



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria dos Anjos Aires Borges

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Professor Dr. Mário João Roque, Dr. Carlos Alberto Pereira Vaz e pela Dr. Joana Barbosa de Melo, e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria dos Anjos Aires Borges

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas,
orientado pelo Professor Dr. Mário João Roque, Dr. Carlos Alberto Pereira Vaz
e pela Dr. Joana Barbosa de Melo, e apresentado à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra.**

Julho de 2023

Agradecimentos

Foram inúmeras as pessoas e entidades que marcaram estes anos, e por isso, a elas, o meu muito obrigada.

Começo por agradecer à Universidade de Coimbra e à cidade de Coimbra por me terem recebido de braços abertos e me terem proporcionado as melhores condições de ensino.

Um agradecimento a todo o corpo docente do curso do Mestrado em Análises Clínicas, pela maneira afetuosa como interagiram comigo, em especial à Professora Ana Miguel.

Um enorme obrigada aos meus orientadores de estágio, pelo apoio e disponibilidade prestado, nomeadamente ao Dr. Mário Roque.

Em segundo, agradecer à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, pela formação excecional que me proporcionou durante três anos no decorrer da minha licenciatura em Bioquímica. Agradecer ao professor Luís Félix, é incansável comigo.

A UTAD vai ser sempre a minha casa.

Agradecer, de forma particular ao meu orientador externo, Dr. Carlos Vaz, por toda a paciência, apreço e disponibilidade que teve comigo. Vai ficar sempre no meu coração. Agradecer também à Dra. Sandra, por todos os dias ser a luz do laboratório e se rir das minhas piadas sem piada.

Agradecer à minha família, ao meu namorado e aos meus amigos por todo o apoio prestado. Agradecer à minha avó que mesmo sem saber me dá a força que muitas vezes preciso. Ao meu avô que me deu a minha maior virtude, o bom coração. Aos meus padrinhos e aos meus primos, em especial ao Diogo que foi e sempre será o meu primeiro amor. À minha mãe e ao meu pai pela possibilidade que me deram em ingressar no ensino superior e por serem a minha fonte de estabilidade e suporte de vida. Agradecer em especial à minha mãe que todos os dias me olha nos olhos e independentemente do que eu leve no coração ela diz que está ali. Agradecer à minha irmã que muitas vezes, e sem ter noção do impacto, me deu palavras de força e gestos de esperança. É e vai ser sempre o meu porto seguro.

A ti Gaspar, que me fizeste perceber a realidade da vida e a maneira certa de enfrentar tudo o que me assusta. É para sempre. Acredito que o afeto cura. Que aponta o Norte e define muito a nossa sorte. Sou rica por poder dizer que tenho na minha vida pessoas cuja existência agradeço todos os dias. Por último, agradecer à Filipa por estes 5 anos ao meu lado.

Obrigada a Deus, por as manter sempre!!!

Índice

Agradecimentos.....	i
Índice de Figuras.....	7
Índice de Tabelas.....	7
Índice de Equações.....	8
Lista de Abreviaturas.....	9
Resumo.....	13
Abstract.....	14
Introdução.....	15
Capítulo I- A citogenética como área fundamental no diagnóstico pré e pós-natal ...	17
1.1 O laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC.....	17
1.2 A Citogenética e os cromossomas.....	17
1.3 Diagnostico genético.....	18
1.4 Metodologias práticas da Citogenética Convencional.....	19
1.4.1 Amostras recebidas.....	19
1.4.2 Estabelecimento da Cultura Celular.....	19
1.4.3 Estabelecimento de cultura de Biopsia das Vilosidades Coriônicas.....	20
1.4.4 Estabelecimento de Cultura em Líquido Amniótico.....	21
1.4.5 Manipulação.....	21
1.4.6 Espalhamento.....	23
1.4.7 Bandagem.....	23
1.4.8 Análise microscópica.....	24
1.5 Casos Clínicos.....	25
Capítulo II- UNILABS Vila Real- Laboratório de Patologia Clínica do Pioledo.....	29
2.1 Laboratório de Patologia Clínica do Pioledo.....	29
2.2 Sistema da Gestão da Qualidade Laboratorial (SGQ).....	29
2.3 Controlo de Qualidade Interno (CQI) e Controlo de Qualidade Externo (CQE).....	30
2.4 Infraestrutura do Laboratório.....	30
2.5 Gestão das Amostras.....	31
2.6 Core: Bioquímica e Imunologia.....	31
2.6.1 ADVIA 1800.....	31
2.6.2 Capillarys Sebia 2.....	32
2.6.3 Heliprobe®.....	32
2.7 Bioquímica Clínica.....	32
2.7.1 Perfil Lipídico e Risco Cardiovascular.....	33

2.7.1.1 Colesterol HDL e Prevenção da Aterosclerose.....	34
2.7.1.2 Colesterol LDL e Risco Aterogénico	35
2.7.1.3 Triglicéridos.....	36
2.7.1.4 Colesterol Total.....	36
2.7.1.5 Proteína C-Reativa (PCR) e Previsão de Risco Cardiovascular	37
2.7.2 Avaliação da Função Renal.....	38
2.7.2.1 Avaliação da Função Glomerular	39
2.7.2.1.1 Ureia.....	39
2.7.2.1.2 Creatinina.....	40
2.7.2.1.3 Ácido Úrico.....	42
2.7.2.1.4 Taxa de Filtração Glomerular	43
2.7.2.1.5 Permeabilidade (Integridade) Glomerular.....	44
2.7.2.2 Avaliação da Função Tubular	45
2.7.2.2.1 Proteínas de Baixo Peso Molecular.....	46
2.7.2.2.2 Potássio (K ⁺).....	46
2.7.2.2.3 Sódio (Na ⁺).....	47
2.7.3 Metabolismo Mineral.....	48
2.7.3.1 Cálcio (Ca ²⁺).....	48
2.7.3.2 Fosfato Inorgânico (Pi)	49
2.7.4 Avaliação da Função Hepática.....	50
2.7.4.1 Lesão Colestática	50
2.7.4.1.1 Bilirrubina Direta (Conjugada) e Colestase.....	51
2.7.4.1.2 Bilirrubina Total.....	51
2.7.4.1.3 Fosfatase Alcalina.....	52
2.7.4.1.4 Gama Glutamil Transferase.....	53
2.7.4.2 Lesão Hepática e Função Hepática.....	53
2.7.4.2.1 Aspartato Aminotransferase e Alanina Aminotransferase	54
2.7.4.2.2 Albumina.....	54
2.7.5 Avaliação da Função Pancreática	55
2.7.5.1 Amilase Pancreática.....	55
2.7.5.2 Lipase.....	56
2.7.6 Metabolismo de Hidratos de Carbono	57
2.7.7 Metabolismo do Ferro	59
2.7.7.1 Transferrina.....	59
2.7.7.2 Ferro.....	59
2.8 Imunologia.....	60
2.8.1 ADVIA Centaur XP.....	60
2.8.2 Setor da Imunologia	60
2.8.3 Formatos da reação dos ensaios.....	61
2.8.4 Diagnóstico da Mononucleose Infeciosa.....	62
2.9 Hematologia.....	62
2.9.1 Hemoglobina Glicada	63
2.9.2 Hemograma.....	63
2.9.3 Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado	64

2.9.4 Velocidade de Sedimentação (VS)	65
2.10 Microbiologia	65
2.11 Casos Clínicos	67
Conclusão	71
Referências.....	73

Índice de Figuras

Figura 1 - Procedimentos laboratoriais da Citogenética Convencional.	18
Figura 2 - Preparação da amostra de Vilosidades Coriônicas de forma a estabelecer cultura. Imagem fornecida pelo LCG-FMUC.....	21
Figura 3 - Caixa com 60-80% de confluência. Imagem fornecida pelo LCG-FMUC.....	23

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Tipos de bandagem, usos e vantagens. Adaptado de [8].	24
Tabela 2 - Propriedades das lipoproteínas plasmáticas, adaptado de [16, 19].	34
Tabela 3 - Valores esperados para os níveis de Colesterol HDL. Adaptado de [21].	35
Tabela 4 - Valores esperados para os níveis de Triglicerídeos. Adaptado de [21].	36
Tabela 5 - Valores esperados para os níveis de Colesterol Total. Adaptado de [30].	37
Tabela 6 - Valores esperados para os níveis de PCR. Adaptado de [33].	38
Tabela 7 - Valores esperados para os níveis de Ureia. Adaptado de [21].	40
Tabela 8 - Valores esperados para os níveis de creatinina. Adaptado de [21].	42
Tabela 9 - Valores esperados para os níveis de Ácido Úrico. Adaptado de [21].	43
Tabela 10 - Valores esperados para os níveis de K^+ . Adaptado de [21].	47
Tabela 11 - Valore esperados para os níveis de Na^+ . Adaptado de [21].	48
Tabela 12 - Valores esperados para os níveis de Ca^{2+} . Adaptado de [21].	49
Tabela 13 - Valores esperados para os níveis de fosfato, Adaptado de [21].	50
Tabela 14 - Valores esperados para os níveis de Bilirrubina Total. Adaptado de [21].	52
Tabela 15 - Valores esperados para a Glucose. Adaptado de [21].	58
Tabela 16 - Valores esperados da Transferrina. Adaptado de [21].	59
Tabela 17 - Valores esperados para os níveis de Ferro. Adaptado de [21].	60
Tabela 18 - Diferenças entre o SI Inato e SI Adquirido. Adaptado de [59].	61
Tabela 19 - Parâmetros analisados no ADVIA CENTAUR XP.	61
Tabela 20 - Equipamentos e respetiva metodologia que fazem parte do setor de Hematologia.....	62
Tabela 21 - Parâmetros a determinar [63].	63
Tabela 22 - Parâmetros a determinar no Hemograma [63].	63
Tabela 23 - Metodologia e Parâmetros Analíticos do Equipamento Sysmex XN-1000.....	64

Tabela 24- Parâmetros de Análise e Métodos de Detecção do Equipamento Sysmex CA-600.....	65
Tabela 25- Equipamentos e tecnologia no setor da Microbiologia.....	66
Tabela 26- Achados laboratoriais.....	67
Tabela 27- Achados laboratoriais.....	69
Tabela 28- ARN VIH1, carga viral, PCR.....	69
Tabela 29- Teste confirmatório (Imunoblot), Anti VIH.....	69

Índice de Equações

Equação 1- Determinação do Colesterol HDL, adaptado de [21, 26].....	35
Equação 2- Determinação dos Triglicerídeos. Adaptado de [21, 28, 29].	36
Equação 3- Determinação do Colesterol Total. Adaptado de [21, 29, 31].	37
Equação 4- Determinação da Ureia. Adaptado de [36].	40
Equação 5- Esquematização das reções espontâneas que levam à formação da creatinina. Adaptado de [21].	41
Equação 6- Determinação da creatinina. Adaptado de [38].	41
Equação 7 - Determinação do Ácido Úrico. Adaptado de [29, 39].	42
Equação 8- Determinação da TFG. Adaptado de [22].	44
Equação 9- Determinação do fosfato. Adaptado de [21].	49
Equação 10- Determinação da Bilirrubina Direta.....	51
Equação 11- Determinação da Bilirrubina Total.....	51
Equação 12- Determinação da Fosfatase Alcalina. Adaptado de [48].	52
Equação 13- Determinação da γ -GT. Adaptado de [49].	53
Equação 14- Determinação da AST. Adaptado de [50].	54
Equação 15- Determinação da ALT. Adaptado de [51].	54
Equação 16- Determinação da Albumina. Adaptado de [52].	55
Equação 17- Determinação da P-amilase. Adaptado de [21].	56
Equação 18- Determinação da Lípase. Adaptado de [53].	57
Equação 19- Determinação da Glucose. Adaptado de [57].	58
Equação 20- Determinação do Ferro. Adaptado de [58].	60

Lista de Abreviaturas

Ac- Anticorpo

ACSS- Administração Central do Sistema de Saúde

Ag- Antigénio

Ag-HBS- Antigénio do Vírus da Hepatite B

AgNOR- Coloração com nitrato de prata das regiões organizadoras de nucléolos

ALT- Alanina aminotransferase

AMP- 2-amino-2-metil-1-propanol

Anti-HCV- Anticorpo do Vírus da Hepatite C

Apo B- Apoproteína B100

APTT- Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

AST- Aspartato aminotransferase

ATg- Anti-tiroglobulina

ATPO- Anti-peroxidase

BCG- solução verde de bromocresol

CGB- Bandas C usando hidróxido de bário e corante Giemsa

CHCM- Concentração Média de Hemoglobina Globular

c-HDL- colesterol HDL

c-LDL- colesterol LDL

CQE- Controlo de qualidade externo

CQI- Controlo de qualidade interno

CRA- Chromosome Resolution Additive

CT- Colesterol Total

CVS- Vilosidades Coriônicas

DGS- Direção Geral de Saúde

D-HDL- Direct HDL Cholesterol

DNA- Ácido desoxirribonucleico

EA- Éster de Acridina

EFLM- European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

ESGH- European Board of Medical Genetics da European Society of Human Genetics

FBS- Soro Bovino Fetal

FISH- Fluorescence In Situ Hybridization

G6D- Glucose-6-fosfato-Desidrogenase

GenQA- Genomics Quality Assessment

GLDH- Glutamato Desidrogenase
GTG/GTL- Bandas G, usando Tripsina e corante de Giemsa/Leishman
HA_{1c}- Hemoglobina Glicada
HAPO- do inglês Hyperglycemia and Adverse Pregnancy outcome
HCM- Hemoglobina Corpuscular Média
HDL- High density lipoproteins
HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana
HMG-Coa redutase- 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA reductase
HMMPS- N-(3-sulfopropil)-3-metoxi-5-metilanilina
HPLC- cromatografia líquida de alta performance
IDL- Intermediate- density lipoproteins
IDMS- Espectrometria de Massa com Diluição de Isótopos
ISE- Eléctrodo seletivo de iões
LA- Líquido Amniótico
LCG-FMUC- Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
LDL- Low-density lipoproteins
Lp(a)- Lipoproteína A
MI- Mononucleose infecciosa
NAD- Nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADH- Nicotinamida-adeninad nucleótido reduzido
NEQAS- National External Quality Assurance Scheme
NGS- Next-Generation Sequencing
NOR- Região Organizadora de Nucléolo
OMS- Organização Mundial de Saúde
Pi- Fosfato Inorgânico
PBS- Tampão fosfato salino
PCR- Proteína C-reativa
PEG- Polietilenoglicol
p-NP- p-nitrofenol
p-NPP- p-nitrofenilfosfato
PPM- Partículas paramagnéticas
PSA- Antígeno Específico da Próstata
PTH- Paratormona

RDW- Índice de Anisocitose
RIQAS- Randox International Quality Assessement Scheme
RLUs- Unidades Relativas de Luz
SGQ- Sistema de Gestão da Qualidade
T3 livre- Tri-iodotironina livre
T3- Tri-iodotironina total
T4 livre- Tiroxina livre
T4 -Tiroxina
TG- Triglicerídeos
TOOS- N-Etil-N-[2-hidroxi 3-sulfopropil]-3-metilnilina
Toxo IgG- Anticorpos IgG contra o *Toxoplasma gondii*
Toxo IgM- Anticorpos IgM contra o *Toxoplasma gondii*
TP- Tempo de Protrombina
TSH- Hormona tirotropina
VCM- Volume Corpuscular Médio
VLDL- Very low-density lipoproteins
VS- Velocidade de Sedimentação
Y-GT- Y-glutamil transferase
 β -HCG- Gonadotrofina Coriónica Humana
 μ ALB- Microalbuminúria

Resumo

No âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, pela Universidade de Coimbra, tive a oportunidade de dividir a minha experiência entre dois laboratórios: O Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (LCG-FMUC) e o Laboratório de Patologia Clínica do Pioledo, pertencente ao grupo UNILABS Portugal.

No laboratório LCG-FMUC, tive a oportunidade de aprofundar os meus conhecimentos relativamente à área da genética e da citogenética, conciliando a isto o diagnóstico pré e pós-natal. A nível do Laboratório de Patologia Clínica do Pioledo foi-me permitindo o aprofundamento e aplicação de conhecimentos teóricos e práticos apreendidos durante o mestrado, na realidade diária de um laboratório de ambulatório.

O presente relatório contém uma caracterização de ambos os laboratórios, englobando uma descrição de metodologias e procedimentos práticos, onde me foi dada a oportunidade de executar durante o período de estágio. A descrição mais pormenorizada incide sobre as áreas da Citogenética e da Bioquímica.

Palavras-Chave: Citogenética, Bioquímica, Análises Clínicas, LCG-FMUC, Laboratório de Patologia Clínica do Pioledo.

Abstract

As part of the Master's Degree in Clinical Analysis at the University of Coimbra, I had the opportunity to share my experience between two laboratories: The Laboratory of Cytogenetics and Genomics of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra (LCG-FMUC) and the Laboratory of Clinical Pathology do Pioledo, belonging to the UNILABS Portugal group.

At the LCG-FMUC laboratory, I had the opportunity to deepen my knowledge in the area of genetics and cytogenetics, combining pre- and post-natal diagnosis with this. At the Pioledo Clinical Pathology Laboratory, it allowed me to deepen and apply the theoretical and practical knowledge learned during the master's degree, in the daily reality of an outpatient laboratory.

This report contains a characterization of both laboratories, including a description of methodologies and practical procedures, where I was given the opportunity to perform during the internship period. The more detailed description focuses on the areas of Cytogenetics and Biochemistry.

Keywords: Cytogenetics, Biochemistry, Clinical Analysis, LCG-FMUC, Laboratory of Clinical Pathology of Pioledo.

Introdução

O presente relatório foi realizado no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, e reporta o estágio curricular realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Pioledo e no laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (LCG-FMUC).

O LCG-FMUC centra a sua atividade a nível do diagnóstico pré e pós-natal, através de áreas como a Citogenética Convencional, Genómica, Citogenética Molecular e Biologia Molecular.

O Laboratório de Patologia Clínica do Pioledo fornece resultados de utentes de praticamente toda a região de Trás-os-Montes e Alto Douro. Inserido num dos maiores grupos de diagnóstico da Península Ibérica, está equipado com a mais recente tecnologia e equipamento para o diagnóstico in vitro.

Este estágio teve como objetivo o aprofundamento e aplicação de conhecimentos teóricos e práticos aprendidos durante o mestrado, na realidade diária de um laboratório de ambulatório e no laboratório de genética médica.

A Citogenética Convencional é uma técnica de diagnóstico importante na medicina, especialmente no diagnóstico pré e pós-natal. Esta técnica permite a análise dos cromossomas em busca de anomalias estruturais e numéricas, que podem estar associadas a diversas condições genéticas.

