

UNIVERSIDADE DE COIMBRA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DO DESPORTO E EDUCAÇÃO FÍSICA

ANDRÉ FILIPE SANTOS MAGALHÃES

**VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA, BIOMARCADORES SALIVARES
DE STRESS E DE DISFUNÇÃO AUTONÓMICA NA OBESIDADE INFANTIL**

COIMBRA
2012

ANDRÉ FILIPE SANTOS MAGALHÃES

**VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA, BIOMARCADORES SALIVARES
DE STRESS E DE DISFUNÇÃO AUTONÓMICA NA OBESIDADE INFANTIL**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências do Desporto e
Educação Física da Universidade de
Coimbra com vista à obtenção do grau de
Mestre em Biocinética.

**Orientador: Prof. Doutor Luís Manuel
Pinto Lopes Rama**

**Co-orientadora: Prof. Doutora Ana
Maria Botelho Teixeira**

COIMBRA

2012

AGRADECIMENTOS

O meu primeiro agradecimento e o mais importante é dirigido à minha mãe, pelo seu exemplo, pela força e coragem com que encara a vida. Ao longo dos anos fui aprendendo com ela, a importância do acreditar e do arriscar, no sentido de alcançarmos as nossas metas. Muito Obrigado minha mãe pelo carinho, paciência e dedicação.

Seguidamente gostaria de agradecer aos meus orientadores de Mestrado, o Prof. Doutor Luís Rama e Prof. Doutora Ana Teixeira. Especificamente, ao Prof. Doutor Luís Rama pelos conhecimentos vários transmitidos, capacidade de resolução de problemas e espírito prático, e também dizê-lo, a sua paciência para longas conversas telefónicas. À Prof. Doutora Ana Teixeira pela simpatia e jovialidade, pelos conhecimentos transmitidos na área da imunologia e na prática laboratorial.

Gostaria de agradecer também ao Prof. Doutor Jorge Mota, à Prof. Doutora Clarice Martins, e à Prof. Doutora Luísa Aires pela possibilidade que me deram em associar o meu projeto de Mestrado ao estudo desenvolvido pelos mesmos, bem como, pela simpatia e disponibilidade que sempre demonstraram para comigo.

Uma palavra muito especial, para os meus colegas de trabalho, Ana Mariz, Ana Vasco, Joana Vaz, Nuno Lobo e Rosário Martins, por me terem ajudado sempre que precisei.

INDICE GERAL

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
LISTA DE APENDICES.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
CAPITULO I – INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Objetivos do Estudo.....	12
1.2 Hipótese do Estudo.....	13
1.3 Estrutura da Dissertação.....	14
CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Obesidade Infantil.....	15
2.1.1 Definição de Obesidade.....	15
2.1.2 Prevalência.....	16
2.1.3 Impacto para a Saúde.....	16
2.2 Função Autonómica Cardíaca.....	17
2.2.1 Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	18
2.2.1.1 Métodos de Aquisição.....	18
2.2.1.2 Métodos de Análise.....	19
2.2.1.3 Aplicabilidade Clínica.....	20
2.3 Biomarcadores Salivares.....	21
2.3.1 Alfa-Amilase.....	21
2.3.2 Imunoglobulina A.....	22
2.3.1 Cortisol.....	23
2.3.1.1 Metabolismo do Cortisol.....	24

2.3.1.2 Mensuração e Valor Clínico.....	24
CAPITULO III – METODOLOGIA.....	26
3.1 Plano Geral de Trabalhos.....	26
3.1.1 Enquadramento.....	26
3.1.2 Desenho do Estudo.....	26
3.2 Procedimentos e Materiais.....	27
3.2.1 Autorizações e Considerações Éticas.....	27
3.2.2 Caracterização da Amostra.....	27
3.2.2.1 Critérios de Inclusão.....	28
3.2.2.2 Critérios de Exclusão.....	28
3.2.3 Avaliação Antropométrica.....	29
3.2.3.1 Estatura em Pé.....	29
3.2.3.2 Massa Corporal.....	29
3.2.3.3 Índice de Massa Corporal.....	29
3.2.3.4 Perímetro da Cintura.....	30
3.2.4 Avaliação da Composição Corporal.....	30
3.2.5 Avaliação do Estadio Maturacional.....	30
3.2.6 Avaliação da Atividade Física por Acelerometria.....	31
3.2.6.1 Aquisição dos Dados.....	31
3.2.6.2 Análise dos Dados.....	31
3.2.7 Análise dos Biomarcadores Salivares.....	32
3.2.7.1 Recolha da Saliva.....	32
3.2.7.2 Doseamento dos Biomarcadores.....	33
3.2.8 Avaliação da Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	33
3.2.8.1 Método de Aquisição.....	33
3.2.8.2 Método de Análise.....	34

3.2.9 Estatística.....	34
CAPITULO IV – RESULTADOS.....	36
4.1 Análise Comparativa Inter Grupo.....	36
4.1.1 Composição Corporal e Perímetro de Cintura.....	36
4.1.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	37
4.1.3 Biomarcadores Salivares.....	37
4.1.4 Indicadores de Atividade Física	38
4.2 Análise Correlativa Parcial.....	39
4.2.1 Composição Corporal e Variabilidade da Frequência Cardíaca..	39
4.2.2 Composição Corporal e Biomarcadores Salivares.....	40
4.2.3 Variabilidade da Frequências Cardíacae Biomarcadores Salivares.....	41
CAPÍTULO V – DISCUSSÃO.....	42
5.1 Obesidade e Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	42
5.2 Obesidade e Biomarcadores Salivares.....	43
CAPÍTULO VI – CONCLUSÃO.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	46
APÊNDICES.....	53

RESUMO

A obesidade e o excesso de tecido adiposo tanto em adultos como em crianças estão associados à disfunção do normal funcionamento do sistema nervoso autônomo (SNA) e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) está estabelecida como uma ferramenta fiável para a caracterização do equilíbrio simpático-vagal do SNA. Existe evidência crescente que suporta a imunoglobulina A salivar (slgA), o cortisol salivar (sCort) e a alfa-amilase salivar (sAA) como biomarcadores fidedignos para avaliar o funcionamento do SNA e do eixo HHA. O objetivo do presente estudo foi avaliar a VFC e determinar as concentrações de sAA, slgA e sCort em crianças obesas e com peso normal, bem como analisar as suas associações com a composição corporal. Um total de 50 crianças (20 com peso normal; 8 com excesso de peso; 22 obesas), entre 6-10 anos de idade (6.2 ± 1.16), de ambos os géneros (23 sexo masculino; 27 sexo feminino) foram avaliadas. As avaliações incluíram variáveis antropométricas (altura; peso; IMC; perímetro cintura) e de composição corporal como a percentagem de gordura total (%MGT) e a percentagem de gordura do tronco (%MGTr) acedidas por meio de DEXA. Os níveis de atividade física foram avaliados por acelerometria. A VFC foi adquirida por meio de uma avaliação de curta duração e analisados o rácio LF/HF e o SDNN. A saliva de repouso foi coletada e os níveis de slgA e sCort foram determinados por técnica ELISA e a sAA por cinética enzimática. Estatística comparativa e correlações parciais ajustadas ao género, idade e maturação foram usadas. As crianças obesas apresentaram um valor de rácio LF/HF e de slgA significativamente superior às não obesas. A %MGT e %MGTr apresentaram uma associação positiva com a slgA, e negativamente com a sAA. Os nossos resultados sugerem uma relação entre obesidade e disfunção simpático-vagal, e que uma maior percentagem de tecido adiposo está associada a maiores níveis de slgA e menores níveis de sAA.

Palavras chave: Obesidade infantil, Composição corporal, Variabilidade da frequência cardíaca, Cortisol, Alfa-Amilase, Imunoglobulina A.

ABSTRACT

The excess of adipose tissue in adults and children is associated with a dysfunction in the normal activity of the autonomic nervous system (SNA) and hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis. It is well established that heart rate variability (HRV) is a reliable tool for the characterization of the sympathovagal balance. Growing evidence supports salivary immunoglobulin (slgA), cortisol (sCort) and alpha-amylase (sAA) as reliable biomarkers to access the functioning of the ANS and HPA axis. The aim of the present study was to evaluate the HRV and determine concentrations of slgA, sCortisol, sAA on obese and normal weight children, as well as their association with body composition in children. A total of 50 school children (20 normal weight; 8 pre-obese; 22 obese), 6-10 year-olds (6.2 ± 1.16), of both genders (23 Males; 27 Females) were analyzed. Measurements included anthropometric (height, weight, BMI) and body composition variables as percentage of total body fat (%MGT) and percentage of trunk fat (%MGTr), acquired by DEXA. Physical activity levels were accessed by accelerometry. Heart rate variability was acquired by short term evaluation and analyzed the low LF/HF ratio and the SDNN. Resting saliva was collected and levels of slgA were determined by ELISA and sAA by enzyme kinetics. Comparative statistics and partial correlations with gender, age and maturational stage adjustments were used. Obese children presented significantly higher LF/HF ratio and slgA than their normal weight counterparts. %TBF and %TF were significantly correlated with slgA, and negative correlations between %TBF, %TF and sAA were observed. Our results suggest an association between the quantity of adipose tissue and sAA, and especially a nouvelle association with slgA. Higher % body fat seems related to lower sAA and higher slgA levels in children

Keywords: Childhood obesity, Body composition, Heart Rate Variability, Cortisol, Alfa-Amilase, Immunoglobulin A.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Medidas no Domínio do Tempo da VFC	19
Tabela 2 - Características gerais da amostra.....	28
Tabela 3 - Análise da %MGT, %MGTr e perímetro de cintura	36
Tabela 4 - Análise dos parâmetros da VFC: SDNN e LF/HF.....	37
Tabela 5 - Análise das concentrações de sAA, sCort e slgA	38
Tabela 6 - Análise dos parâmetros da atividade física avaliados por acelerometria .	39
Tabela 7 - Análise da correlação parcial entre %MGT, %MGTr, SDNN e LH/HF	40
Tabela 8 - Análise da correlação parcial entre %MGT, sAA, sCort e slgA.....	40
Tabela 9 - Análise da correlação parcial entre SDNN, LF/HF, sAA, sCort e SlgA	41

