



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UnICEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
CURSO DE NUTRIÇÃO

OS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE COENZIMA Q10 NA
TERAPÊUTICA DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA: UMA REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA

Leonardo Ferreira Alvarenga

Orientadora

Michele Ferro de Amorim Cruz

Brasília, 2020

Data de apresentação: 04/08/2020

Local: Sala 02

Membros da banca: Daniela de Araújo Medeiros Dias e Camila Araújo de Moura e Lima

1. INTRODUÇÃO

A Insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica em que a capacidade do coração de bombear sangue para suprir as demandas do organismo é ineficaz. É ocasionada por alterações estruturais e/ou funcionais cardíacas, e é caracterizada por sinais típicos, como a incapacidade em manter o débito cardíaco adequado ou por pressões elevadas de enchimento no repouso ou no esforço físico (MANN; ZIPES; LIBBY; BONOW, 2015). É atualmente uma das principais causas de morbimortalidade, apresentando aumento progressivo em sua incidência e prevalência (MAZUREK; JESSUP, 2015). As terapêuticas medicamentosas e não medicamentosas atuais visam diminuir sua progressão e sintomas, melhorando a qualidade de vida do paciente. Portanto, faz-se necessário a busca por terapias que possam prevenir ou retardar o avanço da IC. Um adequado suporte nutricional, com modulação de micronutrientes antioxidantes ou cofatores para elementos antioxidantes é capaz de reduzir o estresse oxidativo e o processo inflamatório presentes na fisiopatologia da doença (MONTERA, 2007).

A ocorrência do Estresse Oxidativo (EO) é manifestada através do desequilíbrio entre compostos antioxidantes e oxidantes, induzindo a uma produção excessiva de radicais livres ou prejudicando a velocidade de remoção destes. Quando presente de forma crônica, o EO possui importantes consequências sobre o processo etiológico de variadas doenças crônicas não transmissíveis, entre elas a IC (BARBOSA et al., 2010).

Atuando no mecanismo oxidativo, devido a seu potencial antioxidante, tem-se evidenciado a Coenzima Q10 (CoQ10), também conhecida como Ubiquinona, molécula presente nas membranas celulares e componente essencial na cadeia transportadora de elétrons, atuando como transportadora de elétrons do complexo I e II para o complexo III, sendo indispensável na produção de Adenosina Trifosfato (ATP) e no metabolismo celular. Sua forma reduzida, Ubiquinol, tem efeito antioxidante, limitando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), protegendo a célula do dano induzido por radicais livres. Baixos níveis de CoQ10 estão relacionados à maior produção de ERO, decorrentes do estresse oxidativo desbalanceado (SOMAYJULU et al., 2005).

A CoQ10 tem sido utilizada como suplemento oral contra a fadiga (MEHRABANI et al., 2019), sintomas miopáticos em pacientes tratados com estatinas (HUA et al., 2018) e por via de prescrição médica em certas patologias, como a fibromialgia (CORDERO et al., 2013). É amplamente distribuída pelo organismo, com maior presença em determinados órgãos, como o coração.

Sabe-se que sua produção no organismo diminui com o avançar da idade e a redução na sua concentração tem sido relacionada à severidade da IC (FOTINO, 2013). O interesse nessa molécula como possível agente terapêutico tem crescido, sendo foco de diversas abordagens científicas.

Diante do exposto e, considerando a relevância do tema, objetivou-se com o presente estudo analisar os efeitos da suplementação de Coenzima Q10 na terapêutica da Insuficiência Cardíaca.

2. METODOLOGIA

O presente estudo trata-se de uma pesquisa bibliográfica exploratória sobre o tema já citado, com revisão da literatura dos últimos 10 anos.

As análises dos dados foram coletadas a partir de plataformas de pesquisa científica, tais como: EBSCO, SCIELO e PUBMED, e de periódicos e/ou revistas científicas, nos idiomas português e inglês.

