

MESTRADO

ANÁLISES CLÍNICAS

Doença renal e Complicações Associadas. Biomarcadores Precoces para o Diagnóstico e Monitorização da Doença.

Marisa Fernandes Lagoa

M

2020

Doença renal e Complicações Associadas.
Biomarcadores Precoces para o Diagnóstico e Monitorização da Doença.

Marisa Fernandes Lagoa

Faculdade de Farmácia

Doença renal Crónica e Complicações Associadas. Biomarcadores Precoces para Diagnóstico e Monitorização da Doença

Marisa Fernandes Lagoa

Monografia do 2º Ciclo de estudos conducente ao Grau de Mestre em Análises
Clínicas

Trabalho realizado sob a orientação da
Professora Alice Santos Silva e co-orientação do Professor Luís Belo

Julho de 2020

Declaração de reprodução

É autorizada a reprodução integral desta dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Resumo

Devido à importância dos rins na homeostasia, a perda de função renal induz complicações em diferentes órgãos e sistemas. A perda gradual de função e/ou evidência de lesão renal, por 3 meses ou mais, designada por doença renal crônica (DRC), é um problema global de saúde pública. A diabetes e a hipertensão arterial são as principais causas de DRC, que associa diversas complicações, como a anemia, inflamação, doenças cardiovasculares, dislipidemia, distúrbios minerais e ósseos, entre outras. O risco de morbidades e mortalidade na DRC é elevado. É fundamental o diagnóstico precoce e a monitorização para a identificação de doentes em maior risco de progredir para falência renal- o estágio final da DRC associado à necessidade de terapias de substituição renal.

Os mecanismos fisiopatológicos desta doença são complexos e variados, dificultando o seu diagnóstico precoce. A determinação da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) e da albuminúria são usadas para o diagnóstico e estratificação do risco da DRC. No entanto, as limitações destes marcadores justificam a procura de novos marcadores, mais sensíveis e específicos. Nas últimas décadas, foram identificados vários marcadores promissores, podendo categorizá-los segundo o seu papel fisiopatológico na DRC: função renal (ex. cistatina C); lesão glomerular (ex. nefrina); lesão tubular (ex. lipocalina associada à gelatinase neutrofílica); lesão endotelial (ex. dimetilarginina assimétrica) e inflamação (ex. pentraxina 3).

É improvável que exista um único marcador com as características necessárias de um biomarcador ideal, para uso na prática clínica. A identificação de um painel de biomarcadores para o diagnóstico precoce de DRC, desde os estádios iniciais, afigura-se, no entanto, possível e importante. Para isso, devem ser selecionados marcadores que apresentem evidências quanto à sua eficácia, sendo específicos e sensíveis, ou seja, com potencial para o diagnóstico, monitorização e prognóstico de DRC. Em conclusão, a identificação de biomarcadores ou de um painel de biomarcadores da doença renal constitui uma área de investigação de atual interesse.

Palavras-chave: Doença renal crônica; lesão renal; complicações; biomarcadores.

Abstract

Due to the importance of the kidneys in homeostasis, the loss of renal function induces complications in different organs and systems. The gradual loss of function and / or evidence of kidney injury over 3 months or more, called chronic kidney disease (CKD), is a global public health problem. Diabetes and arterial hypertension are the main causes of CKD, which associates several complications, such as anemia, inflammation, cardiovascular diseases, dyslipidemia, mineral and bone disorders, among others. The risk of morbidity and mortality in CKD is high. Early diagnosis and monitoring are essential to identify patients at greatest risk of progressing to renal failure - the final stage of CKD associated with the need for renal replacement therapies.

The pathophysiological mechanisms of this disease are complex and varied, making its early diagnosis difficult. The estimated glomerular filtration rate (eGFR) and albuminuria are used for the diagnosis and stratification of the risk of CKD. However, the limitations of these markers justify the search for new, more sensitive and specific markers. In the last decades, several promising markers have been identified, which can be categorized according to their pathophysiological role in CKD: renal function (e.g. cystatin C); glomerular injury (e.g. nephrine); tubular injury (e.g. lipocalin associated with neutrophilic gelatinase); endothelial injury (e.g. asymmetric dimethylarginine) and inflammation (e.g. pentraxin 3).

It is unlikely that there will be a single marker with the necessary characteristics of an ideal biomarker, to use in clinical practice. However, the identification of a panel of biomarkers for the early diagnosis of CKD, from the initial stages, appears to be possible and important. For this, there should be selected markers that have evidence regarding their effectiveness, being specific and sensitive, that is, with the potential for the diagnosis, monitoring and prognosis of CKD. In conclusion, the identification of biomarkers or a panel of kidney disease biomarkers is an area of research of current interest.

Keywords: Chronic kidney disease; kidney injury; complications; biomarkers.

Índice

Resumo	iii
Abstract.....	iv
Índice	v
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	viii
Lista de abreviaturas e símbolos	ix
Introdução	1
Definição e classificação de doença renal	2
Etiologia e fatores de risco de DRC	5
Fisiopatologia da DRC	7
Complicações sistêmicas.....	9
Anemia	10
Etiologia.....	10
Produção inadequada de eritropoietina	11
Deficiência em ferro.....	12
Inflamação	13
Toxinas urêmicas	13
Outras causas.....	14
Tratamento da anemia	15
Inflamação.....	16
Dislipidemia	17
Distúrbios minerais e ósseos.....	18
Doenças cardiovasculares	20
Progressão da doença renal	22
Biomarcadores de diagnóstico e progressão da doença renal	23
Biomarcadores de função e lesão renal.....	24
Ureia nitrogenada sanguínea (BUN).....	27
Creatinina sérica.....	27

Cistatina C	27
Proteína β -trace (BTP)	28
Biomarcadores de lesão túbulo-intersticial	28
Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL)	28
Molécula de lesão renal 1 (KIM-1).....	29
N-Acetil- β -(D) glucosaminidase (NAG)	29
Proteína de ligação a ácidos gordos do tipo hepático (L-FABP)	30
Uromodulina	30
Biomarcadores de lesão glomerular.....	31
Albuminúria	31
Nefrina, Podocina, Podocalixina, Podocitúria	31
Biomarcadores de lesão endotelial	33
Dimetilargininas assimétrica (ADMA) e simétrica (SDMA)	33
Biomarcadores inflamatórios.....	33
Pentraxinas (Proteína C reativa e Pentraxina 3)	34
Interleucina 6 (IL-6).....	35
Forma solúvel dos recetores 1 e 2 do fator de necrose tumoral (sTNFR 1 e 2)	35
Indutor fraco de apoptose relacionado com o TNF (TWEAK).....	36
Recetor solúvel do ativador de plasminogénio tipo urocinase solúvel (suPAR).....	37
Proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1).....	38
Proteómica urinária	39
Chronic kidney disease 273 (CKD273)	40
Conclusão.....	41
Anexos.....	42
Referências bibliográficas.....	43

Índice de figuras

Figura 1- Estrutura de um nefrónio	2
Figura 2- Corpúsculo renal	3
Figura 3- Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na progressão da doença renal crónica	8
Figura 4- Interações entre as complicações sistémicas relacionadas com a doença renal crónica.....	9
Figura 5- Fatores etiológicos na anemia por doença renal crónica	11
Figura 6- Transformação de células produtoras de EPO no rim em miofibroblastos e metilação epigenética no gene EPO.....	12
Figura 7- Causas e consequências da inflamação na doença renal crónica.....	16
Figura 8- Mecanismos normais e mecanismos patológicos associados aos distúrbios minerais e ósseos na doença renal crónica.....	19
Figura 9 –Complicações cardiovasculares na doença renal crónica	21
Figura 10-Modelo conceptual da progressão da DRC e estratégias para melhores resultados.....	23
Figura 11- Localização da nefrina, podocalixina e podocina nos podócitos	32
Figura 12- Vias de sinalização intracelulares ativadas pelo TWEAK quando se liga a FN14 das células tubulares renais	37
Figura 13- Produção de suPAR por neutrófilos, monócitos e outras células	38
Figura 14- Análise proteómica.....	39

Índice de tabelas

Tabela 1: Classificação da doença renal crónica em estádios com base na taxa de filtração glomerular.....	4
Tabela 2: Classificação da doença renal crónica em estádios com base no valor de albuminúria	5
Tabela 3- Fatores de risco de doença renal crónica.....	6
Tabela 4- Etiologia da anemia na doença renal crónica	14
Tabela 5- Biomarcadores de diagnóstico e progressão da doença renal crónica	25
Tabela 6- Equações para estimar a taxa de filtração glomerular	42

Lista de abreviaturas e símbolos

1,25-VD₃- 1,25-dihidroxicolecalciferol

ADMA- *Asymmetric dimethylarginine* (dimetilarginina assimétrica)

Apo- apolipoproteína

BRA- bloqueador do recetor da angiotensina

BTP- β - *trace protein* (proteína β - *trace*)

BUN- *blood urea nitrogen* (ureia nitrogenada sanguínea)

Ca-íão cálcio

CKD-EPI -*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*

CRIC- *Chronic Renal Insufficiency Cohort*

CV- cardiovascular

DCV- doença cardiovascular

DMO- distúrbios minerais e ósseos

DRC- doença renal crónica

ECA- enzima conversora de angiotensina

EPO- eritropoietina

ESA- *erythropoiesis stimulating agent* (agente estimulador da eritropoiese)

FGF23 -*ibroblast growth factor 23* (fator de crescimento fibroblástico 23)

Fn-14 – fator de crescimento de fibroblastos-indutível-14

Hb- hemoglobina

HDL- *high density lipoprotein* (lipoproteína de alta densidade)

HIF- *hypoxia-inducible factor* (fator induzido pela hipóxia)

HRE- *hypoxia response element* (elemento de resposta à hipóxia)

HVE- hipertrofia ventricular esquerda

IECA- inibidor da enzima conversora da angiotensina

IGF-1- *insulin-like growth factor 1* (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1)

IL- interleucina

IL-1RA- antagonista do recetor da IL-1

KDOQI - *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*

KIM-1- *Kidney injury molecule 1* (molécula de lesão renal 1)

LDL- Low density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)

L-FABP- *Liver-type fatty acid-binding protein* (proteína de ligação a ácidos gordos do tipo hepático)

Lp(a)- lipoproteína (a)

LPL- lipoproteína lípase

MBG- membrana basal glomerular

MCP-1- *monocyte chemotactic protein-1* (proteína quimiotática de monócitos-1)

MDRD- *modification of diet in renal disease*

MO- medula óssea

NAG- *N-acetyl-β-D-glucosaminidase* (N-acetil-β-D-glucosaminidase)

NGAL- *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica)

NKF - *National Kidney Foundation*

NO- *Nitric oxide* (óxido nítrico)

PCR- proteína C-reativa

Pi- ião fosfato

PTH- paratormona

PTX3- pentraxina 3

RAC- razão albumina/creatinina

ROS- *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigénio)

SI- sistema imunitário

SDMA- *symmetric dimethylarginine* (dimetilarginina simétrica)

SNS- sistema nervoso simpático

SRAA- sistema renina-angiotensina-aldosterona

sTNFR 1 e 2 -*soluble tumor necrosis factor receptors 1 and 2* (forma solúvel dos recetores 1 e 2 do fator de necrose tumoral)

suPAR- *soluble urokinase-type plasminogen activator receptor* (recetor solúvel do ativador de plasminogénio tipo urocinase)

TEA- taxa de excreção da albumina

TFG- taxa de filtração glomerular

TFGe- taxa de filtração glomerular estimada

TGF- β - *transforming growth factor β* (fator transformador de crescimento β)

TNF- *tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

TNF- α - *tumor necrosis factor α* (fator de necrose tumoral α)

TSAT- *transferrin saturation* (saturação da transferrina)

TWEAK- *tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis* (indutor fraco de apoptose relacionado com o fator de necrose tumoral)

uPAR *urokinase plasminogen activator receptor* (recetor do ativador de plasminogénio urocinase)

VHL- *von Hippel-Lindau*

VLDL- *very low density lipoprotein* (lipoproteínas de muito baixa densidade)

Introdução

, sendo de grande importância o seu diagnóstico precoce e a identificação de doentes com maior probabilidade de progredir para falência renal. Isso permitirá tratar mais cedo, evitar ou atrasar a progressão, reduzir as complicações associadas e melhorar a qualidade de vida destes doentes.

Em resposta à lesão ou alterações na função renal, as concentrações de certas moléculas encontram-se alteradas, podendo servir de biomarcadores da perda de função ou ajudar a identificar o local da lesão. Os mecanismos patológicos desta doença são complexos e variados, o que complica o diagnóstico. De momento, a determinação da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) e da albuminúria permitem o diagnóstico e a estratificação do risco. Contudo, estes marcadores mostram-se insuficientes no diagnóstico precoce, para prevenção da progressão da doença e não identificam especificamente os mecanismos fisiopatológicos, subjacentes à alteração na função renal. Ao longo dos anos, foram surgindo novas equações da TFGe, para melhorar a exatidão dos resultados, mas todas apresentam limitações. É necessária a validação de novos marcadores de diagnóstico diferencial de doença renal, que detetem precocemente o início da doença, a resposta ao tratamento e que prevejam a sua progressão para a falência renal e o risco de mortalidade.

Com os avanços no diagnóstico da DRC, foram encontrados vários marcadores promissores. O objetivo da presente monografia centra-se em descrever a DRC, as suas causas, os principais mecanismos fisiopatológicos e as complicações associadas. Além disso, pretende-se rever os biomarcadores utilizados para o seu diagnóstico e fazer uma revisão bibliográfica sobre alguns dos biomarcadores mais promissores que têm sido estudados nas últimas décadas, para deteção e avaliação da progressão da doença.

Definição e classificação de doença renal

Os rins são responsáveis por desempenhar funções essenciais na homeostasia do corpo humano, sendo as suas principais funções, a excreção de substâncias tóxicas resultantes do metabolismo; manter o equilíbrio eletrolítico, hídrico e ácido-base; e, ainda, sintetizar e regular a produção de hormonas (1).

O rim recebe cerca de 20% do débito cardíaco total, sendo esta irrigação abundante essencial para o funcionamento normal dos nefrónios, a unidade funcional e estrutural dos rins. O nefrónio é formado por um corpúsculo renal (glomérulo e cápsula de *Bowman*), túbulos renais (túbulo proximal, ansa de *Henle*, túbulo distal, ducto coletor) e capilares peritubulares que rodeiam os túbulos renais (figura 1) (1).

