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 para um segundo tubo de plástico. Em ambos os tubos foram colocados 100 µL da amostra, previamente preparada. As amostras foram homogeneizadas no vórtex durante uns segundos, depois colocaram-se no escuro, durante 15 minutos e à temperatura ambiente. Após a incubação as amostras foram introduzidas no preparador automático TQ Prep™, onde foram tratadas com o reagente de lise (IMMUNOPREP™) para destruir os eritrócitos, obtendo-se assim os leucócitos para posterior análise por citometria de fluxo. Adquiriram-se 100.000 células de cada suspensão para análise no citômetro. Utilizou-se a solução de PBS, por não conter íons de cálcio nem de magnésio e minimizar a agregação celular⁸.

Resultados

Patologias analisadas

A informação clínica associada aos LBA analisados permitiu-nos subdividi-los em diferentes grupos, de acordo com as respetivas patologias: sarcoidose, suspeita de sarcoidose, patologia do interstício não definida (PIND), fibrose pulmonar (FP), pneumonia, tuberculose, alveolite, neoplasias, lúpus eritematoso sistémico (LES), e diversos casos e sem informação clínica. O grupo sem informação clínica associada foi o mais representativo (23,77%), da totalidade dos LBA analisados, seguindo-se o das PIND (19,3%), o grupo “diversos casos” representado por 18,8%

e a sarcoidose (12,6 %). O grupo das neoplasias (4,4%) incluiu 1 do pulmão, 1 do mediastino e 7 de origem hematopoiética. No grupo das pneumonias (3,5%) constavam 2 casos de pneumonia eosinofílica, 1 por adenovírus e 4 adquiridas na comunidade. O subconjunto “diversos casos”, que incluiu 39 LBA (18,8%), apresentou informação clínica variável, nomeadamente alterações imagiológicas, tosse, nódulos pulmonares, hipereosinofília pulmonar, esclerodermia, conectivite, asbestose, vasculite, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) e insuficiência respiratória (Figura 1)

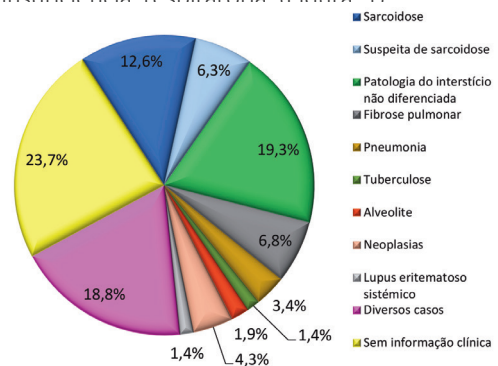


Figura 1 - Situações patológicas cujos lavados broncoalveolares foram analisados.

Para a totalidade dos LBA analisados (n=203) o valor médio, obtido para a contagem celular foi de $407 \times 10^6/\text{mL}$. Encontraram-se valores médios de 70,3% para os macrófagos alveolares, de 14,7% para os linfócitos, de 10,2% para os neutrófilos e de 2,4% para os eosinófilos. Para a razão CD4/CD8 foi obtido um resultado médio de 6,9 (n=68). Como controlo normal foram usados valores médios de Autores, que analisaram o LBA de indivíduos saudáveis, obtendo-se assim o valor usado como controlo normal de $116,3 \times 10^6/\text{mL}$ ⁹⁻¹⁸. Nos LBA estudados foram analisados os seguintes parâmetros: volume (em mL), contagens totais de leucócitos, contagens diferenciais de linfócitos e determinação da razão CD4/CD8.

Volume recuperado e células/mL obtidas

Foi observada uma grande variação nos volumes de LBA rececionados no laboratório (de 0,5 a 100 mL). Observou-se que quanto maior o volume recuperado, mais elevada foi a contagem do número de células/mL ($r=0,307$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Contagem do número de leucócitos $\times 10^6/\text{mL}$ e volume de lavado broncoalveolar recuperado (mL)

Volume recuperado no LBA mL	Número de amostras d LBA	Valor médio do nº de células $\times 10^6/\text{mL}$ (LBA)
0-20	42	250,45
21-40	57	304,96
41-60	49	428,75
61-80	26	444,30
81-100	3	781,00
Total	177	

Contagens celulares

Em todas patologias estudadas com $N < 10$ (pneumonia, neoplasias, tuberculose, alveolite e LES) foi observado um valor médio do nº de células obtidas no LBA superior ao valor normal encontrado na literatura ($\bar{x} = 116,3 \times 10^6$ células/mL). Os valores obtidos para o nº de células totais foi de $830 \times 10^6/\text{mL}$ para os pacientes com pneumonia ($n=6$) e as neoplasias ($n=9$) apresentaram o valor médio de $247,3 \times 10^6$ células/mL. Nos esfregaços destes pacientes, por vezes e ocasionalmente foram observadas células neoplásicas no LBA (Figura 2).

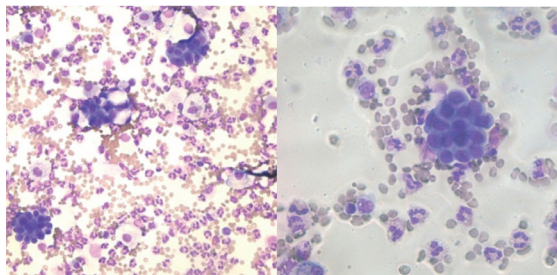


Figura 2 - Lavado broncoalveolar com presença de ninhos de células com morfologia sugestiva de células neoplásicas. Ampliação de 400x (esquerda) e de 1000x (direita). Coloração de Leishman.

As contagens das células totais foram de $362,3 \times 10^6/\text{mL}$ para o grupo com tuberculose ($N=3$), de $352,3 \times 10^6/\text{mL}$ para o grupo com alveolite ($n=4$) e de $802,3 \times 10^6/\text{mL}$ para o grupo com LES ($N=3$). Para as pneumonias, neoplasias, tuberculoses, alveolite e LES não se observaram diferenças estatisticamente significativas quando os respetivos resultados foram comparados com os controlos normais. Na análise da morfologia de alguns esfregaços de DIP

foram, eventualmente, observados linfócitos com chanfradura nuclear (figura 3) compatíveis com achados encontrados em LBA de doentes com pneumonite de hipersensibilidade¹⁹.

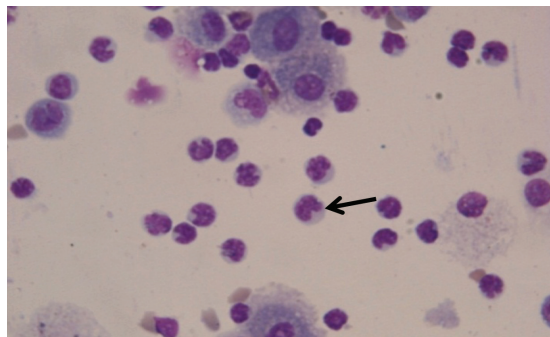


Figura 3 - Linfócitos com dismorfia do núcleo (←) (celularidade total: $189 \times 10^6/\text{mL}$). Coloração de Leishman.

Nas patologias com número de casos estudados superior a 10 ocorreu sempre o aumento do nº de células/mL de LBA. O grupo Sarcoidose incluiu 26 amostras de sarcoidose com diagnóstico confirmado e 13 amostras com diagnóstico aguardando a confirmação ($N=39$). Neste grupo, o valor médio do nº de células/mL foi de $297,4 \times 10^6/\text{mL}$ e o dos controlos normais foi de $116,3 \times 10^6/\text{mL}$. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes e os controlos normais ($p < 0,001$). Os doentes com PIND ($N=40$) apresentaram um valor médio de $343,9 \times 10^6/\text{mL}$ para a contagem celular e na FP ($N=14$) o valor encontrado foi de $421,5 \times 10^6/\text{mL}$. Nestas situações estudadas foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de pacientes e os controlos normais ($p < 0,001$).

Sarcoidose

Contagens celulares totais em lavado broncoalveolar e no sangue periférico

As amostras de LBA com diagnóstico de sarcoidose confirmada ($N=26$) incluíram 14 homens e 12 mulheres e apresentaram o valor médio de $296,4 \times 10^6$ células/mL, superior ao valor normal encontrado pelos Autores selecionados ($\bar{x} = 116,3 \times 10^6/\text{mL}$) (Figura 4).

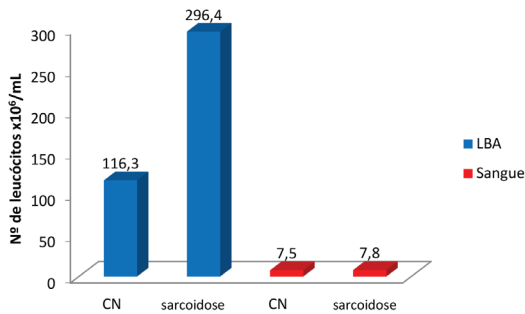


Figura 4 - Contagens celulares obtidas em lavados broncoalveolares e em sangues de controles normais (CN) e indivíduos com sarcoidose.

Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados encontrados para os pacientes e os dos controles normais ($p=0,002$). A totalidade das amostras de sangue periférico analisadas ($N=106$) revelaram um valor médio de $8,7 \times 10^6$ leucócitos/mL. As amostras de sangue dos doentes com sarcoidose ($N=14$) incluíram 9 indivíduos do sexo masculino e 5 do sexo feminino tendo os pacientes apresentado o valor médio igual a $7,8 \times 10^6$ leucócitos/mL, ligeiramente superior ao normal médio encontrado na literatura ($7,5 \times 10^6$ /mL). Não foram encontradas diferenças significativas entre estes valores, contrariamente ao que aconteceu no LBA. Os resultados sugerem que a utilização do LBA para estudo da sarcoidose é mais útil que as amostras sanguíneas.

Linfócitos

No grupo Sarcoidose ($N=39$), incluiu 26 amostras de sarcoidose confirmada e 13 amostras com diagnóstico de sarcoidose aguardando confirmação, e apresentou o valor médio da % de linfócitos (20,4 %) superior ao normal (9,4%), sendo $p=0,003$ (Fig.8). Os dados analisados mostram que, nesta patologia, o nº de linfócitos no LBA se encontram frequentemente aumentados. No esfregaço destes pacientes por vezes ocorre a formação de rosetas (conjuntos de linfócitos revestindo os macrófagos) (Figura 5).

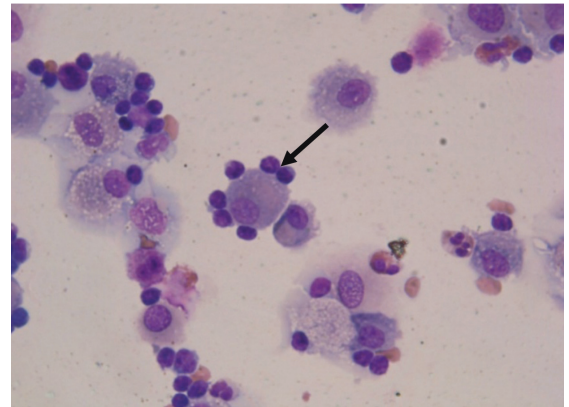


Figura 5 - Lavado broncoalveolar de indivíduo com sarcoidose (81% de linfócitos) evidenciando rosetas de linfócitos/macrófagos (←). Coloração de Leishman. Ampliação 1000x.

Razão CD4/CD8

No grupo Sarcoidose analisado foram incluídas 15 amostras com diagnóstico de sarcoidose confirmada e 9 amostras com diagnóstico de sarcoidose aguardando confirmação ($N=24$) e apresentou um valor médio para a razão CD4/CD8 (6,9) superior ao normal (1,7) ($p=0,001$).