Para a busca foram utilizadas as seguintes palavras-chave cadastradas nos Descritores de ciências da saúde (DeSC): “Insuficiência Cardíaca” (Heart Failure), “Coenzima Q10” (Coenzyme Q10), “Ubiquinona” (Ubiquinone), “Ubiquinol” (Ubiquinol), “Suplementação” (Supplementation), “Estresse Oxidativo” (oxidative stress), “Antioxidante” (antioxidante).

Para avaliação dos dados coletados, verificou-se a seguinte sequência de leitura: título, resumo e artigo na íntegra. Os dados obtidos seguiram os critérios em que a Insuficiência Cardíaca e a busca por possíveis melhoras do quadro clínico sejam o foco do assunto correlacionado, considerando apenas estudos realizados em humanos nos últimos 10 anos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A Insuficiência Cardíaca e o Estresse Oxidativo

A IC é uma síndrome, ou seja, um conjunto de sintomas e sinais comuns a várias doenças, como fadiga, dispneia e edema, podendo ser acompanhada por pressão venosa jugular elevada, sons pulmonares anormais e edema periférico devido à anormalidade estrutural e/ou funcional cardíaca, gerando uma redução do débito cardíaco ou elevada pressão intracardíaca em repouso ou sob esforço (PONIKOWSKI et al., 2016). Manifesta-se como doença crônica estável ou descompensada, gerando limitações funcionais e piora na qualidade de vida do paciente (ARAUJO et al., 2013).

Ainda que a etimologia da IC seja multifatorial, estudos indicam o papel do EO na gênese da IC, de modo que compreender sua atuação e efeitos podem favorecer a prevenção e tratamento da IC (STEIN et al., 2014).

O EO pode ser definido como um desbalanço entre a formação de ERO e a sua eliminação por defesas antioxidantes, gerando um estado pró-oxidante podendo danificar macromoléculas orgânicas e desregulação da sinalização redox celular (COSTA et al., 2016). No coração, as ERO podem induzir modificações de proteínas importantes para a contração cardíaca, contribuindo para a redução da contractilidade e desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e fibrose. Concentrações elevadas de ERO são responsáveis, também, pela indução de apoptose e disfunção mitocondrial nos cardiomiócitos (COSTA et al., 2016).

Além do aumento da síntese de ERO, o EO pode resultar da disfunção das defesas antioxidantes do organismo. As principais enzimas antioxidantes são a Glutathione Peroxidase, a Catalase e o Superóxido Dismutase. Entre os antioxidantes não enzimáticos, destacam-se a Glutathione, as vitaminas C e E, os carotenóides, os minerais selênio, zinco, magnésio e cobre, todos obtidos através da alimentação (SOUSA et al., 2012).

Dentre os compostos antioxidantes, tem-se evidenciado a Coenzima Q10 pela sua capacidade de inibição contra a peroxidação lipídica e remoção de radicais livres de forma direta ou indireta, por meio da regeneração da vitamina E (THOMAS et al., 2010).

3.2 A Coenzima Q10

A CoQ10 é uma coenzima mitocondrial lipofílica essencial na cadeia respiratória, atuando como carreadora de elétrons e indispensável na produção de ATP (CORDERO et al., 2013). É uma molécula sintetizada de forma endógena pelo organismo e presente em alimentos como vegetais verdes, peixes, cereais e carne vermelha. É encontrada em todas as células do corpo humano, porém em maiores concentrações no coração, fígado, cérebro e músculo esquelético (SPINDLER; BEAL; HENCHCLIFFE, 2010).

Essa coenzima é capaz de evitar a peroxidação de fosfolipídeos, proteger da oxidação as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) presentes no plasma e o DNA dos danos oxidativos, além de demonstrar capacidade de regenerar antioxidantes como as vitaminas C e (ácido ascórbico e alfa-tocoferol, respectivamente) (GUTIERREZ et al., 2019).