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Termo de consentimento informado.....	53
--	----

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%AFS – Percentagem de atividade física sedentária
%AFL – Percentagem de atividade física ligeira
%AFM – Percentagem de atividade física moderada
%AFV – Percentagem de atividade física vigorosa
%MGT – Percentagem de massa gorda total
%MGTr – Percentagem de massa gorda do tronco
AA – Alfa-amilase
ACTH – Hormona adrenocortiotrópica
AVP – Vasopressina
CAR- Resposta do cortisol ao acordar
CIAFEL – Centro de Investigação
ECG – Electrocardiográfico
FADEUP – Faculdade de Desporto da Universidade do Porto
GOB – Grupo das crianças obesas
GPN – Grupo as crianças com peso normal
IgA – Imunoglobulina A
HF – Alta frequência
HHA – Hipotalâmico-hipofisário-adrenal
HLC – Corticotropina
IMC – Índice de massa corporal
ITRS - Infeções ou inflamações do trato respiratório superior
LF – Baixa frequência
MNPD – Média de número passos diários
NN50 – Número de intervalos NN que diferem > 50ms do intervalo anterior
PA – Pressão arterial
pNN50 – Percentagem de intervalos NN que diferem >50ms do intervalo anterior
rMSSD – Raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças de intervalos NN
sAA – Alfa-amilase salivar
sCort – Cortisol salivar
SDNN – Desvio padrão de todos os intervalos R-R (NN)
sIgA – Imunoglobulina A salivar
SNA – Sistema nervoso autónomo
ULF – Ultra-baixa frequência
VFC – Variabilidade da frequência cardíaca
VLC – Muito baixa frequência

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso Autónomo (SNA) e o eixo Hipotalâmico-Hipofisário-Adrenal (HHA) controlam importantes funções biológicas no corpo humano. Alterações da função nestes dois sistemas estão associadas à obesidade tanto em adultos como em crianças, podendo levar a distúrbios metabólicos e à desregulação do sistema cardiovascular, com alteração da função autonómica cardíaca (Licht *et al.* 2010; Marques *et al.* 2010). A avaliação da função do SNA através da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e utilização de biomarcadores salivares como a alfa-amilase salivar (sAA), imunoglobulina A salivar (sIgA) e cortisol salivar (sCort) para aferir a função do SNA e eixo HHA, podem ajudar a identificar padrões associados ao estadio de evolução de algumas patologias, severidade e também a eficácia do tratamento (Marques *et al.* 2010; Nater & Rohleder, 2009). No entanto, apesar desta evidência, os estudos que relacionam a obesidade infantil, com a VFC e com biomarcadores salivares são escassos.

1.1 Objetivos do Estudo

O objetivo geral do presente estudo foi o de analisar parâmetros da VFC, concentração de biomarcadores salivares de stress e de disfunção autonómica, e níveis de atividade física em crianças obesas entre os 6 e 10 anos de idade. Mais especificamente pretendeu-se:

- i) Comparar os valores de parâmetros da VFC de domínio do tempo e de domínio espectral em crianças obesas e com peso normal;
- ii) Comparar as concentrações de biomarcadores salivares de stress (sCort) e disfunção autonómica (sAA e sIgA em crianças obesas e com peso normal;

- iii) Comparar os níveis de atividade física registados por acelerometria em crianças obesas e com peso normal;
- iv) Analisar as associações entre a composição corporal, parâmetros da VFC, biomarcadores de stress e de disfunção autonómica, e os níveis de atividade física, controlando para a idade, género e estadio maturacional;

1.2 Hipóteses do Estudo

Tendo por base os objetivos previamente explicitados, como hipóteses do estudo assumimos que ocorram diferenças estatisticamente significativas entre as crianças obesas e as crianças com peso normal nas várias variáveis em estudo, nomeadamente:

- i) As crianças obesas tenham uma menor VFC, menor concentração de sIgA e menores níveis de atividade física moderada ou intensa, comparativamente às crianças não obesas;
- ii) As crianças obesas tenham uma maior concentração de sAA e sCort, comparativamente às crianças não obesas;

Concomitantemente, assumimos que se verifiquem associações estatisticamente significativas entre as várias variáveis em estudo (ajustadas à idade, género e estadio maturacional), particularmente:

- i) Associação positiva entre a quantidade de gordura e as concentrações de sAA e sCort, bem como, com o rácio LF/HF (componentes espectrais LF e HF da VFC);

- ii) Associação negativa entre a quantidade de gordura e a concentração de sIgA e com o SDNN (desvio padrão da média dos intervalos R-R na análise temporal da VFC);

1.3 Estrutura da Dissertação

A presente dissertação está estruturada em seis capítulos. O capítulo I refere-se à introdução onde se explicitam os objetivos e as hipóteses colocadas no estudo. O capítulo II destina-se à revisão da literatura, onde é exposto o enquadramento teórico e conceptual acerca da obesidade infantil, VFC, e biomarcadores de stress e de disfunção autonómica. O capítulo III reporta para a metodologia utilizada, delimitando o desenho do estudo, os procedimentos e materiais. Os capítulos IV e V descrevem os resultados e a discussão dos mesmos, respetivamente. No capítulo VI são referidas as conclusões do estudo e sugeridas e recomendações para futuros trabalhos de investigação nesta área.

CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Obesidade Infantil

2.1.1 Definição de Obesidade

A OMS define a obesidade como uma doença em que o excesso de gordura corporal acumulada pode atingir graus capazes de afectar a saúde. O excesso de gordura resulta de sucessivos balanços energéticos positivos, em que a quantidade de energia ingerida é superior à quantidade de energia dispendida. Os factores que determinam este desequilíbrio são complexos e incluem factores genéticos, metabólicos, ambientais e comportamentais. Este desequilíbrio tende a perpetuar-se, pelo que a obesidade é uma doença crónica (WHO, 2000).

2.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico de pré-obesidade e de obesidade apesar das limitações deste método, faz-se através do cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), e se determina dividindo o peso em quilogramas, pela altura em metros elevada ao quadrado. Considera-se que há excesso de peso ou pré-obesidade quando o IMC é \geq a 25 e que há obesidade quando o IMC é \geq 30 (WHO, 2000). Os critérios de diagnóstico para a obesidade infantil e na adolescência são controversos. No entanto, a utilização do IMC para o diagnóstico do excesso de peso ou obesidade é o parâmetro mais usado. Regendo-se por pontos de corte para a pré obesidade (percentil \geq 85 e $<$ 95) e para a obesidade (percentil \geq 95) relacionados com as curvas de crescimento (Cole *et al.* 2000). Em Portugal, a última revisão das curvas de crescimento foi em 2005, tendo a Direção Geral de Saúde (DGS) optado por substituir as curvas da relação peso-estatura pelas do IMC, mais adequadas à correta monitorização do estado de nutrição de cada criança (DGS, 2005).

2.1.3 Prevalência

A obesidade infantil representa um dos mais preocupantes problemas de saúde pública em Portugal e um enorme desafio ao Sistema Nacional de Saúde e para a sociedade em geral. Segundo dados da OCDE (2010), Portugal é o terceiro país na União Europeia com maior taxa de prevalência de obesidade infantil. O *Health at a Glance 2010* (OECD, 2010) revela que 19% das crianças portuguesas entre os 11 e os 15 anos a apresentam excesso de peso ou já são obesas. Os dados do Observatório Nacional de Obesidade e Controlo de Peso, sobre obesidade infantil são ainda mais alarmantes, o excesso de peso e a obesidade acometem 29% e 12,5% das crianças portuguesas, respectivamente, e 28,2 % e 11,3% dos adolescentes (Miranda *et al.* 2010). Confirmando a tendência de evolução da prevalência da obesidade infantil revelada anteriormente por outros estudos (Ribeiro *et al.* 2003; Padez, 2004; INE, 2009).

2.1.4 Impacto na saúde

As complicações para a saúde da pré-obesidade e obesidade infantil são múltiplas, traduzindo-se principalmente num aumento de factores de risco cardiovascular, complicações metabólicas e endócrinas, distúrbios psicológicos e mesmo morte súbita. (Dietz, 1998; WHO, 2000; NICE, 2006; SIGN, 2010). A literatura refere também, em adultos e crianças com excesso de peso ou obesidade, a presença de disfunção do SNA e do eixo HHA, bem como a existência de um estado inflamatório sistémico de baixo grau (Visser *et al.* 1999; Licht *et al.* 2010; Marques *et al.* 2010).

2.2 Função Autonómica Cardíaca

A avaliação da função autonómica cardíaca é uma pedra basilar na elucidação sobre o funcionamento do SNA, tanto em meio clínico como em investigação (Freeman, 2006). A frequência cardíaca e o ritmo cardíaco, apesar da sua automaticidade intrínseca, respondem dinamicamente a perturbações fisiológicas mediadas pelo SNA simpático e parassimpático (Appel *et al.* 1989). Mesmo em repouso a frequência cardíaca varia ciclicamente, sofrendo interferência direta da respiração, atividade baroreflexa e da termoregulação (Kleiger *et al.* 2005). A maior variação da frequência cardíaca ocorre com as alterações circadianas, particularmente diferenças na frequência cardíaca entre o período diurno e noturno (Molgaard *et al.* 1991). O exercício e as emoções também interferem nesta variação. Estas flutuações da frequência cardíaca reflectem a modulação autonómica e revestem-se de significância prognóstica nos estados patológicos (Kleiger *et al.* 2005).