Fibrose pulmonar

O nº de amostras com FP analisadas foi bastante reduzido ($N=3$). A razão CD4/CD8 apresentou o valor médio de 0,4 inferior ao do controle normal (1,7) com $p=0,002$. Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,003$) entre os valores obtidos do grupo Sarcoidose (6,9) e o grupo FP (0,4).

Discussão

Volume recuperado

Nas diferentes amostras de LBA analisadas foi observada uma grande variedade patologias, sendo as de maior representatividade as patologias do interstício não determinadas (PIND) (19,3%) e a sarcoidose (12,6%). Foi verificado uma grande discrepância nos volumes recuperados (volume recuperado de LBA após broncofibroscopia

variou entre 0,5 e 100 mL), tendo se observado que a um maior volume recuperado (81-100 mL) correspondeu, também, um maior nº de células ($781 \times 10^6/\text{mL}$). A discrepância observada nos volumes rececionados ocorre porque o volume recuperado sofre variações, dependentes da experiência do operador na realização da técnica, da boa ou má “encravação” do broncofibroscópio nos brônquios, da fácil colapsidade destes, do grau de tolerância do doente à técnica, da indução de tosse pelo paciente, da deterioração funcional e do tipo de patologia subjacente que condicionam a % de LBA recuperado. Particularmente nas doenças pulmonares, vários fatores podem influenciar a recuperação do LBA e podem levar a dificuldade na recuperação do fluido instilado, que ocorre principalmente nas doenças obstrutivas. Apesar deste facto, a maioria dos Autores menciona que uma % de volume recuperado entre os 40 a 70%, correlaciona-se com o número total de células obtidas^{1,20}.

Valor de controlo normal

Nas patologias analisadas, todos os parâmetros estudados (contagem celular, % de linfócitos e razão CD4/CD8) foram comparados com controlos normais (CN). O valor do CN utilizado neste estudo foi obtido a partir da média de resultados referenciados por diversos Autores na literatura, que realizaram o LBA em indivíduos saudáveis. Os LBA disponíveis para execução deste trabalho não incluíram amostras normais dado que este exame foi apenas realizado em situações em que existe suspeita de DIP.

Valor médio do nº de células

O valor médio do nº de células no LBA em todas as patologias estudadas foi superior ao normal ($\bar{x} = 116,3 \times 10^6/\text{mL}$), tendo os resultados mais elevados ocorrido na pneumonia ($830,00 \times 10^6/\text{mL}$) e no LES ($802,33 \times 10^6/\text{mL}$) verificando-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$).

As diferentes DIP apresentam alterações nos perfis celulares do LBA que refletem transformações patológicas no parênquima pulmonar. Estes resultados sugerem que a determinação da celularidade total no LBA nas várias DIP é uma ferramenta útil de diagnóstico diferencial uma vez que a presença de valores normais poderão excluir a presença de doenças específicas.

Valor médio do nº de células no sangue e no LBA de doentes com sarcoidose

Uma vez que a sarcoidose está amplamente caracterizada na literatura por um aumento do número absoluto e relativo dos linfócitos e por um aumento da relação CD4/CD8 no LBA, teve interesse estudar-se neste grupo de doentes a contagem celular (no LBA e no sangue), a % de linfócitos e a determinação da razão CD4/CD8.

Na determinação da contagem celular os doentes com sarcoidose confirmada (N=26) apresentaram um valor médio do nº de células no LBA de $296,4 \times 10^6/\text{mL}$ superior ao normal ($\bar{x} = 116,3 \times 10^6/\text{mL}$), verificando-se diferenças estatisticamente significativas ($p=0,002$). As amostras de sangue (n=14) apresentaram uma contagem de $7,8 \times 10^6/\text{mL}$, valor próximo do normal ($7,5 \times 10^6/\text{mL}$). Não foram encontradas diferenças significativas entre estes valores, contrariamente ao que aconteceu no LBA. Tal constatação sugere que o estudo do LBA, em pacientes com sarcoidose é mais interessante que a contagem celular sanguínea. O aumento do nº de células no LBA de doentes com sarcoidose reflete a inflamação intersticial subjacente, semelhante ao processo inflamatório que é encontrado em todos os órgãos afetados pela doença²¹.

Sarcoidose: determinação do valor médio da % de linfócitos e razão CD4/CD8

Para a determinação da % de linfócitos no LBA do grupo sarcoidose (n=39) estes doentes apresentaram um o valor médio de linfócitos de 20,4 %, superior ao normal (9,4%). O aumento de linfócitos observado neste estudo apoia o diagnóstico de sarcoidose embora esta linfocitose se possa encontrar em outras doenças granulomatosas como a pneumonite de hipersensibilidade, berlíose, proteinose alveolar, pneumoconiose, colagenoses, doença de Crohn, tuberculose e pneumonia de origem viral²¹. A determinação da razão CD4/CD8 no grupo sarcoidose (N=24) apresentou um valor médio (6,9) superior ao normal (1,7).

Em suma, no LBA destes doentes foi observado um aumento da celularidade, aumento da % de linfócitos e da razão CD4/CD8 em relação ao normal. O aumento da celularidade, aumento na % de linfócitos e aumento da razão CD4/CD8 no LBA do grupo de doentes estudados com sarcoidose vão de encontro com a hipótese diagnóstica, estando

de acordo com o que vários autores descrevem amplamente na literatura. A % de linfócitos e a razão CD4/CD8 no LBA não são específicos de nenhuma doença pulmonar, contudo, estes dois parâmetros quando combinados aumentam a probabilidade do diagnóstico de sarcoidose eliminando a necessidade de realização de biópsia pulmonar em 40 a 60%²². Embora algumas DIP tenham padrões celulares altamente característicos, como é o caso da sarcoidose, estes resultados por si só requerem interpretação junto com outros detalhes clínicos e radiográficos⁷.

Foram observados em alguns esfregaços de LBA com predomínio de linfócitos, rosetas de linfócitos e macrófagos, em que os linfócitos estão aderidos à superfície de macrófagos alveolares, que não caem e não são fagocitados por estes. Este fenômeno é descrito na literatura por Peripolysis e foi descrito pela primeira vez como um provável mecanismo fisiológico envolvido na regulação da resposta imunitária no pulmão. Mais tarde foi colocada a hipótese destas rosetas se formarem devido à apresentação ativa do antigénio no foco de inflamação ou o reflexo de granulomas que libertam mediadores e recrutam outras células do sistema imunológico para o parênquima pulmonar. Todavia, é consensual que rosetas não são específicas de doença granulomatosa, mas estão fortemente associados a patologias com um aumento de linfócitos no LBA²³.

Fibrose pulmonar

A FP (n=3) apresentou o valor médio da razão CD4/CD8 de 0,4, sendo inferior ao normal (1,7), verificando-se uma diferença estatisticamente significativa (p=0,003) que ocorreu entre os valores obtidos nestes pacientes e os encontrados nos doentes com sarcoidose (6,9), o que sugere que este parâmetro possa ser relevante para o diagnóstico diferencial destas duas situações patológicas. Contudo será necessária uma amostragem mais expressiva para se obter resultados mais confiáveis.

Conclusão

O LBA é uma fonte de informação com inúmeras potencialidades, contudo a sua aplicação clínica torna-se um desafio uma vez que para que os dados fornecidos sejam úteis deverão compreender-se melhor os seus aspetos técnicos e limitações (colheita, transporte, quantidade e qualidade da amostra recuperada). A adoção de um procedimento padronizado irá contribuir para aumentar a probabilidade de identificação de diferenças clinicamente relevantes entre doenças e estádios de doença.

Salienta-se também a importância da morfologia celular como um dado relevante que contribui para complementar o diagnóstico na distinção das diferentes DIP. São exemplo disso a presença de rosetas de macrófagos e linfócitos, presença de células neoplásicas, linfócitos com alterações nucleares, entre outros, que em conjunto com os dados da contagem celular e da imunofenotipagem ajudam a estreitar o diagnóstico diferencial. Apesar destes dados não serem específicos de nenhuma doença pulmonar, contribuem para fazer um diagnóstico confiável eliminando a necessidade de recorrer a biópsia pulmonar^{7,24}.

Nas últimas décadas, outros novos biomarcadores foram explorados com resultados promissores para pacientes com sarcoidose, mas nenhum biomarcador "gold standard" foi ainda definido para o diagnóstico ou previsão do curso da doença²⁵.

Referências Bibliográficas

1. Reynolds HY. Use of Bronchoalveolar Lavage in Humans – Past Necessity and Future Imperative. *Lung* 2000; 178(5): 271-293.
2. Alfaro T, Cordeiro C. Bronchoalveolar lavage. *ERS Monogr* 2016; 71: 74–81.
3. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, et al. American Thoracic Society Committee on BAL in Interstitial Lung Disease. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185(9): 1004-14.
4. Gharsalli H, Mlika M, Sahnoun I, Maalej S, Douik El Gharbi L, Mezni FE. The utility of bronchoalveolar lavage in the evaluation of interstitial lung diseases: A clinicopathological perspective. *Semin Diagn Pathol*. 2018; 35(5): 280-287.
5. Cordeiro R. Lavado broncoalveolar – O estado da arte. *Revista portuguesa de Pneumologia*. 2000; 6(4): 283-295.
6. Ward C, Walters EH. Bronchoalveolar Lavage (BAL): Critical Evaluation of Techniques. *Methods Mol Med*. 2001; 56: 31-59.
7. Davidson KR, Ha DM, Schwarz MI, Chan ED. Bronchoalveolar lavage as a diagnostic procedure: a review of known cellular and molecular findings in various lung diseases. *J Thorac Dis*. 2020; 12(9): 4991-5019.
8. Martin J. Guia de procedimientos – Lavado Broncoalveolar. *Neumosur: Revista de La Asociación de Neumólogos del sur*. 1994; 2(6): 34-39.
9. Pingleton SK, Harrison GF, Stechschulte DJ, Wesselius LJ, Kerby GR, Ruth WE. Effect of location, pH, and temperature of instillate in bronchoalveolar lavage in normal volunteers. *Am Rev Respir Dis*. 1983; 128(6): 1035-7.
10. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. The BAL Cooperative Group Steering Committee. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 141(5 Pt 2): S169-202.
11. Yeager H Jr, Williams MC, Beekman JF, Bayly TC, Beaman BL. Sarcoidosis: analysis of cells obtained by bronchial lavage. *Am Rev Respir Dis*. 1977; 116(5): 951-4.
12. Low RB, Davis GS, Giancola MS. Biochemical analyses of bronchoalveolar lavage fluids of healthy human volunteer smokers and nonsmokers. *Am Rev Respir Dis*. 1978; 118(5): 863-75.
13. Merrill WW, Reynolds HY. Bronchial lavage in inflammatory lung disease. *Clin Chest Med*. 1983; 4(1): 71-84.
14. Velluti G, Capelli O, Lusuardi M, Braghiroli A, Azzolini L. Bronchoalveolar lavage in the normal lung. 2. Cell distribution and cytomorphology. *Respiration*. 1984; 46(1): 1-7.
15. Laviolette M, Carreaux M, Coulombe R. Bronchoalveolar lavage (BAL) cell differentials on microscope glass cover. *Am Rev Respir Dis*. 1988; 138: 451-457.
16. Costabel U, Bross KJ, Reuter C, Rühle KH, Matthys H. Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest*. 1986; 90(1): 39-44.
17. Etensohn DB, Jankowski MJ, Duncan PG, Lalor PA. Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject. I. Technical aspects and intersubject variability. *Chest*. 1988; 94(2): 275-80.
18. Merchant RK, Schwartz DA, Helmers RA, Dayton CS, Hunninghake GW. Bronchoalveolar lavage cellularity. The distribution in normal volunteers. *Am Rev Respir Dis*. 1992; 146(2): 448-53.
19. Taniuchi N, Ghazizadeh M, Enomoto T, Matsuda K, Sato M, Takizawa Y, et al. Evaluation of fractional analysis of bronchoalveolar lavage combined with cellular morphological features. *Int J Med Sci*. 2009; 6(1):1-8.
20. Collins AM, Rylance J, Wootton DG, et al. Bronchoalveolar lavage (BAL) for research; obtaining adequate sample yield. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2014; (85):4345. Published 2014 Mar 24.
21. Barnard J, Newman LS. Sarcoidosis: immunology, rheumatic involvement, and therapeutics. *Curr Opin Rheumatol*. 2001; 13(1): 84-91.
22. Capelozzi VL, Faludi EP, Balthazar AB, Fernezlian Sde M, Filho JV, Parra ER. Bronchoalveolar lavage improves diagnostic accuracy in patients with diffuse lung disease. *Diagn Cytopathol*. 2013; 41(1): 1-8.
23. Bauer RA, Sawyer RT, Daniloff E, Balkissoon R, Rose CS, Newman LS. Bronchoalveolar lavage macrophage-lymphocyte clusters in granulomatous disease are linked to lymphocytosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2000; 17(2): 174-80.
24. Lee W, Chung WS, Hong K, Huh J. Clinical Usefulness of Bronchoalveolar Lavage Cellular Analysis and Lymphocyte Subsets in Diffuse Interstitial Lung Diseases. *Ann Lab Med* 2015; 35: 220-225.
25. Pattnaik B, Sryma PB, Mittal S, Agrawal A, Guleria R, Madan K. MicroRNAs in pulmonary sarcoidosis: A systematic review. *Respir Investig*. 2020; 58(4): 232-238.