Kernt et al. (2010) alegaram que a CoQ10 reduziu de forma eficaz as ERO ocasionadas pela luz UV em células epiteliais do cristalino humano, indicando sua capacidade antioxidante. No estudo de Somayajulu et al. (2005), foi investigado o efeito neuroprotetor da CoQ10, e os resultados indicaram que o tratamento precoce com a coenzima inibiu a geração de ERO e manteve o potencial da membrana mitocondrial durante o EO. A CoQ10 é, também, utilizada no tratamento coadjuvante de doenças cardíacas, como a Insuficiência Cardíaca Crônica (KUMS et al., 2009).

Desde a sua descoberta, muitos estudos demonstraram uma associação entre baixos níveis de CoQ10 e diversas patologias e sintomas, podendo a sua suplementação ser coadjuvante em um possível tratamento.

3.3 Absorção e biodisponibilidade

A absorção da CoQ10 ocorre no intestino delgado e, devido a sua característica lipofílica, é realizada de forma lenta, sendo melhor absorvida na sua forma reduzida, o Ubiquinol. Na suplementação via oral, a ingestão concomitante à alimentos ricos em lipídeos podem favorecer sua absorção (ZAKI, 2016).

A biodisponibilidade dos suplementos alimentares contendo CoQ10 varia de acordo com sua formulação, sendo encontradas fórmulas desenvolvidas com lecitina de soja, microesferas lipídicas e complexos com ciclodextrinas, onde as formulações de Ubiquinol solubilizadas em óleo demonstraram melhores resultados em termos de biodisponibilidade (LÓPEZ et al., 2019; BALAKRISHNAN et al., 2009).

3.4 Reações adversas e interações medicamentosas

Estudos de determinação de risco para a saúde humana indicam que a CoQ10 apresenta baixa toxicidade e sua suplementação é segura, não gerando acúmulo plasmático ou tecidual após terminada a suplementação nem efeitos adversos graves, sendo que o nível de administração seguro observado foi de até 1200 mg/dia (VILLALBA, PARRADO, SANTOS, ALCAIN, 2010).

As reações adversas mais comuns em função da suplementação de CoQ10 são náusea e desconforto gástrico (LÓPEZ et al., 2019).

Foi reportada interação medicamentosa com a Varfarina, um fármaco do grupo dos anticoagulantes. A CoQ10 pode influenciar no metabolismo da Varfarina através da interação seletiva com enzimas do citocromo P450, dificultando atingir as metas de anticoagulação desejadas em pacientes que faziam uso do medicamento em conjunto com a CoQ10 (DELGADO, 2019).

3.5 A suplementação de Coenzima Q10 na terapêutica da Insuficiência Cardíaca

O desenvolvimento e a progressão da IC estão relacionados ao estado nutricional e as alterações da composição corporal, onde a maioria dos pacientes com IC apresentam alguma alteração nutricional, seja obesidade ou desnutrição e alterações nos parâmetros bioquímicos e/ou antropométricos (VON HAEHLING et al., 2012; DOMINGUES et al., 2016).

A deficiência da CoQ10 merece destaque na avaliação nutricional de pacientes com IC, uma vez que estes frequentemente apresentam redução sérica e tecidual das concentrações de CoQ10. Em nota, foram registrados níveis de CoQ10 33% menores no tecido miocárdico em pacientes com IC (SHARMA et al., 2016).

A IC está associada, também, a uma depleção de ATP e a disfunção mitocondrial nos cardiomiócitos, alterando as vias metabólicas cardíacas, resultando na perda de capacidade contrátil do coração. Surge, então, uma possível relação entre a diminuição da concentração de CoQ10 no coração e a severidade da IC (SHARMA et al., 2016).

Sua suplementação tem sido associada com a melhora na fração de ejeção, débito cardíaco, capacidade funcional e qualidade de vida (LEE et al., 2010; DIRETRIZ DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA, 2018). Porém, a maior parte dos estudos realizados eram limitados pelo pequeno número de pacientes, dentre outros

fatores, levando a conclusões divergentes e não elucidativas quanto aos benefícios da suplementação de CoQ10.