Por sua vez, estima-se que 60 a 70% das decisões clínicas são baseadas em resultados laboratoriais. Deste modo o papel do laboratório clínico é essencial, sendo o rigor e o controlo analíticos pontos fulcrais pela importância informativa de que se revestem. Cabe-nos cada vez mais, não só produzir bons resultados assegurando a qualidade analítica, mas sobretudo aprimorar e fornecer elementos de decisão clínica relevantes, contribuindo para a redução do risco clínico.

A maioria das doenças orgânicas (doenças hepáticas, renais e tiroideas) por exemplo, podem ser, na maioria dos casos, identificadas apenas com recurso a exames laboratoriais. Muitas dessas doenças são assintomáticas nos estágios iniciais e, portanto, é pouco provável que sejam clinicamente detetadas. A identificação precoce de patologias assintomáticas deve permitir uma melhor monitorização da doença em si e um menor gasto nos cuidados de saúde.

Capítulo I- A citogenética como área fundamental no diagnóstico pré e pós-natal

1.1 O laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC

A atividade na área do diagnóstico pré e pós-natal no LCG-FMUC teve início na década de 90, sendo desde então coordenado pela Professora Doutora Isabel Marques Carreira. É composto por uma equipa multidisciplinar de 8 especialistas genéticos reconhecidos pela Administração Central do Sistema de Saúde (ACSS), dos quais 4 também reconhecidos como Especialistas Europeus em Genética Clínica Laboratorial, titulados pelo European Board of Medical Genetics da European Society of Human Genetics (ESGH). A nível da Gestão da Qualidade Laboratorial para além de todos os Controlos Internos de Qualidade para os parâmetros de diagnóstico efetuados, participa anualmente em diferentes programas de controlo externo de qualidade do Genomics Quality Assessment (GenQA). O LCG é também certificado pela norma ISO 9001:2015.

Os testes genéticos oferecidos à Comunidade pelo LCG incluem: Citogenética Convencional, Citogenética Molecular, Biologia Molecular, Citogenómica e NGS (Next-Generation Sequencing).

1.2 A Citogenética e os cromossomas

O início da citogenética humana é atribuído a Walther Flemming, que publicou as primeiras ilustrações de cromossomas humanos em 1882. Já em 1888, Waldeyer introduziu a palavra “cromossoma”, do grego “corpo colorido”. A citogenética foi entretanto descrita por Sutton como sendo o estudo dos cromossomas, acoplando a área da genética à área da citologia [1]. O número de cromossomas humanos é 46, sendo que os 46 cromossomas resultam de 23 pares combinados entre si. Destes 23 pares, 22 dizem respeito aos autossomas e os restantes são designados de cromossomas sexuais [1, 2].

O material nucleoproteico dos cromossomas é a cromatina, que resulta do enrolamento de uma molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico) em torno de proteínas histónicas e não histónicas. Este processo de enrolamento de DNA em torno de proteínas constitui o primeiro passo de uma série de processos de enrolamento que dão lugar ao cromossoma compactado que pode ser observado ao microscópio quando em metáfase. Enquanto as proteínas histónicas são fortemente conservadas e participam na condensação de cromossomas, as não histónicas, para além disso, podem atuar na regulação da atividade génica ou funcionar como enzimas (ex: DNA polimerase). A cromatina pode ainda existir

em diferentes formas de condensação, entre as quais temos a eucromatina, menos condensada e contendo as regiões codificantes de DNA, e a heterocromatina, mais condensada não compreendendo DNA codificante [2].

Na citogenética, o requisito mais crítico é que as células estejam vivas e tenham capacidade proliferativa, na medida em que os cromossomas são individualmente distinguíveis apenas durante o processo de divisão celular. A etapa da mitose em que se estudam os cromossomas é a metáfase, em que os cromossomas atingem o ponto máximo de condensação. Estruturalmente, um cromossoma metafásico é constituído por dois cromátídeos irmãos compostos por DNA compactado [1, 3].

I.3 Diagnóstico genético

O diagnóstico genético pode surgir em diferentes contextos, entre os quais o diagnóstico pré-natal e pós-natal.

Atualmente as metodologias para o diagnóstico genético assentam em quatro grandes áreas, a Citogenética Convencional, a Citogenética Molecular, a Biologia Molecular e a Genómica, mas nem sempre assim foi. O cariótipo surgiu na década de 70s, o cariótipo de alta resolução foi desenvolvido na década de 80s e a FISH foi implementada já nos anos 90s. A nível da genómica, desde 2010, que a análise cromossómica por arrayCGH passou a ser uma técnica de primeira linha para as alterações cromossómicas desequilibradas [2].

Os procedimentos laboratoriais da Citogenética Convencional estão esquematizados na *Figura 1*.

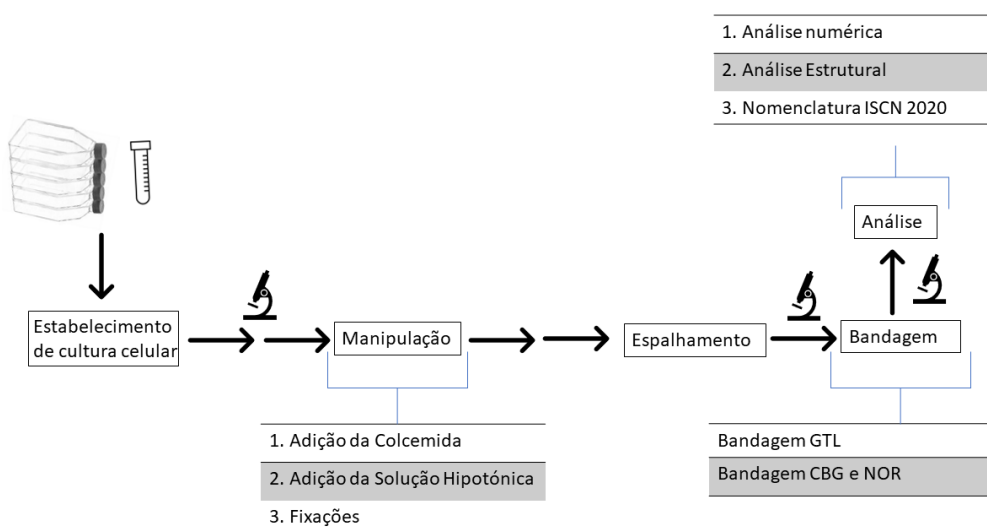


Figura 1 - Procedimentos laboratoriais da Citogenética Convencional.

1.4 Metodologias práticas da Citogenética Convencional

1.4.1 Amostras recebidas

Para o estudo da citogenética convencional e para o estudo molecular, a nível de diagnóstico pré-natal, chegam ao laboratório amostras colhidas por métodos invasivos como as vilosidades coriônicas (CVS) colhidas através de biópsia das vilosidades coriônicas e líquido amniótico (LA) colhido através da amniocentese. No âmbito do diagnóstico pós-natal chegam normalmente fibroblastos, geralmente de produtos de abortamento, e sangue periférico.

As amostras de LA chegam em condições estéreis e armazenadas em duas caixas de cultura celular. As amostras de CVS e de biópsias de pele chegam em tubos de cultura estéreis com meio de transporte específico, tubos estes preparados no laboratório e enviados para o local das colheitas. As amostras de sangue para a realização de cariótipo chegam em tubos de heparina de sódio ou lítio.

Antes do estabelecimento da cultura é feito um registo interno com os dados da amostra. As caixas são devidamente etiquetadas. No caso das amostras de LA é feita uma análise macroscópica da amostra: aspeto e volume (se límpido, turvo ou sanguinolento).

1.4.2 Estabelecimento da Cultura Celular

Todos os procedimentos no LCG-FMUC são feitos em condições de assepsia. As culturas celulares são estabelecidas numa sala própria, sala de cultura, que assegura estas mesmas condições.

São sempre estabelecidas duas linhas celulares para cada amostra, Linha A e Linha B, onde cada caixa difere no seu meio, incubadora, câmara de fluxo e operador. Os meios são enriquecidos com soro bovino fetal para que a cultura possa proliferar de forma mais rápida, contendo também agentes mitogénicos que estimulam as mitoses. O estabelecimento de duas linhas celulares é de extrema importância para assegurar que se tenha sempre crescimento e também para avaliar potenciais fenómenos de cultura que possam surgir apenas numa linha [1].

Após o início das culturas é imperativo que sejam mantidas condições ótimas de temperatura, humidade e pH até que haja um número adequado de células em divisão. A temperatura ideal de crescimento das células humanas é de 37°C, podendo ser mantidas em sistemas abertos ou fechados [1]. Normalmente as amostras de sangue periférico são

mantidas em sistemas fechados enquanto amostras de CVs e LA são mantidas em sistema aberto. O tempo entre as trocas de meios vai depender do tipo celular presente.

1.4.3 Estabelecimento de cultura de Biopsia das Vilosidades Coriônicas

A técnica de biópsia de vilosidades coriônicas é geralmente realizada entre a 10^a e 12^a semana de gestação, sendo que a principal vantagem do uso das CVs é a obtenção de tecido fetal no início da gravidez [4]. Uma das desvantagens destas amostras são os mosaicos confinados à placenta, em que cerca de 1-2% das placentas podem ter uma constituição cromossômica diferente da do embrião obrigando a clínica a prosseguir muitas das vezes para uma segunda colheita invasiva, neste caso de líquido amniótico [2].

As células cultivadas nestas amostras são os fibroblastos do core do trofoblasto que têm grande capacidade proliferativa in vitro, sendo células adequados para fins de diagnóstico citogenético [5].

No caso das CVs é também feita uma separação antes de se prosseguir para o estabelecimento de cultura, visto que normalmente estão contaminadas por partículas de sangue e de tecido materno. O processo inicia-se na câmara de fluxo fazendo-se lavagens sucessivas com tampão-salino (PBS), até retirar todo o meio de transporte limpando assim a amostra e permitindo a sua visualização à lupa. A separação é feita recorrendo ao microscópio de dissecação (ou lupa), dentro da câmara de fluxo, com a ajuda de um par de pinças. O material materno difere do material fetal por ter uma cor mais escura e aparência irregular, enquanto o fetal é de cor mais clara e aparência lisa [6]. Esta etapa é particularmente importante, já que diminui a contaminação das amostras com material materno, o que poderia afetar o correto diagnóstico. No caso das CVS, estas também têm de ser desagregadas para que seja possível a obtenção de uma suspensão celular, sendo esta suspensão obtida através de digestão enzimática com tripsina e colagenase [1].

O processo prossegue então com uma digestão em tripsina e colagenase, permitindo assim a obtenção de uma suspensão celular. Segue-se uma homogeneização no vortex de modo a obter um pellet, sendo que a este pellet é adicionado soro bovino fetal (FBS) para inibir alguma ação enzimática ainda existente. O conteúdo é distribuído pelas duas caixas de cultura, previamente identificados e com os respetivos meios para a linha A e B. Para o crescimento, as duas caixas são colocados em incubadoras distintas com sistema aberto [5]. No caso de terem sido solicitados estudos moleculares uma pequena porção é

colocada em tampão de lise para extração de DNA, sendo que, no caso de ser um feto do sexo feminino, é feito um despiste de contaminação materna.



Figura 2- Preparação da amostra de Vilosidades Coriônicas de forma a estabelecer cultura. Imagem fornecida pelo LCG-FMUC.

1.4.4 Estabelecimento de Cultura em Líquido Amniótico

O período ótimo para realizara amniocentese é entre a 15^a e a 17^a semana de gestação [4]. O estabelecimento de cultura de LA consiste em aplicar diretamente os respectivos meios das linhas A e B em cada uma das caixas de cultura, de modo a estabelecer duas culturas independentes.

No líquido amniótico encontramos os amniócitos que são células de descamação da pele fetal, bexiga, trato gastrointestinal e âmnio. Grande parte destas células está morta, sendo que por isso muitas das vezes se faz uma pequena centrifugação de modo a obter um pellet de células viáveis que vão estabelecer cultura. O sobrenadante é enviado para estudos bioquímicos, se houver solicitação para esses estudos por parte do clínico [1].

1.4.5 Manipulação

A decisão de manipular a caixa vai depender da confluência que estas apresentem quando observadas ao microscópio invertido. O ideal será entre os 60-80% de confluência (*Figura 3*), sendo que com valores inferiores pode não ser possível obter células suficientes para a realização do estudo. No caso de desbastes para DNA, aquando da necessidade de recorrer a técnicas moleculares, a confluência das caixas deve ser próxima de 100%. Nesta situação é feita uma lavagem das caixas com PBS e a destacagem das células é feita com um raspador através de um processo mecânico. No final é adicionado novamente meio nas caixas de cultura.

No caso das caixas com 60-80% de confluência dá-se início ao processo da manipulação. Esta consiste em três etapas fundamentais: (1) Adição da colcemida, (2) Adição de solução hipotónica, (3) Fixações, pontos estes esquematizados na *Figura 1*.

Primeiramente, e antes da adição da colcemida, ocorre a adição de Chromosome Resolution Additive (CRA) para que seja possível obter uma melhor resolução do padrão de bandas dos cromossomas. Após a incubação com a solução de CRA, segue-se a adição do inibidor mitótico colcemida. Esta liga-se à tubulina, impedindo a formação das fibras do fuso acromático e impedindo a migração dos cromatídeos irmãos para os polos na anáfase, interrompendo assim o ciclo celular em metáfase [1].

O segundo passo fulcral na manipulação é a adição da solução hipotónica de KCl, que tem como objetivo o intumescimento das células, permitindo assim uma melhor dispersão dos cromossomas, facilitando o seu estudo. Não se pretende que as células rebentem no choque hipotónico, mas que turjam o suficiente para só rebentarem aquando do espalhamento na lâmina [1, 7]. Ainda antes do processo de fixação ocorre o chamado processo de pré-fixação, em que são adicionadas umas gotas de fixador nas amostras com o intuito de aumentar a rigidez das membranas celulares evitando assim que as células rebentem antes do tempo desejado.

Por fim, o terceiro passo da manipulação é o processo de fixação que diz respeito à adição de 3 fixadores, compostos por uma mistura de ácido acético e metanol, intercalados com centrifugões. Esta etapa tem como objetivo remover a água das células, matando-as e preservando-as, endurecendo as membranas e a cromatina, preparando assim os cromossomas para a bandagem. Na primeira fixação as células são suspensas de forma suave no fixador. As restantes fixações podem ser feitas de forma mais rápida visto que as células já estão mais endurecidas. Aquando da adição do último fixador, o tubo é armazenado no frigorífico sendo que só é submetido a centrifugação aquando do espalhamento. Será importante referir que os fixadores deverão ser preparados no dia, visto que absorvem água diminuindo as suas propriedades [1, 7].



Figura 3- Caixa com 60-80% de confluência. Imagem fornecida pelo LCG-FMUC.

I.4.6 Espalhamento

Um bom espalhamento é a base para uma boa análise cromossômica, fornecendo metáfases bem espalhadas pela lâmina, com poucas sobreposições e desprovidas de citoplasma.

O espalhamento é feito dentro de uma câmara onde é controlada a temperatura e a humidade. Quando as células frágeis e turgidas entram em contacto com a lâmina, o fixador começa a espalhar-se e a evaporar. O tempo de evaporação influencia o espalhamento e, portanto, estas variáveis devem ser controladas pelo operador de modo a obter o melhor resultado. A humidade e temperatura com que se espalha pode variar de acordo com o tempo em que o caso tenha estado em fixador e com o a técnica de espalhamento do próprio operador [1, 7]. São espalhadas normalmente entre 4-6 lâminas sendo que o número depende do operador. As metáfases espalhadas são avaliadas ao microscópio de contraste de fase. Depois do espalhamento é feito um envelhecimento das lâminas para que os cromossomas resistam melhor à ação da tripsina.

I.4.7 Bandagem

Existem várias técnicas de bandagem, sendo as mais comuns o bandeamento GTG/GTL (bandas G, usando Tripsina e corante de Giemsa/Leishman), a bandagem reversa (bandas R), que produzem um padrão de bandas que é o inverso das bandas G, a coloração AgNOR (coloração com nitrato de prata das regiões organizadoras de nucléolos) e o bandeamento CBG (bandas C usando hidróxido de bário e corante Giemsa) (Tabela 1) [8, 9].

As bandas G são as utilizadas por rotina a nível laboratorial, sendo que, sempre que houver necessidade, técnicas de bandagem como a CBG ou AgNOR são utilizadas complementarmente à banda G.

Tabela I- Tipos de bandagem, usos e vantagens. Adaptado de [8].

Tipo de Bandagem	Corante	Análise	Usos e Vantagens
Bandas G	Leishman	Microscópio de campo claro	Identificação de todos os cromossomos e bandas;
Bandas R	Giemsa	Microscópio de campo claro	Identificação de todos os cromossomos e bandas; visualização de telómeros e pequenas bandas R positivas;
Bandas C	Leishman	Microscópio de campo claro	Identifica seletivamente a região de heterocromatina constitutiva em redor dos centrómeros, as regiões polimórficas dos cromossomas 1, 9 e 16 e o braço longo distal do cromossoma Y;
Bandagem AgNOR	Nitrato de prata	Microscópio de campo claro	Identifica as regiões organizadoras de nucléolos contendo DNAr ativo em núcleos interfásicos e locais próximos das extremidades dos braços dos cromossomos humanos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22.

1.4.8 Análise microscópica

Depois das lâminas estarem coradas, estas são enviadas para o laboratório de microscopia onde é feita a análise numérica e estrutural dos cromossomas. A análise estrutural é feita comparando o padrão de bandas dos cromossomas homólogos. A procura das metáfases é feita com a objetiva de 10x, sendo que são procuradas metáfases com os cromossomas de maior resolução e mais bem espalhados. Depois de selecionar as metáfases utiliza-se a objetiva de 100x para a realização do estudo. No estudo são avaliadas várias metáfases de modo que a estrutura de todos os cromossomas seja analisada em, pelo menos, duas metáfases [9]. A nomenclatura utilizada rege-se pelo ISCN 2020 [10].

1.5 Casos Clínicos

Caso Clínico I

Diagnóstico Pré-Natal a partir de uma amostra de CVS com 12 semanas e 4 dias e com indicação clínica de holoprosencefalia, ventriculomegalia, agnesia corpo caloso, polidactilia, onfalocelo e artéria umbilical única. Foi pedido o estudo do cariótipo.

Procedeu-se ao estudo do cariótipo, através da análise das metáfases com bandagem GTL, obtidas a partir de duas linhas de cultura de vilosidades coriônicas.

O resultado do cariótipo segundo a nomenclatura do ISCN de 2020 é:

ISCN (2020): 46,XY,+13,der(13;14)(q10;q10), ou seja, estamos perante um feto do sexo masculino com uma cópia adicional do cromossoma 13, resultante da presença de um derivativo (13;14), dando assim origem a um cariótipo com 46 cromossomas. Por se tratar de uma translocação Robertsoniana entre os cromossomas 13 e 14 os pontos de quebra são em 13q10 e 14q10. A trissomia do 13 está associada ao Síndrome de Patau, sendo que esta aneuploidia estará na origem das alterações ecográficas verificadas no feto.