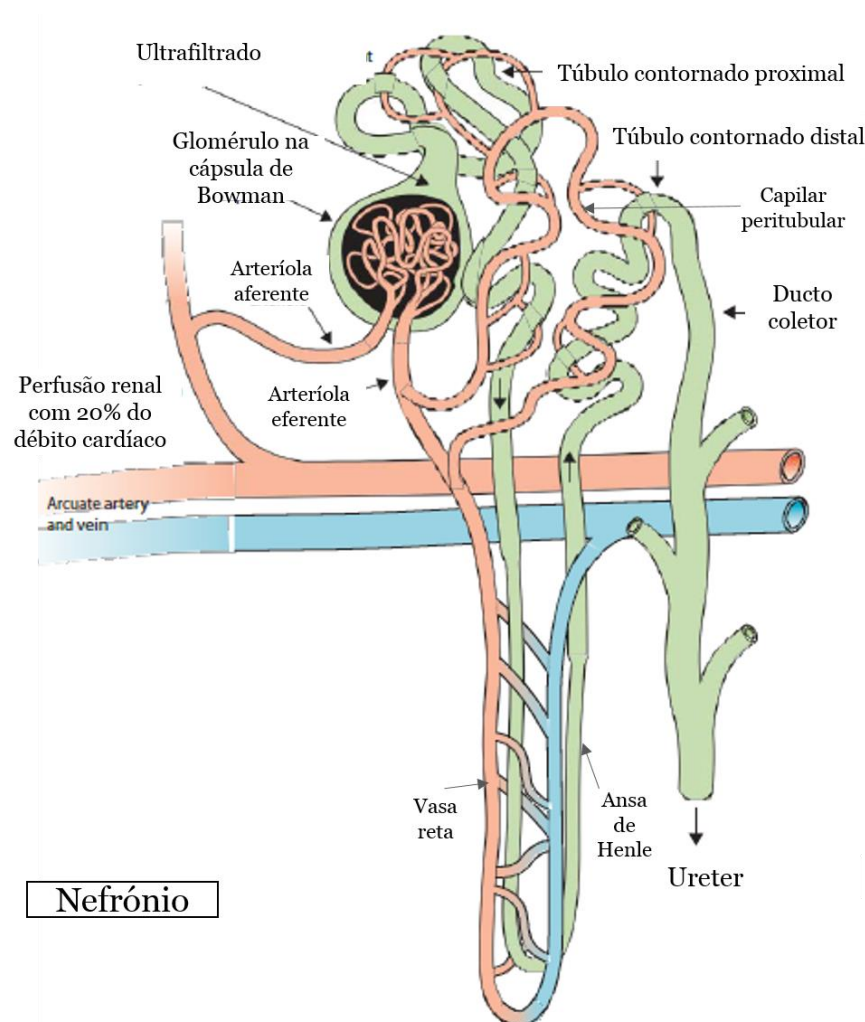


Figura 1- Estrutura de um nefrónio

Adaptado de Eckardt *et al.*, 2013 (2)

O sangue que entra na rede vascular renal, é filtrado nos glomérulos renais, para eliminar os produtos tóxicos resultantes do metabolismo celular. Para isso, tem de passar na barreira de filtração do glomérulo composta por células endoteliais, membrana basal glomerular (MBG) e podócitos, no qual se forma um ultrafiltrado com composição semelhante ao plasma, mas em que as proteínas estão praticamente ausentes (figura 2). Apenas é permitida a passagem de água e moléculas com baixo peso molecular (ex. creatinina, ureia, cistatina C). O filtrado passa para a cápsula de *Bowman* e depois para os túbulos do nefrónio onde sofre alterações na sua composição, através de processos de reabsorção e secreção de solutos até formar o produto final, a urina (1,2).

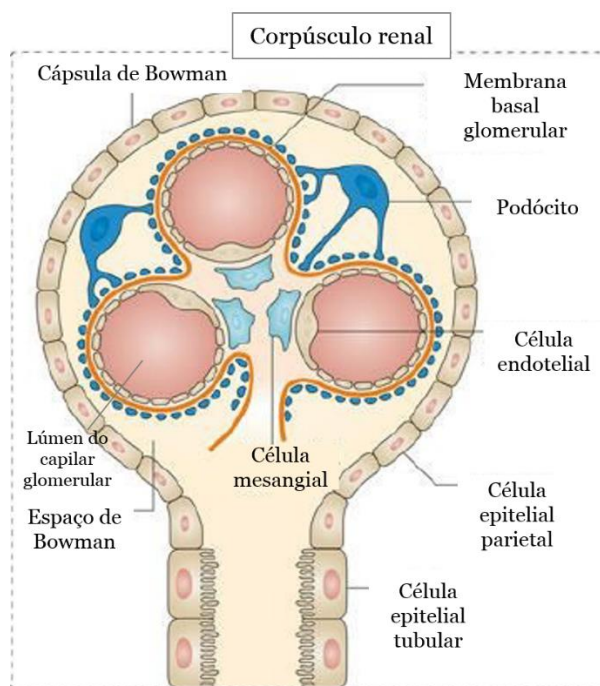


Figura 2- Corpúsculo renal

Adaptado de Wang *et al.*, 2017 (3)

Caso a capacidade funcional do rim esteja comprometida haverá diminuição da filtração do sangue e aumento da concentração de biomarcadores plasmáticos, como a creatinina e ureia, que são usados para diagnóstico da doença renal (1).

A doença renal resulta da lesão ou diminuição da função dos rins, podendo ser aguda ou crónica. É diagnosticada lesão renal aguda quando se observa uma perda rápida da função renal, com diminuição na taxa de filtração glomerular (TFG) e aumento de ureia e creatinina sérica. Pode ser reversível, com recuperação da função renal ou, passar a uma situação de doença renal crónica (4).

Na doença renal crónica (DRC) a perda da função renal ocorre gradualmente, ao longo de meses ou anos, e é frequentemente irreversível. Caracteriza-se por ter uma duração igual ou superior a 3 meses, com implicações na saúde (5).

De acordo com as diretrizes da *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) o diagnóstico e prognóstico da DRC tem por base a avaliação da TFG (tabela 1) e de um marcador de lesão renal, o valor de albuminúria (tabela 2), que está relacionado com a progressão da DRC. São estes parâmetros que vão permitir classificar a doença em estádios de acordo com a sua severidade (5).

A DRC é classificada em 5 estádios segundo a TFG (tabela 1). Acima de 90 mL/min por 1,73 m² (estádio 1) a TFG é considerada normal ou elevada; abaixo de 60 mL/min por 1,73 m² (estádio 3a - 5) é considerada diminuída; abaixo de 15 mL/min por 1,73 m² (estádio 5) há falência renal (5).

Tabela 1: Classificação da doença renal crónica em estádios com base na taxa de filtração glomerular

Estádios	TFG (mL/min/1,73m ²)	Descrição
1	≥ 90	TFG normal ou elevada
2	60 a 89	Diminuição ligeira da TFG
3a	45 a 59	Diminuição ligeira a moderada da TFG
3b	30 a 44	Diminuição moderada a severa da TFG
4	15 a 29	Diminuição severa da TFG
5	< 15	Falência Renal/DRC terminal

TFG -taxa de filtração glomerular; DRC- doença renal crónica; Adaptado de KDIGO 2012 (5)

A albuminúria pode ser quantificada através da taxa de excreção da albumina (TEA) na urina de 24h ou através da razão entre as concentrações de albumina e creatinina (RAC) em amostras de urina ocasional. Uma TEA menor que 30 mg/24h (ou RAC <30 mg/g) é considerado normal (tabela 2); acima deste valor é considerada elevada, sendo que acima de 300 mg/24h (ou RAC >300 mg/g) já existe um aumento substancial do risco para complicações associadas (5).

Tabela 2: Classificação da doença renal crónica em estádios com base no valor de albuminúria

Estádios	TEA (mg/24h) ou RAC (mg/g)	Descrição
A1	<30	Normal a aumento ligeiro
A2	30-300	Aumento moderado
A3	>300	Aumento severo

TEA- taxa de excreção da albumina; RAC- razão albumina/creatinina; Adaptado de KDIGO 2012 (5);

A DRC é confirmada se, durante 3 meses ou mais, a TFG é inferior a 60 mL/min/1,73m² (estádio 3 até 5) ou se há um ou mais dos seguintes marcadores de lesão renal(5):

- Albuminúria (TEA ≥30 mg/24h ou RAC ≥300 mg/g – estádios A2 e A3)
- Sedimento urinário alterado
- Alterações nos eletrólitos ou outras alterações causadas por distúrbios tubulares
- Anomalias patológicas detetadas por histologia
- Anomalias estruturais detetadas por imagiologia
- História de transplantação renal

A frequência com que se monitoriza a TFG e albuminúria é individualizada e baseia-se na história clínica do doente, na causa da doença renal e nos valores de TFG e RAC anteriores. É muito importante a monitorização da doença, pois os estádios iniciais são geralmente assintomáticos e, não sendo tratada e monitorizada, a doença pode progredir até ao estágio terminal, em que o doente precisa de terapia de substituição renal para sobreviver. O risco de morbimortalidade é elevado nestes doentes, particularmente nos doentes no estágio terminal (6).

Etiologia e fatores de risco de DRC

O aumento da incidência e prevalência da DRC em adultos, especialmente em países desenvolvidos, é causado sobretudo por diabetes e hipertensão arterial (7). Nas crianças as causas mais comuns são de origem congénita ou hereditária, ou seja, doenças e malformações no rim ou no trato urinário (glomerulopatias ou uropatias) (8). Há ainda outras causas, como glomerulonefrites, doenças autoimunes (e.g lúpus eritematoso

sistémico), infeções sistémicas, infeções urinárias recorrentes, episódios de lesão renal aguda, uso inadequado de medicamentos (uso regular de medicamentos nefrotóxicos), cálculos renais e algumas neoplasias (2,7,9–11). A causa pode, no entanto, permanecer desconhecida (12).

Nos países em desenvolvimento as principais causas de DRC são as glomerulopatias, infeções, exposição a toxinas e uso de medicamentos nefrotóxicos (12).

Em Portugal, as etiologias mais frequentes nos doentes prevalentes em hemodiálise são a diabetes, a hipertensão arterial e a glomerulonefrite crónica (13).

O género masculino, raça/etnia, idade avançada, hipertensão arterial, diabetes, presença de síndrome metabólico, dislipidemias, hábitos tabágicos, consumo de drogas, história familiar de DRC, estatuto socioeconómico baixo e baixo peso ao nascimento, são alguns dos fatores que estão associadas a um risco aumentado de DRC e que podem acelerar a sua progressão (tabela 3) (2,9–11).

Tabela 3- Fatores de risco de doença renal crónica

Fatores não modificáveis	Idade
	Sexo
	Raça/etnia
	Predisposição genética
Fatores potencialmente evitáveis ou modificáveis	Hipertensão sistémica
	Diabetes <i>mellitus</i>
	Dislipidemia
	Hábitos tabágicos
	Consumo de álcool
	Obesidade/síndrome metabólico
	Infeções
	Estatuto socioeconómico
	Abuso de drogas
	Exposição a toxinas, metais pesados
	Uso inadequado de medicamentos
	Cálculos renais
	Neoplasias
	Baixo peso ao nascimento

Adaptado de Eckardt *et al.*, 2013 (2), Levey e Coresh, 2012 (12) e Rosenthal *et al.*, 2013 (14)

Fisiopatologia da DRC

Independentemente da etiologia, a lesão renal prolongada leva à destruição e fibrose dos diferentes compartimentos dos nefrônios. Como foi observado em estudos com animais e em biópsias renais humanas, a DRC caracteriza-se por glomeruloesclerose, fibrose intersticial e atrofia tubular (7).

À medida que os nefrônios perdem a sua função, por lesão devida à causa primária da doença ou a fatores de risco, observam-se, inicialmente, poucas alterações sistêmicas, pois os nefrônios funcionais adaptam-se, aumentando o seu desempenho (9,15). Como não se formam novos nefrônios, para compensar a perda de função dos nefrônios lesados, os nefrônios viáveis passam a filtrar mais do que o normal (hiperfiltração) e a apresentar um aumento da sua taxa de filtração, com aparecimento de hipertensão glomerular. A hipertensão glomerular e a hiperfiltração irão promover a hipertrofia do nefrônio, aumentando a área de filtração como resposta compensatória (figura 3) (9,15).

A progressão da DRC é acompanhada pelo desprendimento de podócitos da MBG, que parece dever-se à distensão mecânica dos podócitos, provocada pela hiperfiltração, hipertensão e hipertrofia glomerular para tentar manter a barreira de filtração (16). Pode também dever-se a uma deficiente adesão das proteínas do citoesqueleto do podócito à MBG, como uma resposta adaptativa ao stress imposto (17,18). A função dos podócitos é ajudar a criar uma permeabilidade seletiva, restringindo a passagem de proteínas (albumina, citocinas, fatores do complemento, fatores pró-fibróticos) para a urina; quando estes são lesados ou se desprendem, perdem essa seletividade e, conseqüentemente, há passagem de proteínas para a urina – proteinúria (19).

O valor de proteinúria é um marcador importante de perda da função renal e o aumento da sua concentração parece contribuir para a progressão da doença, por diversos mecanismos (20). Assim, em caso de proteinúria, algumas células epiteliais parietais - podócitos progenitores com potencial para se diferenciarem e substituir os podócitos perdidos- podem perder esta função, contribuindo para a glomeruloesclerose (9); a proteinúria pode apresentar toxicidade direta sobre as células do túbulo contornado proximal, uma vez que a reabsorção excessiva de proteínas pode levar à rotura de lisossomas nas células (21); pode ativar as células endoteliais tubulares, aumentando a produção e libertação de espécies reativas de oxigénio, citocinas, quimiocinas, fatores fibróticos, fatores de crescimento, fatores de complemento e moléculas vasoativas (22). A libertação destes compostos cria um ambiente citotóxico, pró-fibrogénico e pró-inflamatório, que desencadeia a mobilização e ativação de macrófagos e leucócitos nos túbulos e interstício renais (7,22). Um dos fatores de crescimento libertado por células renais lesadas é o

transforming growth factor β (TGF- β), uma citocina de ação pró-fibrótica - que estimula células residentes, como os pericitos e fibroblastos perivasculars, a diferenciarem-se em miofibroblastos capazes de sintetizar matriz extracelular, que em excesso provoca fibrose nas diferentes estruturas renais (23–25).

À medida que a fibrose evolui, o epitélio lesado torna-se incapaz de regeneração e inicia-se a apoptose, de que resultará atrofia tubular, com células tubulares epiteliais disfuncionais substituídas por matriz fibrosa (7,26). A fibrose pode observar-se nos capilares glomerulares e também nos capilares peritubulares, o que causa uma redução na irrigação dos túbulos, hipoxia e morte das células epiteliais, contribuindo para a atrofia tubular, que pode ser exacerbada pela ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (26,27).