Na função cardíaca existe uma interação constante da atividade simpática e da parassimpática. A influência parassimpática é mediada via libertação de acetilcolina pelo nervo vago, promovendo a ativação dos recetores muscarínicos da acetilcolina no nódulo sinusal, resultando no início da despolarização diastólica lenta. A intervenção simpática na frequência cardíaca é mediada pela libertação de adrenalina e noradrenalina, levando a ativação dos receptores β -adrenérgicos, que resulta numa aceleração da despolarização diastólica lenta. Em condições de repouso, o tónus vagal prevalece sobre o simpático, e as variações do período cardíaco estão largamente dependentes da modulação parassimpática. O nódulo sinusal é rico em acetilcolinesterases, o que faz com que haja uma resposta rápida a qualquer estímulo vagal, porque a acetilcolina é rapidamente hidrolisada. A influência parassimpática excede os efeitos da activação simpática, provavelmente via dois mecanismos independentes, a função colinérgica induz uma redução da libertação de noradrenalina em resposta a actividade simpática, e induz também, uma atenuação da resposta a um estímulo adrenérgico (Task Force, 1996).

2.2.1 Variabilidade da Frequência Cardíaca

A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é uma ferramenta não invasiva para a avaliação e estudo da função autonómica cardíaca tanto em condições fisiológicas como em condições patológicas. A VFC descreve a oscilação intervalos entre batimentos cardíacos consecutivos (intervalos R-R) através da avaliação do sinal electrocardiográfico (ECG). As variações dos intervalos R-R adquiridas durante condições de repouso representam um bom indicador dos mecanismos de regulação autonómica cardíaca, nomeadamente sobre a forma como os estímulos aferentes e eferentes simpáticos e parassimpáticos interagem nos mecanismos de controlo batimento a batimento. É a actividade eferente simpática e parassimpática no nódulo sinusal que permite em cada ciclo cardíaco a interacção sincronizada de mecanismos centrais (ex: centro vasomotor e centro respiratório) e mecanismos periféricos (ex: pressão arterial e movimentos respiratórios), gerando flutuações rítmicas da descarga neural eferente. A análise destas flutuações rítmicas pode permitir inferências sobre o estado e função dos mecanismos centrais, da actividade eferente simpática e parassimpática, dos factores humorais, e do nódulo sinusal (Task Force, 1996).

2.2.1.1 Métodos de Aquisição

Existem duas configurações usuais, através das quais a VFC pode ser avaliada, as avaliações de curta duração e as avaliações de longa duração. As avaliações de curta duração devem ser realizadas em ambiente laboratorial controlado, ventilação controlada, fármacos, ou outras manobras que desafiem o sistema nervoso autónomo. As avaliações de longa duração da VFC podem ser determinadas através da gravação do sinal ECG durante 24 horas, permitindo aos sujeitos realizarem as suas actividades normais do dia-a-dia. As gravações de 24 horas são particularmente úteis para estratificação do risco em várias patologias, mas também para quantificar a disfunção autonómica. Os métodos mais usados para quantificar a VFC podem ser caracterizados como: domínio do tempo; domínio

das frequências ou espectral; geométrico; e não linear. A sensibilidade baroreflexa e a turbulência da frequência cardíaca podem ser também consideradas como parâmetros de VFC (Kleiger *et al.* 2005).

2.2.1.2 Métodos de Análise

O método mais simples para a análise da VFC é através de medidas no domínio do tempo. Com este método são medidos os intervalos de tempo entre ondas R normais (intervalos R-R ou NN) durante um período de gravação. A partir dos intervalos directamente ou a partir das diferenças entre intervalos num determinado período de tempo, uma variedade de variáveis estatísticas podem ser calculadas (Tabela 1.) O desvio padrão de todos os intervalos R-R normais (SDNN) durante um período de 24 horas é a medida mais usada no estudo da VFC no domínio do tempo, em aquisições de curta duração é utilizado o SDNN durante um período de 5 minutos. As variáveis mais comumente calculadas entre as diferenças entre intervalos R-R normais são rMSSD, NN50, e PNN50 (Kleiger *et al.* 2005; Task Force, 1996).

Tabela 1 - Medidas no Domínio do Tempo da VFC (Adaptado de Kleiger *et al.* 2005)

SDNN	Desvio padrão de todos os intervalos R-R (NN)
rMSSD	Raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças de intervalos NN sucessivos
NN50	Número de intervalos NN que diferem >50ms do intervalo anterior
pNN50	Percentagem de intervalos NN que diferem >50ms do intervalo anterior
Noite-dia diferença	Média dos intervalos R-R da noite menos a média dos intervalos R-R do dia.

A análise da VFC no domínio das frequências ou análise espectral visa quantificar a ciclicidade das flutuações dos intervalos R-R, para esse fim é utilizado a transformada rápida de Fourier ou técnicas autoregressivas. Os componentes espectrais obtidos com este tipo de análise são diferentes consoante a duração da aquisição. Nas aquisições de curta duração, normalmente segmentos de 2 a 5 minutos de ECG, são distinguidos três componentes espectrais principais: muito baixa frequência (VLF); baixa frequência (LF); e alta frequência (HF). A distribuição da potência e da frequência central dos segmentos LF e HF não são constantes, variando de acordo com as modulações autonómicas do período cardíaco. O rácio entre os componentes LF e o HF (LF/HF) é utilizado como indicador do equilíbrio dinâmico entre o SNA simpático e parassimpático. Nas avaliações de 24 horas pode ser analisado outro componente, o componente de ultra-baixa frequência (ULF) (Task Force, 1996; Kleiger *et al.* 2005).

2.2.1.3 Aplicabilidade Clínica

A VFC é um indicador simples e não-invasivo para o estudo da função autonómica cardíaca num variado número de patologias, incluindo a obesidade, com fiabilidade comprovada nas crianças (Dietrich *et al.* 2010). A assunção da importância clínica da VFC surgiu na década de 80, quando foi confirmada como um indicador independente de mortalidade após enfarte agudo do miocárdio (Task Force, 1996). Desde essa altura a VFC tem sido usada para aferir a função autonómica e/ou quantificar o risco de uma grande variedade de patologias, tanto do foro cardíaco como de outros tipos. Estas incluem, entre outras, acidentes vasculares cerebrais, esclerose múltipla, doença renal, diabetes mellitus, doença cardíaca isquémica, enfarte do miocárdio, pacientes que esperam por transplante cardíaco, patologia valvular cardíaca, insuficiência cardíaca, e também a obesidade (Task Force, 1996; Laederach-Hofmann *et al.* 2000; Kleiger *et al.* 2005).

2.3 Biomarcadores Salivares de Disfunção Autonómica e de Stress

A saliva é um fluido mucoseroso exócrino ligeiramente ácido constituído predominantemente por água (97-99,5%). As funções da saliva são a lubrificação, digestão, e formação de uma barreira semipermeável bioativa que recobre a superfície oral e que regula a flora oral (Mandel, 1987). A saliva é uma complexa mistura de secreções das glândulas salivares maiores e pequenas e de substâncias oriundas do fluido crevicular gengival, secreções brônquicas ou nasais, células epiteliais descamadas, restos de alimentos, e microrganismos (Kaufman & Lamster, 2002). Existem três grandes glândulas salivares em cada lado da face: parótida, submandibular, e a sublingual. Adicionalmente, existem numerosas pequenas glândulas salivares que também contribuem na produção de saliva. As glândulas salivares fazem parte do trato digestivo, e são compostas por células acinares, células de sistema de ductos, e células mioepiteliais (Humphrey & Williamson, 2001).

A saliva pode ser denominada de saliva total quando é uma mistura das secreções das várias glândulas ou saliva ductal quando é o fluido produzido por uma só glândula, pode ser ainda caracterizada de saliva de repouso ou estimulada. Sem haver estimulação, 20% da saliva deriva glândulas parótidas, 65% das glândulas submandibulares, e 7-8% das glândulas sublinguais. Quando é estimulada, a contribuição das diferentes glândulas altera-se, passando as parótidas a produzirem mais de 50% da saliva total (Humphrey & Williamson, 2001).

O controlo da secreção salivar depende de mecanismos neurais, nomeadamente do controlo do SNA, mas também de mecanismos celulares (Nater & Rohleder, 2004). As células acinares das glândulas salivares são inervadas tanto por ramos do SNA simpático como do parassimpático (Emmelin, 1987). A inervação parassimpática, via ação colinérgica provoca vasodilatação, aumentando a fluidez da saliva e diminuindo a presença de compostos orgânicos e inorgânicos. Por outro lado, a inervação simpática, via ação adrenérgica, provoca vasoconstrição, diminuindo o volume do fluxo salivar, aumentando a quantidade de proteínas e produtos inorgânicos (Humphrey & Williamson, 2001).

2.3.1 Alfa-Amilase

A sAA é um biomarcador não invasivo e de fácil obtenção sobre o funcionamento o SNA simpático (Nater & Rohleder, 2009), sendo uma das mais importantes enzimas na digestão dos hidratos de carbono. Consiste em duas famílias de isoenzimas, em que uma parte é glicosilada e a outra parte não contém hidratos de carbono (Bosch *et al.* 2011). Ao contrário do cortisol a sAA parece não sofrer grandes variações ao longo dia, apresentando valores mais baixos ao acordar que vão aumentando com o decorrer do dia (Bosh *et al.* 2008). Vários estudos em humanos e animais revelam que a ativação simpática induzida pelo stress, exercício, fármacos, ou via estimulação nervosa, aumentam uniformemente a secreção de sAA e a sua atividade na boca (Wolf *et al.* 2008; Nater & Rohleder, 2009). Alterações da concentração sAA estão associadas a implicações para a saúde várias, patologias respiratórias, alteração do sono, ansiedade e alterações do sono. Começando a haver evidência que poderá estar também associada a disfunção autonómica (Wolf *et al.* 2008). Relativamente a uma possível relação entre sAA e indicadores de obesidade até ao momento, que tenhamos conhecimento, ainda não foram publicados quaisquer estudos.