A trissomia do cromossoma 13 geralmente aparece na sua forma livre, com a presença adicional de um cromossoma 13 em todas as células do corpo. Neste caso em particular, a trissomia 13 resulta da presença de uma translocação Robertsoniana entre o cromossoma 13 e o cromossoma 14 [11, 12].

As implicações deste resultado devem ser bem explicadas aos progenitores numa consulta de genética médica, utilizando linguagem compreensível e clara. Deve ser discutida condição genética, risco de recorrência, o que será espectável a nível de fenótipo pré e pós-natal, futuros estudos dos progenitores, situações de infertilidade e abortos espontâneos [1].

Clinicamente, são manifestadas muitas anomalias congénitas, entre as quais, malformações no cérebro, destacando holoprosencefalia, ventriculomegalia, agnesia do corpo caloso, hidrocefalia, cisterna magna aumentada, microcefalia e anomalias do cerebelo. Defeitos faciais da linha média, destacando lábio leporino mediano. Anomalias cardíacas, destacando defeitos do septo ventricular. Anomalias do trato genitourinário, destacando rins multiquísticos e obstrução uretral. Anomalias a nível da parede abdominal, destacando o onfalocelo. A nível das anomalias dos membros podem ser verificadas polidactilia pré e pós-axial das mãos e dos pés, sendo que neste caso pode existir

dificuldade na detecção devido à posição do feto, obesidade materna, entre outros. Muitas vezes também é verificada artéria umbilical única [1, 11].

A trissomia do 13 é quase sempre fatal durante a gravidez ou logo após o nascimento, devido às malformações complexas, tendo uma incidência de 1 em 12.000 nascidos vivos. Acredita-se que 1 em cada 1.000 indivíduos saudáveis seja portador de uma translocação Robertsoniana, herdando-a de um dos pais com fenótipo normal [1, 2, 11]. Deficiências mentais graves, falha de crescimento e convulsões são observadas naqueles que sobrevivem, sendo que só cerca de 5-10% têm um tempo de vida longo [1, 11]. O risco de recorrência é considerado baixo, sendo que para fins de aconselhamento genético é geralmente citado um risco inferior a 1% [1, 13].

A nível do estudos dos progenitores, estes devem ser feitos para se averiguar se existe uma história familiar por detrás da alteração estrutural, ou seja, verificar se algum dos progenitores é portador do der(13;14) na sua forma equilibrada, tendo assim um cariótipo de 45,XX ou 45,XY [12]. Caso algum dos progenitores seja portador, o estudo deve ser alargado aos pais do portador de forma a ser possível oferecer diagnóstico pré-natal em futuras gestações e para além disso os portadores podem recorrer a um rastreio pré-natal não invasivo, mesmo antes das 10 semanas de gestação.

Para além disso, há uma grande incidência de casos de infertilidade e abortos espontâneos nos portadores do der(13;14) [1, 13, 14]. A estes casais pode ser oferecida a procriação medicamente assistida com diagnóstico genético pré-implantatório (PGD) e no caso de homens com baixa produção de esperma pode ser utilizada a injeção intracitoplasmática que se trata de uma técnica de procriação medicamente assistida, incluída no tratamento de Fertilização in Vitro (FIV) [2].

Caso Clínico 2

Diagnóstico Pré-natal a partir de uma amostra de CVS com 12 semanas e com indicação clínica de higroma e hidrósia. Foi pedido o estudo do cariótipo.

Procedeu-se ao estudo do cariótipo, através da análise das metáfases com bandagem GTL, obtidas a partir de duas linhas de cultura da amostra de vilosidades coriônicas.

O resultado do cariótipo segundo a nomenclatura do ISCN de 2020 é:

ISCN (2020): 45,X, ou seja, estamos perante um feto do sexo feminino com a perda total de um cromossoma X, dando origem a um cariótipo com 45 cromossomas.

A monossomia do X está associada ao Síndrome de Turner, sendo que esta aneuploidia vai de encontro com as alterações ecográficas verificadas no feto.

O Síndrome de Turner é a monossomia mais comum e afeta cerca de 1/2000 nascidos vivos femininos. Cerca de 50% dos pacientes com este síndrome apresenta um cariótipo 45,X, podendo este evento verificar-se em todas as células ou na forma de mosaico, sendo que os restantes 50% apresentam alterações estruturais do cromossoma X [1, 15, 16].

As implicações deste resultado devem ser bem explicadas aos progenitores numa consulta de genética médica, utilizando linguagem compreensível e clara. Deve ser discutida a condição genética, risco de recorrência e o que será espectável a nível de fenótipo pré e pós-natal [1].

A nível da ecografia são encontrados normalmente, edema fetal difuso, higroma cístico septado, anomalias renais e cardíacas, hidrósia fetal não imune, coluna cervical curta, translucência da nuca aumentada, braquicefalia, hidroâmnio e atraso no crescimento [15]. O fenótipo é muito variável, sendo o quadro ecográfico fundamental no que ajuda a definir a situação como sendo mais grave ou menos grave. Normalmente um quadro de higroma cístico septado associado a hidrósia fetal não chega a termo, sendo oferecida a interrupção médica da gravidez.

O Síndrome de Turner é uma das anomalias cromossómicas associadas a abortos espontâneos, tendo uma elevada taxa de letalidade no útero. A maior taxa de letalidade é atingida entre as 12-13 semanas de gestação, sendo que 99.9% dos fetos morre até às 28 semanas. Especula-se que os que sobrevivem tenham algum grau de mosaicismo não detetado, para uma linha celular normal, sendo que a presença desta linha celular pode mudar as características fenotípicas da síndrome [2]. As crianças que sobrevivem, podem

apresentar baixa estatura, amenorreia primária com ausência dos caracteres sexuais secundários e falha gonadal com infertilidade, contudo outros sistemas e tecidos podem estar afetados de forma variável. O fenótipo é, portanto, muito variável sendo que as terapêuticas utilizadas também o são, alguns exemplos são dados a nível da fertilidade e da baixa estatura. A fertilidade nestas mulheres pode estar afetada de diferentes modos, podendo ser inférteis ou ter uma fertilidade diminuída, pelo que a fertilização in vitro poderá ser uma alternativa. A nível da baixa estatura, o tratamento com hormona de crescimento tem sido feito de modo a estimular o crescimento [1, 2].

De acordo com a literatura, a maioria dos casos 45,X terão origem num erro pós-zigótico, não se justificando o estudo dos progenitores. O erro pós-zigótico pode também justificar o facto de não haver uma correlação direta com a idade materna avançada, ao contrário do que é verificado nas trissomias mais comuns [1]. No caso de o ST se dever a uma alteração estrutural do cromossoma X, faria sentido estudar os progenitores de forma a poder identificar possíveis alterações na sua forma equilibrada [2].

A nível do risco de recorrência é pouco provável que pais que tiveram um filho com síndrome de Turner, voltem a ter uma gestação com a mesma aneuploidia. Estima-se que a probabilidade de gestações recorrentes com Síndrome de Turner seja semelhante à da população em geral [2, 15, 16]. A realização de um diagnóstico pré natal numa gestação futura, a ser solicitado, terá como indicação outro motivo que não o risco de recorrência de um cariótipo 45,X.

Capítulo II- UNILABS Vila Real- Laboratório de Patologia Clínica do Pioledo

2.1 Laboratório de Patologia Clínica do Pioledo

A UNILABS iniciou o seu caminho em 2006, sendo que desde aí se potenciou rapidamente utilizando uma estratégia de aquisição de parceiros/laboratórios de elevada qualidade por todo o país.

O Laboratório de Patologia Clínica do Pioledo foi fundado em 1978 e adquirido em 2014 pelo grupo Botelho Moniz. Em 2017 a UNILABS adquire a BASE HOLDING que era detentora dos laboratórios Botelho Moniz, passando assim o Laboratório de Patologia Clínica do Pioledo a fazer parte do grupo UNILABS.

No que diz respeito à equipa, esta é composta pelo diretor técnico, por 2 especialistas em análises clínicas, sendo um deles reconhecido pela EFLM (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine), e seis técnicos de análises clínicas.

Diariamente, o laboratório recebe amostras biológicas de 500-750 clientes/utentes provenientes de um total de 25 postos de colheita distribuídos pela região de Trás-os-Montes e Alto Douro. Cerca de 80% do serviço é feito nas instalações do laboratório, sendo o restante enviado para o laboratório central localizado estrategicamente na zona industrial do Porto, com o objetivo de receber amostras de todo o país, bem como de laboratórios de outros países.

2.2 Sistema da Gestão da Qualidade Laboratorial (SGQ)

A nível do Sistema da Gestão da Qualidade, o Laboratório de Patologia Clínica do Pioledo tem uma política de qualidade cuja gestão está sob a responsabilidade de um gestor da qualidade local, que responde diretamente ao diretor da qualidade do grupo UNILABS.

O laboratório está formalizado de acordo com os requisitos da Norma NP EN ISO 9001:2015 abrangendo todas as atividades realizadas (colheitas e realização de análises clínicas nas valências de microbiologia, bioquímica, hematologia, imunologia, endocrinologia laboratorial, estudo funcional dos metabolismos, órgãos e sistemas de monitorização de fármacos e toxicologia clínica), e sendo este o âmbito da certificação desta organização, desde Março de 2001.

Como software de apoio ao SGQ o laboratório utiliza o InnovWay®, software desenvolvido pela Ambidata® que permite compilar toda a gestão documental bem como registos de manutenção dos equipamentos, ocorrências, constatações, entre outros.

O laboratório está sujeito a auditorias internas trimestrais e auditoria externa anual pelo Bureau Veritas.

2.3 Controlo de Qualidade Interno (CQI) e Controlo de Qualidade Externo (CQE)

Os controlos internos são feitos diariamente na rotina do laboratório, com o objetivo de diminuir a imprecisão dos métodos analíticos garantindo assim resultados fidedignos. São usados controlos da Bio-Rad Laboratories em todos os setores do laboratório com exceção dos equipamentos da Sysmex e Capillarys 2 que utilizam apenas controlos internos dos fornecedores. A Bio-Rad permite fazer uma comparação em termos de performance analítica com outros laboratórios que utilizam o mesmo lote de controlo, através da plataforma Unity Real Time. Por defeito o CQI é feito em dois níveis (no mínimo), podendo ser um nível normal e outro patológico. Alguns parâmetros da Imunologia e coagulação são controlados diariamente em três níveis de controlo.

Para além do controlo interno o laboratório participa semanalmente em programas de controlo externo, com objetivo de avaliar a exatidão dos métodos. Está inserido no UK NEQAS e no RIQAS, estando formalizado de acordo com o Despacho n.º 10009/2019.

2.4 Infraestrutura do Laboratório

O Laboratório de Patologia Clínica do Pioledo, a nível funcional é dividido em 4 setores: O core, que diz respeito às áreas da bioquímica e imunologia, a hematologia, a coagulação e a parte da microbiologia. O sistema informático de suporte ao laboratório é o Clinidata®, desenvolvido pela MAXDATA. O Clinidata® recebe a informação do sistema operacional administrativo ARA. O conjunto destes dois softwares é designado, dentro do grupo UNILABS, como o OneLIS.

O processo analítico tem início com a chegada das amostras ao laboratório, onde é feita uma triagem, através do Clinidata®, ou no caso de malas que cheguem de postos de colheitas informatizados é feita no ARA através da leitura e descarga da mala de transporte das amostras, com a finalidade de dar entrada na unidade de produção. Procedimentos adicionais são feitos, já dentro da infraestrutura do laboratório, de acordo com o destino e pré-tratamento da amostra.

Na triagem de amostras existe o procedimento onde estão descritos e definidos pelo grupo UNILABS os critérios de rejeição de amostra. Estes critérios variam consoante o tipo de amostra bem como os parâmetros a serem determinados.

2.5 Gestão das Amostras

No final do dia todas as amostras são seladas e armazenadas durante um período definido de acordo com a estabilidade da amostra, ficando registado no sistema informático, qual a posição de cada amostra, para o caso de ser necessário efetuar uma nova determinação numa mesma amostra. Após período definido as amostras são destruídas.

2.6 Core: Bioquímica e Imunologia

2.6.1 ADVIA 1800

O autoanalisador ADVIA 1800 é um sistema automatizado de química clínica fabricado pela Siemens. Este equipamento tem como finalidade a realização de uma elevada variedade de testes de bioquímica clínica numa ampla gama de amostras biológicas, incluindo sangue total, soro, plasma e urina. O ADVIA 1800 é capaz de realizar testes de rotina especializados, incluindo ensaios enzimáticos, potenciométricos, colorimétricos e turbidimétricos, utilizando uma tecnologia de deteção ótica avançada para fornecer resultados confiáveis. Para além disso, tem capacidade de processar até 1800 amostras por hora.

Dependendo dos resultados do controlo interno, uma calibração pode ser necessária, como na mudança de lote de reagente, quando o intervalo de calibração tiver expirado, ou quando existe um desvio do CQI. Os resultados são avaliados e validados no Unity[®], plataforma que pertença à Bio-Rad. O grupo UNILABS define os critérios de aceitação de acordo com o procedimento de revisão de bancada por ele definido.

2.6.2 Capillarys Sebia 2

O sistema Capillarys Sebia 2, é um sistema de eletroforese capilar automatizado. Este sistema é utilizado para identificação de proteínas, nomeadamente proteínas séricas, com alta resolução e precisão. A grande vantagem da execução de um proteinograma é distinguir frações de proteínas e identificar os componentes principais dentro de cada fração, saber tratar amostras que tenham um padrão monoclonal, identificar amostras que requerem técnicas adicionais como imunofixação e identificar amostras que tenham padrões anormais de proteínas.

2.6.3 Heliprobe®

O sistema Heliprobe é um teste respiratório de Ureia ^{14}C adequado para a confirmação e erradicação da infeção por *Helicobacter pylori*. O sistema é composto por componentes: HeliCap™, BreathCard™ e o analisador Heliprobe®. Na presença de *Helicobacter pylori* a Ureia ^{14}C é metabolizada a dióxido de carbono e amoníaco pela urease, produzida pela bactéria. Os isótopos ^{14}C disponíveis, agora na forma $^{14}\text{CO}_2$, difundem para o sangue para serem exalados pelos pulmões. Uma resposta positiva evidencia de forma conclusiva que o paciente está infetado com *Helicobacter pylori*.

2.7 Bioquímica Clínica

A Bioquímica é o estudo da química dos processos Biológicos, sendo que estes processos envolvem a interação de duas classes fundamentais de moléculas: as macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos e os metabolitos como a glicose e o glicerol [17].

A importância da Bioquímica Clínica é fundamental a nível das Análises Clínicas, na medida em que estuda processos químicos que ocorrem no organismo humano relacionando-os com situações de saúde ou doença. Através da realização de testes bioquímicos, é possível avaliar a função de diferentes órgãos e sistemas do corpo, como é o caso do perfil lipídico que tem associado a si risco cardiovascular, a função renal com a avaliação da função glomerular e função tubular, a função hepática com avaliação da função de síntese e lesão hepatocelular, a função pancreática, o estudo de alterações no metabolismo de hidratos de carbono, entre outros.

Para a análise Bioquímica chegam ao laboratório amostras de sangue colhidas em tubos BD Vacutainer® SST® II Advance®, que contém ativador de coágulo pulverizado na parede do tubo, acelerando o processo de coagulação, com gel separador para obtenção de soro com a mais alta qualidade. Amostras de urina ocasional e das 24h, em tubos BD Vacutainer® Urinalysis Preservative Plus.

2.7.1 Perfil Lipídico e Risco Cardiovascular

Apesar dos avanços diagnósticos e terapêuticos ocorridos na última década, as doenças cardiovasculares continuam a ser a principal causa de morte a nível mundial, tendo uma contribuição de cerca de 30% do total de óbitos. No entanto, a maior parte dos seus determinantes são conhecidos e modificáveis. O estudo INTERHEART mostrou que a dislipidemia é um dos fatores de risco modificáveis mais importantes em doentes com enfarte agudo do miocárdio, comparativamente à população de controlo. O diagnóstico destas é realizado pela avaliação a nível laboratorial, do colesterol total, triglicéridos (Tg), colesterol das HDL (do inglês High Density Lipoproteins) e colesterol das LDL (do inglês Low-Density Lipoproteins) [18, 19].

A medição do perfil lipídico em jejum versus não jejum é um tema em evolução, sendo que atualmente se considera que as alterações médias máximas para níveis aleatórios sem jejum versus níveis de jejum são de +26 mg/dl para triglicéridos, -8 mg/dl para colesterol total e -8 mg/dl para LDL. O colesterol HDL não apresenta, ao que tudo indica, alterações. Embora o jejum possa ser necessário para a medição precisa de Tg, não há evidências suficientes que comprovem a necessidade de jejum para os restantes componentes do perfil lipídico [20].

As lipoproteínas são complexos macromoleculares de lípidos que cumprem a função de transporte desta biomolécula na corrente sanguínea, sendo constituídas por um core hidrofóbico e uma superfície hidrofílica (constituída por grupos e regiões polares de fosfolípidos e colesterol livre, bem como proteínas - apoproteínas ou apolipoproteínas).

As lipoproteínas são então divididas em 6 classes de acordo com a sua densidade crescente: Quilomicrons, VLDL (do inglês Very Low Density Lipoproteins), IDL (do inglês Intermediate-Density Lipoproteins), LDL e HDL [17, 21]. As propriedades das lipoproteínas plasmáticas estão evidenciadas na *Tabela 2*.

Tabela 2- Propriedades das lipoproteínas plasmáticas, adaptado de [16, 19].

	<u>Quilomicrons</u>	<u>VLDL</u>	<u>IDL</u>	<u>LDL</u>	<u>HDL</u>
Densidade (g/ml)	<0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210
Diâmetro (nm)	>70	26-70	22-24	19-23	4-10
Razão lipido/proteína	99:1	90:10	85:20	80:20	50:50
Principais lipídios	Exógenos (Tg)	Endógeno (Tg)	Endógenos (ésteres de colesterol)	Ésteres de Colesterol	Fosfolípidos
Principais proteínas	A-I B-48 C-I C-II C-III	B-100 C-I C-II C-III E	B-100 E	B-100	A-I A-II

Como referido anteriormente, o perfil lipídico é então composto por diversas frações, incluindo colesterol total, o colesterol LDL, o colesterol HDL e os Tg. As concentrações dessas frações lipídicas na corrente sanguínea podem estar relacionadas com risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, o enfarte do miocárdio e acidente vascular cerebral [21, 22].