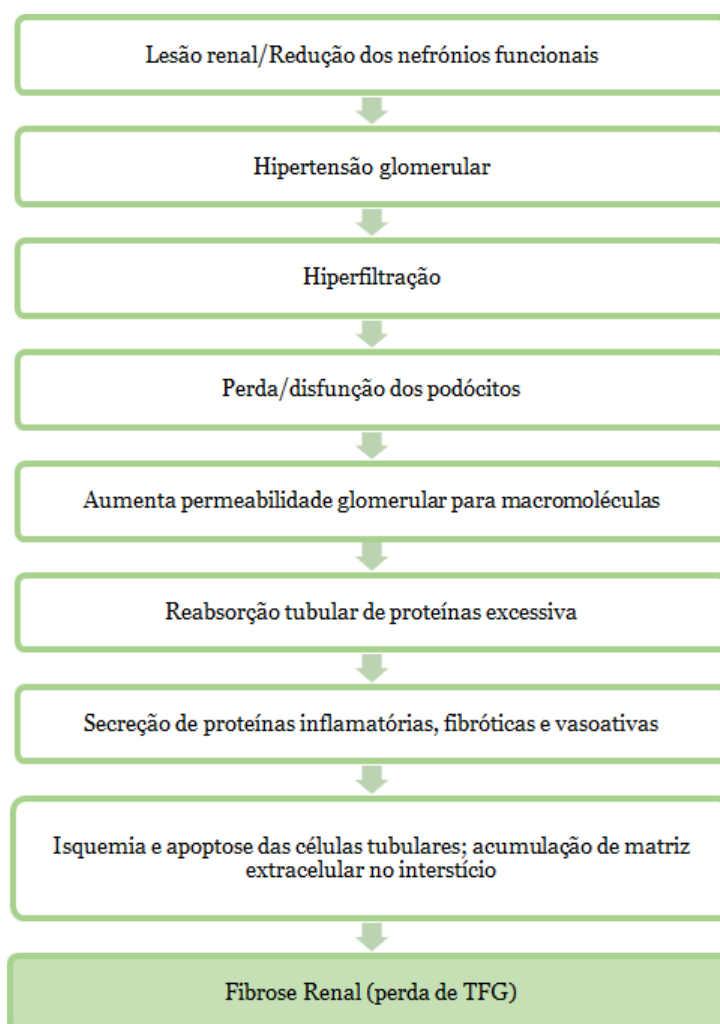
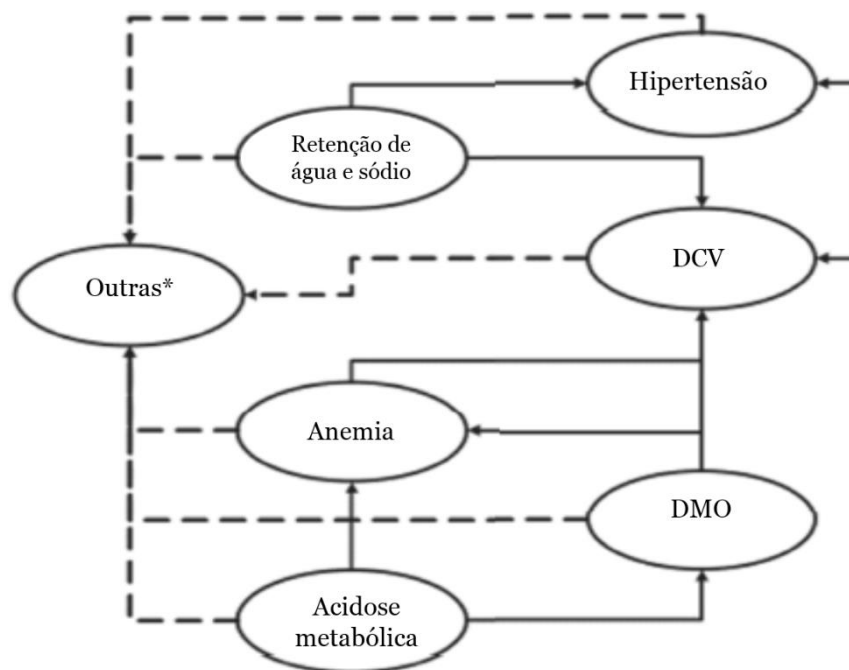


Figura 3- Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na progressão da doença renal crônica

TFG-taxa de filtração glomerular Adaptado de Cravedi e Remuzzi, 2013 (20)

Complicações sistêmicas

A progressiva deterioração renal está associada a variadas complicações, capazes de afetar outros órgãos. Podem aparecer em qualquer estágio, mas são mais prevalentes e severas à medida que a TFG diminui (28). As complicações associadas a DRC incluem: anemia, inflamação, DCV, dislipidemia, distúrbios minerais e ósseos, hipertensão arterial, neuropatia, distúrbios cognitivos, infecções, desnutrição, hipervolemia, distúrbios eletrolíticos, acidose metabólica, síndrome urêmica, distúrbios gastrointestinais, entre outros (5,28–30). Estas complicações podem interagir entre si, desencadeando ou exacerbando a doença e/ou outras complicações (figura 4) (28).



*Infecções, disfunção sexual, anorexia, prurido e insônia

Figura 4- Interações entre as complicações sistêmicas relacionadas com a doença renal crônica

DCV- doenças cardiovasculares; DMO- distúrbios minerais e ósseos; Adaptado de Bello *et al.*, 2017 (28)

As complicações associadas à doença renal contribuem para uma maior mortalidade e morbidade, baixa qualidade de vida e maiores custos associados (5,28). Se a DRC for diagnosticada precocemente e se houver uma correta intervenção, estas complicações e a progressão da doença serão prevenidas ou atrasadas (5).

Anemia

Com a progressão da insuficiência renal, a capacidade dos rins para produzir eritropoietina (EPO) diminui, desenvolvendo-se anemia, que se agrava com a doença (25).

Na anemia ocorre uma diminuição na concentração de hemoglobina (Hb), resultando num insuficiente transporte de oxigénio para as células (31). De acordo com as diretrizes de KDIGO 2012, define-se anemia, nas mulheres, quando a Hb é inferior a 12 g/dL (120 g/L) e, nos homens, quando é inferior a 13 g/dL (130 g/L); estes valores variam, no entanto, com a idade e em caso de gravidez (5).

A incidência e prevalência da anemia aumentam à medida que a TFG diminui e nos estádios mais avançados quase todos os doentes sofrem desta complicação (32–34). A anemia da doença renal, não só acompanha o agravamento da doença, como contribui para a sua progressão e para uma diminuição da qualidade de vida do doente; as manifestações incluem fadiga, dispneia, anorexia, perda de atenção, sonolência, insónia, disfunção cognitiva e sexual, entre outras (35).

A anemia associada a DRC é geralmente normocítica (eritrócitos com volume globular normal), normocrómica (eritrócitos com concentração de Hb normal) e hipoproliferativa (baixa produção eritrocitária). Para se fazer o diagnóstico, é necessário excluir outras causas de anemia, através da avaliação do hemograma completo (concentração de Hb, contagem de eritrócitos, valor de hematócrito, índices hematimétricos, contagem total e diferencial de leucócitos bem como de plaquetas); valor percentual e absoluto de reticulócitos; estudo do metabolismo do ferro (concentração sérica de ferro, ferritina, transferrina e saturação da transferrina); níveis séricos de folatos e vitamina B12 (36).

Etiologia

É aceite que a causa principal da anemia da DRC é a redução na produção renal de EPO (35). No entanto, estudos recentes em modelos animais, sugerem que o metabolismo disfuncional de ferro, causado pelo aumento de hepcidina, pode constituir uma causa importante para o desenvolvimento e/ou agravamento da anemia (37).

Existem, ainda, outros fatores, como a inflamação, que induz o aumento da produção de hepcidina; o aumento de toxinas urémicas, deficiência absoluta em ferro e outras deficiências nutricionais, que podem contribuir para o desenvolvimento da anemia da DRC (figura 5).

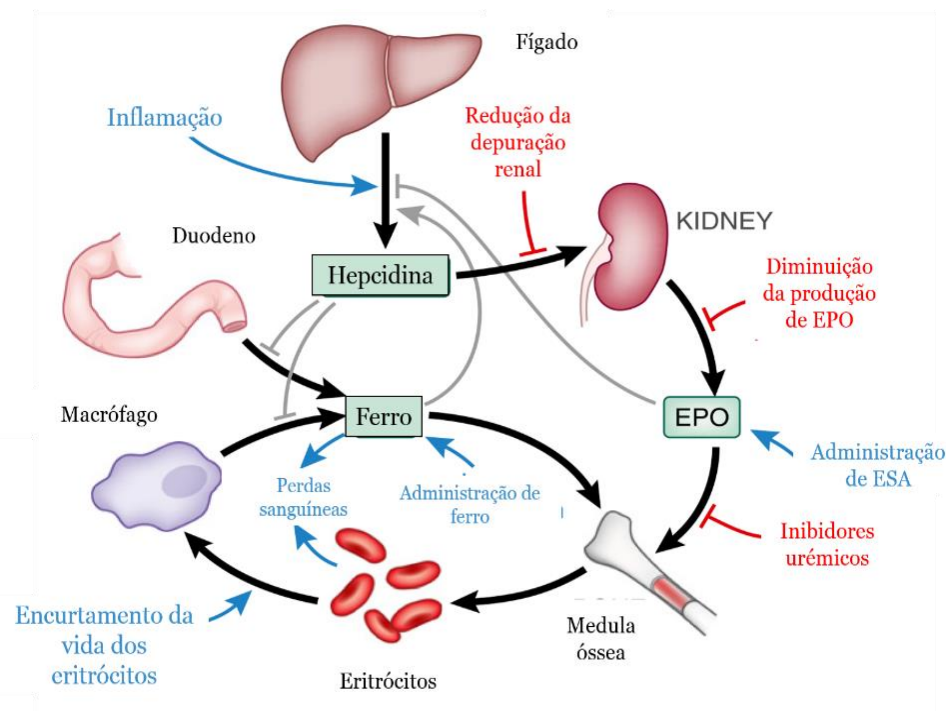


Figura 5- Fatores etiológicos na anemia por doença renal crônica

ESA- erythropoiesis stimulating agent; EPO- eritropoietina; Adaptado de Babitt e Lin, 2012 (38).

Produção inadequada de eritropoietina

A EPO é uma glicoproteína que atua como hormona, ligando-se ao respetivo recetor na membrana de células progenitoras e precursoras eritroides, promovendo a sua sobrevivência, proliferação e diferenciação, na medula óssea (35,39). É sintetizada quase exclusivamente nos rins (90%), por células intersticiais de morfologia semelhante à dos fibroblastos, mas também é produzida, em menor quantidade (10%), noutros órgãos, como o fígado, cérebro, baço, pulmões e testículos (25,40).

Em caso de anemia, a produção de EPO é estimulada pela hipóxia nos tecidos, através do fator de transcrição *hypoxia inducible factor* (HIF). A hipoxia renal induz também um aumento no número das células produtoras de EPO, para aumentar a sua síntese, na tentativa de alcançar um novo equilíbrio (39).

O HIF é um heterodímero composto por 2 subunidades, uma HIF- α (subtipos HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α) e outra HIF- β (subtipos HIF-1 β e HIF-2 β). Em condições de normóxia, os resíduos específicos de prolina no HIF- α são hidroxilados pelas enzimas prolil-4-hidroxilase, servindo de sinal para a proteína *von Hippel-Lindau* (VHL) se ligar ao HIF- α . Esta ligação da VHL facilita o reconhecimento pelo complexo da ubiquitina ligase E3, que se liga ao HIF- α , promovendo a sua ubiquitinação e degradação por proteossomas

(41). Em condições de hipóxia, há redução na hidroxilação dos resíduos de prolina do HIF- α , que não sendo degradado, se liga ao HIF- β , formando-se HIF. Consequentemente, aumenta a síntese de EPO, uma vez que o HIF vai ativar a transcrição do gene da EPO e de outros genes também importantes para a resposta à hipóxia (42).

À medida que a DRC se agrava, como se referiu, há transformação de células produtoras de EPO em miofibroblastos e posteriormente formação de matriz extracelular. Os miofibroblastos são incapazes de produzir esta hormona, porque um elemento do gene EPO (5'-HRE) fica hipermetilado, impedindo que o HIF se ligue e induza a sua transcrição (Figura 6). Com a diferenciação das células produtoras de EPO, desenvolve-se anemia por deficiência em EPO e fibrose renal (25).

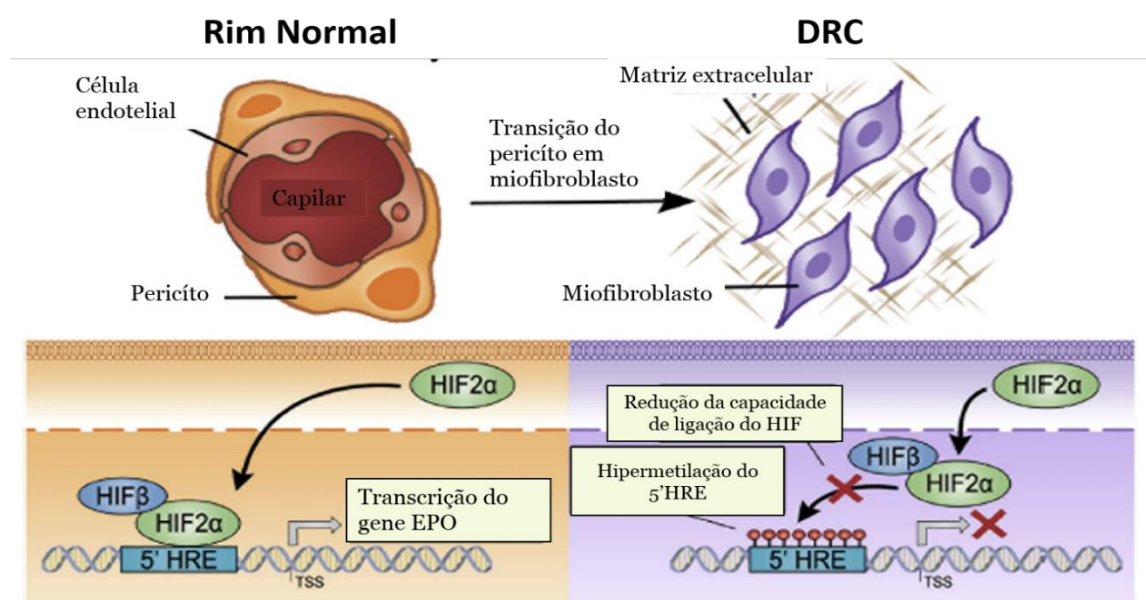


Figura 6- Transformação de células produtoras de EPO no rim em miofibroblastos e metilação epigenética no gene EPO.

DRC- doença renal crônica; EPO- eritropoietina; HIF-*hypoxia inducible factor*; HRE- *hypoxic response element*. Adaptado de Shih *et al.*, 2018 (25).

Deficiência em ferro

O ferro é um elemento indispensável para a síntese de hemoglobina e, por consequência, para uma eritropoiese normal. Nestes doentes, pode ocorrer uma deficiência absoluta em ferro ou uma deficiência funcional. Em caso de deficiência absoluta em ferro, observam-se concentrações baixas de ferritina (<30 ng/mL em homens ou <15 ng/mL nas mulheres) e de saturação de transferrina (TSAT) (<20%). Na deficiência funcional em ferro

observa-se uma concentração elevada de ferritina sérica (>300 ng/mL) e TSAT normal (20-30%). Neste caso, apesar de haver quantidades elevadas de ferro armazenado, há insuficiente mobilização do mesmo pela ação da hepcidina (43).

A hepcidina é um dos principais reguladores do metabolismo do ferro, controlando a absorção do ferro proveniente da dieta e a mobilização de ferro armazenado nos macrófagos, proveniente da fagocitose de eritrócitos senescentes (44). A hepcidina é um péptido sintetizado pelos hepatócitos que degrada a ferroportina, uma proteína que existe na membrana de enterócitos, hepatócitos e macrófagos. A degradação da ferroportina impede a absorção de ferro no duodeno e a mobilização do ferro armazenado no fígado e nos macrófagos (45). Quando há níveis elevados de ferro circulante ou inflamação, a síntese de hepcidina é estimulada. Em contrapartida, em caso de deficiência em ferro, aumento dos níveis plasmáticos de EPO, eritropoiese aumentada ou hipoxia, a sua síntese é inibida (43,45). Nos doentes com DRC, observa-se um aumento dos níveis de hepcidina à medida que a TFG diminui (46). Esse aumento, provocado pela elevação de citocinas inflamatórias e pela redução dos níveis de EPO, contribui para o desenvolvimento e/ou agravamento da anemia, por deficiência funcional em ferro na DRC. A deficiência absoluta em ferro pode resultar de uma deficiência nutricional, de perdas de sangue no dialisador e equipamento de diálise e de flebotomias, que são frequentes nestes doentes (45).

Inflamação

A proteinúria desenvolvida, devido à perda de permeabilidade seletiva glomerular, promove a resposta inflamatória, com recrutamento de células inflamatórias, nomeadamente macrófagos, linfócitos e neutrófilos, que libertam diferentes produtos de ativação, nomeadamente metabolitos de oxigénio e citocinas pró-inflamatórias (21,47). As interleucinas (IL)-1, IL-6, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon- γ , são capazes de inibir a eritropoiese na MO, por inibição da proliferação e maturação dos precursores eritroides, e, ainda, inibir a produção de EPO, pelos rins (48,49). Além disso, a IL-6 faz com que os hepatócitos aumentem a produção de hepcidina, o que perturba o metabolismo do ferro, podendo causar anemia por deficiência funcional em ferro (50-52).