2.3.2 Imunoglobulina A

A produção de IgA, especificamente a IgA presente nas secreções corporais, como por exemplo na saliva e lágrima, desempenha uma função muito importante no sistema imunitário das mucosas. Na saliva a IgA juntamente com a sAA, lactoferrina e a lisoenzima, atuam como a primeira linha de defesa contra os agentes patogénicos presentes na mucosa oral (Walsh *et al.* 2011). Essa defesa contra os agentes patogénicos é assegurada por diversos mecanismos: i) interferindo na aderência microbiana à superfície da mucosa; ii) inibindo a penetração dos antígenos na membrana epitelial; iii) conjugação com antígenos na superfície basolateral do epitélio da mucosa, de modo a facilitar a sua eliminação por

exocitose; iv) mecanismos de proteção tanto ao nível intracelular como extra celular (Brandtzaeg, 1992).

Nos humanos existem duas subclasses de IgA, diferindo na sequência de aminoácidos e no processo de glicosilação da cadeia pesada alfa. A subclasse IgA1 predomina (aproximadamente 90%) no plasma, enquanto a IgA2 predomina na maior parte das secreções das mucosas. Num adulto normal a saliva contém aproximadamente 60% da subclasse IgA1. A investigação relacionada com a sIgA tem-se centrado quase na totalidade em populações praticantes de exercício, nomeadamente em atletas, devido à assunção que os atletas têm maior prevalência de patologia inflamatória e infecciosa do trato respiratório (Gleeson *et al.* 1999). No entanto, estudos mais recentes reportam que os níveis de sIgA não são diferentes entre os indivíduos sedentários e atletas, exceto quando os atletas estão envolvidos em períodos de treino intenso (Walsh *et al.* 2011).

Sendo a secreção da sIgA controlada pelas aferências do SNA e sofrendo influência do eixo HHA, sabendo que a obesidade está associada a alterações do SNA e do eixo HHA, a possível relação entre indicadores de obesidade e sIgA até à data foi muito pouco estudada.

2.3.3 Cortisol

O cortisol é a principal hormona glucocorticóide nos humanos, influenciando uma larga variedade de processos e sistemas biológicos. O cortisol intervém na função cardiovascular e respiratória, sistema imunitário e processos inflamatórios, metabolismo da glicose, modulação da resposta ao stress e fisiologia reprodutiva (Sapolsky *et al.* 2000; Fries *et al.* 2009). Num adulto normal as glândulas suprarrenais segregam entre 5 a 15mg de cortisol por dia. A secreção do cortisol é caracterizada por uma marcada ritmicidade circadiana, com um aumento dos níveis de cortisol ao acordar, denominada de resposta do cortisol ao acordar (CAR), seguida de uma baixa gradual atividade do cortisol no período da tarde e noite, atingindo concentrações mínimas durante a primeira metade da noite (Björntorp &

Rosmond, 2000; Stalder *et al.* 2011;). Apenas uma pequena fração do cortisol produzido é excretada sob a forma de cortisol livre, o resto é eliminado no decorrer de vários processos metabólicos antes da excreção urinária (Walker & Seckl, 2001).

2.3.3.1 Metabolismo do Cortisol

A libertação do cortisol para a corrente sanguínea e a manutenção deste dentro de níveis fisiológicos depende directamente da actividade do eixo HHA (Walker & Seckl, 2001). A actividade do eixo HHA é regulada pela secreção de corticotropina (HLC) e vasopressina (AVP) pelo hipotálamo, mais especificamente pelo núcleo paraventricular do hipotálamo. A HLC e a AVP vão ativar a secreção da hormona adrenocorticotrópica (ACTH) pela hipófise, que vai estimular o córtex adrenal à secreção de glucocorticóides para a corrente sanguínea, sendo o cortisol o principal (Fries *et al.* 2009). O cortisol vai então interagir com os seus recetores em múltiplos tecidos-alvo, um dos recetores do cortisol é a leptina que é produzida nos adipócitos (Syed & Weaver, 2005). Os níveis de cortisol interferem também no eixo HHA, onde são responsáveis pela inibição negativa por feedback da secreção da ACTH pela hipófise e da HLC a partir do hipotálamo (Jurena *et al.* 2004).

2.3.3.2 Mensuração e Valor Clínico

O cortisol pode ser mensurado no plasma sanguíneo e na saliva nas suas formas activas e pode ser medido na urina na sua forma livre (Restituto *et al.* 2008). A mensuração do cortisol salivar é um método fiável para aferição da actividade do eixo HHA, existindo correspondência com os níveis de cortisol plasmático. A avaliação do cortisol salivar matinal demonstra uma correlação significativa com o cortisol plasmático tanto em indivíduos saudáveis como em indivíduos com patologia (Licht *et al.* 2010; Restituto *et al.* 2008).

Alterações ao ritmo circadiano normal do cortisol ou da sua resposta a um estímulo estão associadas ou aumentam a susceptibilidade a processos que levam ao desenvolvimento de várias doenças (Wolf *et al.* 2008). A situação paradigmática dos efeitos negativos para a saúde com a alteração do ritmo do cortisol ocorre nos pacientes com a síndrome de *Cushing's*. Este síndrome caracteriza-se por níveis elevados de cortisol endógeno, estando nestes pacientes o excesso de cortisol está diretamente relacionado com a obesidade, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão e dislipidemia (Soros *et al.* 2008).

CAPÍTULO III – METODOLOGIA

3.1 Plano Geral de Trabalhos

3.1.1 Enquadramento

Este trabalho resulta de uma parceria com o projeto ACORDA (Adolescentes e Crianças Obesas em Regime de Dieta e Atividade Física) desenvolvido pelo CIAFEL (Centro de Investigação em Atividade Física, Saúde e Lazer) da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto (FADEUP). O projeto ACORDA insere-se num estudo longitudinal aplicado a jovens com excesso de peso e obesidade, cujo principal objetivo visa a alteração de comportamentos, proporcionando o acesso facilitado à prática da atividade física orientada, associando a supervisão alimentar e clínica.

O nosso estudo foi enquadrado no plano de trabalhos da avaliação inicial decorrente do projeto ACORDA implementado em crianças das Escolas do Ensino Básico e 1ºCiclo (EB1) do Agrupamento de Escolas de Santa Bárbara, Concelho de Gondomar. Associamo-nos a este plano do estudo, avaliando a VFC e efetuando recolha de saliva para a análise de parâmetros imunitários, hormonais e marcadores inflamatórios.

3.1.2 Desenho do Estudo

As avaliações foram realizadas em 3 sábados do mês de Janeiro de 2012, da parte da manhã, entre as 9h00m e as 13h00m, nas instalações do CIAFEL na FADEUP. Estas avaliações foram efetuadas sempre pelos mesmos observadores, no sentido de reduzir os possíveis erros inter observação. Todas as crianças pertencentes a amostra e respetivos pais foram informados que deveriam estar

presentes para as avaliações com um jejum de 12 horas, podendo apenas beber água, após o jantar do dia anterior.

3.2 Procedimentos e Materiais

3.2.1 Autorizações e Considerações Éticas

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Revisão do Conselho Científico da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto. Sendo parte do projeto ACORDA desenvolvido em meio escolar, este foi também aprovado pelas direcções das Escolas EB1, Direcção do Agrupamento de Escolas de Santa Bárbara e Direcção Regional de Educação do Norte (DREN). Todos os procedimentos a realizar foram explicados às crianças e respetivos pais. Aos pais foi pedido para assinarem um termo de consentimento informado e às crianças foi pedido o consentimento verbal. Foram respeitadas todas as regras de conduta expressas na Declaração de Helsínquia, a legislação nacional em vigor e a confidencialidade das informações recolhidas.

3.2.2 Caracterização da Amostra

As crianças que constituíram a amostra neste estudo participaram no programa ACORDA implementado em 3 Escolas EB1 do Agrupamento de Escolas de Santa Bárbara no Concelho de Gondomar. Neste estudo participaram um total de 50 crianças, com idades compreendidas entre os 6 e 10 anos de idade ($6,2 \pm 1,16$) de ambos os géneros (27 do sexo feminino; 23 do sexo masculino). Segundo as curvas de crescimento de IMC e os pontos de corte adotados pela DGS para Portugal (Cole *et al.* 2000), dessas 50 crianças que constituíram a amostra, 20 tinham peso normal, 8 eram pré-obesas e 22 eram obesas.

Tabela 2 - Características gerais da amostra

Rapazes (N)	23
Raparigas (N)	27
Idade (anos)	6,2 ± 1,16 ^a
Maturação (Tanner)	1,36 ± 0,5
Peso Normal ^b	20
Pré obesos ^b (N)	8
Obesos ^b (N)	22

*Média ± DP

^bPontos de corte (Cole et al. 2000)

3.2.2.1 Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão adotados foram: crianças que participavam no projeto ACORDA provenientes das Escolas EB1 do Concelho de Gondomar; idades compreendidas entre os 6 e os 10 anos idade;

3.2.2.2 Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão foram: maturação sexual prematura; patologia cardiovascular; patologia auto-imune; patologia psiquiátrica ou estados depressivos; patologia ortopédica; medicação no último mês. Os critérios de exclusão foram aferidos previamente através de questionário aos pais.

3.2.3 Avaliação Antropométrica

3.2.3.1 Estatura em Pé

Para determinar a estatura total dos indivíduos (medida correspondente à distância entre a região plantar e o vértex) foi utilizado um estadiómetro da marca *Harpender*. O avaliado estava descalço, ficando postado em posição anatómica sobre a base do estadiómetro encostando a parte posterior do corpo e a cabeça posicionada no Plano de Frankfurt, estando em apneia inspiratória no momento da medida (Tritschler, 2003).