Segundo Grundy and Feingold e White *et al.*, níveis elevados de colesterol LDL estão associados a um risco aumentado de doença cardiovascular e por outro lado níveis elevados de colesterol HDL têm sido associados a um risco reduzido de doenças cardiovasculares [23, 24].

Cointois *et al.*, enfatiza que a adição da medição da apo B ao painel lipídico de rotina, para avaliar e monitorizar pacientes com risco de desenvolver doenças cardiovasculares, seria uma mais valia, na medida em que a apo B é uma componente de todas as partículas com potencial aterogénico, incluindo VLDL, LDL, IDL e lipoproteína (a) (Lp(a)) [25].

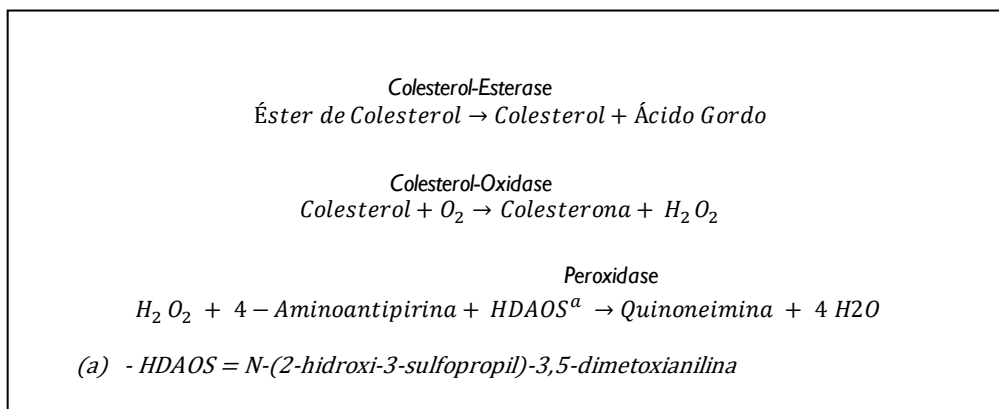
2.7.1.1 Colesterol HDL e Prevenção da Aterosclerose

As HDL têm múltiplas atividades biológicas benéficas no contexto de prevenção da aterosclerose e doenças relacionadas.

As lipoproteínas HDL, também conhecidas como “bom colesterol” são produzidas a nível do fígado e do intestino, e têm como principal função o transporte reverso de colesterol, que leva o colesterol de tecidos extra-hepáticos até ao fígado para ser excretado na forma de biliar

ou nas fezes. Para além disso, outra propriedade das HDL resulta da associação com a paraxonase que tem a capacidade de degradar as LDL oxidadas [17, 18].

O ensaio ADVIA Chemistry Direct HDL Cholesterol mede o colesterol HDL no soro e no plasma [26].



Equação I - Determinação do Colesterol HDL, adaptado de [21, 26].

Valores esperados:

Tabela 3 - Valores esperados para os níveis de Colesterol HDL. Adaptado de [21].

Tipo de Risco	Intervalo de referência
Colesterol HDL Baixo (indesejável; alto risco)	< 40 mg/dl
Colesterol HDL Alto (desejável; baixo risco)	≥ 59 mg/dl

2.7.1.2 Colesterol LDL e Risco Aterogénico

As LDL, também conhecidas como “mau colesterol”, são produzidas na corrente sanguínea (remanescentes das IDL após hidrólise dos triglicerídeos) e endocitadas a nível do fígado e outros órgãos. O processo de regulação da colesterolémia é de extrema importância e baseia-se num processo de feedback negativo quer a nível dos recetores LDL presentes na superfície das células, quer a nível da HMG-Coa redutase [17, 21].

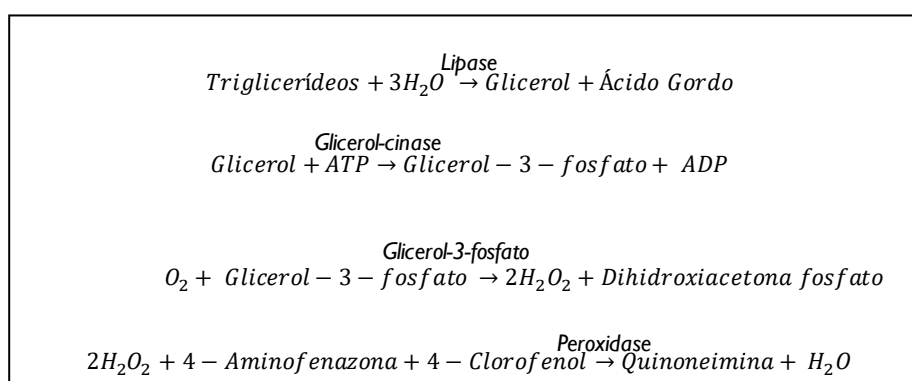
Segundo a Norma N^o 066/2011 da Direção Geral de Saúde (DGS), o diagnóstico das dislipidemias realiza-se pela avaliação laboratorial, no sangue e em jejum de 12 horas, do colesterol total (CT), Tg, c-HDL (colesterol HDL) e c-LDL (colesterol LDL) [27].

O c-LDL pode ser calculado pela fórmula de Friedewald, apenas válida para valores de triglicerídeos <400mg/dl, [c-LDL= (c-HDL + Tg/5), em mg/dl ou c-LDL = CT– (c-HDL+TG/2,2) em mmol/L] [19, 27].

2.7.1.3 Triglicerídeos

Os triglicerídeos são compostos por uma molécula de glicerol e três ácidos gordos. Na via exógena, da dieta, os triglicerídeos são transportados na forma de quilimicrons derivados do intestino. Na via endógena os triglicerídeos são transportados pelas VLDL derivadas do fígado [17, 21].

O ensaio ADVIA Chemistry Triglycerides baseia-se na reação enzimática trifásica Fossati com um ponto final Trinder. O procedimento de reagente único quantifica os triglicerídeos totais, incluindo os mono e diglicéridos e as frações de glicerol livres [21, 28, 29].



Equação 2- Determinação dos Triglicerídeos. Adaptado de [21, 28, 29].

Valores esperados:

Tabela 4- Valores esperados para os níveis de Triglicerídeos. Adaptado de [21].

Resultado	Intervalo de referência
Normal	< 150 mg/dl (< 1,70 mmol/l)
Limite de alto	150–199 mg/dl (1,70–2,25 mmol/l)
Alto	200–499 mg/dl (2,26–5,64 mmol/l)
Muito alto	≥ 500 mg/dl (≥ 5,65 mmol/l)

2.7.1.4 Colesterol Total

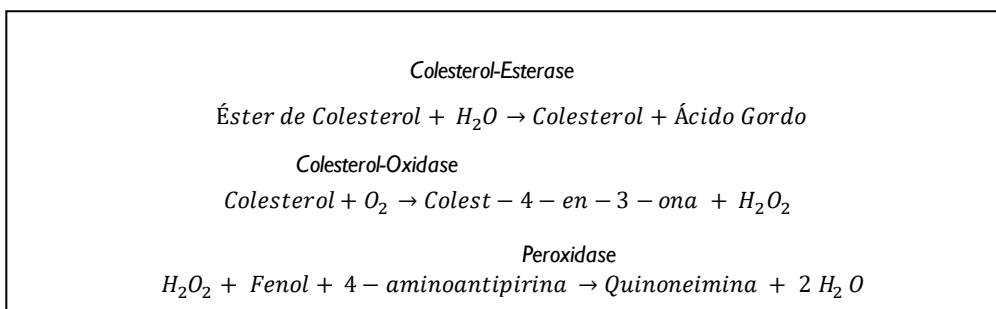
O colesterol é um lipido pertencente à classe dos esteróis que modula a fluidez das membranas celulares, sendo também precursor de hormonas esteroides como testosterona, progesterona, estradiol e cortisol. O fígado é o principal local de síntese de colesterol, apesar do intestino também ter um contributo valorizável. Um adulto com uma dieta pobre em colesterol tipicamente sintetiza cerca de 800mg de colesterol por dia [17].

Como referido anteriormente o colesterol e os triglicerídeos são transportados na corrente sanguínea na forma de lipoproteínas, sendo que a medição do colesterol total diz

respeito à medição conjunta de LDL, HDL e VLDL. O colesterol total é um indicador importante da saúde cardiovascular e juntamente com o doseamento das várias frações de lipoproteínas pode ser usado como uma medida de cálculo de risco para doenças cardiovasculares [17, 21].

Pacientes que obtenham níveis de colesterol acima de 200 mg/dl devem ver o seu valor confirmado numa segunda avaliação, sendo a média dos dois resultados usada para tomar decisões subquentes. Pacientes com colesterol alto (>240 mg/dL) devem ser submetidos à análise de lipoproteínas, sendo que neste caso a determinação do c-LDL é o foco das determinações [30].

O ensaio ADVIA Chemistry Cholesterol baseia-se num método enzimático que utiliza a conversão colesterol-esterase e colesterol-oxidase seguida de um ponto final Trinder [21, 29, 31].



Equação 3- Determinação do Colesterol Total. Adaptado de [21, 29, 31].

Valores esperados:

Tabela 5- Valores esperados para os níveis de Colesterol Total. Adaptado de [30].

Nível de Risco	Colesterol Total
Baixo (desejável)	< 200 mg/dl (< 5,18 mmol/l)
Moderado (limite)	200–239 mg/dl (5,18–6,19 mmol/l)
Alto	≥ 240 mg/dl (≥ 6,22 mmol/l)

2.7.1.5 Proteína C-Reativa (PCR) e Previsão de Risco Cardiovascular

A proteína C reativa é um marcador inflamatório, produzido a nível hepático. O aumento dos valores da PCR é inespecífico para muitos processos de doenças e não deve ser interpretado sem uma avaliação clínica completa.

Esta é comumente usada na prática clínica no auxílio da monitorização e diagnóstico de diversas doenças, nomeadamente aterosclerose. A PCR atinge o seu pico 48h após ter ocorrido um estímulo, tendo um tempo de meia vida de aproximadamente 19h.

Esta proteína liga-se às LDL, VLDL, fatores de ativação plaquetário e a fatores do complemento ativando a via clássica do complemento, contribuindo assim para a defesa contra a infecção e promovendo um processo inflamatório. O estabelecimento de um processo inflamatório crônico é fundamental para o desenvolvimento da placa aterosclerótica [32]. Deve-se concluir que a elevação da concentração plasmática de PCR não pode ser considerada "à priori" como uma causa de aterogênese, mas sim como um marcador de uma situação fisiopatológica que é favorável ao seu desenvolvimento.

O ensaio ADVIA Chemistry Wide Range C-Reactive Protein mede a PCR no soro e plasma através de um método de imunoturbidimetria reforçada com látex. Baseia-se no princípio de que a concentração de analito é uma função da intensidade de luz difusa causada pelos agregados de látex. As partículas de látex revestidas com anti-PCR são rapidamente aglutinadas na presença de PCR, levando a um aumento de turbidez. Esta turbidez é medida a 571 nm. Os valores esperados estão evidenciados na *Tabela 6*.

Valores esperados:

Tabela 6- Valores esperados para os níveis de PCR. Adaptado de [33].

Idade	Proteína C reativa
Adultos	0–0,5 mg/dl (0–5,0 mg/l)
Recém-nascidos, sangue do cordão umbilical	< 0,06 mg/dl (< 0,6 mg/l)
Bebês a partir do 4.º dia de vida até 1 mês	< 0,16 mg/dl (< 1,6 mg/l)

2.7.2 Avaliação da Função Renal

O rim é um órgão fundamental na manutenção da homeostasia do meio interno, desempenhando uma importante função excretora, sendo meio primário para a eliminação de produtos indesejáveis, como a ureia, creatinina, ácido úrico e bilirrubina. Para além da função excretora o rim tem associado a si a função metabólica de síntese de hormonas como eritropoietina, calcitriol e renina. Em situações de jejum prolongado o rim também tem a capacidade de sintetizar glicose a partir de aminoácidos e outros precursores (gliconeogénese) [21, 34].

O estudo bioquímico da função renal centra-se a nível do estudo da função dos nefrónios, que se divide em avaliação da função glomerular e avaliação da função tubular. A função glomerular compreende a capacidade de filtração e a permeabilidade glomerular. A

função tubular diz respeito à capacidade de secreção e à capacidade de reabsorção de compostos endógenos [21, 35].

2.7.2.1 Avaliação da Função Glomerular

A doença glomerular resulta habitualmente do processo de glomerulonefrite, em que há a formação de imunocomplexos que se depositam a nível do glomérulo. Esta lesão glomerular gera uma diminuição do fluxo sanguíneo, alteração da permeabilidade capilar e perda focal do endotélio e epitélio, traduzindo-se isto numa redução do débito urinário, proteinúria e hematúria. Estas alterações traduzem-se em Síndrome Nefrítica, Síndrome Nefrótica e Insuficiência Renal [35].

Como referido anteriormente, a avaliação da função glomerular divide-se na capacidade de filtração e na permeabilidade glomerular. A capacidade de filtração é avaliada através da medição da concentração plasmática de compostos azotados não proteicos como a creatinina, a ureia e o ácido úrico. Estes metabolitos são depurados do organismo pelo rim após filtração glomerular. Posto isto, dosagens das concentrações destes metabolitos em plasma ou soro são usadas como indicadores da função renal e de outras condições [21].

2.7.2.1.1 Ureia

Os aminoácidos resultantes da digestão proteica, são utilizados como unidades básicas de construção em reações de biossíntese. Contudo, os que não são necessários a nível da biossíntese são degradados em compostos que entram no ciclo da ureia.

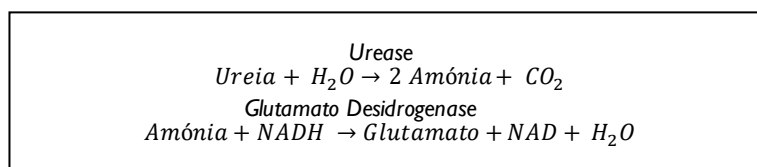
A biossíntese de ureia é realizada a partir da amónia (NH_4^+) derivada do azoto dos aminoácidos e é realizada exclusivamente por enzimas hepáticas do ciclo da ureia. Mais de 90% da ureia é eliminada pelos rins, conseqüentemente a doença renal está associada com a acumulação de ureia no sangue. Um aumento na concentração de ureia no sangue caracteriza o estado urémico.

Vários fatores extra renais influenciam a concentração de ureia circulante, o que limita o seu valor como um teste da função renal. Por exemplo, concentração sérica de ureia é aumentada por uma dieta rica em proteína, aumento do catabolismo de proteína, desidratação

e diminuição da perfusão dos rins. Posto isto, a depuração de ureia geralmente subestima a taxa de filtração glomerular (TFG) [17, 21].

No que diz respeito à determinação da ureia, os métodos químicos têm vindo a ser substituídos pelos métodos enzimáticos, devido à instabilidade dos cromogéneos utilizados [21].

O ensaio ADVIA Chemistry Urea Nitrogen baseia-se na reação enzimática de Roch-Ramel que utiliza Urease e Glutamato Desidrogenase (GLDH) [36].



Equação 4- Determinação da Ureia. Adaptado de [36].

Valores esperados:

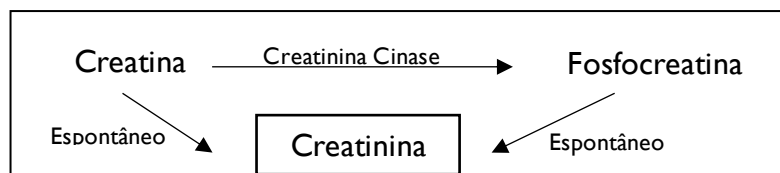
As concentrações séricas tendem a ser ligeiramente menores em crianças e em grávidas e ligeiramente maiores em homens do que em mulheres [21].

Tabela 7- Valores esperados para os níveis de Ureia. Adaptado de [21].

Idade	
Adultos saudáveis	6-20 mg/dL (2,1 a 7,1 mmol/L)
> 60 anos	8-23 mg/dL (2,9 a 8,2 mmol/L)

2.7.2.1.2 Creatinina

A creatinina é o anidrido cíclico de creatina que é produzido como produto final da decomposição da Fosfocreatina. A creatina é sintetizada nos rins, no fígado e no pâncreas por duas reações mediadas enzimaticamente, e sendo depois transportada no sangue para outros órgãos, como músculo e cérebro, onde é fosforilada para fosfocreatina, um composto de alta energia. A interconversão de fosfocreatina e creatina é uma característica particular dos processos metabólicos de contração muscular. Uma proporção da creatina livre no músculo (acredita-se que seja entre 1 e 2% ao dia) converte-se espontânea e irreversivelmente no seu produto de excreção na forma de anidrido - creatinina. Assim, a quantidade de creatinina produzida a cada dia é relativamente constante e está relacionada com a massa muscular [17, 21]. A esquematização das reações espontâneas que levam à formação da creatinina está evidenciada na *Equação da Reação 5*.



Equação 5- Esquematização das reações espontâneas que levam à formação da creatinina. Adaptado de [21].

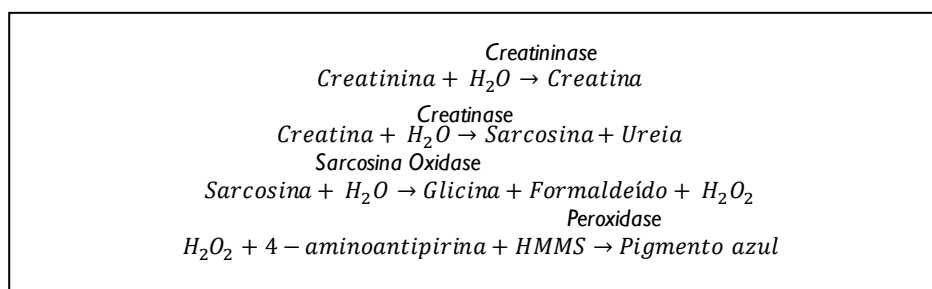
Segundo Baxmann *et al.*, é comum observar correlação entre níveis de creatinina e massa muscular, podendo os valores prevalecer dentro do intervalo de referência, apesar da insuficiência renal, em indivíduos com baixa massa muscular. Em contrapartida, a creatinina pode estar falsamente elevada em indivíduos com maior massa muscular e função renal normal [37].

A concentração sérica de creatinina é mantida dentro de limites estreitos predominantemente por filtração glomerular. Consequentemente, tanto a concentração sérica de creatinina como a sua depuração renal (“clearance de creatinina”) têm sido utilizadas como marcadores da TFG [21]. Apesar da quantificação de creatinina no soro ter sido utilizada como uma medida conveniente, esta é insensível no que diz respeito à função glomerular sendo necessário que a TFG caia para metade para que seja observado um aumento significativo de creatinina sérica [22].