Toxinas urémicas

Com a perda de capacidade de filtração glomerular, ocorre acumulação de diferentes compostos, designados por toxinas urémicas e associadas ao síndrome urémico (53). As toxinas urémicas contribuem para o desenvolvimento/agravamento da anemia através da indução de alterações nos eritrócitos, que levam à diminuição do seu tempo de vida (54). São capazes de causar hipoproliferação dos precursores eritroides na MO e, em associação

com o processo inflamatório e stress oxidativo, contribuem para o desenvolvimento de diferentes lesões nos eritrócitos, que determinam a sua remoção precoce (42). Para além disso, as toxinas contribuem para a fibrose renal, disfunção dos podócitos, e consequentemente, para a progressão da DRC (55).

Outras causas

As perdas de sangue constantes, devidas a flebotomias frequentes e, no caso de doentes em tratamento dialítico, a perdas de sangue no equipamento de hemodiálise, contribuem para o desenvolvimento de deficiências em nutrientes eritropoiéticos, ferro, ácido fólico e vitamina B12 (42,44). O hiperparatiroidismo, deficiências nutricionais (vitamina B12, folato, carnitina, vitamina C e cobre), acumulação de alumínio e a toma de alguns medicamentos, como os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA), ou bloqueadores do recetor da angiotensina (BRA), embora menos comuns, podem também contribuir para o desenvolvimento/agravamento da anemia na DRC (tabela 4) (42,56).

Tabela 4- Etiologia da anemia na doença renal crónica

Etiologia da Anemia de DRC
Deficiência de EPO
Deficiência de ferro
Inflamação/infeção
Toxinas urémicas
Perda crónica de sangue
Deficiência em vitamina B12 e/ou folatos
Deficiência em carnitina
Acumulação de alumínio
Hiperparatiroidismo
IECA ou BRA
Doenças oncológicas
Hemoglobinopatias
Remoção precoce de eritrócitos
Distúrbios na medula óssea (e.g. Aplasia eritrocitária pura)

DRC- doença renal crónica; EPO-eritropoietina; IECA- inibidor da enzima conversora da angiotensina BRA- bloqueador do recetor da angiotensina; Adaptado de Hayat *et al.*, 2008 (48), KDIGO 2012(5) e Nakhoul e Simon, 2016 (33).

Tratamento da anemia

A anemia pode desenvolver-se em qualquer estágio da DRC e a sua frequência e severidade aumentam ao longo da doença, sendo que no estágio 5, cerca de 70% dos doentes apresentam anemia (42). Atualmente, o tratamento da anemia associada à DRC pode incluir suplementação de ferro, tratamento com agentes estimuladores da eritropoiese (ESA) e, apenas em alguns casos, transfusões de eritrócitos (57). Para qualquer um destes tratamentos é preciso primeiro eliminar outras possíveis causas de anemia e ter em consideração os possíveis benefícios e riscos em cada indivíduo com anemia (58).

O tratamento com ferro poderá evitar o tratamento com ESA, melhorar a resposta ao tratamento com ESA ou tratar a deficiência provocada pelo tratamento com ESA (59). A administração de ferro pode ser oral ou intravenosa e a sua escolha depende da gravidade da anemia, se o utente é ou não dialisado, da severidade da deficiência em ferro, da existência de acessos venosos, da tolerância e adesão ao tratamento. A administração por via oral poderá ser preferida nos doentes não dialisados. A via intravenosa permite maior eficácia e é a preferida para os doentes hemodialisados, visto que já têm uma via de acesso vascular. Poderá ser aconselhada a administração intravenosa em doentes não dialisados, se a suplementação oral não for eficaz ou se causar distúrbios gastrointestinais; se durante o tratamento com ESA o doente apresentar TSAT inferior a 30% e ferritina sérica abaixo dos 500 ng/mL (valores em que se obtém resposta significativa aos ESA), no entanto não deverá ser administrado rotineiramente porque os riscos e benefícios não foram adequadamente estudados (60).

Os ESA são análogos da eritropoietina, produzidos a partir da recombinação de DNA da EPO humana e compensam a insuficiência da EPO endógena. O tratamento com ESA corrige a anemia, eliminando ou diminuindo a necessidade de transfusões sanguíneas e, portanto, o risco de sobrecarga de ferro; melhora a qualidade de vida do doente (57). Num doente não dialisado, o tratamento com ESA é considerado quando a Hb é <10 g/dl; num doente em hemodiálise, é sugerido quando a Hb se encontra entre 9.0 e 10.0 g/dl. É possível que esta terapia aumente o risco de eventos cardiovasculares (CV), progressão para diálise e progressão de doenças oncológicas (60). Apenas quando os riscos associados aos ESA e quando o tratamento com ESA não funciona, se considera a transfusão de eritrócitos, que está associada a risco de alo sensibilização e que pode condicionar uma rejeição em caso de futuro transplante renal, para além do risco de infeções, entre outros (61).

Inflamação

A inflamação, seja aguda ou crónica, é caracterizada pela ativação de células inflamatórias, com libertação de biomoléculas designadas por citocinas, que podem ter ações pró-inflamatórias e/ou anti-inflamatórias (62). O aumento das citocinas tem efeitos benéficos numa resposta aguda e são essenciais à sobrevivência, no entanto um estímulo inflamatório constante pode levar a estado inflamatório crónico, com destruição celular e tecidual (63,64).

A inflamação crónica na DRC resulta da interação de múltiplos fatores. O aumento das citocinas inflamatórias, por ativação de células inflamatórias, ocorre devido à redução da eliminação de toxinas urémicas, infeções, hipervolemia, stress oxidativo, ativação simpática excessiva, desnutrição, disbiose intestinal e deficiência em vitamina D; a ativação de células inflamatórias deve-se também a fatores exógenos, como o contacto do sangue com membranas de diálise e com os cateteres venosos (figura 7) (47,65,66). A inflamação pode ajudar a progredir a DRC e causar mais complicações como anemia, distúrbios minerais e ósseos, DCV e desperdício energético proteico. Independentemente da sua etiologia, a resposta inflamatória pode desregular a microcirculação renal e permitir a produção de toxinas que causam lesão renal (67).

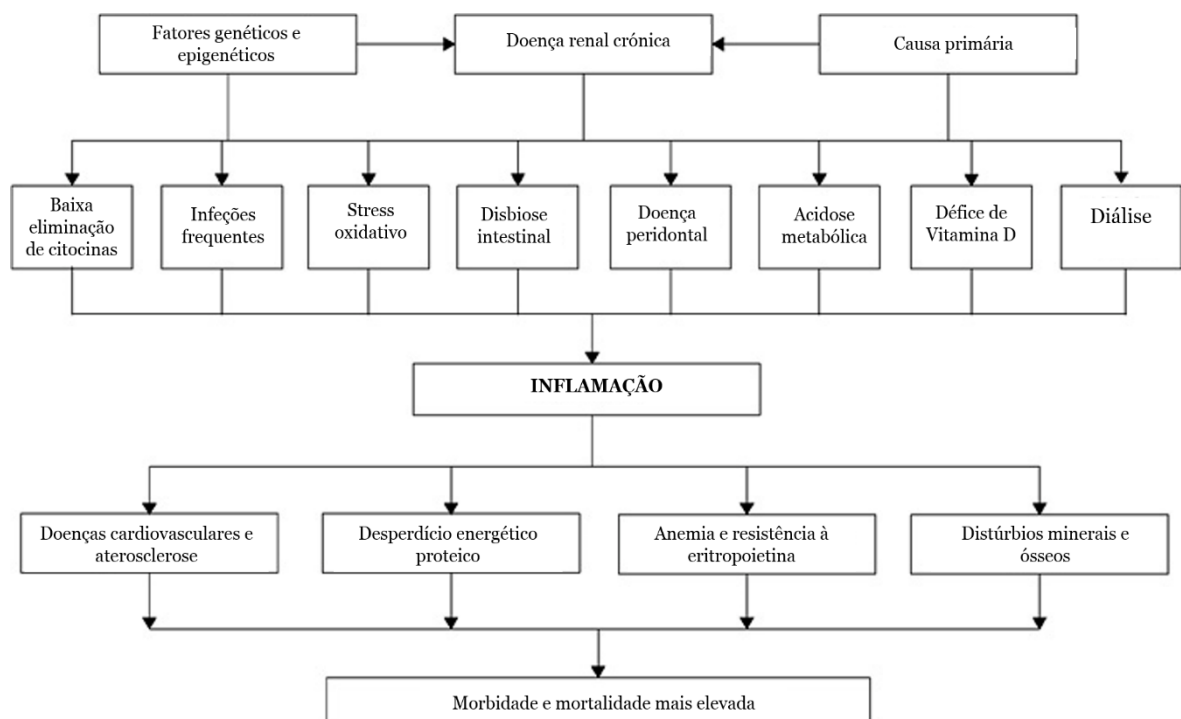


Figura 7- Causas e consequências da inflamação na doença renal crónica

Adaptado de Akchurin and Kaskel, 2015 (66)

A disbiose intestinal e a alteração da barreira intestinal podem ter impacto negativo na progressão da DRC e ser fonte de inflamação. A microflora intestinal dos doentes com DRC parece conter menos bactérias benéficas e mais bactérias produtoras de toxinas urémicas, quando comparada com a de indivíduos saudáveis (55), o que contribui para a acumulação dessas toxinas, que estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias (68). As toxinas também estimulam o sistema nervoso simpático (SNS), que tem um efeito pró inflamatório (69). Quando permanentemente ativado, desencadeia a resposta inflamatória do sistema imunitário que, por sua vez, causa calcificações vasculares, disfunções endoteliais, hipertrofia e fibrose cardíaca (64,70). Nos pacientes em diálise a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) é uma complicação frequente (64,71). As citocinas pró-inflamatórias são também capazes de favorecer o catabolismo proteico, suprimir o apetite, causar resistência à insulina e suprimir a secreção de hormonas anabólicas entre as quais a hormona de crescimento, testosterona, hormonas tiroideias e IGF-1 (72,73).

Dois estudos de coorte em doentes com DRC avaliaram a associação entre função renal, albuminúria e biomarcadores inflamatórios. Foi demonstrado que os níveis plasmáticos de IL-1 β , antagonista do recetor da IL-1 (IL-1RA), IL-6, TNF- α , TGF- β , proteína C-reativa (PCR) e fibrinogénio, estavam aumentados nos indivíduos com menor TFG. Ou seja, a inflamação torna-se maior à medida que a TFG diminui e a albuminúria aumenta (74,75).

Existem vários marcadores inflamatórios que permitem avaliar o risco de mortalidade, como é o caso da IL-6, que é um bom biomarcador de risco de mortalidade geral e de mortalidade por eventos CV nos doentes em estágio 5 (76,77).

A inflamação sistémica tem sido associada a uma morbimortalidade mais elevada, a uma progressão mais rápida da doença e a mais baixa qualidade de vida do doente (65,75).

Dislipidemia

A dislipidemia é dos fatores de risco que mais contribui para a DCV e é uma complicação comum da DRC. A mortalidade por DCV nos doentes em diálise, é 10 a 20 vezes mais elevada do que na população em geral (29).

A maioria dos pacientes com DRC apresentam um perfil lipídico anormal, o que contribui para o risco aterogénico acrescido (29). A dislipidemia pode começar nos estádios iniciais da doença e tende a progredir com a deterioração da função renal (78). Nos doentes com DRC, o quadro de dislipidemia é caracterizado por:

- **Aumento de triglicéridos e de lipoproteínas ricas em triglicéridos** – A redução da atividade da lipoproteína lipase (LPL) resulta na redução do catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicéridos [lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), quilomicra e quilomicra remanescentes] por *downregulation* do gene da LPL e por inibidores da mesma (78).
- **Diminuição de lipoproteína de alta densidade (HDL)**- associada a perda da ação anti-aterogénica da HDL. A diminuição da atividade da lecitina-colesterol aciltransferase e o aumento de proteína de transferência de colesterol esterificado faz diminuir as concentrações de HDL e contribui para a diminuição do seu efeito antioxidante (79).
- **Concentrações variáveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL)**- não há certeza se o início da DRC induz alterações nas concentrações de LDL (78). Geralmente estão normais ou baixas, mas em doentes com proteinúria e/ou sob diálise peritoneal podem estar aumentadas (80).
- **Aumento da razão apolipoproteína (apo) B / apo A-I** – A apo A-I, a principal proteína constituinte proteica da HDL, sofre *downregulation* da expressão hepática do seu gene (78).
- **Aumento de lipoproteína (a) [Lp(a)]**- o aumento desta lipoproteína representa risco aterogénico (80). É provável que o seu aumento resulte da diminuição da *clearance* renal, pois a Lp (a) aumenta à medida que a TFG diminui (78).

Distúrbios minerais e ósseos

Nos doentes com DRC, podem ser observados distúrbios minerais e ósseos (DMO). Estes, englobam alterações no metabolismo do cálcio, fosfato, vitamina D e da paratormona (PTH), bem como perturbações no sistema CV (calcificações vasculares, disfunção endotelial e HVE) (81).

Estes distúrbios começam no estágio 2 e contribuem para a elevada mortalidade associada à DRC. É a própria lesão renal que diretamente conduz a estes distúrbios, através da produção de fatores patogénicos, como a família inibitória Wnt (*portmanteau of wingless and int*), durante a tentativa de reparação renal. Também há diminuição de certas moléculas, como α -*klotho*, um coreceptor ligado à membrana do fator de crescimento dos

fibroblastos 23 (FGF23), que regula as concentrações de fósforo, cálcio, vitamina D e PTH (figura 8) (82).

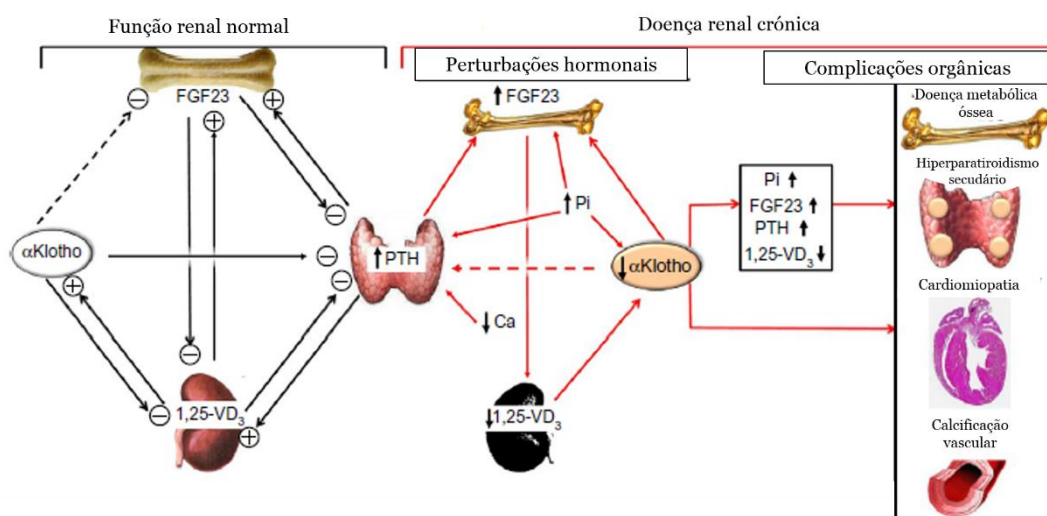


Figura 8- Mecanismos normais e mecanismos patológicos associados aos distúrbios minerais e ósseos na doença renal crônica

Ca- ião cálcio; Pi- ião fósforo; PTH, hormona paratiroideia; FGF23- fator de crescimento fibroblástico 23; 1,25-VD3- 1,25-(OH)2-vitamin D3. Adaptado de Neyra e Hu, 2016 (83).