O TRANSPLANTE CARDÍACO COMO TERAPIA NA MIOCARDIOPATIA HIPERTRÓFICA

HEART TRANSPLANTATION AS THERAPY IN HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY

Autores

Mónica Catanho - Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias- Instituto Politécnico de Castelo Branco, *BSc*

Maria Helena Brandão - Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias - Instituto Politécnico de Castelo Branco, *BSc*

Patrícia Coelho - Sport, Health & Exercise Unit (SHERU) | Qualidade de Vida no Mundo Rural (QRural) - Instituto Politécnico de Castelo Branco, *PhD*

Ana Rafaela Rosa - Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias - Instituto Politécnico de Castelo Branco, *BSc, MSc Student*

Centro de execução do trabalho

Centro Hospitalar Lisboa Ocidental

Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias

Conflitos de interesse

A equipa de investigação declara a não existência de conflitos de interesse na realização do estudo

Fontes de Financiamento

Não existiu qualquer fonte de financiamento de contribuição para a realização do estudo

Contacto do autor responsável

Monica.catanho@ipcbcampus.pt

Tipo de artigo

Caso Clínico

Resumo

A perda da função ventricular, causada pela Miocardiopatia Hipertrófica, surge neste caso, como uma patologia com indicação para transplantação cardíaca.

Apresenta-se o caso clínico de um paciente com 59 anos, do género masculino, com diagnóstico de Miocardiopatia Hipertrófica não obstrutiva, insuficiência cardíaca congestiva e síndrome cardio renal tipo 2, que foi submetido a transplante cardíaco. O doente era portador de um dispositivo de ressincronização cardíaca com desfibrilhador implantado, por episódios de Taquicardias Ventriculares sintomáticas em 2005.

No decurso da doença, estão documentados vários internamentos por insuficiência cardíaca descompensada e progressão da Miocardiopatia Hipertrófica não obstrutiva, tendo sido todos os episódios devidamente corrigidos. Realizou vários exames complementares de diagnóstico. No Ecocardiograma, verificou-se uma Miocardiopatia Hipertrófica não-obstrutiva em repouso, com Fração Ejeção do ventrículo esquerdo preservada e Hipertensão Pulmonar grave (PSAP >67mmHg), dilatação biauricular grave e regurgitação mitral e tricúspide grave. O cateterismo cardíaco direito, revela similarmente, uma hipertensão pulmonar moderada a severa. A Angiografia por Tomografia Computadorizada conclui, uma hipertrofia assimétrica do Ventrículo Esquerdo e uma grave dilatação biauricular. Electrocardiograficamente, o doente apresentava, um quadro de Bloqueio Completo de Ramo Esquerdo e Fibrilhação Auricular. A transplantação cardíaca, surgiu como opção terapêutica neste doente, tendo este procedimento sido realizado com sucesso.

Palavras-Chave

Transplante cardíaco [29419], Miocardiopatia Hipertrófica [19021], Hipertensão Pulmonar [59211], Insuficiência Cardíaca [6486].

Abstract

The loss of ventricular function, caused by Hypertrophic Myocardiopathy appears in this case, as a pathology with indication for cardiac transplantation.

The clinical case of a 59-year-old male patient, with a diagnosis of non-obstructive Hypertrophic Cardiomyopathy, congestive heart failure and type 2 renal cardio syndrome, who underwent heart transplantation, is presented. This patient, had a cardiac resynchronization device with an implanted defibrillator, due to symptomatic ventricular tachycardia episodes in 2005.

During the disease, several hospitalizations for decompensated heart failure - profile B have been documented, and the progression of non-obstructive Hypertrophic Cardiomyopathy episodes, has been properly corrected. He performed several complementary diagnostic tests. The echocardiogram showed a non-obstructive hypertrophic cardiomyopathy at rest, with preserved left ventricular ejection fraction and severe pulmonary hypertension (PSAP > 67mmHg), severe biauricular dilation and severe mitral and tricuspid regurgitation. Right cardiac catheterization, similarly, reveals moderate to severe pulmonary hypertension. The Computed Tomography Angiography concludes, an asymmetric hypertrophy of the Left Ventricle and a severe biauricular dilation. Electrocardiographically, the patient had a Left Bundle Branch Block and Atrial Fibrillation. Cardiac transplantation appears, as a therapeutic option in this patient, who has been successfully performed.

Keywords

Heart Transplantation [29419], Hypertrophic Cardiomyopathy[19021], Pulmonary Hypertension [59211], Heart Failure [6486].

Caso Clínico

A Miocardiopatia Hipertrófica (MCH) é a cardiomiopatia hereditária mais frequente, causada por inúmeras mutações genéticas. O diagnóstico surge de forma desafiante, devido à heterogeneidade fenotípica ⁽¹⁾. É caracterizada, por uma hipertrofia ventricular esquerda (HVE) superior a 15mm, que não é explicada por outras alterações existentes. Esta patologia, contribui para o aumento do risco de morte súbita, insuficiência cardíaca e o surgimento de arritmias ventriculares. Embora variáveis, os sintomas incluem: dor torácica, dispneia, síncope e morte súbita. A MCH, condicionando a diástole numa primeira fase, pode envolver a função sistólica no seu percurso natural. Daqui resultam sinais e sintomas de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), como os presentes neste caso clínico ^(2,3,4).

Paciente do género masculino com 59 anos, 77 kg e 1,75cm, com história clínica de MCH, de fenótipo restritivo. Adicionalmente, apresenta ICC (NYHA Classe III), Síndrome Cardio Renal tipo 2, Hipertensão Pulmonar grave (HTP-65mmHg), Fração Ejeção preservada (>60%) e Fibrilhação Auricular (FA). A Fração Ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) <50%

é frequentemente associada a um indicador de mau prognóstico, o que torna este doente com um quadro clínico mais favorável, pela sua fração de ejeção preservada.

Em 2005, foi implantado um dispositivo de ressincronização cardíaca com desfibrilhador implantado (CRT-D), devido a um quadro de taquicardias ventriculares sintomáticas. O doente, teve vários internamentos prévios por insuficiência cardíaca (IC), sempre compensados e com alta ambulatória.

Tendo em conta as diversas patologias e fatores de risco associados a este doente, é recomendado pela European Society Cardiology (ESC) ⁽⁵⁾: a realização de uma prova de esforço cardiorrespiratória e estudos hemodinâmicos invasivos.

Neste caso clínico o doente apresenta uma IC com NYHA Classe III, com FEVE >50%. Com este diagnóstico, é recomendado pela ESC a introdução de beta bloqueantes, diuréticos em baixa dose, verapamil ou diltiazem, e orientação do doente para a lista de transplante cardíaco ⁽⁶⁾.

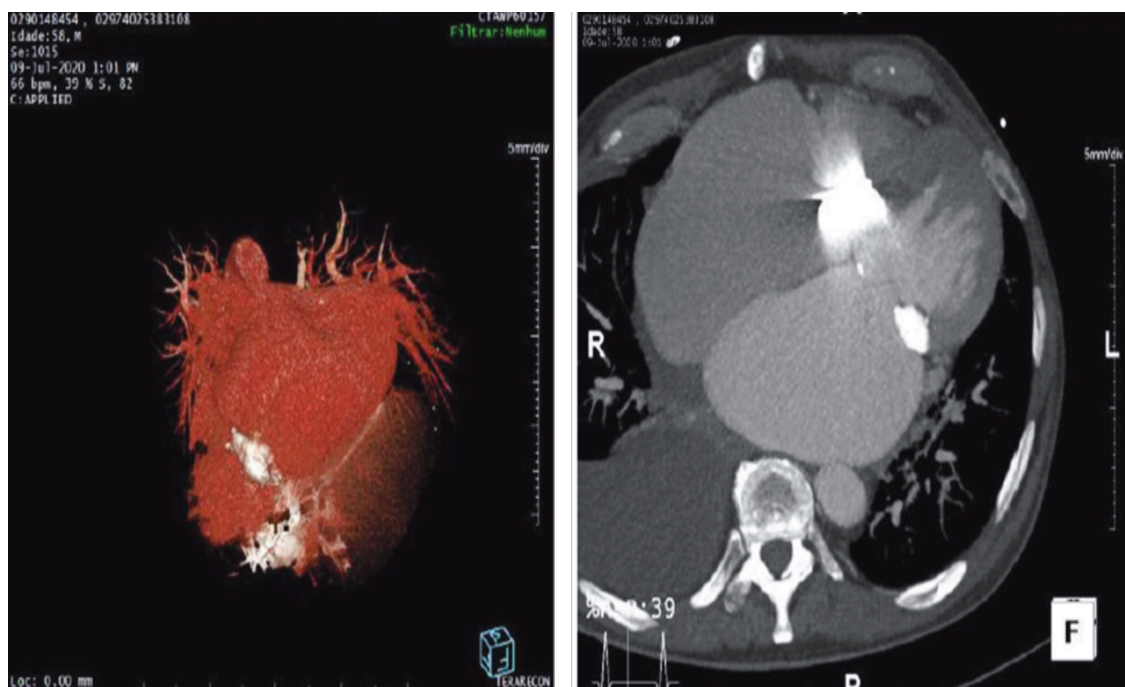


Figura 1 - Angiografia por Tomografia Computadorizada Cardíaca

A última prova de esforço realizada em agosto de 2019, relata um esforço máximo, com limitação moderada, da capacidade funcional de causa circulatória (VO_2 máximo 14,5 ml/kg/min, 48% do previsto) e capacidade vital forçada=2,74 (62% do previsto).