A creatinina sérica é geralmente doseada utilizando-se métodos químicos ou enzimáticos. Outros métodos também têm sido utilizados, incluindo espectrometria de massa com diluição de isótopos (IDMS) e cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Em 1986 Welch descreveu um método definitivo empregando IDMS. A Cromatografia gasosa-IDMS (CG-IDMS) é agora aceita como o método de escolha para estabelecer a concentração real da creatinina no soro, devido à sua excelente especificidade e baixa imprecisão [21].

O ensaio ADVIA Chemistry Enzymatic Creatinine baseia-se na reação enzimática de Fossati, Prencipe e Berti [38].



Equação 6- Determinação da creatinina. Adaptado de [38].

Valores esperados:

Tabela 8- Valores esperados para os níveis de creatinina. Adaptado de [21].

<u>Sexo</u>	<u>Soro/Plasma</u>	<u>Urina</u>
Indivíduos do Sexo Masculino	0,6–1,1 mg/dl (53–97 $\mu\text{mol/l}$)	800–2000 mg/dia (7,1–17,7 mmol/dia)
Indivíduos do Sexo Feminino	0,5–0,8 mg/dl (44–71 $\mu\text{mol/l}$)	600–1800 mg/dia (5,3–15,9 mmol/dia)

2.7.2.1.3 Ácido Úrico

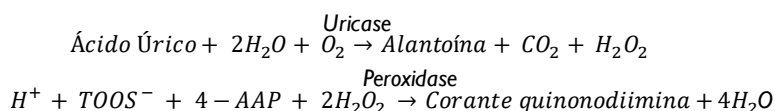
O ácido úrico é um composto orgânico produzido pelo catabolismo das purinas (adenina e guanina), sendo excretado a nível renal e a nível intestinal. Níveis elevados de ácido úrico no sangue podem levar à formação de cristais de urato em diferentes partes do corpo, incluindo as articulações. Esta condição é conhecida como hiperuricemia e pode causar uma variedade de problemas de saúde, incluindo a Gota. Apesar das purinas serem potencialmente sintetizadas e degradadas em todos os tecidos, os uratos são apenas produzidos nos tecidos que contêm xantina-oxidase, nomeadamente fígado e intestino [17].

A taxa de síntese diária de ácido úrico é de aproximadamente 400 mg. Fontes provenientes da dieta contribuem com outros 300 mg. Em pacientes com artrite gotosa e deposição tecidual de urato as reservas podem ir desde 18.000 a 30.000 mg.

Normalmente 2/3 a 3/4 de ácido úrico é excretado a nível renal, sendo o restante eliminado a nível intestinal. O trajeto do ácido úrico a nível renal é complexo e envolve quatro passos sequenciais, sendo excretado 6 a 12% da quantidade de ácido úrico filtrada [17, 21, 22].

A medição dos níveis de ácido úrico é feita frequentemente por técnicas como ácido fosfotúngstico, uricase e métodos baseados em HPLC [21].

O ensaio ADVIA Chemistry Uric Acid baseia-se na reação enzimática de Fossati que utiliza uricase com um ponto final idêntico a Trinder [29, 39].



Equação 7 -Determinação do Ácido Úrico. Adaptado de [29, 39].

Valores esperados:

Tabela 9- Valores esperados para os níveis de Ácido Úrico. Adaptado de [21].

Tipo de amostra	Intervalo de referência
Soro (Indivíduos do sexo masculino)	3,5–7,2 mg/dl (220–547 $\mu\text{mol/l}$)
Soro (Indivíduos do sexo feminino)	2,6–6 mg/dl (184–464 $\mu\text{mol/l}$)
Urina 250–750 mg/dia (1,48–4,43 mmol/dia)	250–750 mg/dia (1,48–4,43 mmol/dia)
Urina aleatória	9–63 mg/dl (530–3700 $\mu\text{mol/l}$)
Indivíduos do sexo masculino < 40 anos de idade	6–114 mg/dl (350–6700 $\mu\text{mol/l}$)
Indivíduos do sexo masculino \geq 40 anos de idade	6–71 mg/dl (350–4200 $\mu\text{mol/l}$)
Indivíduos do sexo feminino < 40 anos de idade	4–93 mg/dl (240–5500 $\mu\text{mol/l}$)
Indivíduos do sexo feminino \geq 40 anos de idade	

Uma abordagem alternativa para a interpretação das concentrações de ácido úrico plasmático é a de considerar o grau de hiperuricemia em relação ao risco de desenvolvimento de gota. Por exemplo, homens com concentrações plasmáticas de ácido úrico superiores a 9 mg/dL são aproximadamente 150 vezes mais propensos a apresentarem concomitantemente artrite gotosa do que os homens com concentrações de ácido úrico menores do que 6,0 mg/dL [21].

2.7.2.1.4 Taxa de Filtração Glomerular

A taxa de filtração glomerular é determinada através da “clearance de creatinina”, sendo por norma o indicador geral mais útil. Neste caso é feita uma avaliação da gravidade e do progresso em relação à insuficiência renal. Os testes de clearance indicam a quantidade (hipotética) de plasma completamente depurado, exclusivamente por filtração glomerular, de uma dada substância, por unidade de tempo. Em um indivíduo saudável, esta taxa é de cerca de 140 mL/min, mas varia enormemente com o tamanho do corpo, sendo normalmente normalizada para levar isto em conta. De maneira geral, a taxa é corrigida com a área de superfície corporal de 1,73 m² (logo, as unidades são mL/min/1,73 m²) [21, 22].

Recentemente, surgiram novas metodologias para a determinação da taxa de filtração glomerular, incluindo a utilização de biomarcadores como cistatina C. A cistatina C é uma proteína de baixa massa molecular que é filtrada e metabolizada após reabsorção tubular, com apenas pequenas quantidades excretadas na urina. A vantagem da utilização da cistatina, é que esta não depende da massa muscular, idade ou sexo [40, 41, 42].

A determinação da TFG implica a determinação da concentração de creatinina no plasma (P) e a concentração de creatinina na urina (U), sendo também necessário determinar o débito urinário (V) [22].

$$TFG = \frac{U \times V}{P} \times \frac{1,73m^2}{A} \text{ ml/min/1.73m}^2$$

Equação 8- Determinação da TFG. Adaptado de [22].

Como referido anteriormente, a relação matemática entre creatinina plasmática e TFG não é linear. Muitas equações foram derivadas da estimativa da TFG utilizando creatinina no plasma corrigida para sexo, tamanho do corpo, raça e idade [21].

A equação desenvolvida pelo Consórcio de Epidemiologia da Doença Renal Crónica (CKD-EPI), é atualmente a equação mais utilizada e recomendada pelas diretrizes internacionais de nefrologia. Em 2021 a equação sofreu uma atualização tendo em conta o fator raça, sendo que esta atualização não se provou ser vantajosa a nível Europeu, tendo-se concluído que o fator raça será muito provavelmente um problema restrito aos Estados Unidos [41].

No laboratório de Patologia Clínica do Pioledo a equação utilizada para a determinação da Taxa de Filtração Glomerular segue o CKD-EPI, não entrando em conta com o fator raça.

2.7.2.1.5 Permeabilidade (Integridade) Glomerular

A membrana basal glomerular, por meio da qual o sangue é filtrado, não permite normalmente a passagem de albumina e grandes proteínas. No caso de dano extenso a nível dos glomérulos, ocorre a filtração de grandes quantidades de proteína.

A permeabilidade glomerular é então avaliada através da proteinúria e também da hematúria de origem glomerular [22].

2.7.2.1.5.1 Albuminúria e Microalbuminúria (μ ALB)

A proteinúria glomerular, por vezes, é referida como albuminúria, porque a albumina é a maior proteína presente nesse caso. Os níveis elevados de albumina na urina indicam uma elevada probabilidade de ocorrência de danos na capacidade de filtração glomerular a nível renal.

Normalmente, apenas 1 a 2g/dia de albumina ultrapassam a barreira glomerular sendo que 99,9% da albumina do ultrafiltrado glomerular retorna pelos túbulos proximais do rim.

Numa população saudável, apenas uma pequena quantidade de albumina (até 10 mg/dia) é excretada na urina, sendo que aumentos ínfimos na excreção, de >30 mg/dia, indicam estágios iniciais da lesão glomerular ou tubular e risco de progressão para doença renal mais grave. No entanto, existem exceções a esta regra. Por exemplo, proteinúria foi observada como resultado de febre e exercício físico (funcional) ou relacionada a postura (ortostática). Estas alterações esporádicas causam dificuldades de interpretação quando se suspeita de uma patologia [21].

A μ ALB é a presença de albumina na urina em quantidades reduzidas, que não permitem a sua deteção por métodos convencionais. Então, a taxa de excreção urinária de albumina como microalbuminúria, varia de 30-300mg/24h utilizando metodologias muito sensíveis como os imuno-ensaios [43, 44].

O ensaio ADVIA Chemistry é um ensaio imunoturbidimétrico reforçado por polietilenoglicol. Uma amostra que contenha albumina de origem humana é adequadamente diluída e, em seguida, reage com um antisoro específico para formar um precipitado que pode ser medido de forma turbidimétrica a 340 nm [44]. O valor esperado para a μ ALB é < 30 mg/dia para a urina [21].

2.7.2.2 Avaliação da Função Tubular

Os túbulos renais são responsáveis pela filtração, reabsorção e secreção de substâncias como eletrólitos, glicose e ácido úrico, sendo que a avaliação tubular a nível laboratorial passa pelo doseamento de eletrólitos e pela capacidade de reabsorção de glicose.

2.7.2.2.1 Proteínas de Baixo Peso Molecular

Na proteinúria tubular, são encontradas na urina proteínas de baixo peso molecular, como resultado da reabsorção diminuída pelos túbulos proximais. A β 2-microglobulina e a α 1-microglobulina são pequenas proteínas filtradas pelos glomérulos e são usualmente reabsorvidas pelas células tubulares. Uma concentração elevada destas proteínas na urina é um sensível indicativo de dano celular nos túbulos renais [21, 22].

Métodos eletroforéticos e imunoensaios são metodologias mais específicas utilizadas para detetar proteinúrias tubulares, principalmente quando o aumento destas proteínas ocorre de forma isolada, sem um aumento significativo da Albumina [21].

2.7.2.2.2 Potássio (K^+)

O K^+ é o principal catião a nível intracelular. As concentrações intracelulares elevadas são mantidas pela bomba de Na^+/K^+ -ATPase, que transporta continuamente o K^+ contra um gradiente de concentração.

As exigências diárias a nível do catião rondam um aporte diário de cerca de 2,4-4,4 g/d, sendo a secreção de potássio a nível tubular um processo essencial para a regulação do equilíbrio eletrolítico no organismo. O K^+ filtrado dos glomérulos é quase completamente reabsorvido a nível proximal, sendo posteriormente secretado a nível distal em troca dos iões de Na^+ , sob influência da aldosterona [21, 45].

As causas de hipocalémia são classificadas ou como redistribuição de K^+ extracelular para o compartimento intracelular, como acontece nas situações de alcalose, ou como déficit verdadeiro de K^+ , gerado pela diminuição da ingestão ou perda de fluidos corporais ricos em potássio. Estas últimas são classificadas em perdas renais e não renais, baseadas na excreção diária de K^+ na urina. Por outro lado, a hipercalemia é resultado isolado ou em combinação de: redistribuição, aumento da ingestão ou aumento da retenção. Para além disso, condições pré-analíticas, tais como hemólise são conhecidas causas de pseudo-hipercalemia [21].

O ensaio ADVIA Chemistry Potassium baseia-se num procedimento potenciométrico indireto, utilizando um eletrodo seletivo de iões (ISE). O eletrodo seletivo de iões de potássio responde seletivamente aos iões de potássio, de acordo com a equação de Nernst [46].

Valores esperados:

Tabela 10- Valores esperados para os níveis de K^+ . Adaptado de [21].

Tipo de amostra	Intervalo de referência
Soro	3,5-5,5 mEq/l (3,5-5,5 mmol/l)
Plasma (indivíduos do sexo masculino)	3,5-4,5 mEq/l (3,5-4,5 mmol/l)
Plasma (indivíduos do sexo feminino)	3,4-4,4 mEq/l (3,4-4,4 mmol/l)
Urina (Dependendo da Dieta)	25-125 mEq/dia (25-125 mmol/dia)

2.7.2.2.3 Sódio (Na^+)

O rim desempenha um papel fundamental no metabolismo do sódio, que é um dos principais eletrólitos presentes na corrente sanguínea. O sódio é o principal catião extracelular sendo essencial para muitos processos biológicos, incluindo a regulação do equilíbrio osmótico e manutenção da homeostasia celular. A nível da dieta, diariamente são ingeridos entre 8 a 15g de NaCl (cloreto de sódio), que é quase completamente absorvido a nível intestinal. O corpo requer apenas de 1-2 mmol/dia, sendo o excesso excretado a nível renal. O Na^+ é então livremente filtrado a nível glomerular, sendo cerca de 80% reabsorvido de forma ativa a nível dos túbulos proximais. A regulação da reabsorção de sódio a nível renal envolve várias hormonas e sistemas de transporte iónico, nomeadamente sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona [21, 45].

As causas mais comuns de hiponatremia são a hiponatremia hipo-osmótica, que surge por exemplo em situações de perdas de Na^+ , hiponatremia hiperosmótica, que surge em situações de hiperglicemia severa, e hiponatremia isosmótica, onde a explicação mais provável é a de pseudo-hiponatremia causada pelo efeito de exclusão de eletrólitos (e caso a osmolaridade do plasma, a glicose e a ureia estejam dentro dos valores de referência). A hipernatremia surge principalmente associada a hipovolemia, onde a medição de Na^+ na urina e a osmolaridade são usadas para perceber a origem da perda do fluido [21].

O ensaio ADVIA Chemistry Sodium baseia-se num procedimento potenciométrico indireto, utilizando um eléctrodo seletivo de iões (ISE). O eléctrodo seletivo de iões de sódio responde seletivamente aos iões de sódio, de acordo com a equação de Nernst [46].

Valores esperados:

Tabela 11 - Valore esperados para os níveis de Na⁺. Adaptado de [21].

Tipo de amostra	Intervalo de referência
Soro/Plasma	135-146 mEq/l (135-146 mmol/l)
Urina	40-220 mEq/dia (40-220 mmol/dia)

2.7.3 Metabolismo Mineral

2.7.3.1 Cálcio (Ca²⁺)

A concentração plasmática de cálcio depende do balanço entre a deposição e reabsorção a nível do osso, da absorção a nível intestinal e da excreção que ocorre a nível renal. As principais hormonas reguladoras são a paratormona (PTH), Vitamina D (Vit D) e a calcitonina. A PTH é sintetizada a nível das glândulas paratiroides, atuando de forma direta no rim e no osso. A nível do osso aumenta a libertação de Ca²⁺ pelos osteoclastos e a nível do rim estimula a reabsorção do cálcio, a eliminação do fosfato e produção de Vitamina D que leva à absorção de Ca²⁺ a nível intestinal.

A causa mais comum da hipocalcemia é a hipoalbuminemia. Algumas condições clínicas comuns associadas com diminuição da albumina no soro incluem doença hepática crónica e Síndrome Nefrótica, por exemplo [21].

Numa situação de Insuficiência Renal Crónica, surge uma deficiência de VIT D, na medida em que o Rim não está apto a desempenhar as suas funções, apesar do estímulo recebido pela produção da PTH. A presença de hiperparatireoidismo secundário é então caracterizada por baixos níveis séricos de VIT D, valores altos de PTH e aumento da ALP no soro. Numa situação de Insuficiência Renal Crónica prolongada pode mesmo desenvolver-se osteomalacia [21, 35].

No que diz respeito à hipercalcemia, algumas causas mais comuns são as são Hiperparatireoidismo primário e Neoplasias, sendo estas duas condições responsáveis por 90-95% das condições de hipercalcemia [21, 35].

A medição do PTH em simultâneo com o doseamento do cálcio é o teste mais sensível e específico para função da paratireoide, sendo central para o diagnóstico diferencial de hipercalcemia [21, 35].

O ensaio ADVIA Chemistry Calcium mede o cálcio através de um método espectrofotométrico, baseando-se no trabalho de Michaylova e Illkova, que descobriram que o Arsenazo III forma um composto estável com cálcio, tendo alta seletividade a um pH baixo [47]. Os valores esperados são:

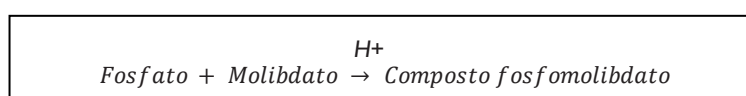
Tabela 12- Valores esperados para os níveis de Ca^{2+} . Adaptado de [21].

<u>Tipo de amostra</u>	<u>Intervalo de Referência</u>
Soro/Plasma	8,7-10,4 mg/dl (2,18-2,60 mmol/l)
Urina das 24h	100-300 mg/dia (2,50-7,50 mmol/dia)
Urina ocasional (sexo masculino)	0,9-37,9 mg/dl (0,225-9,47 mmol/l)
Urina ocasional (sexo feminino)	0,5-35,7 mg/dl (0,125-8,92 mmol/l)

2.7.3.2 Fosfato Inorgânico (Pi)

No corpo humano cerca de 90% do fosfato é armazenado no osso, na forma de hidroxiapatite (fosfato de cálcio), sendo o restante distribuído pelos tecidos moles. Este existe em diferentes formas, nomeadamente a forma orgânica, presente no trifosfato de adenosina (ATP), e a forma inorgânica, que se encontra a nível da hidroxiapatite. No plasma existe tanto como fosfato monovalente (H_2PO_4^-), como anião divalente (HPO_4^{2-}), sendo um dos mais importantes tampões fisiológicos. Para além disso, o fosfato é um ião predominantemente intracelular sendo que menos de 1% é encontrado no fluido extracelular [21].

A hipofosfatemia, em alguns casos pode surgir associada a Hiperparatireoidismo primário ou secundário, tendo em conta que a PTH aumenta a depuração renal de fosfato, para além disso também se pode verificar em situações de picos de insulina, em que há maior aporte de glucose e P para o interior da célula. No caso da hiperfosfatemia, esta ocorre principalmente devido à incapacidade de os rins excretarem fosfato, como na insuficiência renal. Um moderado aumento pode ser verificado em situações de hipoparatiroidismo (diminuição da PTH) [21, 35].



Equação 9- Determinação do fosfato. Adaptado de [21].

Valores esperados:

É importante referir que os valores de referência se dividem por grupos etários. Por exemplo, no caso das crianças, estas vão ter valores superiores pois as suas necessidades são maiores, devido ao desenvolvimento ósseo [21].

Tabela 13- Valores esperados para os níveis de fosfato, Adaptado de [21].