Com a diminuição de α -klotho, há aumento de FGF23. Esta proteína, produzida por osteócitos e osteoblastos, tem um papel fundamental no metabolismo do fósforo e da vitamina D e, consequentemente, no desenvolvimento de DMO. As concentrações circulantes de FGF23 aumentam progressivamente com o declínio da função renal devido ao aumento da sua secreção pelos osteócitos e à diminuição do seu catabolismo por causa da lesão renal (82). O FGF23 aumenta a excreção de fósforo no túbulo renal proximal, através da inibição do cotransportador sódio-fósforo, e diminui a absorção intestinal de fósforo (84). Além disso, regula a atividade das enzimas que ativam a vitamina D, causando o déficit da mesma. A falta de vitamina D causa redução da absorção intestinal do cálcio (82). Juntamente com hipocalcemia e hiperfosfatemia, a vitamina D estimula a secreção excessiva de PTH, levando ao desenvolvimento de hiperparatireoidismo secundário nos doentes com DRC, que é comum nos estádios 3 a 5 da DRC (81). Com o agravamento da função renal também há menor resposta por parte do recetor de vitamina D na paratireóide, resultando na síntese adicional de PTH; os recetores-sensores de cálcio ficam menos expressos, o que, com o tempo, causa hiperplasia da paratireóide (84). Esse excesso de PTH promove remodelação, mineralização anormal, enfraquecimento, fraturas ósseas e, em crianças e adolescentes, afeta também o seu crescimento ósseo (82,85). Em crianças é recomendado a monitorização de cálcio, fósforo, PTH e fosfatase alcalina a partir do estágio 2, enquanto nos adultos é a partir do estágio 3 (86).

Como o FGF23 aumenta antes de haver alterações nos níveis de cálcio, fósforo ou PTH, foi reconhecido como um dos primeiros biomarcadores detetáveis dos DMO na DRC, indicando que a lesão renal já afetou a função dos osteócitos (82).

As células musculares dos vasos sanguíneos que reverteram a sua diferenciação, estão suscetíveis à transformação osteoblástica, ficando com um fenótipo semelhante a um osteoblasto (82,87). Esta transição é estimulada pela hiperfosfatémia presente na DRC e contribui para calcificação vascular e desenvolvimento de HVE (82).

Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morbidade e mortalidade em doentes com DRC, podendo surgir em qualquer estágio da doença (71). As doenças cardíacas isquémicas (como o enfarte agudo do miocárdio) são as que mais causam mortes por complicações CV nos doentes com DRC. O desenvolvimento destas complicações decorre de interações entre os rins, o coração e o sistema vascular influenciando as funções uns dos outros (88).

O aparecimento das DCV nos doentes com DRC está associado ao aumento de fatores de risco tradicionais (como diabetes *mellitus*, hipertensão, HVE, tabagismo, dislipidemia, etc.) que também promovem a DRC, e ao aumento de fatores de risco não tradicionais (albuminúria, stress oxidativo, DMO, anemia, inflamação crónica, disfunção endotelial, síndrome urémica, etc.) que resultam da perda de função renal (89). Devido à diversidade de fatores de risco, há complexos mecanismos patológicos que conduzem às DCV na DRC, mas alguns ainda estão pouco esclarecidos (88). Sabe-se que os diversos fatores de risco provocam a ativação do SRAA, SNS, aumento do stress oxidativo e desregulação do metabolismo mineral e ósseo associado ao FGF23 e *klotho*. A ativação destes mecanismos causa lesão, disfunção e morte das células envolvidas no sistema CV (células endoteliais vasculares, células musculares lisas, cardiomiócitos e fibroblastos) (90).

A fibrose é um processo que se verifica no coração e nos vasos durante as complicações CV. Nos vasos sanguíneos ocorre substituição de elastina por colagénio, calcificação e formação de placas ateroscleróticas (90). As lesões ateroscleróticas são causadas por disfunção endotelial e inflamação crónica na parede vascular e, frequentemente, estas lesões encontram-se calcificadas. A calcificação vascular ocorre devido à transformação osteoblástica das células do músculo liso vascular e por causa da disfunção ou perda de inibidores de calcificação. No miocárdio, desenvolve-se fibrose e hipertrofia celular que contribuem para a disfunção diastólica e sistólica. Uma das alterações na estrutura cardíaca é a HVE provocada pela hipertensão, inflamação crónica,

anemia, ativação do SRAA, dilatação ventricular e DMO. A HVE é um fator de risco de morte por paragem cardíaca nos doentes com DRC (88).

Sabe-se que os doentes com DRC também sofrem alterações sistémicas que contribuem para o risco CV. Com a perda da função renal, há acumulação de toxinas urémicas (e.g. p-cresol, indoxil sulfato) que contribuem para a patogénese das DCV (figura 9), pois são capazes de interferir com a função das células envolvidas no sistema CV; desencadear inflamação e aterosclerose; contribuir para o stress oxidativo e disfunção endotelial na DRC (91). Devido à lesão renal também há perda de enzimas antioxidantes, o que permite a acumulação de substâncias pró-oxidantes, e desenvolvimento de stress oxidativo. Estas substâncias são capazes de causar morte celular e inflamação, levando à isquemia renal (91). O processo de hemodiálise também contribui para o desenvolvimento de stress oxidativo por ativação de células inflamatórias, com produção exacerbada de ROS (91).

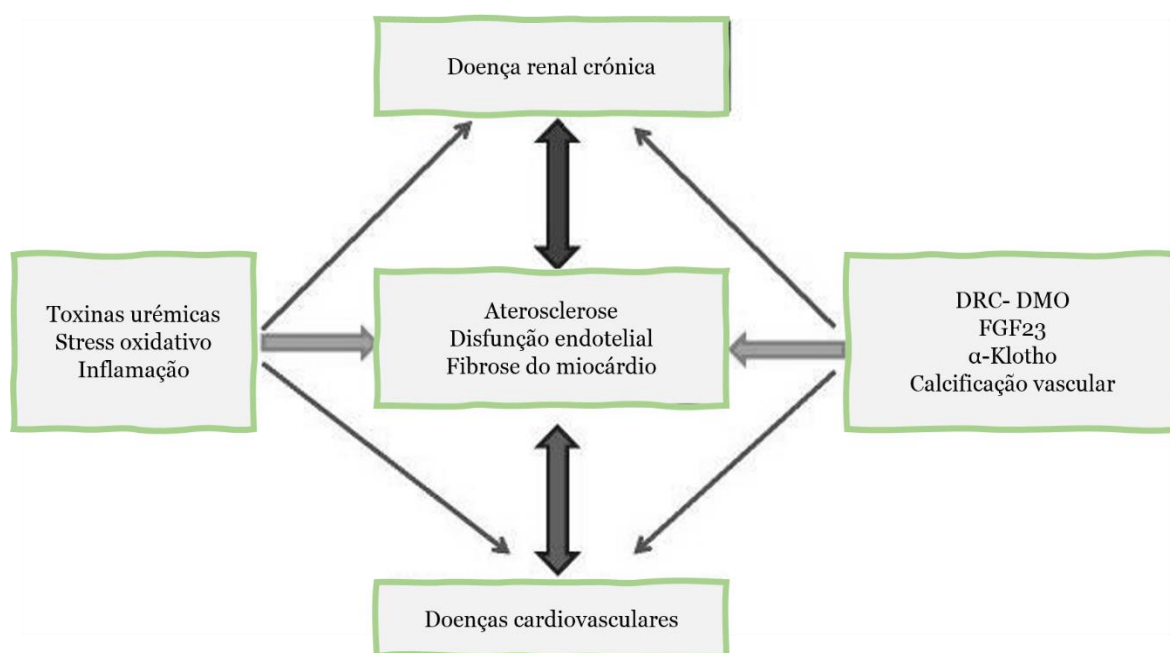


Figura 9 –Complicações cardiovasculares na doença renal crónica

DRC-doença renal crónica; DMO- distúrbios minerais e ósseos; FGF23- fator de crescimento fibroblástico 23;
Adaptado de Cozzolino *et al.*, 2018 (91).

Progressão da doença renal

A progressiva diminuição da TFG reflete a gradual destruição do tecido renal e da sua função, causada por lesão/estímulo inicial. Na tentativa de se adaptar à lesão, os nefrónios não afetados tentam compensar a perda dos outros nefrónios, mesmo que a causa inicial da lesão já tenha sido resolvida. Esta resposta adaptativa errada dos nefrónios e outros fatores, como a inflamação, a perda (e a severidade da perda) de podócitos, hipóxia, fatores de risco, entre outros, contribuem para a progressão de DRC. A lesão numa das estruturas do nefrónio levará à destruição das outras estruturas (20). Apesar das variadas causas de DRC, a progressão da doença apresenta uma via comum, caracterizada pelo desenvolvimento de glomeruloesclerose, esclerose vascular e fibrose túbulo-intersticial (92,93).

Para além da TFG e albuminúria, existem outros fatores prognósticos, de progressão para falência renal. Foi descrito que ser do sexo masculino e ser jovem são fatores que preveem um risco maior de falência renal. A nível sistémico, valores baixos de albumina, cálcio, bicarbonato e valores elevados de fósforo estão associados a maior risco de progressão para falência renal (94).

A velocidade da progressão é variável. Poderá ser rápida, levando à falência renal em poucos meses ou pode evoluir lentamente, ao longo de décadas, o que acontece na maioria das vezes, ou até mesmo estabilizar. Em raros casos, a DRC pode regredir, apresentando um aumento da TFG (figura 10) (95). Por isso, é importante a monitorização constante do doente e a promoção do controlo de fatores de risco de DRC.

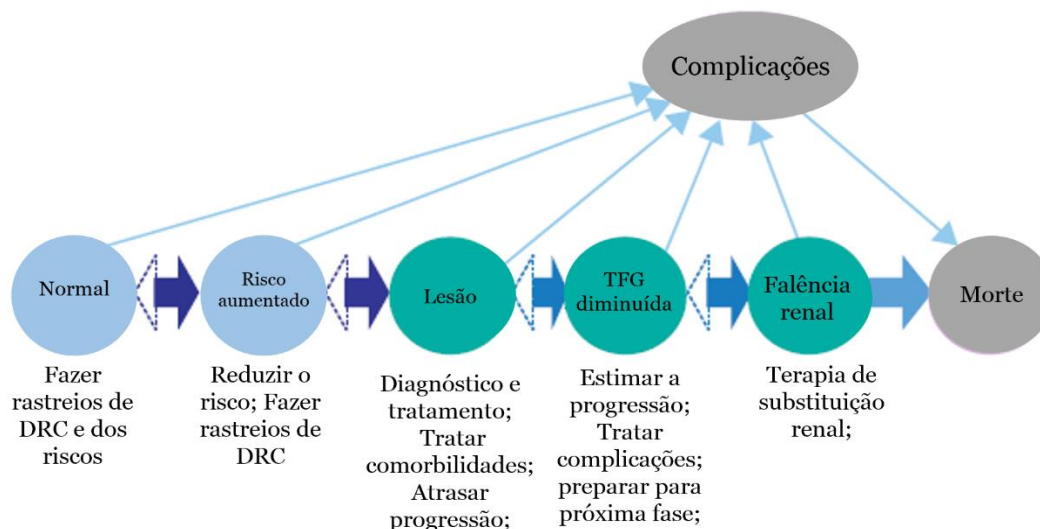


Figura 10-Modelo conceptual da progressão da DRC e estratégias para melhores resultados

Círculos azuis representam os antecedentes da DRC; círculos verdes representam estádios da DRC; círculos cinzentos representam consequências; setas horizontais representam a progressão (setas para a direita) ou regressão (setas para a esquerda); Setas finas representam a ocorrência de complicações associadas à DRC; DRC- doença renal crónica; TFG- taxa de filtração glomerular; Adaptado de Levey e Coresh, 2012 (12).

Alguns tratamentos podem prevenir ou retardar a progressão, reduzir complicações e melhorar a qualidade de vida do doente (12). Não existem atualmente tratamentos para inibir a fibrose renal diretamente, mas podem ser usados os IECA e BRA em doentes com proteinúria elevada (96). A monitorização é também importante para identificar os doentes em elevado risco de progressão para DRC terminal e que poderão precisar de terapia de substituição renal (12).

Biomarcadores de diagnóstico e progressão da doença renal

Os biomarcadores são úteis para um diagnóstico rápido, para fornecer informações sobre o prognóstico, para monitorizar a progressão da doença e para a resposta terapêutica. A sua utilização pode ser importante para substituir a biópsia renal, que atualmente, permanece o *gold standard* no diagnóstico de doenças renais. Por ser invasiva, estar associada a riscos e, por vezes, não fornecer informação suficiente sobre o prognóstico e resposta terapêutica, torna-se importante encontrar bons biomarcadores (97).

Atualmente, os biomarcadores usados com mais frequência para o diagnóstico e monitorização da doença renal são a TFG estimada (TFGe) e albuminúria. A sua quantificação deve ser feita sobretudo nos doentes com maior risco de progressão da doença; deverá ser individualizada, tendo por base a história clínica do doente e/ou após uma situação clínica que possa ter impacto na função renal. Todavia, quando estes dois marcadores se encontram alterados, habitualmente já ocorreram lesões significativas no rim, condicionando um atraso no diagnóstico nos estádios iniciais. Importa, assim, descobrir marcadores mais sensíveis de diagnóstico (precoce) de DRC (6).

Um bom biomarcador para diagnóstico/monitorização de DRC deve possuir certas características: ter pouca variabilidade biológica (para melhorar a avaliação que se faz ao longo do tempo); não ser influenciado pela idade, alimentação ou outros problemas de saúde; ser de determinação rápida e acessível; não invasivo; sensível; específico para doenças renais; estar correlacionado com os resultados histopatológicos e de progressão da doença; variar em resposta ao tratamento; ajudar na estratificação do risco; permitir identificação precoce da doença; permitir avaliar o prognóstico (98,99).

Biomarcadores de função e lesão renal

Para avaliar a função e lesão renal usam-se mais frequentemente a TFGe, que se calcula com base nos valores de creatinina sérica ou ureia nitrogenada sanguínea (BUN) e de albuminúria. Porém, estes marcadores não são bons para detetar doença renal nos estádios iniciais, uma vez que apenas se alteram após lesão renal significativa (100,101);

Um biomarcador renal ideal deve satisfazer os seguintes requisitos (102):

- Endógeno;
- Não tóxico;
- Livremente filtrado no glomérulo (sem estar ligado a proteínas);
- Produção constante;
- Pouca variabilidade intra-individual;
- Não secretado, reabsorvido ou metabolizado nos túbulos renais;
- Excreção exclusivamente renal;
- Não influenciado por substâncias exógenas.

A TFG é o melhor marcador de função renal, mas, infelizmente, não pode ser diretamente quantificada. A TFG pode ser medida indiretamente através da depuração

urinária de marcadores de filtração exógenos como a inulina e o ioexol- chamada TFGm (TFG *measured*); como alternativa, pode ser estimada – TFGe através de equações com base na concentração sérica de marcadores de filtração endógenos (creatinina sérica, BUN e cistatina C) em conjugação com fatores demográficos (ex. idade, sexo e raça) (100,103). A TFGm oferece resultados mais aproximados à verdadeira TFG sendo, por isso, considerada o *gold standard* para medir a função renal (104). Por ser mais cara, demorada, complexa e invasiva é mais utilizada a TFGe (105,106).