3.2.3.2 Massa Corporal

Para a avaliação da massa corporal foi utilizada uma balança electrónica da marca *Seca* (modelo 708). Os sujeitos estavam descalços e apenas em roupa interior, colocaram-se no centro da plataforma permanecendo imóveis até ao processamento do resultado. A leitura dos valores foi realizada após estabilização dos dígitos da balança, sendo o peso expresso em quilogramas com aproximação às décimas (Tritschler, 2003).

3.2.3.3 Índice de Massa Corporal

Para avaliação do IMC, definido como a razão do peso corporal em quilogramas pela estatura expressa em metros elevada ao quadrado, utilizou-se o índice de Quetelet ($IMC = Kg/m^2$) (Tritschler, 2003). Através das curvas de referência relacionadas com a idade e género estabelecidas pela DGS, e respetivos pontos de coorte (Cole et al. 2000) as crianças que faziam parte da amostra foram classificadas como tendo um peso normal (percentil ≥ 5 e < 85), pré obesas (percentil ≥ 85 e < 95) ou obesas (percentil ≥ 95).

3.2.3.4 Perímetro da Cintura

Para a medição dos perímetros utilizou-se uma fita métrica flexível e não elástica da marca *Seca* com precisão de 0,1 centímetros. As medições foram realizadas com os indivíduos em roupa interior e em posição anatómica. O perímetro da cintura foi medido no ponto médio entre a margem inferior da última costela e a crista ilíaca, num plano horizontal, no final da expiração normal (Malina *et al.* 2004).

3.2.4 Avaliação da Composição Corporal

A composição corporal foi avaliada por DEXA (*dual-energy X-ray absorptiometry*) da marca *Hologic*, modelo *Explorer*. Este procedimento de avaliação teve uma duração de 20min, os elementos da amostra colocaram-se na posição de decúbito dorsal com os membros superiores em extensão junto ao tronco e os membros inferiores em extensão, com uma ligeira abdução dos pés. Previamente à avaliação os sujeitos tiveram que retirar a roupa e todos os objetos metalizados (brincos, relógios, entre outros) e vestiram uma bata. A partir da avaliação por DEXA foram utilizados os dados relativos à percentagem de massa gorda total (%MGT) e percentagem de massa gorda no tronco (%MGTr).

3.2.5 Avaliação do Estadio Maturacional

Na avaliação do estadio maturacional os sujeitos da amostra foram questionados separadamente por um professor ou professora no caso de ser rapaz ou rapariga, respetivamente. Cada sujeito registou o seu estágio sexual secundário: o estágio do desenvolvimento da mama para as raparigas e o pêlo púbico para os rapazes de acordo com os critérios estabelecidos (Tanner & Whitehouse, 1976) previamente usados e validados numa amostra semelhante (Mota *et al.* 2002).

3.2.6 Avaliação da Atividade Física por Acelerometria

3.2.6.1 Aquisição dos Dados

A atividade física da amostra foi avaliada durante 7 dias consecutivos usando acelerómetros da marca *Manufacturing Technology Inc. (MTI)* e modelo *GTX3*. O modelo de acelerómetros usado dispõe de um inclinómetro para determinar a posição do sujeito e que permite identificar períodos em que o dispositivo tenha sido removido, dispõe também de um sensor de movimento eletrónico que mede acelerações/desacelerações no plano vertical do movimento corporal. Neste estudo, o acelerómetro foi colocado ao nível da anca através de uma fita elástica. O “*epoch period*” (duração do período amostragem) do acelerómetro foi definido para 10 segundos e o output foi definido para fornecer o número de *counts* (contagens) por minuto (*counts/min*). Os estudos para validação deste acelerómetro sugerem que o mesmo fornece uma medição válida e fiável da atividade física em crianças, com uma forte correlação com o gasto energético avaliado por calorimetria indireta (Trost *et al.* 1998; Ekulund *et al.* 2000; Brage *et al.* 2003)

Previamente à avaliação foram disponibilizados aos sujeitos da amostra instruções escritas sobre os cuidados a ter e sobre a colocação dos acelerómetros. Foi também facultado aos sujeitos um diário, que estes deveriam preencher com as atividades realizadas desde o momento de levantar de manhã até ao momento de deitar à noite, incluindo o horário escolar, e que nele também indicassem quando retirassem o acelerómetro, como por exemplo para tomar banho ou fazer natação. Antes do início de cada avaliação, cada dispositivo foi testado no sentido de averiguar possíveis funções anormais e aferir a duração da bateria. Os dispositivos foram iniciados de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.6.2 Tratamento dos Dados

Para aferir os níveis de atividade física o número de contagens obtidas foi somado para cada hora, entre as 7h00 e as 24h00 de modo a representar um padrão de atividade diário normal de uma criança. Os critérios de inclusão para a análise dos dados foram: 1) gravação de um período mínimo de 4 dias da semana e 1 dia no fim de semana; 2) gravação de mais de 600 minutos por dia. Períodos de tempo de pelo menos 10 minutos em que o dispositivo não detetou qualquer “count” não foram considerados para análise (Troiano *et al.* 2008). Na análise dos dados foram utilizados pontos de corte de modo a caracterizar a intensidade das atividades realizadas pelos sujeitos. Os pontos de corte utilizados foram (Anderson, Hagstromer, & Yngve 2005): atividades sedentárias (AFS) entre 0 e 499 counts; atividades ligeiras (AFL), 500 a 1999 counts; atividades moderadas (AFM), 2000 a 2999 counts; atividades vigorosas (AFV), 3000 a 4499 counts e para atividades muito vigorosas (AFMV), número de counts superior a 4500. Os dados recolhidos pelos acelerómetros foram processados pelo uso de um *software* específico denominado *Propero*.

3.2.7 Análise dos Biomarcadores Salivares

3.2.7.1 Recolha da Saliva

A recolha de saliva foi realizada entre as 9h00 e as 10h00 em grupos de 6 indivíduos de cada vez, nos 10 minutos prévios a cada recolha era pedido aos mesmos para lavar a boca com água destilada de forma a remover possíveis resíduos de alimentos, era também pedido aos pais para preencherem um breve questionário relativo aos filhos sobre a ocorrência ou não de afeções ao nível do trato respiratório na última semana.

Para a recolha da saliva os indivíduos permaneceram sentados, esta foi realizada de forma passiva durante 3 minutos, utilizando para tal, frascos de

polipropileno de alta qualidade, evitando problemas com retenção de substância ou introdução de contaminantes que possam interferir com a técnica para quantificação do cortisol. Imediatamente após a recolha, os tubos contendo a saliva foram congelados.

3.2.7.2 Doseamento dos Biomarcadores

Em ambiente laboratorial para a mensuração do cortisol salivar, os tubos contendo a saliva serão descongelados e centrifugados de forma a mensurar os volumes e calcular a taxa fluxo salivar. O sCort e a slgA foram doseados com *kits* da marca *Salimetrics* pela técnica *ELISA* com duplicação das amostras, enquanto a sAA foi doseada por cinética enzimática. O coeficiente de variação intra ensaio foi calculado para o Scort (4,7%), slgA (5,8%) e sAA (2,5%).

3.2.8 Avaliação da Variabilidade da Frequência Cardíaca

3.2.8.1 Método de Aquisição

A aquisição da VFC (intervalos R-R) foi realizada entre as 8:30 e as 10:30 horas, num ambiente calmo (sala de aulas vazia), em condições de temperatura (21 a 23°C) e humidade (40 a 60%) controladas. De modo a evitar interferências na aquisição do sinal, a sala em questão não tinha luzes brancas nem quadro elétrico, os telemóveis não eram permitidos no interior sala, e foram dispostos 6 colchões a uma distância não inferior a 5 metros uns dos outros. Previamente à aquisição foi explicado a todos os indivíduos o procedimento, com ênfase para a importância dos mesmos permanecerem relaxados, imóveis e não falarem. Foi-lhes também explicado a importância de manterem uma respiração constante entre 12 a 15 ciclos respiratórios por minuto (0.2Hz), tendo para tal o auxílio de um metrónomo no decorrer da aquisição. O equipamento utilizado foi a fita e o recetor de frequência

cardíaca da marca Polar S810i (*Polar Electro OY, Kempele, Finland*). Equipamento validado para análise da VFC em crianças (Gamelin *et al.* 2008). A fita do cardiofrequêncímetro foi colocada no tórax de cada indivíduo, sobre o terço distal do esterno. A aquisição tinha uma duração de 12 minutos, foi realizada a 6 indivíduos de cada vez, estes permaneciam em decúbito dorsal nos 6 colchões dispostos na sala para o efeito. Durante o tempo da avaliação, era regularmente pedido às crianças para se manterem calmas, não se moverem e para sincronizarem a sua respiração com o metrónomo.

3.2.8.2 Método de Análise

A análise da VFC foi realizada através de métodos lineares no domínio do tempo e no domínio das frequências com recurso ao *software* informático *Kubios* (*Biosignal Analysis Image Group, Department of Physics, University of Kuopio, Finland*). Os parâmetros da VFC analisados foram o SDNN e LF/HF. Para análise da densidade espectral dos intervalos R-R foram utilizados métodos não paramétricos (transformada rápida de Fourier) sendo os intervalos de frequência assumidos foram de 0,04 a 0,15Hz para o componente LF e de 0,15 a 0,4Hz para o HF (Task Force, 1996). Previamente à análise, todos os registos da VFC foram submetidos a uma inspeção visual prévia e sujeitos a um filtro que removeu ocorrências ectópicas de acordo com os procedimentos sugeridos pela empresa que desenvolveu o *software*.