Amostra	Intervalo de referência
Soro/Plasma	2,4–5,1 mg/dl (0,78–1,65 mmol/l)
Urina	0,4–1,3 g/dia (12,9–42,0 mmol/dia)

2.7.4 Avaliação da Função Hepática

O fígado possui diversas funções fisiológicas, nomeadamente a síntese de bÍlis, síntese e metabolismo de proteínas, metabolismo dos hidratos de carbono e manutenção dos valores de glicémia dentro dos intervalos fisiológicos, síntese de lípidos e lipoproteínas e metabolismo e excreção de bilirrubina e sais biliares. Para além disso, o fígado metaboliza compostos endógenos e exógenos (como medicamentos e toxinas) por biotransformação, permitindo a sua eliminação [21, 34].

A nível do fígado podemos ter dois tipos de lesão: (1) lesão hepatocelular e (2) lesão colestática (diminuição/interrupção do fluxo biliar) [17, 21, 22].

No laboratório a lesão hepatocelular é avaliada através da medição de parâmetros tais como, as enzimas Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), Gama Glutamil Transferase (GGT) e Fosfatase Alcalina (ALP), bem como através do doseamento da albumina e do estudo da coagulação. A nível da lesão colestática são doseadas a bilirrubina total, a bilirrubina direta e a ALP.

2.7.4.1 Lesão Colestática

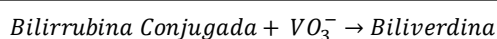
A colestase é uma diminuição do fluxo de bÍlis, implicando que os produtos não sejam excretados, levando à acumulação de bilirrubina. O acumular de bilirrubina culmina num processo denominado de icterícia. A icterícia é uma condição caracterizada por hiperbilirrubinemia e deposição de pigmento biliar na pele, em membranas mucosas e na esclerótica, resultante de uma aparência amarelada do paciente [21, 22, 34].

2.7.4.1.1 Bilirrubina Direta (Conjugada) e Colestase

A bilirrubina resulta do metabolismo do grupo heme. Este é convertido a bilirrubina no sistema reticulo endotelial (baço) sendo depois lançado para a circulação na forma de bilirrubina não conjugada (insolúvel), ligada a albumina, até ao fígado. No fígado é conjugada com ácido glucorónico, sendo posteriormente excretada para os canalículos biliares e daí para o intestino, onde é convertida em urobilinogénio que é absorvido para ser eliminado a nível da urina. Nas fezes é eliminada na forma de estercobilinogénio [21, 22].

Normalmente níveis elevados de bilirrubina conjugada estão associados a icterícia obstrutiva, resultado da obstrução dos canalículos biliares, nesta situação a taxa de formação de bilirrubina é normal, mas esta não passa da corrente sanguínea para o intestino. A bilirrubina livre ainda entra nos hepatócitos sendo sujeita a conjugação, mas é libertada para a corrente sanguínea tornando-se predominante em relação à bilirrubina livre [34].

O ensaio ADVIA Chemistry Direct Bilirubin baseia-se num método de oxidação química que utiliza o vanadato como agente oxidante.



Equação 10- Determinação da Bilirrubina Direta.

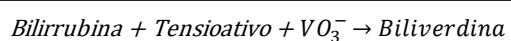
Valores esperados:

O intervalo de referência para bilirrubina direta é $\leq 0,3 \text{ mg/dl}$ ($\leq 5,1 \text{ } \mu\text{mol/l}$) [21].

2.7.4.1.2 Bilirrubina Total

A importância da determinação da bilirrubina total surge na medida em que permite saber a concentração da bilirrubina não conjugada. O aumento desta na corrente sanguínea pode estar associada, por exemplo, a processos hemolíticos onde a função do excretora do fígado não está comprometida, mas a hemólise ocorre de forma tão rápida que o fígado não tem capacidade de conjugação [34].

O princípio de ensaio do ADVIA Chemistry Total Bilirubin baseia-se na oxidação do vanadato



Equação 11- Determinação da Bilirrubina Total.

Valores esperados:

Tabela 14- Valores esperados para os níveis de Bilirrubina Total. Adaptado de [21].

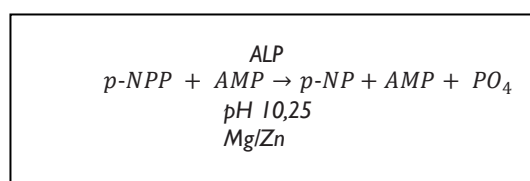
<u>Idade</u>	<u>Valor esperado</u>
Dia	< 8,0 mg/dl 137 µmol/l
1–2 dias	< 12,0 mg/dl 205 µmol/l
3–5 dias	< 16,0 mg/dl 274 µmol/l
> 5 dias–60 anos	0,3–1,2 mg/dl 5–21 µmol/l
60–90 anos	0,2–1,1 mg/dl 3–19 µmol/l
> 90 anos	0,2–0,9 mg/dl 3–15 µmol/l

2.7.4.1.3 Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina é uma enzima membrana dos ductos biliares. Uma lesão a nível dos ductos induz um aumento da síntese da enzima sendo um marcador de dano colestático. Apesar disso, a fosfatase alcalina apresenta inespecificidade de substrato (está presente em outras localizações anatómicas como osso, rim e intestino). Algumas vezes, a causa do aumento da atividade de fosfatase alcalina no sangue não é conhecida de imediato, sendo que uma elevada concentração de GGT pode sugerir que o fígado é a fonte do aumento de fosfatase alcalina. Clinicamente, as medidas da ALP séricas são particularmente valiosas na investigação da doença hepatobiliar e na doença óssea associada à atividade aumentada de osteoblastos [21, 22].

O ensaio ADVIA Chemistry Alkaline Phosphatase baseia-se no procedimento de referência primário para a medição da atividade catalítica da fosfatase alcalina a 37°C, tal como descrito pela International Federation of Clinical Chemistry. O método da fosfatase alcalina baseia-se num procedimento publicado por Bowers e McComb [48].

Equação da reação:



Equação 12- Determinação da Fosfatase Alcalina. Adaptado de [48].

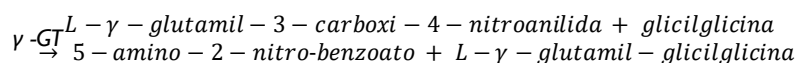
Valores esperados:

A atividade da ALP no soro varia com a idade. As crianças apresentam maior atividade de ALP do que adultos saudáveis como resultado do vazamento da ALP óssea dos osteoblastos durante o crescimento ósseo. Os valores de referência para homens adultos e mulheres em pré-menopausa são de 43 a 115 U/L e 33 a 98 U/L, respectivamente.

2.7.4.1.4 Gama Glutamil Transferase

A GGT está presente (em abundância decrescente) no túbulo renal proximal, fígado, pâncreas e intestino. A nível hepático é uma enzima membranar presente nos ductos biliares e também a nível dos hepatócitos (em menor escala). O seu aumento acompanhado do aumento da fosfatase alcalina é indicador de lesão colestática. Caso o seu aumento seja conjunto com as transaminases pode ser indicador de lesão hepatocelular. Para além disso é uma enzima que é induzida pelo consumo de álcool e drogas, tal como a fenitoína [21, 22].

O ensaio ADVIA Chemistry Gamma-Glutamyl Transferase baseia-se no procedimento descrito por Shaw *YhU'z*[49].



Equação 13- Determinação da γ -GT. Adaptado de [49].

Valores esperados:

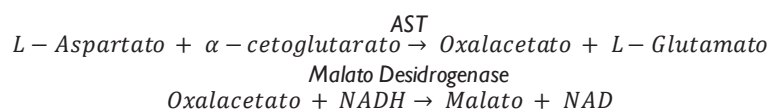
O intervalo de referência para gama-glutamil transferase é < 73 U/l para indivíduos do sexo masculino e < 38 U/l para indivíduos do sexo feminino [21].

2.7.4.2 Lesão Hepática e Função Hepática

A lesão hepática é avaliada pelo aumento das transaminases enquanto a função de síntese é avaliada pela albumina e tempo de protrombina.

2.7.4.2.1 Aspartato Aminotransferase e Alanina Aminotransferase

A AST e a ALT são exemplos de aminotransferases de interesse clínico. As causas mais importantes do aumento da atividade destas enzimas no soro são as doenças hepáticas. Na maior parte dos tipos de doença hepática, a atividade de ALT é maior do que a atividade de AST, exceções podem ser encontradas em hepatite alcoólica, cirrose e neoplasia hepática [21]. O ensaio ADVIA Chemistry Aspartato Aminotransferase é um ensaio IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) modificado [50].

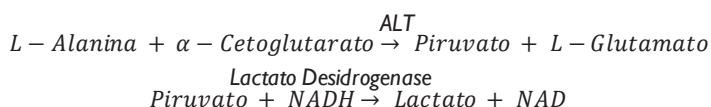


Equação 14- Determinação da AST. Adaptado de [50].

Valores esperados:

O intervalo de referência para aspartato aminotransferase para adultos < 60 anos de idade do sexo masculino é < 35 U/l e para adultos < 60 anos de idade do sexo feminino é < 31 U/l [21].

O ensaio ADVIA Chemistry Alanina Aminotransferase é um ensaio IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) modificado [51].



Equação 15- Determinação da ALT. Adaptado de [51].

Valores esperados:

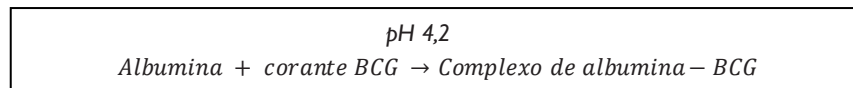
O intervalo de referência para alanina aminotransferase é para um adulto do sexo masculino é <45 U/l e para um adulto do sexo feminino é <34 U/l [21].

2.7.4.2.2 Albumina

A albumina é a proteína plasmática mais abundante, representando mais de metade da massa de proteína do plasma. Esta é a principal responsável pela pressão oncótica coloidal no espaço vascular. Quando as concentrações de albumina são diminuídas, eleva-se a tendência

para que fluido ocupe os espaços extravasculares e produza edema. A doença hepática pode traduzir uma diminuição na concentração de albumina na medida em que esta é sintetizada pelas células do parênquima hepático. Nesta situação a função de síntese hepática está afetada. É importante referir que existem diversas situações que levam a hipoalbuminemia, como por exemplo perda urinária, perda gastrointestinal e desnutrição [21].

O ensaio ADVIA Chemistry Albumin Reagent baseia-se no método de Doumas, Watson e Biggs e utiliza solução verde de bromocresol (BCG) como corante de fixação [52].



Equação 16- Determinação da Albumina. Adaptado de [52].

Valores esperados:

O intervalo de referência para albumina é 3,5–5,2 g/dl para adultos entre os 20 e os 60 anos [21].

2.7.5 Avaliação da Função Pancreática

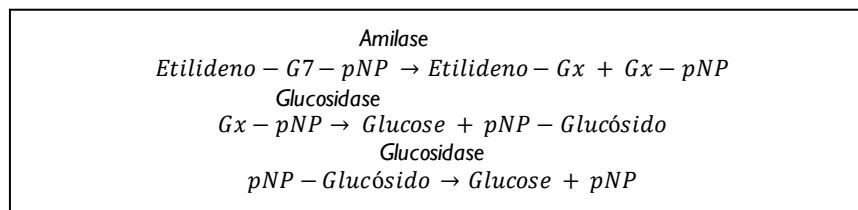
Os biomarcadores de soro mais comuns para a investigação de doença pancreática, mais especificamente de pancreatite aguda, são as enzimas digestivas amilase e lipase. O pâncreas é uma glândula mista com uma função endócrina (secreção de insulina, glucagona e somatostatina) e uma porção exócrina com secreção de suco pancreático (do qual fazem parte a amilase e a lipase) [21].

2.7.5.1 Amilase Pancreática

A amilase cliva ligações glicosídicas α -1,4 em polissacarídeos, apresentando atividade máxima na presença de brometo e cloreto. Esta enzima é excretada pelos rins, sendo a única enzima plasmática que pode aparecer na urina de forma fisiológica. É encontrada em vários órgãos e tecidos, estando maioritariamente a nível das glândulas salivares e pâncreas. No caso de pancreatite aguda o seu aumento ocorre entre 5-8h após o início da sintomatologia. Devido à baixa especificidade da amilase total no diagnóstico de pancreatite aguda surgiu a medida direta da P-amilase (Amilase Pancreática) apresentando uma especificidade de 90% (quando 3x superior ao Limite Superior da Normalidade).

O método Amilase Pancreática mede a atividade da amilase pancreática em soro de origem humana através da reação enzimática da amilase com as isoformas não pancreáticas bloqueadas pelos anticorpos.

Apesar de apenas os métodos baseados na inibição seletiva de Amilase Salivar (S-amilase) por anticorpos monoclonais mostrarem precisão, confiabilidade, praticabilidade e velocidade analítica para serem clinicamente úteis, foram verificados resultados falso positivos de P-amilase reportados em indivíduos com macroamilasemia, nos quais a Ig complexada à amilase diminui/impede a ligação de anticorpos monoclonais incluídos no teste para inibir eficientemente a S-amilase [21].



Equação 17- Determinação da P-amilase. Adaptado de [21].

Valores esperados:

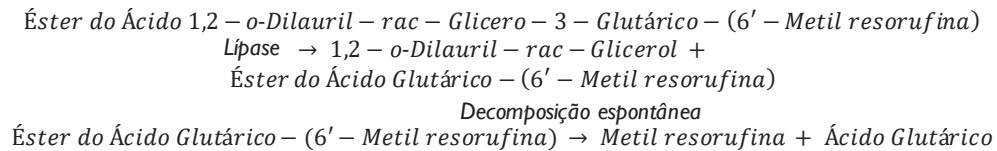
Os valores esperados para este método são 13 – 53 U/l [21].

2.7.5.2 Lipase

A lipase humana tem origem predominantemente pancreática, estando presente em concentração 5000 vezes superior no pâncreas do que em outros tecidos. Esta atua no duodeno na presença de sais biliares e colipase, clivando ligações éster dos carbonos 1 e 3 dos Tg. Neste caso, esta não é excretada a nível renal, sendo totalmente reabsorvida pelos túbulos renais.

O doseamento da lipase séria é o marcador recomendado para o diagnóstico de pancreatite aguda, apresentando uma especificidade e sensibilidade que variam entre 80-100%. Após um ataque de pancreatite aguda, a atividade sérica de LPS aumenta em 4 a 8 horas, atingindo o seu pico após 24 horas e decresce entre 7 e 14 dias [21].

O ensaio ADVIA Chemistry Lipase mede a atividade da enzima lipase no soro e no plasma pela reação enzimática da lipase, produzindo metil resorufina, a qual é determinada espectrofotometricamente [53].



Equação 18- Determinação da Lípase. Adaptado de [53].

Valores esperados:

O intervalo de referência para lípase em adultos é <38 U/l [21].

2.7.6 Metabolismo de Hidratos de Carbono

O metabolismo dos hidratos de carbono, é um processo complexo que ocorre no corpo humano de forma a fornecer energia às células. Este processo envolve várias etapas, desde a ingestão de carboidratos na dieta até à sua conversão em glicose para utilização celular. A concentração de glicose no sangue é mantida dentro de um intervalo relativamente estreito sob diversas condições (de alimentação, jejum ou exercício severo) por hormonas tais como a insulina, glucagon e epinefrina. A alteração mais frequentemente encontrada no metabolismo de carboidratos é a alta concentração de glicose no sangue devido a *Diabetes mellitus* [17, 21, 22].

Segundo a Norma nº 002/2011 da DGS, o diagnóstico de diabetes é feito com base nos seguintes parâmetros e valores para plasma venoso na população em geral [54]:

- a) Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl (ou $\geq 7,0$ mmol/l);
- b) Sintomas clássicos + glicemia ocasional ≥ 200 mg/dl (ou $\geq 11,1$ mmol/l);
- c) Glicemia ≥ 200 mg/dl (ou $\geq 11,1$ mmol/l) às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75g de glicose;
- d) Hemoglobina glicada A_{1c} (HbA_{1c}) $\geq 6,5\%$.

A classificação da diabetes envolve principalmente a existência de quatro tipos clínicos, etiologicamente classificados como Diabetes tipo 1, Diabetes tipo 2, Diabetes Gestacional e Outros tipos específicos de diabetes.

A diabetes tipo 1 resulta da destruição das células β dos ilhéus de Langerhans do pâncreas, com insulinopenia absoluta, passando a insulinoterapia a ser indispensável para assegurar a sobrevivência. Na maioria dos casos, a destruição das células dá-se por um mecanismo autoimune, pelo que se denomina diabetes tipo 1 auto-imune.

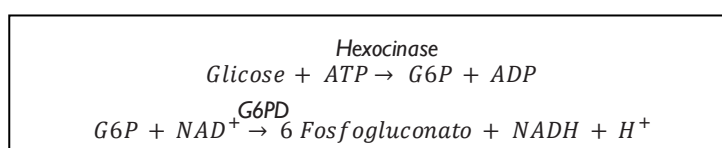
A diabetes tipo 2 é a forma mais frequente de diabetes, resultando da existência de insulinopenia relativa, com maior ou menor grau de insulinorresistência. Corresponde a cerca de 90% de todos os casos de diabetes e, muitas vezes, está associada a obesidade, principalmente abdominal, a hipertensão arterial e a dislipidemia. A diabetes tipo 2 é clinicamente silenciosa na maioria dos casos e é diagnosticada frequentemente em exames de rotina ou no decurso de uma hospitalização por outra causa.

A diabetes gestacional corresponde a qualquer grau de anomalia do metabolismo dos hidratos de carbono documentado, pela primeira vez, durante a gravidez [54, 55].

Os critérios de diagnóstico recomendados para a diabetes gestacional são baseados nos resultados do estudo Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO), sendo que um valor da glicemia em jejum (de 8 a 12 horas) superior ou igual a 92 mg/dl mas inferior a 126 mg/dl faz o diagnóstico de diabetes gestacional. Caso o valor da glicemia seja inferior a 92 mg/dl, a grávida deve ser reavaliada entre as 24 e 28 semanas de gestação com uma PTOG com 75 g de glicose.

A prova consiste na ingestão de uma solução contendo 75 g de glicose diluída em 250-300 ml de água, sendo necessárias colheitas de sangue para determinação da glicemia plasmática às 0, 1h e 2h após a sobrecarga oral de glicose. Na hora 0 são de esperar valores de glicemia < 92 mg/dl, após 1h < 180mg/dl e após as duas horas são de esperar valores < 153 mg/dl. Um valor igual ou superior às glicemias referidas anteriormente é suficiente para o diagnóstico de Hiperglicemia na Gravidez [56].

O princípio do ensaio utilizado na determinação dos níveis de glucose é a Hexocinase [57].



Equação 19- Determinação da Glucose. Adaptado de [57].

Valores esperados:

Tabela 15- Valores esperados para a Glucose. Adaptado de [21].