Foram desenvolvidas múltiplas equações para calcular a TFGe (tabela 6). As mais comuns são a Cockcroft-Gault, a *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) e a *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI), baseadas na creatinina sérica (100). Mais tarde, surgiu uma variação da equação CKD-EPI que combina creatinina sérica, cistatina C e os coeficientes demográficos. Esta demonstrou ser mais exata e precisa do que as outras equações que usam apenas creatinina sérica ou cistatina C (107,108). Numa análise inicial e para a maioria das circunstâncias clínicas, é recomendado o uso da creatinina sérica para determinar a TFGe, por ser apropriado para diagnóstico, estratificação e monitorização da progressão da DRC. Em situações especiais em que se precisa de obter valores de TFG mais exatos, é sugerido o uso da fórmula com a cistatina C e creatinina sérica (5,107).

Há marcadores usados na clínica há décadas, designados por marcadores tradicionais/convencionais, e marcadores novos, validados recentemente ou que aguardam validação. Os tradicionais avaliam fundamentalmente alterações na função, enquanto os novos podem já detetar e localizar a lesão renal precoce (tabela 5) (109).

Tabela 5- Biomarcadores de diagnóstico e progressão da doença renal crónica

Biomarcadores de função renal
Convencionais
TFGe baseada na creatinina sérica
TFGe baseada na ureia nitrogenada sanguínea
TFGm (<i>measured</i>) com ioexol, inulina
TFGe baseada na cistatina C
Novos
TFGe baseada na BTP - proteína β -trace
Biomarcadores de lesão tubular

NGAL- Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica
KIM-1-Molécula de lesão renal
NAG- N-acetil- β -D-glucosaminidase
L-FABP- Proteína de ligação a ácidos gordos do tipo hepático
Uromodulina
Biomarcadores de lesão glomerular
Convencionais
Albuminúria
Novos
Nefrina
Podocina
Podocalixina
Podócituria
Biomarcadores de lesão endotelial
ADMA- dimetilarginina assimétrica
SDMA- dimetilarginina simétrica
Biomarcadores inflamatórios
PCR- proteína C reativa
PTX3- pentraxina 3
IL-6- interleucina 6
sTNFR 1 e 2- Forma solúvel dos recetores 1 e 2 do fator de necrose tumoral
TWEAK- Indutor fraco de apoptose relacionado com fator de necrose tumoral
suPAR- recetor solúvel do ativador de plasminogénio tipo urocinase
MCP-1- Proteína quimiotática de monócitos-1
Proteómica urinária
Painel de marcadores - CKD273- <i>chronic kidney disease 273</i>

TFG- taxa de filtração glomerular; TFGe- taxa de filtração glomerular estimada

Ureia nitrogenada sanguínea (BUN)

A quantificação de BUN, apesar de ainda ser bastante usada, não é considerada um bom método para avaliar a função renal. Este biomarcador aumenta quando há diminuição da TFG e quando a TFG é normal (causado por dietas ricas em proteínas, hipovolemia, hipercatabolismo, fármacos, entre outros); por isso, os resultados com BUN devem ser interpretados cuidadosamente (110).

Creatinina sérica

Para substituir a BUN surgiu a creatinina sérica, um dos parâmetros atualmente mais usados no laboratório para calcular a TFG. A creatinina resulta do metabolismo da creatina e da fosfocreatina no músculo, sendo sintetizada a uma taxa constante e de forma proporcional à massa muscular de cada um. É livremente filtrada pelo glomérulo. Não é reabsorvida pelos túbulos renais, mas é secretada pelos túbulos renais, podendo variar a taxa de secreção no mesmo indivíduo (110). Este marcador está longe de ser ideal, pelo facto de variar com a idade, sexo e raça, que são parâmetros já considerados nas equações de TFG; é também influenciado pela massa muscular, dieta, fármacos, doença hepática, rabdomiólise, e não tem eliminação exclusivamente renal (106,111). Além disso, à medida que a TFG diminui, a secreção de creatinina pelos túbulos aumenta, o que faz com que o valor da TFG apresente um valor superior real (110,112). Só quando a TFG estiver 50% abaixo dos valores normais é que se deteta um aumento da creatinina sérica (112).

Cistatina C

A cistatina C é uma proteína não glicosilada de baixo peso molecular (cerca de 13000 Da) sintetizada nas células nucleadas a uma frequência constante, cuja concentração aumenta com a perda de função renal. É livremente filtrada no glomérulo, reabsorvida e completamente catabolizada no tubo proximal e não é secretada, o que significa que a sua concentração no sangue depende quase exclusivamente da TFG (113).

Apesar do seu uso clínico ser muito menor que o da creatinina sérica, a cistatina C demonstra ser um marcador de disfunção renal melhor que a creatinina sérica; deteta precocemente pequenas reduções da TFG, enquanto a creatinina sérica permanece inalterada (114,115); o uso de cistatina C, juntamente com a creatinina sérica e albuminúria, permite obter maior precisão no prognóstico (116).

A sua produção não é afetada por inflamação, doença hepática, ou outras doenças metabólicas, nem pela idade, sexo, raça, massa muscular ou pelo consumo de tabaco (117,118). A quantificação de cistatina C torna-se importante em crianças, idosos ou pessoas com doenças que afetem a composição muscular, podendo nessas situações ser importante

avaliar também a creatinina (117). Contudo, deve-se ter em consideração que a cistatina C sérica aumenta com uso de corticosteroides, em casos de hipertiroidismo, diabetes, disfunções cardíacas, e diminui em casos de hipotireoidismo (118,119).

Proteína β -trace (BTP)

Para ultrapassar as limitações exibidas pelos biomarcadores convencionais, têm sido investigados novos marcadores não-invasivos da TFG, dos quais se destaca a BTP.

A BTP sérica é uma pequena molécula pertencente à família das lipocalinas. É produzida por células da glia no sistema nervoso central a uma taxa constante; tem um processamento e eliminação pelo rim que é igual ao da cistatina C (110,120). A BTP sérica está aumentada nos doentes com DRC, podendo ajudar na detecção precoce da perda da função renal (120–122). Tem a vantagem, em comparação com outros marcadores, de não ser afetada pela composição corporal, idade, sexo, raça, nem por distúrbios na tireóide ou inflamação, ou terapêutica com corticosteroides (120,123,124). No entanto, as equações que incluem a BTP (sozinha ou com a β 2-microglobulina) não parecem ter melhor desempenho do que a CKD-EPI com uso combinado de cistatina C e creatinina sérica (123,124).

Conforme ocorre diminuição da TFG, há aumento da BTP sérica e urinária, podendo, por isso, quantificá-la em ambas as amostras biológicas (121). O valor de BTP aumenta na urina a partir do estágio 2, enquanto que a cistatina C urinária ou a β 2-microglobulina urinária só aumenta a partir do estágio 4 (121,125). A BTP urinária pode ser útil na realização de rastreios à população para identificar indivíduos com comprometimento da função renal (121).

Biomarcadores de lesão túbulo-intersticial

Em resposta à lesão túbulo-intersticial, as células epiteliais tubulares sofrem alterações e libertam proteínas específicas (NGAL, NAG, KIM-1, L-FABP, entre outras) na urina e na circulação sistémica.

Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL)

A NGAL é uma glicoproteína da família das lipocalinas, que é expressa nos leucócitos, células epiteliais, células tubulares renais, hepatócitos e células vasculares nas placas ateroscleróticas (6). Quando há lesão renal, inflamação ou transformação neoplásica, a produção de NGAL aumenta rapidamente e em grande quantidade, observando-se um

aumento do seu valor no sangue e na urina, antes de se observar um aumento na creatinina sérica (6,126,127).

Vários estudos demonstram que a NGAL urinária pode ser útil para prever o risco de progressão da DRC (127–129); que tem uma correlação inversa com a TFG_e (127); que a razão NGAL/creatinina está correlacionada com o risco de morte e de progressão para diálise (127,128). A NGAL plasmática/sélica também está inversamente correlacionada com a TFG_e (127,130,131); deteta precocemente a DRC, melhor do que a cistatina C ou a creatinina sérica (130); está diretamente correlacionada com a fibrose intersticial e atrofia tubular (132). Contudo, se o NGAL plasmático é ou não um marcador de progressão renal em doentes nos estádios iniciais, permanece uma incerteza, pois há estudos que encontram relação e outros não (127,133).

Molécula de lesão renal 1 (KIM-1)

A KIM-1 está presente nas células epiteliais, mielóides e linfóides; funciona como porta de entrada para alguns vírus (ébola e hepatite A) e como recetor *scanvanger* para LDL oxidadas e fosfatidilserina (134). Não havendo doença renal, a KIM-1 está ausente na urina, ou em baixas concentrações; após lesão dos túbulos renais, a sua expressão aumenta e está associada ao grau de fibrose intersticial e inflamação renal (135). A sua avaliação pode ser útil para identificar pessoas em risco de desenvolver DRC (136).

Há alguns estudos que indicam que a progressão de DRC pode ser prevista pelo aumento da concentração de KIM-1 urinária, independente da presença de albuminúria (136,137). Num estudo coorte (REGARDS) com 1472 pessoas com TFG_e <60 mL/min e albuminúria (ACR>30 mg/g), verificou-se que as concentrações elevadas de NGAL urinária e KIM-1 estavam associadas a maior risco de morte e de progressão para DRC terminal (138). Uma meta-análise de 10 estudos com 29366 participantes, concluiu que KIM-1 urinária esteve perto de ser estatisticamente significativa a prever o estágio 3 de DRC de forma independente; a NGAL urinária foi identificada como um preditor independente de DRC terminal e de risco de mortalidade nos doentes com DRC; no entanto, a KIM-1 e a NAG não parecem ser marcadores independentes de risco de DRC terminal (139).

N-Acetil-β-(D) glucosaminidase (NAG)

A NAG é uma enzima lisossomal encontrada nas células epiteliais do túbulo proximal. A sua concentração na urina aumenta quando há lesão tubular, resultante de doenças renais ou de agentes nefrotóxicos (129,140). É uma molécula grande demais para ser filtrada livremente no glomérulo; por isso, não é encontrada na urina, em condições normais (6). A NAG urinária fornece uma indicação precoce de lesão tubular, prevê a

albuminúria, mas não parece estar associada com a progressão da DRC, sendo que nesse aspecto NGAL ou KIM-1 apresentam melhor performance (129,140).

Proteína de ligação a ácidos gordos do tipo hepático (L-FABP)

A L-FABP é uma proteína intracelular transportadora de ácidos gordos, expressa nos hepatócitos e epitélio dos túbulos proximais. O seu aparecimento na urina está associada a lesões estruturais das células renais, podendo ser atribuída a vários fatores que provocam a progressão da DRC (proteinúria, hiperglicemia, isquemia, toxinas...)(141,142).

A concentração urinária de L-FABP mostra estar correlacionada com a progressão da DRC (142); mostra refletir o grau de lesão túbulo-intersticial, sendo que a sua diminuição poderá indicar atenuação da lesão (141,143); o seu aumento acompanha a deterioração da função renal (144); está fortemente correlacionada com o prognóstico nos doentes com DRC (141); deteta precocemente o desenvolvimento e progressão de nefropatia diabética (145); é um potencial fator de risco na progressão de nefropatia diabética(141); prevê o desenvolvimento e progressão de albuminúria em diabéticos tipo 1 (145); prevê diminuição da função renal em doentes com DRC sem albuminúria (146).

O estudo de coorte *Chronic Renal Insufficiency Cohort* (CRIC) mostrou que o NAG, KIM-1, NGAL e L-FABP urinários, não estão independentemente associados à progressão de DRC; não melhoram a estratificação da doença; e não são mais relevantes que os marcadores convencionais (TFGe e RAC) na deteção da progressão (147).

Uromodulina

A uromodulina, também conhecida por proteína Tamm-Horsfall, é a proteína mais abundante na urina normal e o maior componente de cilindros urinários. É produzida exclusivamente nas células da porção espessa ascendente da ansa de Henle e no início do túbulo distal (148). Após a lesão destas células, há diminuição na produção de uromodulina (149). Apesar de o seu papel fisiológico não estar completamente esclarecido, pensa-se que quando é libertada no lúmen, tem um efeito protetor nas células tubulares durante infeções e formação de cálculos renais (148,149). No entanto, quando há lesão tubular, também pode entrar para o interstício, estimulando células do sistema imunitário (SI) a causar lesão túbulo-intersticial e progressão da DRC (149,150). Doentes com DRC com fibrose intersticial e atrofia tubular apresentam concentrações muito baixas de uromodulina sérica e urinária (149).

Steubl *et al.* realizaram um estudo incluindo indivíduos sem e com DRC (em vários estádios) e observaram uma correlação linear entre TFGe e uromodulina, enquanto que a

obtida com outros marcadores (creatinina, BUN e cistatina C) era hiperbólica. Pessoas sem DRC apresentam valores mais elevados de uromodulina do que os doentes com DRC (151). Doentes com albuminúria ou hipertensão, também têm concentrações mais baixas de uromodulina sérica; além do mais, quem veio a desenvolver DRC, tinha uromodulina sérica mais baixa do que quem não desenvolveu (152). Num estudo coorte com 2652 doentes com DRC, observou-se que concentrações baixas de uromodulina sérica estão associados ao declínio da função renal e incidência de DRC terminal (153). Estas evidências sugerem que a uromodulina é um marcador direto da quantidade de células intactas na porção ascendente da ansa e indica o número de túbulos funcionais presentes (148,151).

Biomarcadores de lesão glomerular

Albuminúria

Em doenças renais, a albumina é a principal componente proteica na urina; o seu aumento é causado pela perda de seletividade da MBG; tem efeitos adversos no tecido renal, conduzindo à progressiva perda de função (154). A albuminúria, definida como TEA ≥ 30 mg/24h ou RAC ≥ 30 mg/g, é um marcador convencional de disfunção renal que precede a diminuição da TFG_e; está associada à progressão de DRC e é um fator de risco de mortalidade em geral e de mortalidade associada a eventos CV (100); permite diagnosticar DRC em pessoas que têm a TFG_e normal (136); no entanto, a albuminúria tem limitações: pode aparecer apenas após lesão glomerular significativa; pode estar ausente em certas doenças (doenças túbulo intersticiais e doença renal hipertensiva) (100); parte dos doentes com DRC não diabética não apresentam albuminúria (136); a albuminúria pode regredir, espontaneamente ou após tratamento; pode haver rápida progressão de DRC sem albuminúria severa (155).

Combinar albuminúria com TFG_e melhora a previsão da progressão de DRC; no entanto, as limitações destes marcadores tornam necessária a procura de marcadores alternativos, não invasivos, e que se correlacionem com a etiologia da DRC, que ajudem a prevenir as complicações e a progressão da DRC (100).

Nefrina, Podocina, Podocalixina, Podocitúria

O comprometimento estrutural e funcional dos podócitos causa glomeruloesclerose e progressão de DRC (16,156). Os podócitos envolvem os capilares glomerulares contribuindo para a seletividade da barreira de filtração glomerular; formam fendas entre os seus prolongamentos e os prolongamentos dos podócitos vizinhos, sendo através desses

espaços que algumas moléculas conseguem passar (156). A integridade da barreira de filtração depende dos podócitos, sendo essencial manter sua integridade; para isso, existem, na fenda de filtração, várias moléculas essenciais nomeadamente a nefrina, podocina, podocalixina (figura 11) (157).