Em julho de 2020, aquando de realização de um novo Ecocardiograma, para além do diagnóstico principal - MCH não-obstrutiva (repouso), com envolvimento biventricular e Fração de Ejeção preservada (FEVE 63%), revela-se ainda uma regurgitação mitral grave de etiologia mista funcional e degenerativa, uma regurgitação tricúspide grave, Pressão Sistólica da Artéria Pulmonar (PSAP) de 67mmHg e dilatação biauricular grave. Foi encaminhado para realização de cateterismo direito que comprova o diagnóstico de hipertensão pulmonar moderada a severa, com componente pré e pós capilar. Prossegue-se, com a realização de uma Angiografia por Tomografia Computadorizada (Figura 1) compatível com hipertrofia assimétrica do ventrículo esquerdo, atingindo preferencialmente, os segmentos septais (15mm), grave dilatação biauricular (figura 3), aorta e artéria pulmonar não dilatadas, veia cava inferior e seio coronário dilatados. Em outubro de 2020, após 9 meses de espera é chamado para transplante cardíaco. No eletrocardiograma pré-operatório, observa-se um Bloqueio Completo de

Ramo Esquerdo com FA associada conforme se pode visualizar na figura 2.

O transplante é equacionado em doentes com MCH que permanecem sintomáticos, ou que tenham evoluído para ICC mesmo com tratamento médico. A transplantação cardíaca apresenta-se sob duas técnicas principais, uma delas a técnica Cirúrgica Clássica (atualmente em desuso) - os ventrículos são excisados, permanecendo apenas os grandes vasos e as aurículas do recetor. O coração do dador é posteriormente suturado. A outra, a técnica Bicaval, atualmente mais utilizada, em que é realizada a excisão completa da aurícula direita, sendo posteriormente efetuadas as devidas anastomoses ⁽⁷⁾.

Durante o procedimento operatório, o doente foi posicionado em decúbito dorsal e procedeu-se à sua monitorização (pressão arterial média, eletrocardiograma, Saturação O_2 , temperatura). Após esternotomia mediana, procedeu-se à canulação arterial e venosa, da forma habitual. Entrou-se em circulação extracorporeal garantindo apoio hemodinâmico, com arrefecimento central até aos 28°C e clampou-se a artéria aorta. Aquando a desclampagem da aorta, o coração encontrava-se em Fibrilhação Ventricular, a qual foi convertida com quatro desfibrilhações de 20 Joules.

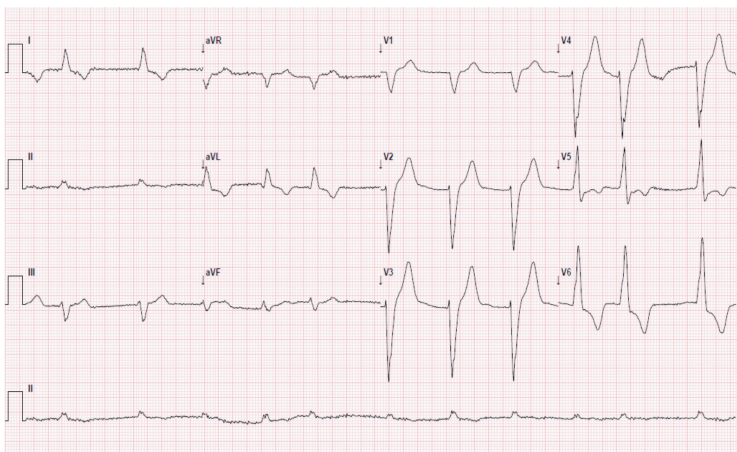


Figura 2 - Eletrocardiograma pré-operatório apresentando Bloqueio Completo do Ramo Esquerdo e Fibrilhação Auricular

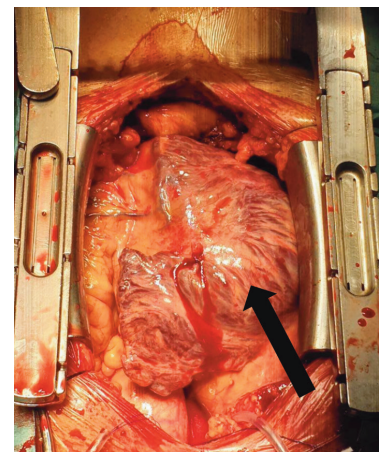


Figura 3 - Coração do doente onde se visualiza dilatação auricular

Discussão

O transplante cardíaco, é uma opção terapêutica a considerar, em doentes com MCH com sinais e sintomas de ICC, ou que se encontrem em estado terminal. Esta população apresenta frequentemente hipertensão pulmonar grave, que pode ser uma contraindicação para a realização do transplante.

Há indicação para transplante cardíaco, neste caso por apresentar: MCH e ICC⁽⁸⁾. A possibilidade do transplante suporta a hipótese de aumentarmos a longevidade de doentes com cardiomiopatia hipertrófica e IC avançada.

São definidos como critérios de recetor "ideal": idade inferior a 50 anos (mencionado na literatura como um critério controverso e relativo), sexo masculino, PSAP <50mmHg, IMC normal para a idade e estar clinicamente estável. Embora alguns parâmetros não sejam criteriosamente ideais no contexto apresentando, o doente em questão é um bom candidato a transplante⁽⁹⁾.

É importante termos em conta que o sucesso da transplantação cardíaca, não está só relacionado com a técnica cirúrgica, mas com fatores de risco do doente e com a adequada gestão de todos os parâmetros em cirurgia. Quando não é possível modificar os fatores de risco existentes no paciente recetor, e este apresentar uma ICC em estágio final, juntamente com uma terapêutica farmacológica que não proporciona qualidade de vida, torna o mesmo, um possível candidato a transplante. Nenhum outro tratamento tem uma eficácia equivalente ao transplante cardíaco.



Figura 4 - Preparação do coração que foi transplantado

Esta opção, influencia positivamente a sobrevida e o ganho em saúde dos doentes transplantados, apesar de existirem riscos e episódios de rejeição associados. Segundo a literatura, o recurso a esta técnica apresenta um aumento da sobrevida em 80% no primeiro ano e 70% no quinto ano, associado muitas vezes ao retorno a NYHA Classe I⁽¹⁰⁾. O tempo de isquémia do coração a ser doado, é um fator importante decisivo no sucesso inicial do transplante. Como tempo limite de isquémia, é estabelecido um máximo de quatro horas, apresentando-se neste caso uma isquémia de 2h 15min^(8,10,11). Para assegurar a preservação miocárdica, o coração a ser transplantado chega ao bloco operatório, envolvido numa solução cardioplégica cristalóide hipotérmica a 4°C, até à realização do transplante, sendo verificadas todas as estruturas cardíacas de forma a assegurar a viabilidade do coração (Figura 4)^(9,12).

No caso apresentado para o transplante recorreu-se à técnica Bicaval, tendo sido dissecados o septo interauricular e a aurícula direita, permanecendo uma pequena parte da aurícula esquerda contendo as veias pulmonares^(10,12). Como referido na literatura, esta técnica tem como vantagens: preservação da geometria auricular, diminuição da incidência de arritmias auriculares e da insuficiência tricúspide. No recetor, devido a desnervação que ocorre na utilização desta técnica, o débito cardíaco deixa de ser influenciado pela estimulação simpática e parassimpática, passando a estar dependente da pré e pós carga^(9,10,12).

Conclusão

A MCH caracteriza-se por uma patologia hereditária, demonstrando um aumento da espessura das paredes dos ventrículos (normalmente o esquerdo). A insuficiência cardíaca é uma relevante consequência da MCH e por este motivo é de extrema importância um diagnóstico precoce, por forma a diminuir o risco de morte súbita e as complicações cardiovasculares associadas.

Referências Bibliográficas

1. Wolf CM. Hypertrophic cardiomyopathy: genetics and clinical perspectives. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2019;1-28.
2. Baxi AJ, Restrepo CS, Vargas D, et al. Hypertrophic Cardiomyopathy from A to Z: Genetics, Pathophysiology, Imaging, and Management. *Cardiac Imaging.* 2016;36(2):1-23.
3. Geske JB, Ommen SR, Gersh BJ. Hypertrophic Cardiomyopathy - Clinical Update. *Heart Failure.* 2018; 6(5):1-12.
4. Suboc T. Miocardiopatia Hipertrófica. Manual MSD - versão para profissionais de saúde. 2019.
5. Bax JJ, Bonis M, Hamm C, et al. Recomendações da ESC/EACTS para o Tratamento da Doença Valvular Cardíaca. ESC Sociedade Europeia de Cardiologia. 2017; 1-61.
6. Anastasakis A, Borger MA, Borggref M, et al. Recomendações para o diagnóstico e tratamento da Miocardiopatia Hipertrófica. Sociedade Portuguesa de Cardiologia. 2014; 1-53.
7. Torres MF, Villa FP. Heart transplantation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Global Cardiology Science Practise*;1-9.
8. Blanes JRG, Molina MS, Mateo JJS. Hypertrophic cardiomyopathy. *Med Clin.* 2018; 434-442.
9. Nesralla IA, Silva JP, Mendonça JT, Fortunato JA. Aspectos técnicos do transplante cardíaco. *Arq Bras Cardiol [Internet].* 1999; 1-7.
10. Loureiro MFS. Reabilitação e transplante cardíaco. Instituto Politécnico de Bragança; 2015. Mestrado em Enfermagem de Reabilitação; p. 93.
11. Hertl M. Transplante Cardíaco. Manual MSD - versão para profissionais de saúde. 2020. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/immunologia-dist%C3%BArbios-al%C3%A9rgicos/transplante/transplante-card%C3%ADaco>
12. Coutinho J, Jazbik JC. Técnica operatória em transplante cardíaco. *Revista da SOCERJ.* 2002; Vol XV (3):1-6.

TETRALOGIA DE FALLOT E COMORBIDADES ASSOCIADAS - DETEÇÃO E ABORDAGEM TERAPEÚTICA

TETRALOGY OF FALLOT AND ASSOCIATED COMORBIDITIES - DETECTION AND THERAPEUTIC APPROACH

Autores

Ana Raquel Agudo Constâncio - Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias - Instituto Politécnico de Castelo Branco, *BSc*

Maria Helena Brandão - Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias - Instituto Politécnico de Castelo Branco, *BSc*

Patrícia Coelho - Sport, Health & Exercise Unit (SHERU) | Qualidade de Vida no Mundo Rural (QRural) - Instituto Politécnico de Castelo Branco, *PhD*

Ana Rafaela Rosa - Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias - Instituto Politécnico de Castelo Branco, *BSc*, *MSc Student*

Centro de execução do trabalho

Centro Hospitalar Lisboa Ocidental

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

Conflitos de interesse

A equipa de investigação declara a não existência de conflitos de interesse na realização do estudo

Fontes de Financiamento

Não existiu qualquer fonte de financiamento de contribuição para a realização do estudo

Contacto do autor responsável

ana_raquel_99@live.com.pt

Tipo de artigo

Caso Clínico

Resumo

A Tetralogia de *Fallot* é uma doença congênita cuja reparação dos seus defeitos deve ser realizada o mais cedo possível. Os exames complementares de diagnóstico apresentam-se fundamentais na caracterização desta. A cirurgia corretiva deve ser executada no *timing* recomendado e utilizar a técnica de circulação extracorporeal a fim de manter o doente estável e garantir as condições ideais ao cirurgião. No presente caso clínico apresenta-se um doente com Tetralogia de *Fallot* à qual estavam associadas outras comorbidades não esperadas e evidenciadas durante a cirurgia, com destaque para a rara persistência da veia cava superior esquerda e ausência da veia cava superior direita. Estas comorbidades são normalmente detetadas em exames e cirurgias, referidas em casos clínicos pontuais com mais exemplos na população adulta, têm impacto no *outcome* e na execução da técnica de circulação extracorporeal. O doente estudado revela-se um caso a abordar, considerando os achados e relevância científica, por se tratar de um doente em idade pediátrica.

Palavras chave

Tetralogia de *Fallot* (C14.240.400.849); pediatria (H02.403.670); circulação extracorporeal (E04.292); cirurgia cardíaca (H02.403.810.803); comorbidade (N05.715.350.225).