Tipo de amostra	Intervalo de referência
Soro/Plasma	Adulto: 74–106 mg/dl (4,1–5,9 mmol/l)
	Recém-nascido 1 dia: 40–60 mg/dl (2,2–3,3 mmol/l)
	Recém-nascido > 1 dia: 50–80 mg/dl (2,8–4,4 mmol/l)
	Criança: 60–100 mg/dl (3,3–5,6 mmol/l)
Urina	< 0,5 g/dia (< 2,78 mmol/dia)

2.7.7 Metabolismo do Ferro

A quantidade de ferro no corpo é em média de 4 a 5g, com cerca de 65% na forma de hemoglobina. O ferro é absorvido a nível intestinal, sendo que rapidamente se combina com a apotransferrina, no plasma sanguíneo, dando origem à transferrina que está encarregue do seu transporte. O armazenamento está a cargo da ferritina e hemossiderina [21].

2.7.7.1 Transferrina

O ferro é transportado no plasma pela proteína transportadora apotransferrina. O complexo apotransferrina/Ferro férrico (Fe^{3+}) é chamado de transferrina. Normalmente, \approx 2,5 mg de ferro está presente no plasma. Quando a transferrina se liga ao recetor de transferrina nas células, o complexo transferrina/recetor é internalizado num endossoma que se torna acidificado, de forma a libertar o ferro a partir da transferrina e reduzindo-o ao estado ferroso (Fe^{2+}) [21].

A medição da concentração de transferrina tem uma boa correlação com a medição da capacidade total de transporte de ferro e é útil na avaliação dos níveis globais de ferro. O ensaio ADVIA Chemistry TRF é um ensaio imunoturbidimétrico reforçado por polietilenoglicol.

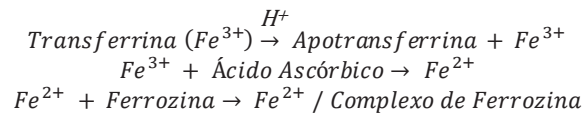
Valores esperados:

Tabela 16- Valores esperados da Transferrina. Adaptado de [21].

Sexo	Intervalo de Referência
Indivíduos do sexo masculino	215–365 mg/dl (2,15–3,65 g/l)
Indivíduos do sexo feminino	250–380 mg/dl (2,50–3,80 g/l)

2.7.7.2 Ferro

O ferro é libertado a partir da transferrina em condições ácidas e é reduzido ao seu estado ferroso para combinar com um cromogénio para medição colorimétrica, sendo determinado através do método da Ferrozina [58]. Esta medição é utilizada no diagnóstico e tratamento de anemias por deficiência de ferro e hemocromatose.



Equação 20- Determinação do Ferro. Adaptado de [58].

Valores esperados:

Tabela 17- Valores esperados para os níveis de Ferro. Adaptado de [21].

População	Intervalo de referência
Indivíduos do Sexo Masculino	65–175 µg/dl (11,6–31,3 µmol/l)
Indivíduos do Sexo Feminino	50–170 µg/dl (9,0–30,4 µmol/l)

2.8 Imunologia

2.8.1 ADVIA Centaur XP

O Sistema de Imunoensaio Siemens ADVIA Centaur XP consiste num analisador imunológico desenvolvido pela Siemens Healthineers, com um rendimento de até 240 testes por hora. Este sistema é utilizado para a deteção quantitativa de marcadores imunológicos em amostras de sangue, soro ou plasma, como hormonas, proteínas e anticorpos. O ADVIA CENTAUR XP utiliza a tecnologia de quimiluminescência direta utilizando éster de acridina (EA), sendo capaz de incluir uma ampla gama de ensaios imunológicos, nomeadamente função tiroidea, testes de fertilidade, testes de marcadores tumorais e testes de doenças infecciosas como é o caso do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

2.8.2 Setor da Imunologia

Ao setor da imunologia chegam amostras de soro colhidas em tubos BD Vacutainer® SST® II Advance®, sendo avaliados diversos parâmetros analíticos, de acordo com os requisitos médicos, evidenciados na *Tabela 19*. A *Tabela 18* evidencia algumas diferenças entre o Sistema Imunitário (SI) Inato e SI Adquirido.

Tabela 18- Diferenças entre o SI Inato e SI Adquirido. Adaptado de [59].

Sistema Imunológico Inato	Sistema imunológico adquirido
Primeira linha de defesa	Última linha de defesa (resultado da persistência do Ag)
Mecanismos celulares e bioquímicos prontos a atuar mesmo antes de haver infecção	Desenvolve-se em resposta à infecção
Reação contra produtos/padrões microbianos	Expansão clonal de linfócitos específicos para Ag;
Incapacidade para distinguir pequenas diferenças entre os agressores	Capacidade para acompanhar a proliferação microbiana
Respostas semelhantes em encontros repetidos com o mesmo agressor	Adapta-se à infecção, tendo diversidade, memória e tolerância ao próprio

2.8.3 Formatos da reação dos ensaios

O sistema DVIA Centaur XP aplica os princípios de ligação dos anticorpos do imunoensaio utilizando diversos formatos, nomeadamente o formato tipo sanduíche, o formato competitivo e o formato de captura de anticorpos. Os parâmetros analisados no ADVIA CENTAUR XP estão evidenciados na *Tabela 19*.

Tabela 19- Parâmetros analisados no ADVIA CENTAUR XP.

Parâmetros	Princípio do Ensaio	Utilidade Diagnóstica
Sífilis	Tipo “sanduíche”	Marcadores de doença Infeciosa
Ag-HBs	Tipo “sanduíche”	
HIV 1 e HIV 2	Tipo “sanduíche”	
Anti-HCV	Tipo “sanduíche”	
T3 livre (Tri-iodotironina livre)	Tipo competitivo	Função da Tiróide
T4 livre (Tiroxina livre)	Tipo competitivo	
T3 (Tri-iodotironina total)	Tipo competitivo	
T4 (Tiroxina)	Tipo competitivo	
TSH (Hormona tireotropina)	Tipo “sanduíche”	
Anti-tiroglobulina (ATg)	Tipo competitivo	Avaliação de Anemias
Anti-peroxidase (ATPO)	Tipo competitivo	
Ferritina	Tipo “sanduíche”	
Folatos	Tipo competitivo	Défices Vitamínicos
Vitamina B12	Tipo competitivo	
Vitamina D	Tipo “sanduíche”	Marcador tumoral da próstata
Psa livre e total	Tipo “sanduíche”	
B-HCG total	Tipo “sanduíche”	Fertilidade

2.8.4 Diagnóstico da Mononucleose Infeciosa

Para além das análises mencionadas anteriormente, no laboratório de Patologia Clínica do Pioledo também é feito o diagnóstico de Mononucleose Infeciosa (MI), utilizando um teste rápido que deteta ac heterófilos da mononucleose, de modo qualitativo em sangue total, soro ou plasma.

A MI é causada pelo vírus Epstein-Barr, o qual pertence à família dos vírus herpes e sendo o diagnóstico feito com base na presença de ac heterófilos. Os ac heterófilos da mononucleose infecciosa são da classe IgM, estando presentes entre 80-90% de casos de de IM aguda e podendo ser detetados entre 60-70% dos pacientes durante a primeira semana da doença crítica [61, 62].

O Clearview[®]IM II é um teste simples que utiliza um extrato de eritrócitos bovinos para detetar, de modo qualitativo e seletivo, ac heterófilos em sangue total, soro ou plasma, numa questão de minutos.

2.9 Hematologia

Ao setor da Hematologia chegam amostras colhidas em tubos BD Vacutainer[®] K3EDTA, que contêm um aditivo de tripotássico EDTA, atuando como anticoagulante. Este tubo é utilizado para a determinação de parâmetros em que seja necessário o uso de sangue total, nomeadamente o KIT para a deteção de anticorpos heterofilos, HgA_{1c}, hemograma e velocidade de sedimentação, entre outros. Para o estudo da coagulação chegam amostras colhidas em BD Vacutainer[®] Citrate Tubes que contêm citrato de sódio como anticoagulante.

Os equipamentos utilizados no setor da Hematologia estão evidenciados na *Tabela 20*.

Tabela 20- Equipamentos e respetiva metodologia que fazem parte do setor de Hematologia.

Equipamento	Tecnologia
Hb9210 da Menarini	Cromatografia Líquida de Elevada Performance por Afinidade ao Boronato
Sysmex XN-1000	Método de Sulfato Lauril de Sódio sem cianeto; Citometria de Fluxo e Impedância e Foco hidrodinâmico
Sysmex CA-600	Deteção foto-ótica de coágulos
Ves-Matic Cube 200	Deteção ótica

2.9.1 Hemoglobina Glicada

As proteínas são frequentemente glicadas durante várias reações enzimáticas quando as condições são fisiologicamente favoráveis. Contudo, no caso da hemoglobina, a glicação ocorre pela reação não enzimática entre a glicose e a extremidade N-terminal da cadeia β , que forma uma base de Schiff. Durante o rearranjo, a base de Schiff é convertida em produtos Amadori, dos quais o mais conhecido é o HbA_{1c}. A HbA_{1c} tem mostrado ser uma ferramenta muito útil, importante e robusta na monitorização da Diabetes, sendo considerada padrão de ouro para avaliar o controlo glicémico em pessoas com diabetes [62].

O equipamento Hb9210 da Menarini analisa amostras de sangue e quantifica a HbA_{1c}, sendo importante para o acompanhamento de utentes diabéticos, porque permite avaliar os níveis médios de glicose sanguínea nos últimos 2-3 meses.

2.9.2 Hemograma

O hemograma é um dos marcadores mais importantes no diagnóstico médico e na rotina de exames de sangue, indicando a presença de certas doenças, como a anemia, cancro, infeções bem como de condições fisiológicas graves, como hemorragias e desidratação [63]. Os parâmetros a determinar estão evidenciados na *Tabela 21* e *Tabela 22*.

Tabela 21- Parâmetros a determinar [63].

<u>Parâmetros a determinar</u>	
Eritrócitos	Quantificação; Conteúdo; forma; Tamanho; Relação eritrócitos/plasma
Leucócitos	Quantificação; Sub-tipos, Granularidade, Segmentação
Plaquetas	Quantificação; Granularidade; Tamanho; Agregados

Tabela 22- Parâmetros a determinar no Hemograma [63].

Parâmetros do Hemograma

Hemoglobina (Hg)

Hematócrito

VCM (Volume Corpuscular Médio)

HCM (Hemoglobina Corpuscular Média)

CHCM (Concentração Média de Hemoglobina Corpuscular)

RDW (índice de anisocitose)

O Sysmex XN-1000 é um analisador hematológico com capacidade de processar 100 amostras por hora, permitindo uma análise hematológica quantitativa, de identificação, de análise percentual de sinalização de componentes do sangue (eritrócitos, leucócitos, plaquetas). Este equipamento realiza análises hematológicas usando as metodologias de: Foco hidrodinâmico, método de citometria de fluxo (com laser semiconductor) e Sulfato Lauril de Sódio sem cianeto. A Metodologia e Parâmetros Analíticos do Equipamento Sysmex XN-1000 estão evidenciadas na *Tabela 23*.

Tabela 23- Metodologia e Parâmetros Analíticos do Equipamento Sysmex XN-1000.

Metodologia	Parâmetros Analíticos
Método de Sulfato Lauril de Sódio sem cianeto	Hemoglobina
Cirtometria de Fluxo	Diferencial leucocitário; Granulócitos imaturos; Reticulócitos; Eritrócitos nucleados; Fração imatura dos reticulócitos; Contagem das plaquetas fluorescentes; Fração imatura;
Impedância e Foco hidrodinâmico	Contagem de eritroblastos; Hematócrito; Contagem de plaquetas por impedância;

2.9.3 Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

A hemostase é um processo fisiológico complexo que protege o sistema vascular de uma lesão, com reparação de tecidos e restabelecimento de funções. O processo de hemostase envolve três mecanismos distintos. Inicia-se com a hemostase primária, seguindo-se a coagulação ou hemostase secundária e terminando com a fibrinólise.

O Tempo de Protrombina (TP) indica a eficiência da via extrínseca, permitindo determinar deficiências congênitas ou adquiridas de fatores das vias extrínseca (VII) e comum (X, V, II, X e fibrinogénio) [64].

O Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (APTT), mede o tempo de coagulação do plasma, depois da ativação dos fatores de contacto (sem adição de fatores tecidulares) indicando globalmente a eficácia da “via intrínseca” (XII, XI, IX, VIII) e comuns (X, V, II e fibrinogénio). O APTT é um teste importante a nível clínico-patológico, principalmente a nível das coagulopatias, nomeadamente hemofilia A e B com défices ou anormalidades dos fatores VIII e IX, respetivamente [64].

O equipamento Sysmex CA-600 é um instrumento automático e compacto de análise de coagulação. Possui a capacidade de realizar 5 testes de coagulação, imunológicos ou cromogénicos em simultâneo. Os parâmetros de análise e métodos de deteção do Equipamento Sysmex CA-600 estão representados na *Tabela 24*.

Tabela 24- Parâmetros de Análise e Métodos de Deteção do Equipamento Sysmex CA-600.

<u>Parâmetro</u>	<u>Nome do teste</u>	<u>Metedologia</u>
Tempo de Protrombina	PT	Método de Coagulação
Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada	APTT	Método de Coagulação

2.9.4 Velocidade de Sedimentação (VS)

A velocidade de sedimentação é um teste comum a nível da hematologia que permite indicar e monitorizar um aumento na atividade anti-inflamatória causada por uma ou mais condições como doenças auto-imunes, Mieloma Múltiplo, tumores, entre outros.

Superficialmente os eritrócitos têm carga negativa, o que faz com que estes estejam naturalmente num estado de repulsão. Um aumento nas proteínas plasmáticas (presentes em condições inflamatórias) potenciará a formação de rouleaux, que se depositam mais prontamente do que os glóbulos vermelhos isolados. A formação de rouleaux permite que os eritrócitos se depositem em uma taxa mais rápida, aumentando assim a VS [65].

O equipamento Ves-Matic Cube 200 utiliza tecnologia de deteção ótica para determinar o nível de sedimentação dos eritrócitos.

2.10 Microbiologia

No setor da microbiologia são processados urinas e espermogramas, sendo os restantes produtos biológicos enviados para o laboratório central.

A nível dos espermogramas é feito um screening, sendo avaliados fundamentalmente a mobilidade dos espermatozoides e o seu número. No que diz respeito ao processamento das urinas, todas elas são doseadas no Sysmex UC-350 e UF-4000 (*Tabela 25*). Algum cross-check entre estes dois equipamentos é indicativo para visualização manual ao microscópio, com avaliação do sedimento urinário.

De acordo com o pedido do médico prescritor, algumas são inoculadas em meio CLED e colocadas na estufa a 37°C durante 24h. O meio CLED Agar (Agar de cistina lactose deficiente em electrólitos) é um meio de cultura para diferenciação para utilizar no isolamento e enumeração de bactérias da urina. Este meio suporta o crescimento de agentes patogénicos e contaminantes urinários, mas evita a proliferação indevida de espécies de *Proteus* devido a ausência de eletrólitos [66].

Após o período de 24h é avaliado o crescimento bacteriano em placa.

As negativas são automaticamente lançadas no sistema informático do laboratório e as positivas seguem para o laboratório central onde é feita identificação e antibiograma.

Tabela 25- Equipamentos e tecnologia no setor da Microbiologia.

<u>Equipamentos</u>	<u>Tecnologia</u>
UC-3500	Método de fotometria por reflectância e refratometria
UC-4000	Citometria de fluxo fluorescente com laser semiconductor azul ($\lambda=488\text{nm}$) e foco hidrodinâmico

O UC-3500 da Sysmex é um equipamento automatizado e eficiente que pode realizar essa análise com precisão e eficiência, auxiliando os profissionais de saúde no diagnóstico e tratamento de doenças do trato urinário. Por sua vez a utilização do analisador automatizado UF-4000, com a técnica de citometria de fluxo, é um avanço significativo na urinálise, permitindo a identificação e quantificação precisa de células e outras características da urina. Isso possibilita um diagnóstico mais preciso e rápido de doenças do trato urinário e renal, além de proporcionar uma análise mais completa e confiável da amostra de urina.

A utilização de analisadores de sedimento urinário automatizados pode oferecer vantagens em relação à microscopia manual de contraste de fase, como a redução do tempo de processamento e a padronização dos resultados. Além disso, a utilização de analisadores automatizados de sedimento urinário pode ser uma opção viável para laboratórios com alto volume de amostras e que buscam maior eficiência e redução de erros. Apesar disso o *statndard gold* continua a ser a visualização microscópica.

Um estudo realizado por Langlois *et al.*, mostrou que a citometria de fluxo automatizada tem uma sensibilidade e especificidade maior na deteção de alterações na urina do que a leitura automatizada de tiras de teste. Também neste mesmo estudo, a citometria de fluxo automatizada revelou-se capaz de detetar e quantificar com maior precisão a presença de células e elementos anormais na urina, tais como glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e cilindros [67].

2.11 Casos Clínicos

Caso Clínico 3

Indivíduo do sexo masculino de 73 anos de idade com histórico de ligeiro aumento dos valores de creatinina sérica (1,43mg/dl) e ácido úrico (7,6 mg/dl) desde setembro de 2021 (Tabela 26). Os achados analíticos em setembro de 2021 não revelaram aumentos de Antígeno Específico da Próstata (0,23 ng/ml).

Tabela 26- Achados laboratoriais.

Parâmetros	27/02/23	04/10/22	01/09/21
HgA_{1c} (< 5.7%)	7,2	6,6	6,6
Creatinina Sérica (0,6-1,2 mg/dl)	1,49	1,43	1,13
Ácido Úrico (3,5-7,2 mg/dl)	ND	6,7	7,6
Ureia (17-49 mg/dl)	47	47	42
K⁺ (3,5-5,1 mmol/l)	ND	4	3,9
Triglicerídeos (<150 mg/dl)	ND	113	130
Colesterol total (< 200mg/dl)	ND	143	148
Urianálise	Proteína (++-)	Proteína (++-)	Proteína (++-)
Creatinina na urina 24h (0,8-2g/24h)	1,158	ND	ND
Microalbuminúria na urina das 24h (<30mg/24h)	2177	ND	ND
Proteínas totais na urina 24h (<150mg/24h)	3860	ND	ND

ND= Não Determinado

De acordo com os achados laboratoriais a hipótese diagnóstica será Síndrome Nefrótica que surge como resultado de Diabetes *melittus*, associada a nefropatia diabética. Segundo Alicic et al., o controle intensivo da glicemia no início da Diabetes exibe um efeito favorável de longa duração sobre o risco de desenvolvimento de nefropatia diabética [68].

Neste caso, o diagnóstico diferencial teria de ser feito entre a Insuficiência Renal e o Síndrome Nefrótico. A hipótese de Insuficiência Renal é descartada devido aos valores de ureia e creatinina não indicarem falência a nível tubular.