Entretanto, em 2014 foi publicado na *Journal of the American College of Cardiology* – programa de periódicos cardiovasculares mais lido no mundo, com reputação internacional de excelência, um grande estudo (provavelmente o maior) duplo-cego randomizado, chamado Q-Symbio, onde seu principal objetivo era avaliar a CoQ10 como coadjuvante na terapêutica da IC, determinando as alterações dos sintomas e biomarcadores, assim como os resultados do tratamento a longo prazo.

Este estudo foi conduzido por 2 anos em 420 pacientes diagnosticados com IC moderada a grave, em centros clínicos europeus, asiáticos e australianos. As dosagens de CoQ10 utilizadas buscaram garantir maiores níveis séricos, e foram baseadas em estudos anteriores, onde 100 a 200mg/dia divididas em duas doses diárias apresentavam maiores níveis séricos em relação a uma única dose de 200mg. No Q-Symbio a dosagem administrada foi de 100mg, 3 vezes ao dia, de modo a garantir um aumento significativo no nível sérico (MORTENSEN et al. 2014).

Os pacientes foram divididos de forma aleatória em grupo placebo e grupo CoQ10 e ambos os grupos eram tratados com a terapêutica farmacológica para IC. Foram utilizados os parâmetros da classificação funcional da New York Heart Association, a NYHA, que proporciona um meio de classificar a extensão da IC, categorizando-os em uma de quatro categorias baseadas na limitação da atividade física (MORTENSEN et al. 2014).

Segundo o estudo de Mortensen et al. (2014), não houveram mudanças significativas no curto prazo (16 semanas), entretanto, após 106 semanas, foi possível notar menores ocorrências de eventos cardiovasculares no grupo CoQ10, tais como: redução na mortalidade por causas cardiovasculares (CoQ10 N = 18 vs Placebo N = 34), redução na mortalidade por diversas causas (CoQ10 N = 21 vs Placebo N = 39), maior quantidade de pacientes apresentaram melhora na classe funcional segundo a NYHA em ao menos um grau (CoQ10 N = 86 vs Placebo = 68) e menor número de hospitalizações devido à IC (CoQ10 N = 17 vs Placebo N = 31).

Estes resultados demonstraram que o tratamento prolongado com CoQ10 em pacientes com IC é seguro e bem tolerado, e, em conjunto com a terapêutica padrão, está associado a melhora dos sintomas e redução de eventos cardiovasculares adversos (MORTENSEN et al. 2014).

As diferenças demográficas foram um fator limitante neste estudo no tocante à diferença de gestão dos pacientes (diferentes terapêuticas padrão, disponibilidade de medicamentos e cultura), pois foram inscritos pacientes europeus e, principalmente, asiáticos, o que gera um potencial de afetar os resultados dos ensaios clínicos. Com base nisso, foi realizado um estudo adjacente ao Q-Symbio, com o objetivo de avaliar a consistência nos efeitos do tratamento com CoQ10 na subpopulação europeia (N = 231), a partir da população total do estudo Q-Symbio (N = 420) (MORTENSEN et al., 2019).

Nesta análise do subgrupo europeu foram alcançados uma diminuição ainda maior nos eventos cardiovasculares adversos no grupo tratado com CoQ10 (N = 10 vs Placebo N = 33), assim como redução da mortalidade por causas cardiovasculares e por diversas causas, melhora na classificação segundo a NYHA e aumentos da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, que não havia sido detectado no estudo original (MORTENSEN et al., 2019).

Esta análise trouxe um respaldo maior ao estudo original Q-Symbio, demonstrando o potencial da CoQ10 na terapia adjuvante da IC.

Uma meta-análise conduzida por Fotino, Thompson-Paul e Bazzano (2013), focada nos efeitos da suplementação de CoQ10 nos resultados clínicos relevantes à IC, ou seja, a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE) e a classificação NYHA, onde somente ensaios clínicos randomizados com grupo controle de CoQ10 e placebo foram selecionados, totalizando 13 estudos, mostrou uma melhora de 3,7% na FE e diminuição na classe funcional NYHA, embora não tenham alcançado grande significância.