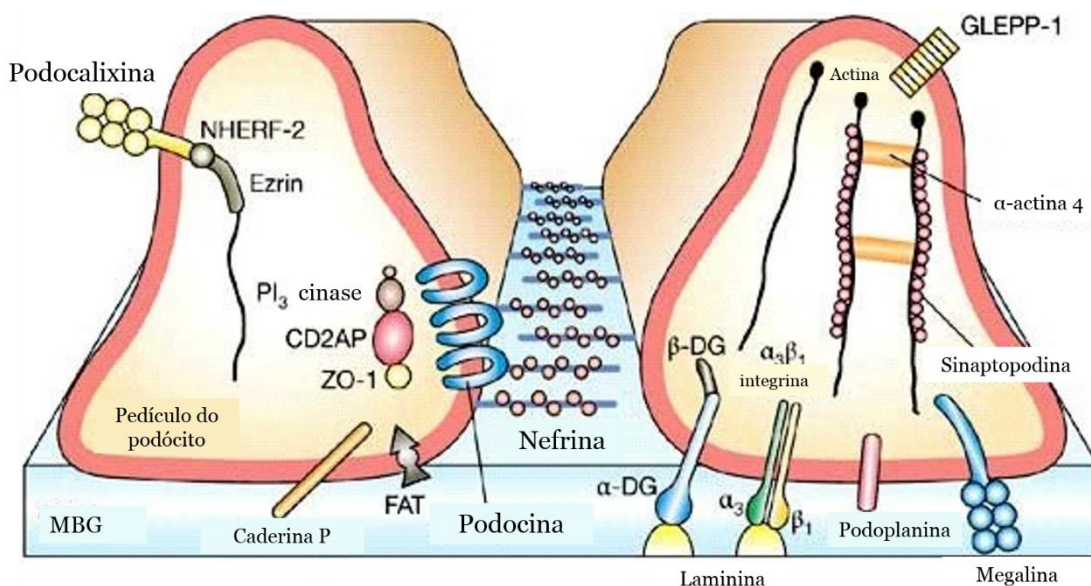


Figura 11- Localização da nefrina, podocalixina e podocina nos podócitos

MBG-membrana basal glomerular; Adaptado de Kostovska *et al.*, 2017 (158).

Os podócitos são alvo de lesões em muitas doenças renais, como a nefropatia diabética, nefropatia membranosa, nefropatia por IgA, nefropatia lúpica, glomerulopatia de lesões mínimas e glomeruloesclerose segmentar e focal (156). Em doentes com nefropatia diabética, a nefrina e a podocalixina urinárias estão correlacionadas com a TFGe e albuminúria (159); a podocina também se correlaciona com a albumina sérica (159). No início da nefropatia diabética, a nefrina, a podocina e a podocalixina na urina aumentam, indicando o comprometimento dos podócitos (159,160). Na nefropatia lúpica ocorre aumento da podocina e da nefrina (143); e nas nefropatias membranosas e por IgA, aumentam a nefrina e a podocalixina (159).

A quantificação do número de podócitos urinários também é um marcador de lesão glomerular, permitindo obter informação em tempo real da lesão nos podócitos e antecipar a albuminúria (6,160). A podocitúria encontra-se associada à proteinúria e às lesões encontradas em biópsias, podendo refletir lesão glomerular nos doentes com DRC (161).

Biomarcadores de lesão endotelial

Dimetilargininas assimétrica (ADMA) e simétrica (SDMA)

A ADMA e a SDMA são aminoácidos produzidos em todas as células nucleadas, que resultam da metilação da arginina (162). São considerados como toxinas urêmicas e o seu aumento acompanha a perda da função renal (163,105,101). A ADMA inibe as sintetases produtoras de óxido nítrico (NO) a partir de arginina, deixando a produção de NO comprometida; essa diminuição de NO causa disfunção endotelial e contribui para o desenvolvimento de aterosclerose (143,164).

Concentrações elevadas de ADMA tem sido encontradas em todos os estádios de DRC e estão associadas com a progressão da doença (165,166). Num estudo coorte com doentes de DRC, a ADMA correlacionou-se inversamente com a TFG e previu o risco de progressão para DRC terminal e de mortalidade (167). Além disso, o aumento de ADMA também tem sido associado com a ocorrência de eventos cardiovasculares (fatais e não fatais) (168).

Tal como a ADMA, o seu isómero SDMA também é um marcador do risco de mortalidade e de DCV (163,169). Apenas 15% de ADMA é eliminada por via renal sem ser metabolizada (170). No entanto, a SDMA é quase totalmente excretada nos rins e, talvez por isso, seja mais sensível a detetar alterações da função renal do que a ADMA (163). A SDMA não tem efeito inibitório direto do NO mas impede o *uptake* intracelular de arginina, reduzindo assim a sua disponibilidade para a síntese de NO (162); para além disso, promove modificações nas HDL, que perdem as suas propriedades vasoprotetoras, contribuindo para disfunção endotelial (171). Uma meta-análise de 18 estudos, considerou a SDMA plasmática como um excelente marcador de função renal, pois está fortemente correlacionado com a TGFm com inulina e com a TFG e com creatinina sérica (162). Num estudo coorte com 528 doentes entre os estádios 2-4, a SDMA esteve mais consistentemente associada a alterações CV e renais, do que outras metilargininas, incluindo a ADMA. Isto indica um possível efeito fisiopatológico na progressão de DRC e DCV aterosclerótica (170).

Biomarcadores inflamatórios

À medida que a TFG diminui e a albuminúria aumenta, a inflamação também aumenta. Visto que a inflamação está associada à elevada morbidade, mortalidade e rápida progressão da DRC, têm sido propostos diferentes marcadores de inflamação como preditores desse risco (74,75).

Pentraxinas (Proteína C reativa e Pentraxina 3)

Pentraxinas são proteínas de fase aguda, que incluem 2 grupos, as pentraxinas curtas, como a PCR e as pentraxinas longas, como a pentraxina 3 (PTX3); estas proteínas diferem no tamanho, local de síntese, moléculas estimuladoras da sua síntese e nos ligandos (172).

Um dos marcadores de inflamação mais usados na clínica é a PCR. Esta proteína é produzida principalmente por hepatócitos, em resposta a citocinas inflamatórias (IL-1, TNF- α e, especialmente, IL-6), podendo aumentar até 1000x, em resposta a um estímulo inflamatório (173,174).

A PCR foi extensamente estudada em doentes com doença renal, verificando-se que o seu aumento está associado com a diminuição da função renal (175,176); se correlaciona negativamente com a albuminémia e positivamente com a albuminúria (74,176); aumenta o risco de desenvolvimento de DRC, sendo que o seu valor preditivo é mais significativo em doentes diabéticos, hipertensos ou com TFG_e entre 60 e 90 mL/min/1,73 m² (177). De forma idêntica, em sobreviventes de enfarte de miocárdio, foi encontrada uma associação entre o aumento da PCR e o risco de progressão de DRC (178). O risco de complicações CV nos doentes com DRC também é maior quando as concentrações de PCR aumentam (176). A PCR é um marcador preditivo da morbidade e mortalidade, incluindo por eventos cardiovasculares, em doentes com DRC ou na população em geral (179,180).

Doentes com DRC e falência renal, que têm concentrações de PCR cronicamente elevadas (3-6 meses), apresentam maior risco de mortalidade, sendo essencial monitorizar os valores de PCR, de forma a avaliar a evolução da doença e a realizar rapidamente o tratamento necessário (6).

Produzida rapidamente em resposta a estímulos inflamatórios, a síntese da PTX3, ao contrário da PCR, não é estimulada pela IL-6, mas sim por TNF- α , IL-1, ativação dos recetores *toll-like* e por microrganismos (172). É sintetizada no local da inflamação por células residentes (células epiteliais, endoteliais, adipócitos, músculo liso, etc.) e células inflamatórias (células dendríticas, neutrófilos, monócitos/macrófagos) (172,174,180). Nos rins, há produção de PTX3 pelas células epiteliais do túbulo proximal, células mesangiais primárias e fibroblastos (181).

A PTX3 tem um papel importante na imunidade e na inflamação. Altas concentrações de PTX3 foram observadas em múltiplas DCV, autoimunes, pulmonares e também na DRC (182). O aumento sistémico de PTX3 está associado a declínio de função renal e ao risco de desenvolver DRC (179,183,184); correlaciona-se negativamente com albuminémia e positivamente com albuminúria (180,184); associa-se a risco de morbilidade

e mortalidade associada a eventos CV, nos doentes com DRC (179). Em doentes em diálise, prevê a mortalidade com maior exatidão do que os biomarcadores inflamatórios convencionais (180). A PTX3 mostra ser um marcador abrangente, rápido e sensível da inflamação e um marcador promissor de DRC, bem como dos riscos associados à doença (179,180,183). No entanto, dado o potencial deste marcador, são necessários mais estudos para entender a sua relevância clínica nos estádios iniciais de DRC.

Interleucina 6 (IL-6)

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina predominantemente pró-inflamatória secretada por macrófagos, fibroblastos, adipócitos, células renais (podócitos, células mesangiais, endoteliais e epiteliais tubulares), entre outras (173,185). Estimula a produção de proteínas de fase aguda, promove a diferenciação (linfócitos T e B e monócitos) e recruta monócitos para o local da inflamação (186).

A IL-6 é um marcador de inflamação que contribui para a progressão de DRC; agrava a lesão renal existente, e pode contribuir para o desenvolvimento de outras complicações, sobretudo cardiovasculares, através da redução das sínteses de NO e adiponectina (uma adipocina anti-inflamatória e anti-aterosclerótica) (185). Em doentes renais idosos e em estágio terminal, a IL-6 é um forte preditor de complicações CV e de mortalidade, melhor do que outras moléculas (IL-1 β , TNF- α , PCR ou albumina) (187). O seu aumento correlaciona-se com a perda de função renal e associa-se à prevalência e severidade da DRC (188); parece ser um melhor marcador de estratificação da doença do que outras moléculas, nomeadamente a PCR e o TNF (6,75).

Forma solúvel dos recetores 1 e 2 do fator de necrose tumoral (sTNFR 1 e 2)

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida predominantemente por células do SI, mas também por células renais durante a inflamação (189). Depois de clivado, é libertado na circulação, numa forma solúvel, que se pode ligar a dois tipos de recetores, sTNFR1 e sTNFR2. Quando o TNF- α se liga aos recetores, ativa vias de sinalização que desencadeiam respostas imunológicas, inflamação e apoptose (189,190). O sTNFR1 é expresso nas células glomerulares e endoteliais, enquanto o sTNFR2 está ausente e só é transcrito quando há doenças renais (189). As funções do sTNFR1 e 2 não estão completamente esclarecidas, no entanto, ambos estão aumentados em doentes com DRC. Esses aumentos estão associados a deterioração da função renal (175,190,191); risco de

mortalidade ou risco aumentado de eventos CV na DRC avançada e progressão de DRC e DRC terminal em diabéticos (192,193). Juntamente com marcadores renais de rotina (creatinina sérica, BUN, albumina sérica, cistatina C), sTNFR 1 e 2 podem melhorar a exatidão do diagnóstico de DRC (191).

Indutor fraco de apoptose relacionado com o TNF (TWEAK)

O TWEAK é uma citocina que pertence à superfamília TNF; circula no plasma na forma solúvel, podendo ativar o *fibroblast growth factor-inducible 14* (Fn14). O TWEAK induz a apoptose de células mesangiais e tubulares; inflamação com lesão de células tubulares renais, podócitos e células mesangiais; angiogénese e regeneração de tecidos. Dependendo do tipo de célula, do estado da célula e do microambiente (como a presença ou ausência de inflamação), a ligação TWEAK- Fn14 resulta em diferentes respostas celulares (figura 12) (194,195). A sinalização temporária induzida pelo TWEAK/Fn14 pode ser benéfica para a reparação de tecidos após uma lesão aguda. No entanto, a sua ativação persistente ou excessiva, que acontece na lesão crónica, causa lesões teciduais progressivas e remodelação tecidual patológica (196). O Fn14 está presente em células renais (células mesangiais, tubulares, podócitos) e em células inflamatórias (macrófagos), sendo que a sua expressão celular permanece baixa em tecidos saudáveis e aumenta em resposta a stress ou a lesão tecidual. Na DRC, a ativação dos recetores Fn14 pelo TWEAK, nas células renais, promove o desenvolvimento de fibrose e envelhecimento precoce, através da indução de citocinas inflamatórias e redução da expressão de *klotho*, uma hormona com propriedades anti-inflamatória/antienvelhecimento altamente expressa nas células tubulares (194). Nos doentes em hemodiálise, as concentrações elevadas de TWEAK plasmático contribuem para o aumento do risco de mortalidade em geral e associada a eventos CV, especialmente quando está associado a inflamação sistémica. A IL-6 e o TWEAK, em conjunto, podem ajudar a identificar a subpopulação de doentes renais em maior risco de mortalidade (197).

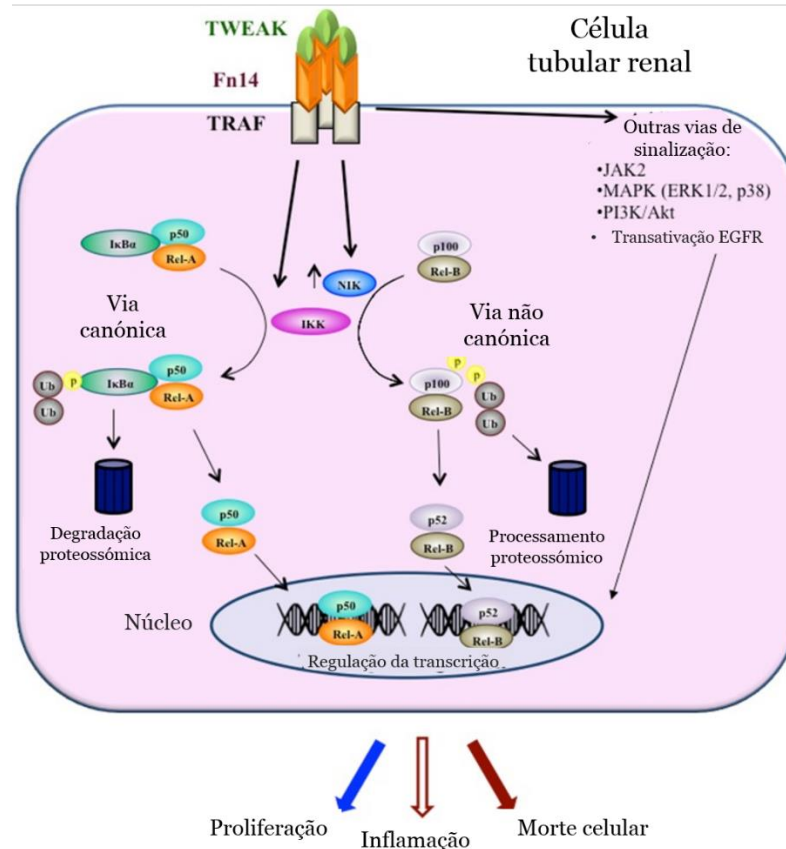


Figura 12- Vias de sinalização intracelulares ativadas pelo TWEAK quando se liga a FN14 das células tubulares renais

Fn-14-*fibroblast growth factor-inducible 14*; TWEAK- *Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis*;

Adaptado de Poveda *et al.*, 2013 (198)

Recetor solúvel do ativador de plasminogénio tipo urocinase solúvel (suPAR)

O suPAR, a forma circulante da proteína da membrana *urokinase plasminogen activator receptor* (uPAR) é expressa em leucócitos, células endoteliais e podócitos (figura 13) e está envolvida na adesão celular e migração através da interação com integrinas (199).