Abstract

Tetralogy of Fallot is a congenital disease whose defects must be repaired as soon as possible. The complementary diagnostic exams are fundamental in characterizing it. Corrective surgery should be performed at the recommended time and the extracorporeal circulation technique should be used in order to keep the patient stable and guarantee the ideal conditions for the surgeon. This case presents a patient with Tetralogy of Fallot with other unexpected comorbidities associated and evidenced during surgery, with emphasis on the rare persistent left superior vena cava and absent right superior vena cava. These comorbidities are usually detected in exams and surgeries, referred to in occasional clinical cases with more examples in the adult population, and have an impact on the outcome and implementation of the extracorporeal circulation technique. The patient studied is a case to be addressed considering the findings and scientific relevance because he is a pediatric patient.

Keywords

Tetralogy of Fallot (C14.240.400.849); pediatrics (H02.403.670); extracorporeal circulation (E04.292); cardiac surgery (H02.403.810.803); comorbidity (N05.715.350.225).

Introdução

A Tetralogia de *Fallot* (TOF) é uma doença congénita cardíaca que apresenta quatro defeitos, sendo eles a hipertrofia do ventrículo direito, a estenose da artéria pulmonar, o cavalgamento da aorta e a comunicação interventricular (CIV). Representando cerca de 10% de todos os defeitos congénitos e uma prevalência de 3 a 5 afetados por cada 10 000 nados vivos, apresenta como sintomatologia principal a cianose e hipoxia, que é tanto maior quanto maior o grau de estenose, onde a persistência do canal arterial permite o atraso do aparecimento dos sintomas. À origem da TOF associam-se vários fatores, como são exemplo a diabetes gestacional e anormalidades genómicas como mutações e deleções cromossómicas, não sendo ainda perfeitamente conhecido o mecanismo do seu desenvolvimento^(1,2).

À TOF podem estar associadas outras comorbidades. *Josue Diaz-Frias et al.* referem a persistência do *foramen ovale* como uma possível quinta alteração, existindo outros exemplos como o arco aórtico direito, artérias coronárias anormais, colaterais aórtico-pulmonares, múltiplos defeitos septais e regurgitação aórtica⁽¹⁾. No caso do doente deste caso clínico, associada à TOF estavam a persistência da veia cava superior esquerda (PLSVC), a ausência da veia cava superior direita (VCSD) e a comunicação interauricular (CIA). Estas comorbidades acentuam a cianose pré-existente e em cirurgia aumentam a dificuldade da sua execução, apresentando-se como uma agravante aos possíveis *outcomes*. A raridade destas comorbidades nota-se através da sua referência em casos clínicos pontuais e, na sua maioria, sobre adultos que são sujeitos a cirurgias; em idade pediátrica, aquando da revisão científica foram poucos os exemplos encontrados, motivando o interesse neste doente.

Os exames complementares de diagnóstico e terapêutica permitem o diagnóstico e caracterização da TOF, sendo de destacar o papel fundamental do ecocardiograma (transtorácico (ETT) e transesofágico (ETE)), eletrocardiograma (ECG) e raio X tórax que apresentam elementos típicos representativos desta, permitindo o diagnóstico rápido e assertivo, e ainda a caracterização das comorbidades⁽¹⁾.

A correção total cirúrgica foi o tratamento selecionado que deve ser realizado o mais precocemente possível. A técnica de circulação extracorporeal (CEC) é fundamental, permitindo a assistolia cardíaca e proporcionando um campo cirúrgico limpo e seco ao cirurgião. A otimização dos *outcomes* e redução da mortalidade pós-operatória é evidente, apesar das possíveis complicações a curto e longo prazo como arritmias, defeitos septais residuais e persistência da obstrução ao fluxo de saída do ventrículo direito^(1,3). Neste doente realça-se que a realização precoce da cirurgia trouxe ainda a vantagem de diagnóstico das restantes alterações cardíacas existentes, permitindo a sobrevivência possivelmente posta em causa pela ignorância da sua presença.

Caso clínico

Indivíduo do sexo masculino, com 4 meses de idade, caucasiano, com um peso de 6,380 Kg e 55 cm de altura. Não tem antecedentes familiares relevantes e como antecedentes pessoais refere-se uma gestação sob vigilância por diabetes gestacional, nascido às 37 semanas por cesariana e com período neonatal sem intercorrências, sem alergias conhecidas nem história de infeções recorrentes. Realizou ecocardiogramas seriados durante a gestação que revelaram a presença de TOF clássica com ramos da artéria pulmonar ligeiramente hipoplásicos. Começa a ser seguido em consultas de cardiologia pediátrica que o indicam para a realização de cirurgia eletiva. Como medicação habitual refere-se a toma de propranolol desde os 10 dias de vida.

No dia do internamento, o indivíduo apresentava-se cianótico, hidratado, apirético, eupneico, com pressão arterial (PA) de 91/49 mmHg, frequência cardíaca (FC) de 104 bpm, saturação de O₂ de 87% e pulsos palpáveis, amplos e simétricos. É realizado um ETT que apresenta PLSVC, CIA com *shunt* esquerdo-direito, CIV perimembranosa subaórtica com cavalgamento aórtico, ventrículo direito dominante e hipertrofiado, desvio infundibular anterior, válvula pulmonar displásica e hipoplásica, ramos pulmonares hipoplásicos, persistência de canal arterial com *shunt* esquerdo-direito e duas aparentes CIV's musculares no trato de saída do ventrículo direito (TSVD). Para além deste, são ainda realizados um raio X tórax que apresenta silhueta cardíaca em forma de bota

e alargamento do mediastino superior e médio e um ECG com ritmo sinusal, padrão de bloqueio incompleto de ramo direito (BIRD) e sobrecarga direita. Com estas informações foi possível verificar o diagnóstico de TOF e detetar adicionalmente uma CIA e a PLSVC.

À entrada na sala cirúrgica o doente apresentava-se estável, com ritmo sinusal e fração de ejeção superior a 50%. Foi realizada a exposição do coração e realizado um ETE intraoperatório que revela discrepâncias entre a visão cirúrgica direta e o observado no ETT pré-operatório: não existe VCSD apesar da sua aparente visibilidade nos exames, a veia cava superior esquerda (VCSE) é muito pequena gerando preocupação quanto à sua canulação, CIV's musculares descritas para além da principal associada à TOF não são detetadas e a CIA encontrada é muito grande ao contrário do esperado e documentado, pelo que era necessária correção. Perante as novidades, a equipa cirúrgica decide a realização primária da correção da CIA seguida da correção dos defeitos inerentes à TOF sob hipotermia moderada. Foram feitas as canulações adequadas, entrando-se em *bypass* parcial com a simultânea produção de débito cardíaco pelo coração do doente e pela máquina de CEC. Após clampagem completa da aorta deu-se entrada em *bypass* total, com a máquina de CEC a assumir a totalidade do débito cardíaco e ventilação do doente, sendo seguidamente administrada a solução de cardioplegia sanguínea por via anterógrada (190 mL).

Realizou-se o encerramento da CIA utilizando um *patch* seguido da correção total da TOF sem *patch* transanular (correção da estenose pulmonar e encerramento de CIV). Durante a execução das técnicas cirúrgicas, os parâmetros vitais dados pela máquina de CEC foram controlados e registados de 15 em 15 min, cuja variação se comportou da seguinte forma: débito fornecido entre 500 e 930 mL/min, pressão de infusão entre 72 e 144 mmHg, pressão arterial média (PAM) entre 40 e 89 mmHg, temperatura nasofaríngea entre 27° e 37°C e temperatura retal entre 28° e 36°. A oximetria cerebral não invasiva apresentou uma variação dentro da normalidade e a diurese produzida ao longo da CEC foi de 57 mL. Foram realizadas 2 gasometrias arteriais e venosas – a primeira apresentava uma acidose metabólica, pelo que

foi feita a administração de 10 mEq/L de NaHCO 8.4% como correção, e a seguinte sem quaisquer alterações. Para além da administração corretiva do equilíbrio ácido-base, foi administrada nova dose de cardioplegia (100 mL), 50 mL de plasma *lyte* e 50 mL de concentrado eritrocitário, sendo os dois últimos a fim de colmatar a diminuição do retorno venoso, justificada pelas anormalidades venosas encontradas. As medições do tempo de coagulação ativado (ACT) realizadas mantiveram-se todas acima dos 400 seg.

A saída de *bypass* foi fácil, sendo realizado o ETE intraoperatório pós-correções no qual se denotou boa função biventricular, CIV residual *peri-patch*, CIV médio-ventricular muscular e infundíbulo hipertrofiado, e tendo sido registado o tempo total de CEC de 1h48min com 52 min de clampagem da aorta. Para além da técnica de CEC e ETE, foram utilizadas as técnicas do CO₂, da medição da saturação venosa de O₂ e da ultrafiltração convencional. À saída do bloco operatório o doente apresentava PA média de 55 mmHg e 36°C de temperatura.

No pós-operatório, o doente permaneceu conectado ao *pacemaker* em modo DDD devido a raros períodos de bloqueio auriculoventricular completo (BAV) garantindo a sincronização auriculoventricular, com uma FC de 140 bpm. As drenagens hemáticas foram reduzidas, apresentando-se bem perfundido, com extremidades quentes, pulsos palpáveis e simétricos e o raio X tórax realizado demonstrava derrame pleural à direita. As análises pós-cirurgia demonstravam uma ligeira subida da maioria dos parâmetros relativamente aos da pré-cirurgia, à exceção do potássio que se encontrava diminuído e controlado terapeuticamente.

Ao longo do período de pós-operatório, o doente sofreu algumas alterações da FC, com presença de taquicardias, variações no ritmo cardíaco, a estabilizar para ritmo sinusal e ainda conectado ao *pacemaker*, alguma dificuldade nos débitos urinários, sendo feito o seu controlo. Registaram-se ainda algumas complicações ao nível das drenagens do derrame pleural, edemas faciais e das extremidades em redução; manteve sempre uma boa perfusão, com pulsos palpáveis e simétricos e gasometrias equilibradas. Em relação aos ETT pós-operatórios realizados denotou-se para além das

correções TOF uma ligeira disfunção do ventrículo direito, manutenção da CIV residual e CIV muscular e regurgitação pulmonar a reduzir de grave para moderada. Às 48h do pós-operatório encontrava-se hemodinamicamente estável, ainda sedado e em progressão para extubação após estabilizar completamente o ritmo e frequências cardíacas e as drenagens existentes, não tendo existido hemorragias.

Discussão

O acompanhamento pré-natal evidenciou-se no controlo da doença e intervenção atempada, permitindo a relação entre os antecedentes e a patologia, nomeadamente a diabetes gestacional, não sendo esta relação ainda evidente na literatura^(1,4). A toma de betabloqueantes, retardantes dos sintomas da patologia por proporcionarem o relaxamento muscular, permitiu melhorar o fluxo de saída do ventrículo direito e, conseqüentemente, o fluxo sanguíneo pulmonar, reduzindo a cianose, tal como a presença da persistência do canal arterial se mostrou contribuidora ao permitir o *shunt* esquerdo-direito^(1,2).