Os autores sugeriram que a suplementação de CoQ10 pode ser benéfica para pacientes com IC, entretanto as diversas limitações dos estudos, como o número pequeno de participantes (entre 6 e 69), informações limitadas quanto as características dos pacientes (raça, pressão arterial, peso, comorbidades ou regimes de medicação), indicam a necessidade de cautela e realização de novos estudos bem projetados (FOTINO; THOMPSON-PAUL; BAZZANO, 2013).

Em outra meta-análise de ensaios clínicos publicada em 2017 na BMC Cardiovascular Disorders, foram analisados 14 ensaios clínicos, totalizando 2149 pacientes, onde os autores relataram que a suplementação de CoQ10 reduziu a mortalidade em comparação ao placebo e melhorou a capacidade de exercício. No entanto, não foi observada diferença na fração de ejeção do ventrículo esquerdo e

tanto o grupo CoQ10 quanto o grupo placebo obtiveram classificações semelhantes na NYHA (LEI; LYU, 2017).

Os autores indicam a necessidade de ensaios internacionais mais rigorosos, com maiores amostras e menor heterogeneidade no desenho dos estudos para confirmar os resultados (LEI; LYU, 2017).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na fisiopatologia da IC, tem-se associado a maior ocorrência de eventos cardiovasculares adversos à deficiência de CoQ10. Esta coenzima é uma molécula antioxidante e carreadora de elétrons na cadeia respiratória naturalmente presente no organismo e nos alimentos, mas sua produção endógena é reduzida com o avançar da idade e em certas patologias, como a IC.

A IC é uma das principais causas de morbimortalidade no mundo, gerando impactos negativos na qualidade de vida do paciente. Os achados deste estudo sugerem o potencial efeito benéfico da suplementação de CoQ10 na terapia coadjuvante em pacientes acometidos pela IC, sendo o tratamento a longo prazo seguro e bem tolerado. Sua suplementação pode contribuir para a redução dos sintomas e eventos cardiovasculares adversos.

No entanto, os resultados analisados não são conclusivos devido ao pequeno número de estudos publicados sobre o tema nos últimos 10 anos e suas limitações. A falta de controle sobre a dieta dos pacientes é um fator limitante a todos os estudos analisados neste trabalho, o que pode incorrer em alterações nas análises clínicas, uma vez que uma alimentação adequada pode ter efeitos sobre o nível sérico de CoQ10 e favorecer as defesas antioxidantes do organismo, desfavorecendo o estresse oxidativo.

Estudos adicionais com maiores dimensões e melhor controle sobre a gestão do paciente, como a padronização da terapêutica medicamentosa e alimentação adequada, são necessários antes que a CoQ10 possa ser amplamente utilizada na terapêutica da IC.

REFERÊNCIAS

ALCOCER-GÓMEZ, E. et al. Effect of Coenzyme Q10 on Psychopathological Symptoms in Fibromyalgia Patients. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 188–189, 2017.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BALAKRISHNAN, P. et al. Enhanced oral bioavailability of Coenzyme Q10 by self-emulsifying drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.374, p.66-72, 2009.

CASO, G.; KELLY, P.; MCNURLAN, M. A.; LAWSON, W. E. Effect of Coenzyme Q10 on Myopathic Symptoms in Patients Treated With Statins. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 99, issue 10, p. 1409-1412, 2007.

CORDERO, M. D. et al. Can Coenzyme Q10 Improve Clinical and Molecular Parameters in Fibromyalgia? **Antioxidants & redox signaling**, v. 0, p. 1356 – 1361, 2013.

COSTA, S. et al. Estatinas e Estresse Oxidativo na Insuficiência Cardíaca Crônica. **Revista Portuguesa de Cardiologia**. v. 35, issue 1, p. 41-57, 2016

FOTINO, A. D.; THOMPSON-PAUL, A. M.; BAZZANO L. A. Effect of coenzyme Q 10 supplementation on heart failure. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 97, issue 2, p. 268-275, 2013.