3.2.9 Estatística

Foi utilizado o *software* informático *Statistical Program for Social Sciences* – SPSS, versão 17.0 para *Windows* e o *Microsoft Office Excell 2010*. Os dados foram analisados fazendo uso de ferramentas de estatística descritiva, métodos comparativos e correlacionais. Previamente à análise estatística comparativa foi avaliada a normalidade da distribuição da amostra para todas as variáveis estudadas (teste de normalidade de Shapiro-Wilk), apresentando unicamente uma

distribuição não normal a variável sAA. Na análise comparativa entre grupos (foi usado o teste t-student para amostras independentes e o equivalente não paramétrico (teste de Mann-Whitney) para a sAA.

A análise correlativa utilizada foi do género multivariada parcial, através do coeficiente de correlação de *Pearson* ou do equivalente não paramétrico, ajustada ao género, idade e estadio maturacional. Precedentemente à análise correlativa parcial, de modo a sustentar o uso das variáveis supracitadas como variáveis de ajuste, foi verificado se haveria alguma correlação bivariada entre estas três variáveis, o que não se verificou.

CAPÍTULO IV – RESULTADOS

4.1 Análise Comparativa Inter Grupo

Esta análise é relativa ao estudo comparativo entre dois grupos, as crianças identificadas como tendo um peso normal (GPN) e as crianças identificadas como tendo obesidade (GOB) nas diferentes variáveis avaliadas. A opção em incluir apenas estes dois grupos para a análise comparativa e não um terceiro grupo que incluiria os elementos identificados com excesso de peso, teve a ver com o seu número baixo (N=8).

4.1.1 Composição Corporal e Perímetro de Cintura

Os resultados indicam uma diferença estatisticamente significativa entre o GPN e o GOB nas três variáveis antropométricas e de composição corporal analisadas, a %MGT ($t = -7,563$; $p = 0,00$), a %MGTr ($t = -8,115$; $p = 0,00$) e o perímetro de cintura ($t = -6,618$; $p = 0,00$). O GOB apresentou um valor médio de perímetro de cintura de $75,39 \pm 9,62$ cm enquanto o GPN apresentou $59,08 \pm 5,62$ cm. No que diz respeito às variáveis de composição corporal, na %MGT e %MGTr o GOB apresentou respetivamente, valores médios de $39,53 \pm 5,80$ e $37,15 \pm 6,75$, já o GPN apresentou valores médios de $27,12 \pm 4,72$ e $22,54 \pm 4,60$, respetivamente.

Tabela 3 - Análise da %MGT, %MGTr e perímetro de cintura

Parâmetros	Grupos	N	Média	Desvio Padrão	Sig.
%MGT	Peso Normal	20	27,12	4,72	,000**
	Obesidade	22	39,53	5,80	
% MGTr	Peso Normal	20	22,54	4,60	,000**
	Obesidade	22	37,15	6,75	
Perímetro da Cintura (cm)	Peso Normal	20	59,08	5,62	,000**
	Obesidade	22	75,39	9,62	

** $p < 0,005$

4.1.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca

Foram analisados dois parâmetros da VFC, um relativo ao domínio do tempo o SDNN e o outro, relativo ao domínio das frequências, o rácio LF/HF. Entre os dois grupos (GOB e GPN) houve uma diferença estatisticamente significativa no rácio LH/HF ($t = -3,119$; $p = 0,004$), o mesmo não ocorrendo no SDNN ($p = 0,691$). Na variável onde existiu a diferença estatisticamente significativa, o rácio HF/LF, o GOB registou um valor médio de $1,26 \pm 0,73 \text{ ms}^2$ enquanto o GPN $0,69 \pm 0,28 \text{ ms}^2$.

Tabela 4 - Análise dos parâmetros da VFC: SDNN e LF/HF

Parâmetros	Grupos	N	Média	Desvio Padrão	Sig.
SDNN (ms)	Peso Normal	18	72,15	35,79	,691
	Obesidade	21	76,27	28,36	
LF/HF (ms^2)	Peso Normal	18	,69	,28	,004**
	Obesidade	21	1,26	,73	

** $p < 0,005$

4.1.3 Biomarcadores Salivares

Os resultados indicam uma diferença estatisticamente significativa entre o GPN e o GOB na concentração da sIgA ($t = -3,519$; $p = 0,004$) o mesmo não aconteceu na concentração de sCort ($p = 0,882$) e de sAA ($Z = -1,513$; $p = 0,130$). Na concentração de sIgA o GOB registou um valor médio de $145,64 \pm 62,65 \mu\text{g/dL}$ enquanto o GPN $87,06 \pm 38,40 \mu\text{g/dL}$.

Tabela 5 - Análise das concentrações de sAA, sCort e sIgA

Parâmetros	Grupos	N	Média	Desvio Padrão	Sig.
AAs (U/mL)	Peso Normal	20	34,75	39,05	,130 ^{NP}
	Obesidade	22	19,93	26,88	
sCort (µg/dL)	Peso Normal	20	,18	,11	,882
	Obesidade	22	,19	,16	
sIgA (µg/mL)	Peso Normal	19	87,06	38,40	,001 ^{**}
	Obesidade	21	145,64	62,65	

**** p < 0,005****NP – Teste não paramétrico**

4.1.4 Indicadores de Atividade Física

A partir dos dados recolhidos pelo acelerómetro foram analisados 5 parâmetros relativos aos níveis de atividade física: percentagem de actividade física sedentárias (%AFS); percentagem de actividade física ligeira (%AFL); percentagem de actividade física moderada (%AFM); percentagem de actividade física vigorosa (%AFV); média número de passos diários (MNPD). Entre os dois grupos houve (GOB e GPN) uma diferença estatisticamente significativa em dois destes parâmetros, na %AFM ($t = 2,179$; $p = 0,037$) e na %AFV ($t = 2,933$; $p = 0,006$). Na %AFM e %AFV o GOB apresentou valores médios de $39,53 \pm 5,80$ e $37,15 \pm 6,75$, respetivamente. Enquanto o GPN apresentou valores médios de $27,12 \pm 4,72$ e $22,54 \pm 4,60$.

Tabela 6 - Análise dos parâmetros da atividade física avaliados por acelerometria

Parâmetros	Grupos	N	Média	Desvio Padrão	Sig.
%AFS	Peso Normal	16	69,44	4,15	,141
	Obesidade	17	71,86	4,96	
%AFL	Peso Normal	16	25,77	3,95	,448
	Obesidade	17	24,61	4,67	
%AFM	Peso Normal	16	3,68	1,22	,037*
	Obesidade	17	2,86	,93	
%AFV	Peso Normal	16	1,10	,46	,006*
	Obesidade	17	,66	,39	
MNPD	Peso Normal	16	11147,19	2317,10	,247
	Obesidade	17	10258,53	2006,80	

* p < 0,05

4.2 Análise Correlativa Parcial

Serão apresentados os resultados da análise correlativa parcial entre as variáveis relativas à composição corporal, VFC, concentrações dos bio marcadores salivares e níveis de atividade física. A análise correlativa foi ajustada à idade, maturação e género da amostra.

4.2.1 Composição Corporal e Variabilidade da Frequência Cardíaca

Os resultados demonstraram uma correlação positiva ($p = 0,00$) entre as duas variáveis de composição corporal (%MGT e %MGTr). Entre as duas variáveis da VFC (SDNN e LF/HF) não houve correlação. Verificou-se ainda uma correlação positiva entre o LF/HF e a %MGT ($p = 0,011$) e entre o LH/HF e a %MGTr ($p = 0,007$).

Tabela 7 – Análise da correlação parcial entre %MGT, %MGTr, SDNN e LH/HF

Variáveis de controlo			%MGT	%MGTr	SDNN	LF/HF
Género		Correlação	1,000	,970	,045	,378
Maturação	%MGT	Sig.	.	,000**	,772	,011*
Idade		df	0	42	42	42
		Correlação	,970	1,000	,050	,403
	%MGTr	Sig.	,000	.	,747	,007*
		df	42	0	42	42
		Correlação	,970	1,000	,050	,403

* p < 0,05

** p < 0,005

4.2.2 Composição Corporal e Biomarcadores Salivares

Tabela 8 - Análise da correlação parcial entre %MGT, sAA, sCort e slgA

Variáveis de controlo			%MGT	%MGTr	sAA	sCort	slgA
Género		Correlação	1,000	,975	-,412	-,037	,417
Maturação	%MGT	Sig.	.	,000**	,005*	,812	,005*
Idade		df	0	42	42	42	42
		Correlação	,975	1,000	-,369	-,067	,419
	%MGTr	Sig.	,000**	.	,014*	,666	,005*
		df	42	0	42	42	42
		Correlação	,975	1,000	-,369	-,067	,419

* p < 0,05

** p < 0,005

Os resultados apresentaram uma correlação positiva entre a %MGT e a slgA ($p = 0,005$) e entre a %MGTr e a slgA ($p = 0,005$). Verificou-se também uma correlação negativa entre a %MGT e a sAA ($p = 0,005$) e entre a %MGTr e a sAA ($p = 0,014$).

4.2.3 Variabilidade da Frequência Cardíaca e Biomarcadores Salivares

Não se verificou qualquer correlação estatisticamente significativa entre as variáveis relativas à VFC (SDNN e rácio LF/HF) e aos biomarcadores salivares (sAA, sCort e sIgA).

Tabela 9 - Correlação entre SDNN, LF/HF, sAA, sCort e sIgA

Variáveis de controlo			SDNN	LF/HF	sAA	sCort	sIgA
Género		Correlação	1,000	-,163	,013	-,291	-,094
Maturação	SDNN	Sig.	.	,310	,937	,065	,558
Idade		df	0	39	39	39	39
		Correlação	-,163	1,000	-,001	-,070	,050
	LF/HF	Sig.	,310	.	,996	,665	,756
		df	39	0	39	39	39

CAPÍTULO V - DISCUSSÃO

Os nossos resultados demonstram que nesta amostra constituída por crianças pré púberes entre os 6 e 10 anos de idade, as crianças obesas (N=22) comparativamente às crianças com peso normal (N=20) já apresentam indicadores de alteração do equilíbrio simpático-vagal na função autonómica e do funcionamento do eixo HHA. Por outro lado, através da avaliação dos níveis de atividade física por acelerometria verificamos que as crianças obesas tinham níveis de atividade física moderada e vigorosa menores que os com peso normal.