Os ecocardiogramas realizados permitiram definir a existência da TOF, demonstrando as malformações clássicas com uma hipoplasia pulmonar justificada pela reduzida passagem do sangue relacionada com a estenose pulmonar existente. Posteriormente e com outros exames complementares, detetaram-se ainda algumas das comorbidades associadas – a PLSVC é uma anomalia congénita rara encontrada em cerca de 0,3% da população em geral e onde até 10% dos seus portadores possuem outras patologias congénitas, como é exemplo a TOF; na maior parte dos casos apenas é descoberta na realização de exames ou cirurgia. Este é um importante fator para a realização das canulações, pois seria uma das veias utilizadas para recolher todo o sangue do doente na realização da técnica de CEC⁽⁵⁾. Quanto à CIA, por não ter repercussões evidentes nem tamanho justificativo nos exames previamente realizados, esta não foi inicialmente considerada para correção, admitindo-se que iria fechar espontaneamente. *Mostafa Behjati-Ardakani et al.* estudaram a evolução e a frequência do fecho espontâneo de defeitos septais auriculares em crianças e adultos, concluindo que o tamanho era o preditor principal para o possível

encerramento ou necessidade de intervenção, seguido da idade, pois quanto mais novos os indivíduos maior a probabilidade do encerramento espontâneo (81%); só defeitos de médias a grandes dimensões necessitaram de intervenção. No doente apresentado, como a sua CIA se revelou de grandes dimensões já em cirurgia, a correção era inevitável⁽⁶⁾.

A inexistência da VCSD foi o achado mais inesperado, visto a sua raridade e sendo a sua incidência associada à PLSVC variável entre 0,09 e 0,13%. Por si só, estes achados não apresentam conseqüências hemodinâmicas, mas têm influência direta em alguns procedimentos cirúrgicos, como a impossibilidade de utilização da cardioplegia retrógrada ou na inserção de eletrocateteres de *pacemaker*, sendo descritos na literatura através de casos clínicos pontuais e das medidas a tomar em caso de intervenção. O seu conhecimento permite preparar as adaptações necessárias: utilização de cateteres com formatos adequados, utilização de diferentes vias de acesso na introdução de cateteres, uso isolado de cânula venosa para drenagem da PLSVC, entre outras, e complicações que podem trazer quando associadas a outras patologias. Neste sentido, há referência às associações destas duas alterações (e aplicando ao doente apresentado) à TOF e CIA, sendo sob esta forma a sua maior existência – 46% dos casos de PLSVC com ausência da VCSD estão associados a defeitos cardíacos congénitos. Especificamente, estas comorbidades estão associadas à TOF em 9% dos casos e à CIA em 16%^(5,7-9).

Apesar da associação com patologias tipicamente detetadas em crianças, na revisão literária percebeu-se que a referência à PLSVC e ausência da VCSD é na maioria das vezes em casos clínicos de pacientes adultos. *Serdar Kula et al.* num estudo realizado em 1205 crianças comprovaram a raridade já referida por não detetarem nenhuma com simultânea presença das alterações e *Ayten Gümüş et al.* relataram os casos de dois doentes de 4 e 5 anos com estas comorbidades cuja descoberta foi coincidente com a realização de um cateterismo^(10,11). Por isto se entende que o doente do caso clínico apresentado é um perfeito exemplo da necessidade prévia de estudo através de exames complementares de diagnóstico e da importância deste conhecimento na abordagem e intervenção que, apesar da imprevisibilidade, produziu bons *outcomes*.

A técnica cirúrgica realizada é uma das atuais terapêuticas utilizadas, no entanto existe controvérsia na comunidade científica quanto à estratégia ideal para as correções da TOF, nomeadamente entre a correção total (realizada neste doente) e a correção em duas fases, e ainda sobre as implicações da utilização ou não de *patch* transanular. *Josue Diaz-Frias et al.* relatam as opções de tratamento desenvolvidas e utilizadas ao longo dos anos, realçando a correção total como mais benéfica quanto mais cedo for realizada, existindo disparidades de opinião nos doentes sintomáticos⁽¹⁾. *Pekka Ylitalo et al.* concluíram que a utilização de *patch* transanular aumenta o risco de uma reoperação, fazendo notar que esta necessidade pode não só advir da utilização de *patch*, mas também da gravidade dos defeitos; relatam ainda que a cirurgia em 2 fases é muitas vezes evitada pela menor capacidade terapêutica, mas que a cirurgia de correção total tem normalmente um maior tempo de recuperação pós-operatório devido à agressividade da cirurgia⁽¹²⁾. Considerando estes dois estudos e as comorbidades apresentadas pelo doente, percebe-se o porquê do *timing* cirúrgico precoce, o não uso de *patch* transanular e as possíveis vantagens de ambos: a intervenção precoce permitiu não só a deteção das anomalias não visíveis e subvalorizadas nos exames, como a correção destas e das já diagnosticadas, tendo influência direta nos resultados obtidos.

A realização da técnica de CEC implicava todo o rigor e cuidado verificados devido aos achados e idade do paciente, refletindo-se o seu sucesso na cirurgia e no pós-operatório. *David Whiting et al.* demonstram as particularidades e desafio da realização de CEC em idade pediátrica, alertando para possíveis variações anatómicas e consequentes adaptações, como é de certa forma o caso deste paciente⁽¹³⁾. A CEC tem um papel fundamental para um ótimo *outcome*, sendo que a hipotermia moderada com a utilização de cardioplegia para proteção miocárdica, tal como os tempos de clampagem da aorta e de CEC realizados se apresentaram dentro de um espectro ideal, considerando um estudo realizado por *Chang-Ha Lee et al.*, garantindo-se ainda o princípio de oferecer ao cirurgião um campo limpo e seco⁽¹⁴⁾.

Relativamente ao *outcome* do doente, entende-se que as complicações intra- e pós-operatórias se tenham relacionado às comorbidades associadas à TOF, onde a área da perfusão conseguiu garantir a maior estabilidade possível durante a efetuação das técnicas cirúrgicas necessárias, apesar das adversidades encontradas. Por se tratar de um doente tão novo prevê-se que a hipertrofia e as CIV's residual e muscular existentes têm maior probabilidade de recuperar, em caso de necessidade futura, poderão ser intervencionadas. Também é sabido que estas alterações estão associadas à fase pós-operatória da cirurgia de correção da TOF, não gerando por isto preocupação acrescida. A taquicardia e a regurgitação pulmonar são achados pós-operatórios comuns da cirurgia de correção da TOF e encontrados no doente apresentado. *Yagnesh Patel et al.* referem que na presença da PLSVC há a acrescida possibilidade de existirem defeitos congénitos e de haver o desenvolvimento de BAV (apesar de pouco frequente), alterações estas verificadas no doente estudado^(1,8). As saturações de O₂ entre o pré- e pós-cirúrgico sofreram um aumento substancial dos 87% para os 100%, sendo possível a perfeita oxigenação dos tecidos e eliminando a cianose característica, salientando o sucesso cirúrgico. A ausência de hemorragias, boa perfusão e o equilíbrio das gasometrias ao longo dos dias subsequentes contribuem para a mesma noção. As alterações nas análises são decorrentes da própria técnica de CEC, mas não constituíram preocupação para além da já esperada num pós-operatório regular.

Conclusão

O presente caso clínico representa a importância dos exames complementares de diagnóstico na deteção precoce de cardiopatias congénitas e a adaptação da equipa cirúrgica no encontro de novas adversidades, ambas essenciais para o sucesso cirúrgico.

Referências Bibliográficas

1. Diaz-Frias J, Guillaume M. Tetralogy of Fallot. StatPearls. Treasure Island (FL) 2021.
2. Lacerda AA, Barbosa Da Silva BR, Anchieta A, Filho S, Da Fonseca E, Silva R. Tetralogia de Fallot: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. Revista Multiprofissional em Saúde do Hospital São Marcos. 2013;1(1):50-7.
3. Clara BMA, Cristina MVAT, Azevedo BS, Carla FCH, Salaroli VK. Tetralogia de Fallot. Revista Interdisciplinar Pensamento Científico. 2020;5(5):1855-63.
4. M BC. Tetralogia de Fallot - Um Desafio Multidisciplinar [Mestrado]: Faculdade de Medicina de Lisboa; 2017.
5. Bisoyi S, Jagannathan U, Dash AK, Tripathy S, Mohapatra R, Pattnaik N, et al. Isolated persistent left superior vena cava: A case report and its clinical implications. Annals of Cardiac Anaesthesia. 2017;20(1):104-7.
6. Behjati-Ardakani M, Golshan M, Akhavan-Karbasi S, Hosseini SM, Behjati-Ardakani MA, Sarebanhassanabadi M. The Clinical Course of Patients With Atrial Septal Defects. Iranian Journal Pediatrics. 2016;26(4):e4649.
7. Sheikh AS, Mazhar S. Persistent Left Superior Vena Cava with Absent Right Superior Vena Cava: Review of the Literature and Clinical Implications. Echocardiography. 2014;31(5):674-9.
8. Patel Y, Gupta R. Persistent Left Superior Vena Cava with Absent Right Superior Vena Cava. Methodist DeBakey Cardiovascular Journal. 2018;14(3):232-5.
9. Uçar O, Paşaoğlu L, Çiçekçioğlu H, Vural M, Kocaoğlu I, Aydoğdu S. Persistent left superior vena cava with absent right superior vena cava: a case report and review of the literature. Cardiovascular Journal of Africa. 2010;21(3):164-6.
10. Kula S, Cevik A, Sanli C, Pektas A, Tunaoglu FS, Oguz AD, et al. Persistent left superior vena cava: Experience of a tertiary health-care center. Pediatrics International. 2011;53(6):1066-9.
11. Gümüş A, Yıldırım SV. Absent right superior vena cava with persistent left superior vena cava: two case reports. Turkish Journal of Pediatrics. 2012;54(5):545-7.
12. Ylitalo P, Nieminen H, Pitkänen OM, Jokinen E, Sairanen H. Need of transannular patch in tetralogy of Fallot surgery carries a higher risk of reoperation but has no impact on late survival: results of Fallot repair in Finland. European Journal Cardio-Thoracic Surgery. 2015;48(1):91-7.
13. Whiting D, Yuki K, DiNardo JA. Cardiopulmonary bypass in the pediatric population. Best Practice Research Clinical Anaesthesiology. 2015;29(2):241-56.
14. Lee CH, Kwak JG, Lee C. Primary repair of symptomatic neonates with tetralogy of Fallot with or without pulmonary atresia. Korean Journal of Pediatrics. 2014;57(1):19-25.

LOSS OF MOTHERS AGAINST DECAPENTAPLEGIC HOMOLOG 4 (SMAD4) EXPRESSION AND ITS CORRELATION WITH CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS IN PANCREATIC CARCINOMA

Autores

C. Vareda - Instituto Politécnico de Coimbra; Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, *BSc*

P. F. Teixeira - Centro hospitalar e Universitário de Coimbra, *MSc*

D. R. Martins - Instituto Politécnico de Coimbra; Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, *PhD*

A. M. Valado - Instituto Politécnico de Coimbra; Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, *PhD*

F. J. Mendes - Instituto Politécnico de Coimbra; Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, *PhD*

Centro de execução do trabalho

Instituto Politécnico de Coimbra; Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Conflitos de interesse

A equipa de investigação declara a não existência de conflitos de interesse na realização do estudo

Fontes de Financiamento

Não existiu qualquer fonte de financiamento de contribuição para a realização do estudo

Contacto do autor responsável

catarinavareda@gmail.com

Tipo de artigo

Artigo de Revisão

Abstract

Pancreatic cancer (PC) has an important role in the clinical and research area representing one of the lowest five-year rates as well as a global mortality rate of 4.8% due to its late and poor diagnosis. Therapeutic strategies have also an unsatisfactory response. Even after surgery, the recurrence or appearance of metastasis are frequent, leading to a poor overall survival.

The PC has been related with several mutations, including K-RAS; P16; TP53; HER2. Besides, it is also associated with the deleted in pancreatic cancer locus 4 (DPC4), also known as the suppressor mothers against decapentaplegic homolog 4 (SMAD4) which is present in nearly 50% of the diagnosed patients with PC.

Preceding studies proved that SMAD4 loss expression plays an important role in tumorigenesis and in the promotion of pancreatic carcinoma's growth. Therefore, it is highly relevant in late stages suggesting that SMAD4 may be a molecular biomarker in prognostic results.