A Síndrome Nefrótica caracteriza-se por proteinúria intensa, sobretudo albuminúria (>3,5g nas 24 horas), com hipoalbuminemia, hipercolesterolemia e desenvolvimento de edema. A anormalidade primária é a perda de albumina na urina, devido a alteração da permeabilidade glomerular, levando a baixa albumina sérica e baixa pressão oncótica sérica, com consequente aumento da síntese hepática de apolipoproteínas e potenciando fenômenos de dislipidemia e edema [35, 68, 69].

Sendo assim, a proteinúria é o que distingue os estados edematosos devido a doença renal das outras doenças às quais esteja associada a condição de edema [35].

Neste caso clínico em particular, a dislipidemia não se verifica, muito provavelmente devido ao facto de o utente estar sobre um possível tratamento com Estatinas, daí os valores de colesterol total e triglicéridos não serem elevados. Para além disso não temos dados referentes ao exame físico do paciente nem aos níveis de albumina sérica, não sendo possível afirmar que o senhor apresenta hipoalbuminémia e edema.

Caso Clínico 4

Indivíduo do sexo feminino com 31 anos e serologia HIV-1/HIV-2 positiva e Toxoplasmose positiva a 24/06/22. Os testes serológicos, sugeriam um caso pouco comum, onde a paciente poderia apresentar uma infecção causada por mais do que um agente infeccioso.

Foram feitos dois testes adicionais, o imunoblot e pesquisa de genoma viral do HIV-1, com ambos resultados negativos. Posteriormente, a 14/04/23, já numa condição de grávida a serologia HIV-1 e HIV-2 volta a dar positiva, sendo repetidos os mesmos testes que voltam a ser negativos (Tabela 27,28 e 29).

Tabela 27- Achados laboratoriais.

<u>Parâmetros</u>	<u>14/04/23</u>	<u>06/12/22</u>	<u>17/10/22</u>	<u>24/06/22</u>
HIV-1 E HIV-2 (serologia)	7,9 (<0,9) Positivo	Não determinado	Não determinado	10,5 (<0,9) Positivo
Imunoblot HIV	Não detetado	Não Determinado	Não Determinado	Não detetado
RNA HIV-1	Não detetado	Não Determinado	Não Determinado	Não detetado
Toxo IgG	120	128,5	159,2	236,9 (<6,4)
Toxo IgM	0,9	1,3	1,3	1,8 (<0,9)
B-HCG	Positivo	Não Determinado	Não Determinado	Negativo

Tabela 28- ARN VIH1, carga viral, PCR.

HIV 1 (carga viral)	< 0,17
Interpretação HIV	Não detetado

Tabela 29- Teste confirmatório (Imunoblot), Anti VIH.

P31 (HIV1, peptídeo)	Negativa
gp169	Negativa
P24	Negativa
gp41	Negativa
gp36	Negativa
gp140	Negativa

De acordo com os achados laboratoriais existe uma forte possibilidade de se tratar de uma reação cruzada. Poder-se-ia relacionar este facto com a presença de Ac anti-Toxoplasma, mas a bula do fornecedor do equipamento referente ao teste utilizado, não faz referência a qualquer tipo de reação cruzada que esteja evidenciada no perfil analítico obtido. A nível da literatura científica não foram encontrados estudos que comprovem uma possível reação de reatividade cruzada entre HIV e Toxoplasma.

Contudo, um estudo realizado por Lin *et al.*, conclui que a reatividade cruzada em pacientes com testes de screening reativos para HIV é cerca de 0,10%, tendo maior incidência

com o aumento da idade dos pacientes estudados (> 66 anos). Para além disso refere também que as reações de falsos positivos são diferentes de acordo com o espectro de doença associado a cada paciente, sendo que em 5 deles depois de ser implementado o tratamento para a patologia associada os testes de screening para HIV são negativos [70].

A condição de grávida poderia ser uma possível causa de reatividade cruzada. Em um estudo realizado por Güler *et al.*, não foram detetadas cargas virais em mulheres grávidas com teste screenig positivo. Posto isto, qualquer amostra que dê positivo num teste screening ELISA, deve ver o seu resultado confirmado pelo teste do ácido nucleico [71]. Neste caso em particular a condição de grávida, muito provavelmente, não será a causa da reatividade cruzada, na medida em que a utente já apresentava teste de screening positivo a 24/06/22.

A pesquisa de uma possível doença autoimune poderia ser sugerida de forma a perceber a condição que está por de trás da reação cruzada, visto que doenças autoimunes são associadas a resultados falso positivos para o HIV [71].

Ultimamente, a nível da literatura, têm surgido estudos a nível da reatividade cruzada entre HIV e o vírus SARS-COV 2, tendo concluído que devido a semelhanças estruturais a nível da proteína *spike* há possibilidade de ocorrência de reatividade cruzada, dando origem a resultados falso positivos [72].

Conclusão

No decorrer do estágio realizado no LCG-FMUC, foi-me possível compreender que a Citogenética tem um papel fulcral no que ao diagnóstico pré-natal diz respeito. Esta permite-nos detetar alterações equilibradas, detetar mosaicos e mesmo inferir a percentagem de mosaicismo. Apesar dos avanços tecnológicos a Citogenética Convencional é fundamental quando queremos detetar alterações numéricas dos cromossomas, quando queremos estudar a história familiar de uma alteração cromossómica estrutural ou quando queremos confirmar uma alteração cromossómica. Este estágio permitiu-me adquirir conhecimentos, competências técnicas, espírito crítico sobre a abordagem metodológica e forma de reportar resultados, mas sobretudo consciência da responsabilidade e rigor que são necessários para a obtenção de um diagnóstico correto. Foi um estágio extremamente desafiante e enriquecedor na minha formação, superando completamente as minhas expectativas.

No laboratório de Patologia Clínica do Pioledo foi-me permitido concluir que o contributo do laboratório de Análises Clínicas é essencial nos atuais e mais recentes cuidados de saúde, uma vez que os testes de diagnóstico in vitro desempenham um papel fulcral na previsão e suscetibilidade de doenças, no estabelecimento de medidas preventivas eficazes, no diagnóstico sobretudo numa fase precoce, no prognóstico e monitorização de doenças, bem como para personalizar terapias e melhorar os resultados. A identificação precoce de doenças, principalmente em indivíduos assintomáticos, permite uma melhor gestão e utilização dos recursos públicos e privados [73]. Como disciplina médica e como profissão, foi-me também possível perceber que a medicina laboratorial, sofre pouca visibilidade e pouco reconhecimento pelo esforço em comparação com outras áreas da medicina. Os profissionais de laboratório, são muitas vezes desvalorizados e reconhecidos como “técnicos de equipamentos” sem qualquer posição na partilha do valor clínico do resultado. Daí a questão central “Que caminhos devemos seguir para nos tornarmos relevantes para a saúde?” [74].

Uma das principais conclusões, permitiu-me perceber que ainda estão por enfrentar grandes desafios, como a necessidade de uma especialização cada vez maior dos profissionais de laboratório, o aparecimento de inovações tecnológicas, a exploração da ciência de dados, otimização dos sistemas de Gestão da Qualidade. Foi importante perceber que por trás das sofisticadas tecnologias de automação, existem processos químicos e enzimáticos que desempenham um papel essencial no doseamento quer direto quer indireto de parâmetros. A compreensão destes processos é fundamental para o sucesso das análises clínicas, pois permite uma visão aprofundada que favorece o conhecimento técnico e permite uma interpretação mais crítica dos resultados obtidos.

Referências

1. KEAGLE, M.B. [et al.] - The Principles of Clinical Cytogenetics: Second Edition. Humana Press. (2005).
2. GARDNER, R.J.M. [et al.] - Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. Oxford University Press. (2018).
3. WANNER, G. [et al.] - A new chromosome model. J Struct Biol. 132(2): (2000) 147-161 .
4. GONZALES, P.R. [et al.] - Overview of Clinical Cytogenetics. Curr Protoc Hum Genet, (2016). 89: (2016) 8.1.1-8.1.13.
5. JACKSON, L. [et al.] - Preparation of metaphase spreads from chorionic villus samples. Curr Protoc Hum Genet. Chapter 8: (2001) Unit 8.3.
6. BREMAN, A. [et al.] - Preparation of chorionic villus samples for metaphase chromosome analysis and chromosomal microarray analysis. Curr Protoc Hum Genet. 8 (2012) 8.3.1-8.3.9.
7. LAWCE, H.J. [et al.] - Cytogenetics: an overview, in The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. 4 (2017) 25-85.
8. SCHERECK, R.R. [et al.] - Chromosome Banding Techniques. Current Protocols in Human Genetics. 4 (1994) 4.2.1-4.2.36.
9. SILVA, M. [et al.] - European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. European Journal of Human Genetics : EJHG vol. 27,1 (2019) 1-16.
10. Nomenclature, I.S.C.o.H.C. [et al.] - ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. 2020: Karger.
11. CHEN, C.-P. [et al.] - Prenatal Sonographic Features of Trisomy 13. Journal of Medical Ultrasound. 15 (2007) 58-66.
12. PLAIASU, V., [et al.] - Clinical relevance of cytogenetics to pediatric practice. Postnatal findings of Patau syndrome - Review of 5 cases. Maedica (Bucur). 5(2010) 178-185.
13. ENGELS, H., [et al.] - Genetic counseling in Robertsonian translocations der(13;14): frequencies of reproductive outcomes and infertility in 101 pedigrees. Am J Med Genet A,. 146a (2008) 2611-2616.
14. SAEED, S., [et al.] - A Familial Case of Robertsonian Translocation 13;14: Case Report. Cureus,. 14 (2022) e29430.
15. POLIVKA, B. [et al.] - Sonographic Prenatal Diagnosis of Turner Syndrome. Journal of Diagnostic Medical Sonography. 31 (2014) 99-102.

16. LARIZZA, D. [et al.] - Familial occurrence of Turner syndrome: casual event or increased risk? J Pediatr Endocrinol Metab. 24 (2011) 223-225.
17. BERG, J.M. [et al.] - Biochemistry. 6^a Ed. W. H. Freeman 2010. ISBN: 1429277793.
18. YUSUF, S. [et al.] (2004) - Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. Lancet. 364 (2004) 937-952.
19. REINER, Z. [et al.] - ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). Eur Heart J. 32 (2011) 1769-818.
20. NORDESTGAAR, B.R. [et al.] - A Test in Context: Lipid Profile, Fasting Versus Nonfasting. J Am Coll Cardiol. 70 (2017)1637-1646.
21. WU, A.H.B. - Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests. Saunders/Elsevier. (2015).
22. GAW, A. [et al.] - Bioquímica Clínica. Elsevier Brasil. (2015).
23. GRUNDY, S.M. [et al.] - Guidelines for the Management of High Blood Cholesterol, in Endotext, K.R. Feingold, et al., Editors. (2000), MDTText.com, Inc. Copyright © (2000-2023), MDTText.com, Inc.: South Dartmouth (MA).
24. WHITE, J. [et al.] - Association of Lipid Fractions With Risks for Coronary Artery Disease and Diabetes. JAMA Cardiol. 1 (2016) 692-699.
25. CONTOIS, J.H. - Apolipoprotein B and cardiovascular disease risk: position statement from the AACCC Lipoproteins and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. Clin Chem. 55 (2009) 407-419.
26. OKADA, M. [et al.] - Direct measurement of HDL cholesterol: method eliminating apolipoprotein E-rich particles. J Clin Lab Anal. 15 (2001) 223-229.
27. PORTUGAL. Norma n° 066/2011 da Direcção-Geral da Saúde - Prescrição de Exames Laboratoriais para Avaliação de Dislipidemias no Adult. Lisboa: DGS, 2015.
28. FOSSATI, P. [et al.] - Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. Clin Chem. 28 (1982) 2077-2080.
29. TRINDER, P. - Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor. Annals of Clinical Biochemistry. 6 (1969) 24-27.
30. Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. The Expert Panel. Arch Intern Med. 148 (1988) 36-69.

31. ROESCHLAU, P. [et al.] - Enzymatic determination of total cholesterol in serum. Z Klin Chem Klin Biochem. 12(1974) 226.
32. ABD, T.T. [et al.] - The role of C-reactive protein as a risk predictor of coronary atherosclerosis: implications from the JUPITER trial. Curr Atheroscler Rep. 13 (2011) 154-161.
33. KINDMARK, C.O. - The concentration of C-reactive protein in sera from healthy individuals. Scand J Clin Lab Invest. 29 (1972) 407-11.
34. HALL J.E. [et al.] - Tratado de Fisiologia Médica. 12ªED. Elsevier Inc. 2011. ISBN: 978-1-4160-4574-8.
35. PINTO, A. - Fisiopatologia-Fundamentos e Aplicações (cover). 2013. ISBN: 9789897520082.
36. ROCH-Ramel, F. - An enzymic and fluorophotometric method for estimating urea concentrations in nanoliter specimens. Analytical Biochemistry. 21 (1967) 372-381.
37. BAXMANN, A.C. [et al.] - Influence of muscle mass and physical activity on serum and urinary creatinine and serum cystatin C. Clin J Am Soc Nephrol. 3 (2008) 348-354.
38. FOSSATI, P. [et al.] - Enzymic creatinine assay: a new colorimetric method based on hydrogen peroxide measurement. Clin Chem. 29 (1983) 1494-1496.
39. FOSSATI, P. [et al.] - Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. Clin Chem. 26 (1980) 227-231.
40. BAXMANN, A.C. - Influence of muscle mass and physical activity on serum and urinary creatinine and serum cystatin C. Clin J Am Soc Nephrol. 3 (2008) 348-354.
41. DELANAYE, P. [et al.] - The new, race-free, Chronic Kidney Disease Epidemiology Consortium (CKD-EPI) equation to estimate glomerular filtration rate: is it applicable in Europe? A position statement by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). Clinical chemistry and laboratory medicine. 61 (2022) 44-47.
42. SHLIPAK, M.G. [et al.] - Cystatin C versus creatinine in determining risk based on kidney function. N Engl J Med. 369 (2013) 932-943.
43. PRASAD, R.M. [et al.] - Microalbuminuria, in StatPearls. StatPearls Publishing Copyright © (2023), StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
44. FIELDING, B.A. [et al.] - Enzyme immunoassay for urinary albumin. Clin Chem. 29 (1983) 355-7.

45. MUNÓZ-Durango, N. [et al.] - Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System beyond Blood Pressure Regulation: Molecular and Cellular Mechanisms Involved in End-Organ Damage during Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci.* 17 (2016) 797.
46. EISENMAN, G. - Glass Electrodes for Hydrogen and Other Cations: Principles and Practice. Illustrated. George Eisenman, 1967. ISBN: 0608179672, 9780608179612.
47. MICHAYLOVA, V. [et al.] - Photometric determination of micro amounts of calcium with arsenazo III. *Analytica Chimica Acta.* 53 (1971) 194-198.
48. BOWERS, G.N.J. [et al.] - A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clin Chem.* 12 (1966) 70-89.
49. SHAW, L.M. [et al.] - International Federation of Clinical Chemistry, (IFCC), Scientific Committee, Analytical Section. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 4. IFCC method for gamma-glutamyltransferase [(gamma-glutamyl)-peptide: amino acid gamma-glutamyltransferase, EC 2.3.2.2]. *J Clin Chem Clin Biochem.* 21 (1983) 633-646.
50. SCHUMANN, G. [et al.] - IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clin Chem Lab Med.* 40 (2002) 725-733.
51. SCHUMANN, G. [et al.] - IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. *Clin Chem Lab Med.* 40 (2002) 718-24.
52. DOUMAS, B.T. [et al.] - Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. *Clin Chim Acta.* 31 (1971) 87-96.
53. TIETZ, N.W. [et al.] - Lipase in serum-the elusive enzyme: an overview. *Clin Chem,* 39 (1993) 746-56.
54. PORTUGAL. Norma nº 002/2011 da Direcção-Geral da Saúde - Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. Lisboa: DGS, 2011.
55. WORLD HEALTH ORGANIZATION. - Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation. Part I, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva : WHO, 1999.

56. HAPO STUDY COOPERATIVE RESEARCH [et al.] - Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. The New England journal of medicine. 358 (2008) 1991-2002.
57. BERGMEYER, H.U. - Methods of Enzymatic Analysis. 2^a Ed. University of Michigan: Hans Ulrich Bergmeyer, 2008. ISBN: 978-0-12-091302-2.
58. ARTISS, J.D. [et al.] - Spectrophotometric study of several sensitive reagents for serum iron. Clin Biochem. 14 (1981) 311-315.
59. AROSA, F.A. [et al.] - Fundamentos De Imunologia. 2^a Ed. Brasil: Lidel, 2012. ISBN: 978-972-757-856-6
60. HICKEY, S.M. [et al.] - What every pediatrician should know about infectious mononucleosis in adolescents. Pediatr Clin North Am. 44 (1997) 1541-1556.
61. LINDE, A. - Diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. Scand J Infect Dis Suppl. 100 (1996) 83-8.
62. SHERWANI, S.I. [et al.] - Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. Biomark Insights. 11 (2016) 95-104.
63. CELKAN, T.T. - What does a hemogram say to us? Turk Pediatri Ars. 55 (2020) 103-116.
64. PORWIT Anna [et al.] - Blood and Bone Marrow Pathology E-Book. 2^a Ed., Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier, 2011. ISBN: 9780702031472.
65. TIHKOWSKI, K. [et al.] - Erythrocyte Sedimentation Rate. StatPearls. (2023), StatPearls Publishing Copyright© (2023), StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
66. MACKEY, J.P. [et al.] - Diagnosis of Urinary Infections. Br Med J. 1 (1966) 1173.
67. LANGLOIS, M.R. [et al.] - Automated Flow Cytometry Compared with an Automated Dipstick Reader for Urinalysis. Clinical chemistry. 45 (1999) 118-122.
68. ALICIC, R.Z., M.T. [et al.] - Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. Clin J Am Soc Nephrol. 12 (2017) 2032-2045.
69. NELSON, R.G., [et al.] - Development and progression of renal disease in Pima Indians with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetic Renal Disease Study Group. N
70. LIN, Y.Q. [et al.] - Analysis of the characteristics of patients with false-positive HIV screening assay results. Int Immunopharmacol. 105 (2022) 108556.
71. SALIH, R.Q. [et al.] - False-positive HIV in a patient with SARS-CoV-2 infection; a case report. Ann Med Surg (Lond). 71 (2021) 103027.
72. Güler, E. [et al.] - Positive Anti-HIV ELISA Results in Pregnancy: Is It Reliable?. Infectious diseases in obstetrics and gynecology. (2022) 1157793.

73. PLEBANI, M., [et al.] - Driving the route of laboratory medicine: a manifesto for the future. *Internal and Emergency Medicine*. 14 (2019) 337-340.
74. FERRARO, S. [et al.] - Laboratory medicine in the new healthcare environment. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 54 (2016): 523-33.