5.1 Obesidade e Variabilidade da Frequência Cardíaca.

Neste estudo as crianças obesas evidenciaram níveis de ativação do SNA simpático significativamente superiores, traduzidos um rácio LF/HF mais elevado ($1,26 \pm 0,73 \text{ ms}^2$) comparativamente às crianças com peso normal ($0,69 \pm 0,28 \text{ ms}^2$). Paralelamente, os resultados também demonstraram ainda uma clara associação positiva ($p < 0,005$) entre a percentagem de massa gorda corporal e o rácio LF/HF. Relativamente à variável SDNN que reflete a VFC no domínio do tempo não existiram diferenças significativas inter grupo.

Os nossos resultados parecem concordar com a grande maioria dos estudos publicados até à data sobre VFC e obesidade infantil, que quase na sua totalidade apontam para um desequilíbrio simpátovagal presente nas crianças obesas, tanto por aumento da atividade simpática e/ou retirada parassimpática, que é refletido num rácio LF/HF aumentado (Riva *et al.* 2001; Kaufman *et al.* 2007; Latchman *et al.* 2011; Tascilar *et al.* 2011). Isto apesar das diferenças metodológicas entre os mesmos, por exemplo, no que respeito diz à metodologia de aquisição e análise do sinal ECG, caracterização da obesidade idade e estadio maturacional das crianças da amostra. Contrariamente, o estudo recente de Vanderlei *et al.* 2011 demonstrou um retirada tanto vagal como simpática, não se refletindo em diferenças no rácio LF/HF.

O rácio LF/HF tem sido proposto como um indicador preciso do equilíbrio simpático-vagal do SNA no qual valores mais elevados deste rácio correspondem a uma preponderância das aferências do SNA simpático na função cardíaca (Task Force, 1996). O nosso estudo, sendo composto por uma amostra de crianças com uma idade muito baixa ($6,2 \pm 1,16$), constitui tanto quanto sabemos a mais baixa dos estudos publicados, registou já alterações da função autonómica expressas no rácio LF/HF nas crianças obesas, e também uma associação positiva entre a quantidade de gordura total e do tronco o LF/HF. Na nossa opinião, as alterações neuro-imuno-endócrinas associadas a uma maior percentagem de massa gorda, poderão explicar já a disfunção autonómica mesmo em crianças muito jovens.

5.2 Obesidade e Biomarcadores Salivares

No que diz respeito aos biomarcadores salivares associados à função autonómica e de stress não foram encontradas quaisquer diferenças entre as crianças com obesidade e com peso normal. No entanto, os resultados reportam uma associação positiva entre a percentagem de gordura corporal tanto total como do tronco com a sIgA e uma associação negativa entre as mesmas variáveis de composição corporal e a sAA. Os estudos que relacionam a sIgA com a obesidade são muito poucos (Pallaro et al 2002; Zuniga-Torres et al. 2009), e que saibamos até à data não existem estudos publicados sobre a sAA e indicadores de obesidade, quer em adultos como em crianças.

Um fato muito interessante nos nossos resultados está relacionado com a natureza das associações encontradas, ser de certa forma contrária ao que esperávamos. A secreção da sAA apesar das aferências parassimpáticas, pensa-se que é essencialmente por estímulo do SNA simpático, e o aumento da sua secreção está associado ao stress físico ou psicológico (Nater & Rohleder, 2009). Os resultados demonstraram níveis inferiores de sAA em indivíduos com percentagens de gordura corporal elevadas, indivíduos que a VFC demonstrou terem uma

preponderância da do SNA simpático. O que na nossa opinião, poderá ser um indicador da complexidade da regulação simpático-vagal na secreção do sAA.

Relativamente à slgA, é aceite que a secreção de IgA sofre influências do SNA e também do HHA, o treino intenso ou o stress crónico são suscetíveis de diminuir os níveis de slgA, o que é um reflexo da baixa do sistema imune (Walsh *et al.* 2011). Os nossos resultados demonstraram uma associação positiva entre a slgA e a quantidade de gordura corporal, o que poderá ter estar relacionado com o fato de serem crianças ou a influência de outro ou outros fatores que não foram controlados neste estudo, como por exemplo a ocorrência de episódios de infeções ou inflamações do trato respiratório superior (ITRS) recentes ou em início de aparecimento, que possam explicar alguma exuberância na concentração de slgA.

Quanto ao sCort não se encontraram diferenças entre as crianças obesas e as crianças com peso normal, nem qualquer associação com a composição corporal. Resultados que concordam com outros estudos realizados em crianças (Hershberger *et al.* 2004; Netherton *et al.* 2004; Koupil *et al.* 2005). Por outro lado, Misra *et al.* (2008) verificaram uma forte correlação entre os níveis de cortisol e medidas de composição corporal, resistência à insulina, e dislipidemia, mas num estudo realizado em adolescentes obesas, resultados em linha com que acontece nos adultos (Soros *et al.* 2008).

O cortisol desempenha uma importante função contra regulatória à insulina, aumentando os níveis circulantes de glicose, prevenindo a hipoglicemia (Bolli *et al.* 1999). Um dos fatores metabólicos chave no desenvolvimento da obesidade tanto em adultos como em crianças relaciona-se com o desenvolvimento de resistência à insulina, o que está associado ao aumento da massa gorda (Soros *et al.* 2008). No entanto, algumas crianças obesas mas com alterações de glicose em jejum, podem ainda apresentar uma variação circadiana normal de cortisol, mas ter concentrações de cortisol inferiores a crianças de peso normal, facto justificado com possíveis mecanismos protetores que induzem a uma supressão adaptativa do cortisol (Soros *et al.* 2008). Na nossa opinião os dados sugerem que o aumento do cortisol matinal como indicador de disfunção do eixo HHA associado à obesidade, não é demonstrável nas crianças, este poderá ter início na adolescência.

CAPÍTULO VI – CONCLUSÃO

O nosso estudo permite concluir que comparando crianças obesas com crianças com peso normal, as crianças obesas mesmo as mais jovens, já apresentam alterações na variabilidade da frequência cardíaca, o que é poderá ser indicador de disfunção autonómica precoce.

Verificamos ainda que as crianças obesas apresentam níveis de atividade física moderada e vigorosa menores que as crianças com peso normal.

Muito relevante neste estudo foi o fato de terem sido encontradas associações até à data nunca estudadas, sobre a percentagem de gordura corporal e a sAA e slgA. Na nossa opinião esta relação entre estes biomarcadores e gordura corporal merece ser explorada em estudos futuros.

BIBLIOGRAFIA

American College of Sports Medicine. ACSM'S Health-related Physical Fitness Assessment. Philadelphia: *Lippincott Williams & Wilkins*. 2008.

Appel ML, Berger RD, Saul JP, Smith JM, Cohen RJ. Beat to beat variability in cardiovascular variables: noise or music? *J Am Coll Cardiol*. 1989 Nov 1;14(5):1139-48.

Bjorntorp P, Rosmond R. Obesity and cortisol. *Nutrition*. 2000 Oct;16(10):924-36.

Bolli GB, Fanelli CG. Physiology of glucose counterregulation to hypoglycemia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1999;28(3):467-93, v.

Bosch JA, Veerman EC, de Geus EJ, Proctor GB. alpha-Amylase as a reliable and convenient measure of sympathetic activity: don't start salivating just yet! *Psychoneuroendocrinology*. 2011 May;36(4):449-53.

Brage S, Wedderkopp N, Franks PW, Andersen LB, Froberg K. Reexamination of Validity and Reliability of CSA Monitor in Walking and Running. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35(8):1447–1454.

Brandtzaeg P. Humoral immune response patterns of human mucosae: Induction and relation to bacterial respiratory tract infections. *J. Infect. Dis*. 1992; 165 4: S167–76.

Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000 May 6;320(7244):1240-3.

Dietz WH. Health consequences of obesity in youth: childhood predictors of adult disease. *Pediatrics*.1998;101:518–525.

Duclos M, Marquez Pereira P, Barat P, Gatta B, Roger P. Total versus abdominal fat mass: relationships with the HPA axis phenotype in obese women. *Obes Res*. 2005;13:1157– 66.

Ekelund U, Yngve A, Sjostrom M, Westerterp KR. Field evaluation of the Computer Science Application's Inc. activity monitor during running and skating training in adolescents athletes. *Int J Sports Med.* 2000;21:586–592.

Emmelin N. Nerve interactions in salivary glands. *J Dent Res.* Feb 1987;66(2):509-517.

Freeman R. Assessment of cardiovascular autonomic function. *Clin Neurophysiol.* 2006 Apr;117(4):716-30.

Fries E, Dettenborn L, Kirschbaum C. The cortisol awakening response (CAR): facts and future directions. *Int J Psychophysiol.* 2009 Apr;72(1):67-73.

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Bosquet L. Validity of the polar S810 to measure R-R intervals in children. *International journal of sports medicine.* 2008 Feb;29(2):134-8.

Gleeson M, Hall ST, McDonald WA, Flanagan AJ, Clancy RL. Salivary IgA subclasses and infection risk in elite swimmers. *Immunol Cell Biol.* Aug 1999;77(4):351-355.

Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation.* 1996 Mar 1;93(5):1043-65.

Hershberger AM, McCammon MR, Garry JP, Mahar MT, Hickner RC. Responses of lipolysis and salivary cortisol to food intake and physical activity in lean and obese children. *J Clin Endocrinol Metab.* Sep 2004;89(9):4701-4707.