The main goal of this review is to highlight the foregoing findings focused on SMAD4 deletion and its influence in clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma by referring some of the investigations and clinical trials made in this field. Furthermore, it is also required to contemplate some of the therapeutical strategies and the influence of SMAD4 in future therapies.

Keywords

Pancreatic cancer; SMAD4; TGF- β

Introduction

The deleted pancreatic cancer locus 4 (DPC4), also known as the suppressor mothers against decapentaplegic homolog 4 (SMAD4), plays a major function in the carcinogenesis of the pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) ⁽¹⁾. The PDAC represents one of the most common types of pancreatic cancer (PC) as approximately 90% of all pancreatic malignancies ^(1,2).

SMAD4, located in chromosome 18q21.1, is a suppressor gene that significantly impacts the transforming growth factor beta (TGF- β) pathway signalling regulation ⁽³⁾. This downstream effect has an essential role in the proliferation and survival of tumour cells ⁽³⁾. The loss of expression of the SMAD4 has a higher frequency in pancreatic carcinoma and a lower percentage in other types of carcinomas as breast, ovary, stomach, oesophagus, neck, colon, and biliary tract ⁽³⁾.

This gene can be inactivated by homozygous deletion due to the deletion of both alleles or just the mutation in one of the alleles, consequently leading to the loss of the other (heterozygosity) ⁽³⁾. Wilentz et al. used 46 tissue samples from PC to demonstrate that immunohistochemistry labelling for SMAD4 is a specific and sensitive method to detect SMAD4 inactivation by either homozygous or heterozygous deletions ⁽⁴⁾.

SMAD4 gene

In 1996, Hahn and his team did the first description of SMAD4 and its repercussions in PC ⁽⁵⁾. The SMAD4 has 10 introns and 12 exons ^(5,6). Preliminary studies identified 11 exons, and later it was discovered another exon named exon 0 ^(5,6). This gene encodes a 552 aminoacids protein with 60 KD as its molecular weight ^(5,6).

Structurally, this protein involves three main components: N-terminal MH1 domain and C-terminal MH2 domain linked by an intermedial region ⁽¹⁾. This region's function is to recognize the SMAD-binding element that can bind DNA and interact with other SMAD protein through MH1 domain ⁽¹⁾. To activate transcriptional activity, it is necessary the presence of SMAD activation domain located in C-terminal of the linker region ⁽¹⁾.

This region owns phosphorylation spots for the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the extracellular signal-regulated kinases (Erk) ⁽⁴⁾. Additionally, it possesses

spots of consent for kinases regulated by calcium and one proline-tyrosine motif, that recognizes WW domains for sumoylation and ubiquitination of SMADS ⁽⁴⁾.

The homozygous deletion in PC is present in approximately 30% of the cases ⁽⁴⁾. The repercussions of SMAD loss starts in late stages of the neoplasia and it is only histologically detectable in advanced infiltrative stages ⁽⁷⁾.

In later investigations, Wilentz and their team observed a significant difference between low-grade and high-grade neoplasms in PC by comparing histological features labelled with monoclonal antibody for SMAD4 ⁽⁸⁾. They concluded that the loss of SMAD4 gene appears in late stages of tumorigenesis and helps the progress and tumour invasion at a histological identifiable level ⁽⁸⁾.

The SMAD4 protein

SMADS family

SMAD4 is one of the eight members of the SMAD family, which is divided into three sub-groups ⁽¹¹⁾. The R-SMADS, sub-group also known as the receptor-regulator SMADS which includes SMAD 1, 2, 3, 5 and 8 ⁽¹¹⁾. The co-SMAD4 or just SMAD4 represents the third group ⁽¹¹⁾. The last sub-group is the I-SMADS that includes SMAD 6 and 7 which have inhibitory functions ⁽¹¹⁾.

The mechanisms of SMADS centres on the phosphorylation and activation through transmembrane serine-threonine receptor kinases responding to TGF- β ⁽¹¹⁾. SMAD4 can either form homomeric or heteromeric complexes that interact with other activated SMADS, leading to an accumulation in the nucleus, interfering with the transcription of specific genes ⁽¹¹⁾.

SMAD4 protein location

The SMAD4 protein can move between the nucleus and the cytoplasm ^(9,10). It can break through the nuclear membrane in a spontaneous process that is not dependent on TGF- β signalling ^(9,10). The immunohistochemistry mainly presents a cytoplasmatic staining ^(9,10). However, if the gene is intact, the nuclear staining can be used too ^(9,10).

In laboratory diagnosis, immunohistochemistry is a useful method to distinguish between in situ and invasive PDCA on biopsies samples of benign to reactive pancreas ^(9,10). In benign lesions, the SMAD4 immunoexpression is still present ^(9,10).

SMAD4 in pancreatic cancer

SMAD4 and the TGF- β pathway signalling

TGF- β is a major signalling pathway involved in PDCA⁽¹⁾. A previous study reported that increased levels of TGF- β in the serum is an indicator of poor prognosis related to a weak survival in unresectable tumour cases⁽¹⁾.

In a normal physiological response, SMAD4 interacts with TGF- β to prevent tumorigenesis⁽⁷⁾. This partnership results in the blockade of mitogenic growth signals⁽⁷⁾. This blockade leads to the inhibition of cell proliferation as well as the activation of programmed cell death via apoptosis of the pancreatic cells⁽⁷⁾. In other words, the TGF- β /SMAD4 signalling pathway restores the balance and homeostasis ensuring the tumour suppressive environment⁽⁷⁾.

In a tumoral state, the deleted SMAD4 associated with a TGF- β mutated pathway creates a deregulation of the transcriptional phase boosting the proliferation and the cell expansion of the malignant cells⁽⁵⁾.

Levy et al. inhibited SMAD4 functions in cell lines Colo-357 of pancreatic tumour using a tetracycline-inducible small interfering RNA⁽¹²⁾. They proved that the loss of SMAD4 can stimulate tumorigenesis by eliminating the normal TGF- β /SMAD4 pathway with a tumoral suppressor role⁽¹²⁾.

This pathway also controls the communication between the tumour and the stroma⁽¹³⁾. PDAC is subcategorized into two main components: the complete epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the partial EMT⁽¹³⁾. It is suggested that the last one may be a product of increased metastasis rate⁽¹³⁾. When TGF- β /SMAD4 is compromised, the modulation of fibrotic response and intracellular mechanisms suggests that this mutation promotes the proliferation and changes the metabolic programme in tumour microenvironment⁽¹³⁾.

Therefore, SMAD4 have a dual mechanism in the tumour, indicating the possibility to inhibit TGF- β rather than activating⁽¹⁴⁾. Pre-clinical trials have revealed a possible TGF- β inhibitor (Galuni-sertib) showing efficacy when combined with chemotherapeutics⁽¹⁴⁾.

Besides, it is also known that SMAD4 down-regulates the expression of proto-oncogene c-Myc and up-regulates p15 and p21 (CDK inhibitors)⁽⁶⁾. SMAD4 is also involved in various events like apoptosis, angiogenesis, differentiation, and cell cycle regulation⁽⁶⁾.

SMAD4 and the tumour microenvironment

The tumour microenvironment (TME) is portrayed as an important piece in the neoplasia progression and cell growth, providing a suppressive ambience⁽¹⁵⁾. It is formed by a dense stromal compartment with cancer-associated fibroblast, blood vessels and infiltrating immune cells⁽¹⁶⁾. Patients diagnosed with PDAC and complemented with a decidedly immunosuppressive profile were more likely to have a poor prognostic⁽¹⁵⁾.

Wang et al, proved the existence of a significant correlation between infiltrating immune cells in the tumour microenvironment and the suppressive genes like TP53; p16 and SMAD4⁽¹⁵⁾. They have a specific influence on the overall survival and in the relapse-free survival (RFS)⁽¹⁵⁾. They used different assays like immunohistochemistry and quantification of gene expression which revealed that SMAD4 performs an important role in recruiting and regulating infiltrating immune cells in the TME⁽¹⁵⁾.

SMAD4 in the PC development and progression

Three main neoplasia lesions have been described by being potentially involved in the malignancy progression defined as: pancreatic intraepithelial neoplasm (PanIN), intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) and mucinous cystic neoplasm (MCN)^(17,18).

PanIN is the most frequent and the most well-known neoplasia lesion^(17,18). It is divided into three main categories: PanIN-1 which has no cellular atypia, PanIN-2 lesion characterized by cellular atypia and the papillary architecture^(17,18). The PanIN-3 resembles to carcinoma in situ^(17,18). It has been reported that the loss of SMAD4 appears to be more frequent in PanIN-3 and in PDAC when compared to other types of pancreatic cancer^(17,18).

It is important to consider that SMAD4 mutation alone is insufficient for the development of PanIN-1 (17,18). Subsequently, the malignancy evolution is based on several suppressing genes and pro-oncogenes activation, providing a perfect genomic ambience for tumorigenesis (17,18).

Clinicopathological parameters and therapy strategies

The current treatment of pancreatic cancer is based on surgery, chemotherapy, radiation and palliative care, depending on the stage (19).

The final diagnosis is based on different parameters like tumour stage including the T stage, the presence of lymph nodes metastasis as well as distant metastasis and other imaging exams (20). A study revealed that the complementary analyses are beneficial to establish a more accurate diagnosis (20). Several therapeutical strategies, clinicopathological analysis and laboratory parameters were evaluated as potential prognostic factors compared with short and long-term survival (20). The analysis included increased levels of total bilirubin, higher levels of CA19-9, advanced T stage, the existence of lymph node metastasis and lack of surgical and chemotherapy procedures (20). They concluded that evaluation of the prognostic factors was linked to worse outcomes validating the importance of the independent prognostic parameters (20).

Currently, the therapy strategies are applied based on the different tumoral stages (21). In resectable tumours, the gold standard is the surgery with adjuvant chemotherapy (gemcitabine and capecitabine) (21). The neoadjuvant strategies are more applicable to chemotherapy than radiation therapy in cases of a borderline, locally advanced or unresectable tumours. Nevertheless, more comprehensive studies are needed in this field (21).

For metastatic tumour, the FOLFIRINOX and nab-paclitaxel-gemcitabine are used, presenting a better rate of survival compared with monotherapy (21).

SMAD4 and prognostic factors

Throughout this review, it is understood that the loss of SMAD4 cooperates with neoplasia progression and promotion of tumour growth. Therefore, many studies have been made to correlate the mutation with clinical and prognostic parameters as well as understanding its association with therapy responses.

A previous study compared the effectiveness of treatment strategies for recurrent PDAC with the SMAD4 genetic status by analysing recurrence patterns and their responses to several therapeutical strategies (4). Outcomes indicated that recurrence patterns after pancreatectomy rely on SMAD4 genetic status (4).

Later, Shin et al. studied 641 patients with recurrent PDCA combined with chemotherapy as well as local control (22). They concluded that the inactivation of the SMAD4 gene was a major parameter to predict metastatic reappearance (9). Patients with an initial loss of SMAD4 had a better response to intensive local control of relapses, which was a major factor to choose a higher effectiveness initial treatment for recurrent PDAC (22).

In opposition, specialists in the field suggested that negative SMAD4 pancreatic carcinomas have the worst response to treatment for distant metastasis (23). Therefore, chemotherapy is more suitable for locally advanced PDAC (23).

Since TGF- β /SMAD4 have a crucial role in carcinoma progression, it is a great potential target for therapy (7). Clinical trials in mouse models showed the neutralized TGF- β type III receptor (TBR11) could decrease metastasis and tumour proliferation and at the same time, it would increase apoptosis in PDAC primary tumour (7).

Prospective therapies

Despite some controversial studies, SMAD4 is still a budding target for therapy (24). Thus, several studies have been made to accomplish some novel treatments (24).