GUTIERREZ, F. M. et al. Coenzyme Q 10: from bench to Clinic in Aging Diseases, a translational review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 59, p.2240-2257, 2019

HUA, Q. et al. Effects of coenzyme Q10 on statin-induced myopathy: An updated meta-analysis of randomized controlled trials. **Jornal of the American Heart Association**. v. 7, issue 19, p.1-11, 2018.

JAMES, A. M.; SMITH, R. A. J.; MURPHY, M. P. (2004). Propriedades antioxidantes e pró-oxidantes da coenzima mitocondrial Q. **Arquivos de Bioquímica e Biofísica**. v. 1, p. 47-56, 2004.

LEE, S. M. et al. Tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid selectively induces activated T cell death via intracellular GSH depletion. **Immunol. Lett.** v.132, p. 53-60, 2010.

LEI, L.; LIU, Y. Efficacy of coenzyme Q10 in patients with cardiac failure: A meta-analysis of clinical trials. **BMC Cardiovascular Disorders**. v. 17, p. 1-7, 2017.

LOPEZ, G. et al. Bioavailability of coenzyme Q10 supplements depends on carrier lipids and solubilization. **Nutrition**. v. 57, p. 133-140, 2019.

MADMANI, M. E.; YUSUF, S. A.; TAMR, A. K. et al. Coenzyme Q10 for heart failure. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. v. 6, art. N° CD008684, 2014.

MANN, D. L.; ZIPES, D. P.; LIBBY, P.; BONOW, R. O. **Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine**. 10th ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. *E-book*.

MAZUREK, J. A.; JESSUP, M. Understanding Heart Failure. **Card Electrophysiol Clin**. v. 7, n. 4, p. 557-575, 2015.

MEHRABANI, S. et al. Effect of coenzyme Q10 supplementation on fatigue: A systematic review of interventional studies. **Complementary Therapies in Medicine**. v. 43, p. 181–187, 2019.

MENDON, A. de A. M. et al. Insuficiência Cardíaca: Características Sociodemográficas e Clínicas de Pacientes. **Revista de Enfermagem UFPE**. v. 7, n. 9, p. 5383-5390, 2013.

MIZUNO, K. et al. Antifatigue effects of coenzyme Q10 during physical fatigue. **Nutrition**. v. 24, issue 4, p. 293-299, 2008.

MONTERA, V. S. P. Benefícios dos Nutrientes Antioxidantes e seus Cofatores no Controle do Estresse Oxidativo e Inflamação na Insuficiência Cardíaca. **Revista da SOCERJ**, v.20, n.1, p. 20-26, 2007.

MORTENSEN, S. A. et al. The effect of coenzyme Q10 on morbidity and mortality in chronic heart failure: results from Q-SYMBIO: a randomized double-blind trial. **JACC Heart Failure**. v. 6, p. 641-649, 2014.

MORTENSEN, A. L., ROSENFELDT F., FILIPIAK K. J. Effect of coenzyme Q10 in Europeans with chronic heart failure: A sub-group analysis of the Q-SYMBIO randomized double-blind trial. **JACC Heart Failure**. v. 2 p. 641 – 649, 2019.

PONIKOWSKI, P. et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. **European Heart Journal**. v. 37, p. 2129-2200, 2016.

SHARMA, A. et al. Coenzyme Q10 and heart failure. **Circ Hear Fail**. v. 9, p. 1-8, 2016.

SOMAYAJULU, M. et al. Role of mitochondria in neuronal cell death induced by oxidative stress: neuroprotection by Coenzyme Q10. **Neurobiology of disease**, Oxford, v.18, n.3, p.618-627, 2005.

SPINDLER, M.; BEAL, M. F.; HENCHCLIFFE, C. Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease: A review. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, Albany, v. 5, p.597-610, 2010.

VILLALBA, J. M.; PARRADO, C.; SANTOS, M.; ALCAIN, F. J. Therapeutic use of coenzyme Q10 and coenzyme Q10-related compounds and formulation. **Expert Opin Investig Drugs**. complex I, P. 535-554, 2010.

ZAKI, N. M. Strategies for oral delivery and mitochondrial targeting of CoQ10. **Drug Delivery**. v. 23, p.1868-1881, 2016.