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* Feb 2001;85(2):162-169.

Instituto Nacional de Estatística. 4.º Inquérito nacional de saúde – 2005/2006. Lisboa: INE 2009.

- Kaufman CL, Kaiser DR, Steinberger J, Kelly AS, Dengel DR. Relationships of cardiac autonomic function with metabolic abnormalities in childhood obesity. *Obesity* (Silver Spring). 2007 May;15(5):1164-71.
- Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):197-212.
- Kleiger RE, Stein PK, Bigger JT, Jr. Heart rate variability: measurement and clinical utility. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2005 Jan;10(1):88-101.
- Koupil I, Mann V, Leon DA, Lundberg U, Byberg L, Vagero D. Morning cortisol does not mediate the association of size at birth with blood pressure in children born from full-term pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Jun 2005;62(6):661-666.
- Latchman PL, Mathur M, Bartels MN, Axtell RS, De Meersman RE. Impaired autonomic function in normotensive obese children. *Clin Auton Res*. 2011 Feb 13.
- Laederach-Hofmann K, Mussgay L, Ruddel H. Autonomic cardiovascular regulation in obesity. *J Endocrinol*. 2000 Jan;164(1):59-66.
- Licht CM, Vreeburg SA, van Reedt Dortland AK, Giltay EJ, Hoogendijk WJ, DeRijk RH, et al. Increased sympathetic and decreased parasympathetic activity rather than changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity is associated with metabolic abnormalities. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010 May;95(5):2458-66.
- Malina RM, Bouchard C, Bar-Or O. Body composition. In Malina RM, Bouchard C, Bar-Or O (Eds). Growth, maturation, and physical activity. 2nd Edition. *Human Kinetics*. Champaign IL; 5 101-120. 2004.
- Mandel ID. The functions of saliva. *J Dent Res*. Feb 1987;66 Spec No:623-627.
- Marques AH, Silverman MN, Sternberg EM. Evaluation of stress systems by applying noninvasive methodologies: measurements of neuroimmune biomarkers in the sweat, heart rate variability and salivary cortisol. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(3):205-8.

Millis RM, Austin RE, Hatcher MD, Bond V, Faruque MU, Goring KL, et al. Association of body fat percentage and heart rate variability measures of sympathovagal balance. *Life Sci.* 2010 Jan 30;86(5-6):153-7

Miranda, A. et al. Regional Differences in the Prevalence of Overweight and Obesity in Portuguese Children (2-5 years) and Adolescents (11-15 years). *Public Health Nutrition.* 2010 Sept;13(9A):188.

Molgaard H, Sorensen KE, Bjerregaard P. Circadian variation and influence of risk factors on heart rate variability in healthy subjects. *Am J Cardiol.* 1991 Sep 15;68(8):777-84.

Mota J, Guerra S, Leandro C, Pinto A., Ribeiro JC, & Duarte JA. Association of maturation, sex, and body fat in cardiorespiratory fitness. *Am J Hum Biol.* 2002; 14(6), 707-712.

Nater UM, Rohleder N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology.* 2009 May;34(4):486-96.

National Institute of Health (USA) National Heart, Lung and Blood Institute. Department of Health and Human Services. The fourth report on the diagnosis, evaluation and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *NIH Publ;* 2005.

Netherton C, Goodyer I, Tamplin A, Herbert J. Salivary cortisol and dehydroepiandrosterone in relation to puberty and gender. *Psychoneuroendocrinology.* Feb 2004;29(2):125-140.

NICE. Obesity: guidance on the prevention, identification, assessment and management of overweight and obesity in adults and children. NICE clinical guideline 43. London: *National Institute for Health and Clinical Excellence;* 2006.

OECD. Health at a Glance: Europe 2010. *OECD Publishing,* Paris; 2010.

Pallaro A, Barbeito S, Taberner P, et al. Total salivary IgA, serum C3c and IgA in obese school children. *J Nutr Biochem*. Sep 2002;13(9):539.

Padez, C. et al. Prevalence of overweight and obesity in 7-9-year-old Portuguese children: trends in body mass index from 1970-2002. *Am J Hum Biol*. 2004 16(6):670-8.

Rabbia F, Silke B, Conterno A, Grosso T, De Vito B, Rabbone I, et al. Assessment of cardiac autonomic modulation during adolescent obesity. *Obes Res*. 2003 Apr;11(4):541-8.

Restituto P, Galofre JC, Gil MJ, Mugueta C, Santos S, Monreal JI, et al. Advantage of salivary cortisol measurements in the diagnosis of glucocorticoid related disorders. *Clinical biochemistry*. 2008 Jun;41(9):688-92.

Ribeiro, J. et al. Prevalência de excesso de peso e obesidade numa população escolar da área do Grande Porto, de acordo com diferentes pontos de corte do índice de massa corporal. *Acta Pediatr Port*. 2003 1(34):21-4.

Riva P, Martini G, Rabbia F, et al. Obesity and autonomic function in adolescence. *Clin Exp Hypertens*. Jan-Feb 2001;23(1-2):57-67.

Ross WD, Marfell-Jones MJ. Kinanthropometry. In MacDougall JD, Wenger HA, Green HJ, eds. *Physiological Testing of the High-Performance Athlete*, pp 223-308. Champaign, Illinois: Human Kinetics Books, 1991.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*. 2000 Feb;21(1):55-89.

SIGN. Management of obesity. SIGN publication no. 115. Edinburgh: *Scottish Intercollegiate Guidelines Network*; 2010.

Soros A, Zadik Z, Chalew S. Adaptive and maladaptive cortisol responses to pediatric obesity. *Med Hypotheses*. 2008 Sep;71(3):394-8.

Syed AA, Weaver JU. Glucocorticoid sensitivity: the hypothalamic-pituitary-adrenal-tissue axis. *Obes Res.* 2005 Jul;13(7):1131-3.

Tascilar ME, Yokusoglu M, Boyraz M, Baysan O, Koz C, Dundaroz R. Cardiac autonomic functions in obese children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2011;3(2):60-64.

Tanner JM & Whitehouse RH. Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity, weight velocity, and stages of puberty. *Arch Dis Child.* 1976; 51(3), 170-179.

Tritschler, K. Medida e avaliação em educação física e esportes de Barrow & McGee. 5 ed. Barueri-SP: Manole, 2003.

Trost SG, Morehouse S, Watson P, Ward DS, Riner W, Burke J. Validity of the Computer Science and Application (CSA) activity monitor in children. *Med Sci Sports Exerc.* 1998;30(40):629–633.

Vanderlei LC, Pastre CM, Freitas Junior IF, de Godoy MF. Analysis of cardiac autonomic modulation in obese and eutrophic children. *Clinics (Sao Paulo).* 2010 Jun;65(8):789-92.

Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB, *Low-Grade Systemic Inflammation in Overweight Children*, *Pediatrics.* 2001; 107(1): 1-6.

Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB, *Elevated C-Reactive Protein Levels in Overweight and Obese Adults*, *JAMA.* 1999; 282(22): 2131-2135. .

Walker BR, Seckl JR: *Cortisol* Metabolism in Björntorp. In *International Textbook of Obesity*, Chichester: *John Wiley and Sons*, 2001.

Wolf JM, Nicholls E, Chen E. Chronic stress, salivary cortisol, and alpha-amylase in children with asthma and healthy children. *Biol Psychol.* 2008 Apr;78(1):20-8.

World Health Organization. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic.* Geneva: *W.H.O.*, 2000.

Zuniga-Torres MG, Martinez-Carrillo BE, Pardo-Morales RV, et al. Are immunoglobulin concentrations associated with the body composition of adolescents? *Hum Immunol*. Nov 2009;70(11):891-894.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Termo de consentimento informado

Estudo de investigação (componente transversal)

Marcadores de risco aterogénico em adolescentes obesos portugueses.

Predisposição genética e modificações associadas à prática de exercício físico regular.

Função autonómica cardíaca e biomarcadores salivares em crianças obesas

Eu, abaixo-assinado, _____,
na qualidade Encarregado de Educação de
_____, fui informado de que
o estudo de investigação acima mencionado se destina a avaliar a influência de
variantes genéticas bem como de modificações do estilo de vida em marcadores de
risco aterogénico e de função autonómica cardíaca em adolescentes e crianças
obesas portuguesas.

Sei que neste estudo está prevista a realização da colheita de mais de 1mL de saliva
e de mais 5 mL de sangue na mesma punção que se fará para a realização dos
estudos de rotina, pelo que a integração no estudo não trará qualquer incómodo
para os participantes. A colheita de saliva e de sangue permitirá realizar a avaliação
dos diversos marcadores de risco aterogénico e de função autonómica cardíaca.

Sei que uma parte da saliva e do sangue vai ser utilizada de imediato para fazer
algumas análises e que outra parte vai ser armazenada para ser utilizada
posteriormente. O armazenamento terá a duração de cerca de três anos, tempo
necessário para a realização de todos os estudos analíticos.

Sei ainda que alguns dos estudos que vão ser efetuados são estudos genéticos,
respeitando o estabelecido no Decreto-Lei 12/2005, de 26 de Janeiro.

Foi-me garantido que todos os dados relativos à identificação dos participantes neste estudo são confidenciais e que a utilização das amostras será apenas no âmbito do estudo.

Sei que posso recusar-me a autorizar a participação ou interromper a qualquer momento a participação no estudo do menor de idade de que sou responsável, sem nenhum tipo de penalização por este facto.

Compreendi a informação que me foi dada, tive oportunidade de fazer perguntas e as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Autorizo de livre vontade a participação daquele que legalmente represento no estudo acima mencionado.

Concordo que sejam efectuados os exames e a colheita de amostras de saliva e de sangue para realizar as análises que fazem parte deste estudo.

Também autorizo a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, garantindo o anonimato.

Nome do seu representante legal

Assinatura _____ Data ____/____/____.