In addition to TGF- β mutated pathway, there are other altered pathways such as WNT/GSK3 and ERK pathways⁽²⁴⁾. These alterations can boost the glycogen synthase kinase 3 (GSK3) phosphorylation resulting in protein degradation and the subsequent loss of SMAD4 function⁽²⁴⁾. Later investigations revealed that is possible to use a GSK3 inhibitor to restore TGF- β pathway and stabilize SMAD4⁽²⁴⁾.

Another investigation suggested that the detection of this mutation may be helpful to stratify patients for a better choice in the therapeutical protocols⁽²⁴⁾. The researchers used screening methodologies based on synthetic lethality to detected two components named as UA62001 and UA62784⁽²⁴⁾. So that, they could target selectively the negative SMAD4 cells⁽²⁴⁾. The cells treated with UA62001 showed an interruption of the cell cycle during phase S and G2 (mitotic phases)⁽²⁴⁾. Additionally, the UA62784 component activated the CDK1 and generated mitotic cell arrest and apoptosis⁽²⁴⁾.

Conclusion

Despite all the improvements made in this topic, there are still some uncertainties on the real influence of SMAD4 loss of expression in clinicopathological findings for pancreatic cancer. This reinforces the need for new advances in this area. There are yet many challenges ahead, such as the poor overall survival associated with a late prognosis regardless of the carcinoma stage.

Nevertheless, SMAD4 remains a potential bidding target for therapy giving hope to future investigations and optimistically bringing an upturn of the overall survival for patients with pancreatic carcinoma.

References

1. Zhao M, Mishra L, Deng CX. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2018 Jan 12 [cited 2021 Feb 16];14(2):111–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29483830/>
2. Orth M, Metzger P, Gerum S, Mayerle J, Schneider G, Belka C, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. *Radiat Oncol* [Internet]. 2019 Dec 8;14(1):141. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1345-6>
3. Hua Z, Zhang YC, Hu XM, Jia ZG. Loss of DPC4 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2003 [cited 2020 Nov 15];9(12):2764–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14669329/>
4. Wilentz RE, Su GH, Dai J Le, Sparks AB, Argani P, Sohn TA, et al. Immunohistochemical Labeling for Dpc4 Mirrors Genetic Status in Pancreatic Adenocarcinomas. *Am J Pathol* [Internet]. 2000 Jan [cited 2020 Nov 22];156(1):37–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10623651/>
5. Ormanns S, Haas M, Remold A, Kruger S, Holdenrieder S, Kirchner T, et al. The Impact of SMAD4 Loss on Outcome in Patients with Advanced Pancreatic Cancer Treated with Systemic Chemotherapy. *Int J Mol Sci Art* [Internet]. 2017; Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
6. Ke Z, Zhang X, Ma L, Wang L. Deleted in pancreatic carcinoma locus 4/Smad4 participates in the regulation of apoptosis by affecting the Bcl-2/Bax balance in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol* [Internet]. 2008 Oct [cited 2020 Nov 21];39(10):1438–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18620728/>
7. Ahmed S, Bradshaw A-D, Gera S, Dewan M, Xu R. The TGF- β /Smad4 Signaling Pathway in Pancreatic Carcinogenesis and Its Clinical Significance. *J Clin Med* [Internet]. 2017;6(1):5. Available from: www.mdpi.com/journal/jcm
8. McCarthy DM, Brat DJ, Wilentz RE, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia and infiltrating adenocarcinoma: Analysis of progression and recurrence by DPC4 immunohistochemical labeling. *Hum Pathol* [Internet]. 2001 Jun [cited 2020 Dec 10];32(6):638–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11431719>
9. Watanabe M, Masuyama N, Fukuda M, Nishida E. Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Rep* [Internet]. 2000 Aug [cited 2020 Nov 28];1(2):176–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11265759/>
10. Pierreux CE, Nicolás FJ, Hill CS. Transforming Growth Factor β -Independent Shuttling of Smad4 between the Cytoplasm and Nucleus. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2000 Dec 1 [cited 2020 Nov 28];20(23):9041–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11074002/>
11. Wrana JL. The Secret Life of Smad4. *Cell* [Internet]. 2009 Jan 9 [cited 2020 Nov 28];136(1):13–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19135880/>
12. Levy L, Hill CS. Smad4 Dependency Defines Two Classes of Transforming Growth Factor β (TGF- β) Target Genes and Distinguishes TGF- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition from Its Antiproliferative and Migratory Responses. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2005 Sep 15 [cited 2020 Dec 2];25(18):8108–25. Available from: <https://mcb.asm.org/content/25/18/8108>
13. Qian Y, Gong Y, Fan Z, Luo G, Huang Q, Deng S, et al. Molecular alterations and targeted therapy in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2020 Dec 2;13(1):130. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00958-3>
14. Melisi D, Garcia-Carbonero R, Macarulla T, Pezet D, Deplanque G, Fuchs M, et al. TGF β receptor inhibitor galunisertib is linked to inflammation- and remodeling-related proteins in patients with pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2019 May 18 [cited 2020 Dec 9];83(5):975–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30887178/>
15. Wang W-Q, Liu L, Xu H-X, Wu C-T, Xiang J-F, Xu J, et al. Infiltrating immune cells and gene mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Surg* [Internet]. 2016 Aug [cited 2020 Nov 22];103(9):1189–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27256393/>
16. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* [Internet]. 2012 Mar 20 [cited 2020 Dec 3];21(3):309–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22439926/>
17. Xia X, Wu W, Huang C, Cen G, Jiang T, Cao J, et al. SMAD4 and its role in pancreatic cancer. *Tumor Biol* [Internet]. 2015 Jan 3 [cited 2020 Nov 28];36(1):111–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25464861/>
18. Borazanci E, Dang C V, Robey RW, Bates SE, Chabot JA, Von Hoff DD. Pancreatic Cancer: “A Riddle Wrapped in a Mystery inside an Enigma.” *Clin Cancer Res* [Internet]. 2017 Apr 1;23(7):1629–37. Available from: www.aacrjournals.org
19. Yamada S, Fujii T, Shimoyama Y, Kanda M, Nakayama G, Sugimoto H, et al. SMAD4 expression predicts local spread and treatment failure in resected pancreatic cancer. *Pancreas* [Internet]. 2015 May 25 [cited 2020 Dec 8];44(4):660–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25760429/>
20. Zhang S, Huang X, Tian Y, Aimaiti S, Zhang J, Zhao J, et al. Clinicopathologic characteristics, laboratory parameters, treatment protocols, and outcomes of pancreatic cancer: a retrospective cohort study of 1433 patients in China. *PeerJ* [Internet]. 2018 May 28;6(5):e4893. Available from: <https://peerj.com/articles/4893>
21. Neoptolemos JP, Kleeff J, Michl P, Costello E, Greenhalf W, Palmer DH. Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2020 Dec 7];15(6):333–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29717230/>
22. Shin SH, Kim HJ, Hwang DW, Lee JH, Song KB, Jun E, et al. The DPC4/SMAD4 genetic status determines recurrence patterns and treatment outcomes in resected pancreatic ductal adenocarcinoma: A prospective cohort study. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Mar 14;8(11):17945–59. Available from: <http://www.nature.com/articles/1201017>
23. Tatarian T, Winter JM. Genetics of Pancreatic Cancer and Its Implications on Therapy [Internet]. Vol. 96, *Surgical Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2016 [cited 2020 Dec 8]. p. 1207–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27865273/>
24. Dardare J, Witz A, Merlin J-L, Gilson P, Harlé A. SMAD4 and the TGF β Pathway in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 May 16;21(10):3534. Available from: www.mdpi.com/journal/ijms



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



A Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias do IPCB,
deseja-lhe um Feliz Natal e um Próspero Ano 2022.

O Diretor
Francisco Rodrigues



CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS
LABORATORIAIS



ENFERMAGEM



FISIOLOGIA
CLÍNICA



FISIOTERAPIA



IMAGEM MÉDICA
E RADIOTERAPIA



MESTRADO
EM CUIDADOS
PALIATIVOS

REGRAS DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS

1. Idioma

Os artigos podem ser submetidos em língua portuguesa, inglesa ou espanhol. É obrigatória a entrega do resumo em inglês caso o autor tenha optado em submeter o artigo somente no idioma português ou espanhol.

2. Página do Título

a) Título em português e inglês ou espanhol, conciso e objetivo no máximo com 120 caracteres com espaços incluídos.

b) A identificação do(s) autor(es) deve ser feita pelo nome clínico ou com a(s) inicial(ais) do(s) primeiro(s) nome(s) seguido do apelido, devendo ainda constar a designação do centro onde o trabalho foi executado; o grau acadêmico ou cargo do(s) autor(es); os organismo(s), departamento(s) ou serviços hospitalares em que o(s) autor(es) exerça(m) a sua atividade.

c) Devem ser explicitados todos os conflitos de interesse de cada um dos autores.

d) Fontes de financiamento que contribuíram para a realização do trabalho.

e) Morada institucional e e-mail do autor responsável pela correspondência relativa ao manuscrito

f) Tipo do artigo

3. Resumo

O resumo deve conter o máximo de 400 palavras com espaços incluídos e deve conter: Objetivo(s), Métodos, Resultados, Conclusões.

Descritores ou palavras passe – no máximo 5 e devem ser extraídos do vocabulário «Descritores em Ciências da Saúde» (DeCS) (<http://decs.bvs.br/>), quando acompanharem os resumos em português, e do Medical Subject Headings (MeSH) (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>), para os resumos em inglês.

4. Manuscrito

O corpo de texto do artigo não pode ultrapassar as 12 páginas. Deve ser escrito na fonte Cambria com avanço de 0,6 cm à primeira linha, num corpo de 12 pontos, com um intervalo de 1,15 linhas e seis pontos depois do parágrafo. Consoante o tipo de artigo proposto, deverão ser cumpridos os seguintes pressupostos (Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Bibliografia).

Os autores devem explicitar no capítulo “Métodos” que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Declaração de Helsínquia e aprovada pela Comissão de Ética da instituição onde a pesquisa foi realizada, apresentando o respetivo parecer.

5. Títulos e Subtítulos

5.1 Títulos - Devem apresentar-se sequencialmente numerados, sem avanço à primeira linha, num corpo (tamanho) entre 14 e 16 pontos na fonte Trebuchet MS, na sua variante negrita (bold) com um intervalo simples e seis pontos depois do parágrafo.

5.2 Subtítulos - Devem apresentar-se sequencialmente numerados, sem avanço à primeira linha, num corpo dois pontos abaixo dos títulos, na fonte Trebuchet MS, na sua variante negrita (bold) com um intervalo simples e seis pontos depois do parágrafo.

6. As tabelas, quadros, gráficos e figuras

Limitadas a 8 no seu conjunto devem respeitar a seguinte formatação:

Os textos associados deverão apresentar-se em Trebuchet MS num corpo de 10 pontos, com a informação do seu número em negrito e o resto do texto em regular, sem avanço especial, entrelinha simples (10 pontos), 6 pontos antes e 12 pontos depois do parágrafo. No caso dos gráficos e das figuras devem apresentar-se na base da imagem, enquanto que as das tabelas devem surgir no topo.

O corpo de texto deve ser escrito na fonte cambria num corpo de texto de 10 pontos.

Devem ser enviadas no formato: JPEG 300 DPI (.Jpg), devidamente colocadas e identificadas no texto e ainda enviadas num ficheiro em separado no formato JPEG 300 DPI.

7. Bibliografia

Limitadas a 25 referências de preferências com menos de 5 anos de publicação, devem cumprir as normas de Vancouver ou APA.

Artigos com referências acima das 25 serão analisados pela Comissão de Editores.

Importante: Os textos devem ser editados em processador de texto (Word da Microsoft®)