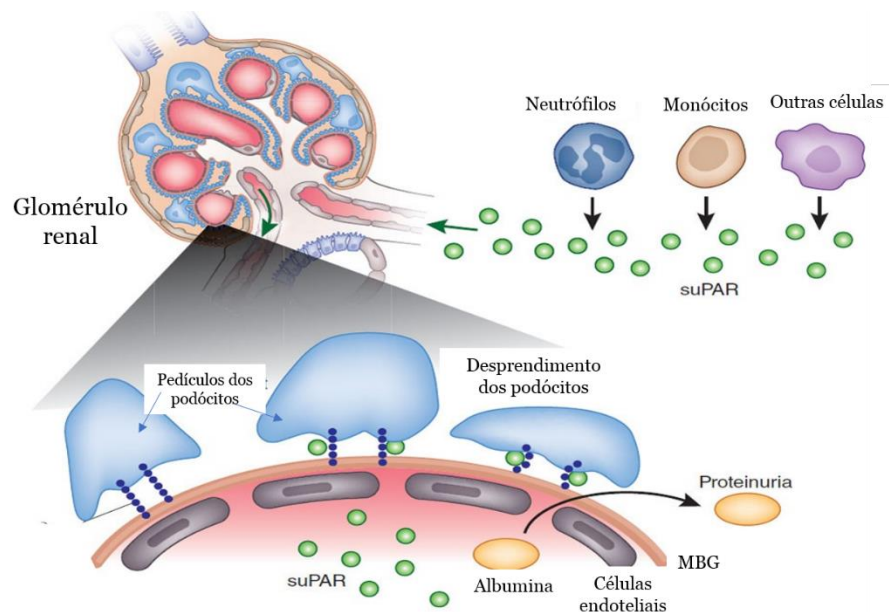


Figura 13- Produção de suPAR por neutrófilos, monócitos e outras células

suPAR interage com a integrina, essencial para manter o podócito conectado à MBG. MBG-membrana basal glomerular; suPAR- *Soluble urokinase-type plasminogen activator*; Adaptado de Kostovska *et al.*, 2017 (158).

As concentrações aumentadas da suPAR plasmática estão associadas a várias doenças renais. Apesar de não estar esclarecida a razão e o mecanismo que causa o aumento de suPAR, este parece estar envolvido na destruição de podócitos, contribuindo para o processo inflamatório (200). Em doentes com DRC e até em indivíduos saudáveis, a suPAR mostra ser um biomarcador preditivo de DRC, prevendo o seu desenvolvimento e progressão (201). O seu aumento está correlacionado com a severidade da DRC (199); é proporcional ao risco de morte, de eventos cardiovasculares e de falência renal (200).

Proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1)

A MCP-1 é uma quimiocina inflamatória que promove o recrutamento e a transformação de monócitos em macrófagos. Nos rins, esta proteína é libertada sobretudo por células epiteliais tubulares, em resposta a estímulos inflamatórios (202). Está envolvida no desenvolvimento de inflamação intersticial e fibrose renal, acontecimentos comuns na DRC progressiva (155). Em doenças inflamatórias, como a nefropatia diabética e o lúpus nefrítico, a MCP-1 aumenta, sendo um marcador preditivo de nefropatia diabética e de declínio da TFG_e, independentemente da albuminúria (100,202,203). Para além disso, está fortemente associada à progressão da DRC e pode identificar doentes em risco de fibrose (203). O valor de MCP-1 na urina mostra potencial como biomarcador de diagnóstico e de

prognóstico nas doenças renais, podendo ser usado em combinação com marcadores convencionais no diagnóstico e monitorização da doença renal (100,202).

Proteómica urinária

Com o desenvolvimento da genómica, transcriptómica, proteómica e metabolómica, foi possível identificar novos biomarcadores em doenças renais e desvendar mecanismos fisiopatológicos da DRC. Contudo, a complexidade, acessibilidade e os custos destes métodos representam obstáculos à sua utilização na prática clínica quotidiana (202).

Múltiplas investigações na área da proteómica têm sido conduzidas na última década, para identificar marcadores de deteção precoce e/ou prognóstico de doenças crónicas. No contexto da DRC, pretende-se identificar alterações moleculares associadas ao início da doença e/ou à sua progressão, evitando o diagnóstico tardio pelos métodos convencionais (figura 14) (204).

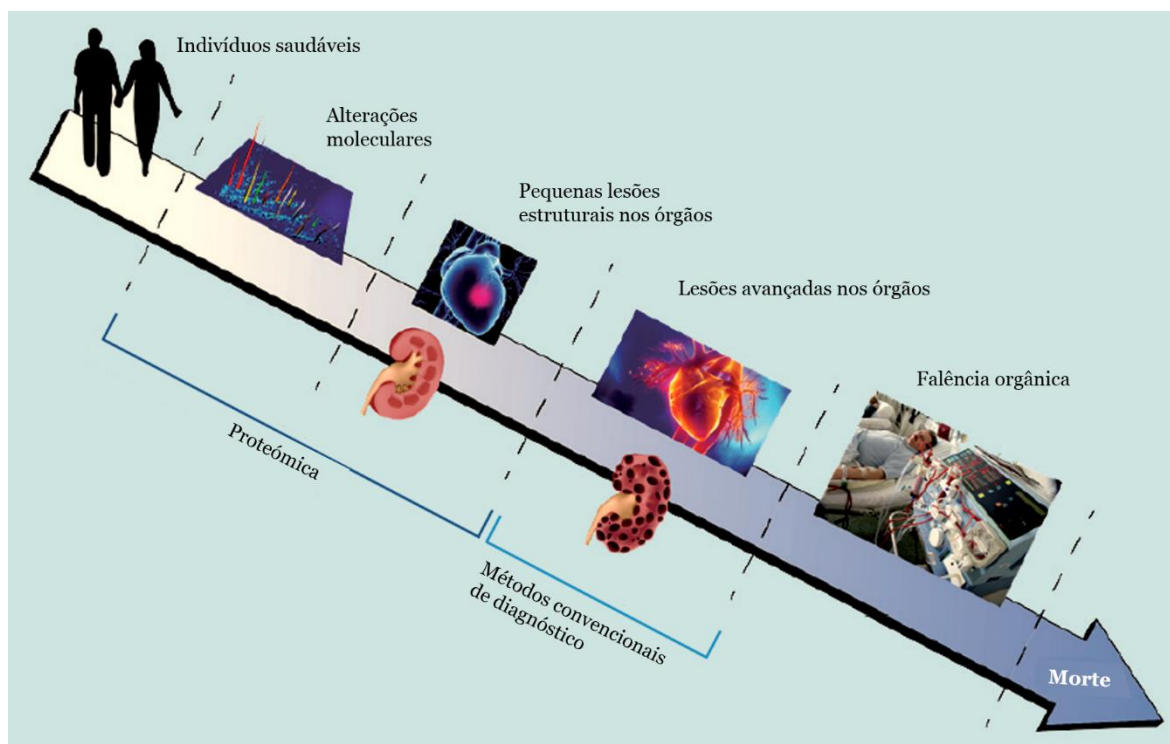


Figura 14- Análise proteómica

A análise proteómica ajuda a identificar alterações moleculares associadas ao início da doença e/ou à sua progressão, permitindo o diagnóstico precoce, melhores resultados no tratamento e evitar complicações.

Adaptado de Stepczynska *et al*, 2016 (204).

Chronic kidney disease 273 (CKD273)

O CKD273 é um algoritmo classificador do desenvolvimento e progressão de DRC, de elevada sensibilidade e especificidade, baseado na proteómica urinária, que combina informação sobre 273 péptidos urinários (205). As concentrações destes péptidos variam entre controlos saudáveis e doentes com DRC, sendo possível detetar a doença, independentemente da sua etiologia (206). Os componentes mais representativos do CKD273 incluem fragmentos derivados de colagénio, que estão diminuídos na DRC; fragmentos de proteínas plasmáticas (e.g. α 1-antitripsina, albumina sérica...), que estão aumentados na DRC; fragmentos de proteínas secretadas e proteínas específicas do rim (e.g. uromodulina) (205). As proteínas que deram origem aos fragmentos urinários, estão associadas à fisiopatologia da DRC. Uma menor quantidade de fragmentos derivados de colagénio indica fibrose renal, enquanto que o aumento de fragmentos de proteínas plasmáticas poderá representar, para além da fibrose, inflamação renal (206).

Com a utilização do CKD273 é possível identificar precocemente indivíduos com lesão renal, que podem vir a desenvolver DRC; prever a deterioração da função renal em diabéticos que desenvolvem DRC sem mostrar albuminúria significativa; e classificar a DRC, de acordo com a severidade (207). O CKD 273 parece ser um melhor marcador que a albuminúria, para prever a progressão DRC apenas nos estádios mais precoces e o agravamento de albuminúria (155).

A complexidade da DRC faz com seja improvável a utilização de apenas um biomarcador, portanto, o ideal seria utilizar um conjunto de biomarcadores, como acontece com o CKD273, que permitam detetar precocemente alterações renais para um diagnóstico atempado, que permita uma intervenção rápida, prevenindo a progressão da doença renal (95).

Conclusão

À medida que a DRC progride, há desenvolvimento de outras complicações, cada vez mais frequentes e severas, que contribuem também para elevada morbidade, mortalidade e baixa qualidade de vida dos doentes. É fundamental o diagnóstico precoce e a monitorização da doença renal.

Como os marcadores tradicionais, TFGe (baseada na creatinina sérica) e albuminúria, apresentam bastantes limitações, a procura de novos marcadores tem sido cada vez maior. Existem marcadores não invasivos que parecem detetar a lesão renal numa fase mais precoce da doença, comparativamente com os marcadores convencionais, e que se podem classificar segundo o processo alterado que evidenciam: função renal (ex. cistatina C); lesão glomerular (ex. nefrina); lesão tubular (ex. NGAL); lesão endotelial (ex. ADMA) e inflamação (ex. PTX3). Também novas tecnologias, como a proteómica, permitiram avançar na identificação de potenciais marcadores, como o CKD273, para o diagnóstico e monitorização da DRC.

Os múltiplos e complexos mecanismos patológicos envolvidos no desenvolvimento e progressão de DRC tornam improvável a utilização de apenas um marcador que reflita todas as alterações ocorridas no decurso desta doença. Com base nos estudos mencionados na presente monografia, pode concluir-se que será necessário um painel de biomarcadores para diagnosticar a DRC desde os estádios iniciais. Deverão ser selecionados marcadores que já apresentam evidências suficientes quanto à sua eficácia como marcador individual e/ou combinado; deverão ser específicos e sensíveis; úteis no diagnóstico, monitorização e prognóstico de DRC.

Em conclusão, a identificação de biomarcadores ou de um painel de biomarcadores da doença constitui uma área de investigação de interesse atual. Talvez num futuro não tão distante, os marcadores convencionais sejam substituídos por novos marcadores, de reconhecida eficácia, sensibilidade e especificidade, através de grandes estudos a longo prazo, permitindo diagnosticar precocemente, reduzir custos associados à progressão da doença para falência renal e à elevada morbidade observada nestes doentes.

Anexos

Tabela 6- Equações para estimar a taxa de filtração glomerular

Cockcroft-Gault	$140 - \text{idade} \times \text{peso} / (72 \times \text{creatinina s\acute{e}rica}) \times 0,85$ (se mulher)
Equa\c{c}\~ao MDRD	$175 \times \text{creatinina s\acute{e}rica}^{-1,154} \times \text{idade}^{-0,203} \times 0,742$ (se mulher) $\times 1,212$ (se de ra\c{c}\~a negra)
Equa\c{c}\~ao CKD-EPI (2009) baseada na creatinina s\acute{e}rica	$141 \times \min(\text{creatinina s\acute{e}rica} / \kappa, 1)^{\alpha} \times \max(\text{creatinina s\acute{e}rica} / \kappa, 1)^{-1,209} \times 0,993^{\text{idade}}$ [$\times 1,018$ (se mulher)] [$\times 1,159$ (se de ra\c{c}\~a negra)]
Equa\c{c}\~ao CKD-EPI (2012) baseada na cistatina C s\acute{e}rica	$133 \times \min(\text{cistatina C s\acute{e}rica} / 0,8, 1)^{-0,499} \times \max(\text{cistatina C s\acute{e}rica} / 0,8, 1)^{-1,328} \times 0,996^{\text{idade}}$ [$\times 0,932$ se mulher]
Equa\c{c}\~ao CKD-EPI (2012) baseada na cistatina C e na creatinina s\acute{e}rica	$135 \times \min(\text{creatinina s\acute{e}rica} / \kappa, 1)^{-\alpha} \times \max(\text{creatinina s\acute{e}rica} / \kappa, 1)^{-0,601} \times \min(\text{cistatina C s\acute{e}rica} / 0,8, 1)^{-0,375} \times \max(\text{cistatina C s\acute{e}rica} / 0,8, 1)^{-0,711} \times 0,995^{\text{idade}}$ [$\times 0,969$ se mulher] [$\times 1,08$ se de ra\c{c}\~a negra]

K = 0,7 para mulheres; K= 0,9 para homens; α = -0,248 para mulheres; α = -0,207 para homens; CKD-EPI - *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*; MDRD- *modification of diet in renal disease*; Adaptado de Wasung *et al.*, 2015 (105) e Gentile e Remuzzi, 2016 (98)

Referências bibliográficas

1. Burtis C, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6ª edição. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2008. 631–643 p.
2. Eckardt K-U, Coresh J, Devuyst O, Johnson RJ, Köttgen A, Levey AS, et al. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet*. 2013;382(9887):158–69.
3. Wang J, Masehi-Lano JJ, Chung EJ. Peptide and antibody ligands for renal targeting: nanomedicine strategies for kidney disease. *Biomater Sci*. 2017;5(8):1450–9.
4. Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Injury 2012. *Kidney Int Suppl*. 2012;2(1):19–36.
5. KDIGO 2012: Definition and classification of CKD. *Kidney Int Suppl*. 2013;3(1):19–62.
6. Santos-Silva A, Costa E, Alves R. Chronic Kidney Disease. Em: Biomarkers of Cardiometabolic Risk, Inflammation and Disease [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [citado 2 de Maio de 2020]. p. 95–111. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-16018-4_5
7. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *The Lancet*. 2017;389(10075):1238–52.
8. Harambat J, van Stralen KJ, Kim JJ, Tizard EJ. Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatr Nephrol*. 2012;27(3):363–73.
9. Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, et al. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3(1):1–24.
10. Weiner DE. Causes and consequences of chronic kidney disease: implications for managed health care. *J Manag Care Pharm*. 2007;13(3 Suppl):S1–9.
11. Kazancioğlu R. Risk factors for chronic kidney disease: an update. *Kidney Int Suppl*. 2013;3(4):368–71.
12. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2012;379(9811):165–80.
13. SPN. Portuguese Registry of Dialysis and Transplantation. *Port J Nephrol Hypert*. 2018;
14. Herget-Rosenthal S, Dehnen D, Kribben A, Quellmann T. Progressive chronic kidney disease in primary care: modifiable risk factors and predictive model. *Prev Med*. 2013;57(4):357–62.
15. Rosenberg AZ, Kopp JB. Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(3):502–17.
16. Kriz W, Lemley KV. A Potential Role for Mechanical Forces in the Detachment of Podocytes and the Progression of CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(2):258–69.
17. Sever S, Schiffer M. Actin dynamics at focal adhesions: a common endpoint and putative therapeutic target for proteinuric kidney diseases. *Kidney Int*. 2018;93(6):1298–307.

18. Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: Is the podocyte the culprit? *Kidney Int.* 1998;54(3):687–97.
19. Endlich K, Klieve F, Endlich N. Stressed podocytes-mechanical forces, sensors, signaling and response. *Pflugers Arch.* 2017;469(7–8):937–49.
20. Cravedi P, Remuzzi G. Pathophysiology of proteinuria and its value as an outcome measure in chronic kidney disease. *Br J Clin Pharmacol.* 2013;76(4):516–23.
21. Matovinović MS. 1. Pathophysiology and Classification of Kidney Diseases. *EJIFCC.* 2009;20(1):2–11.
22. Ruggenenti P, Cravedi P, Remuzzi G. Mechanisms and treatment of CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(12):1917–28.
23. Vega G, Alarcón S, San Martín R. The cellular and signalling alterations conducted by TGF- β contributing to renal fibrosis. *Cytokine.* 2016;88:115–25.
24. Lin S-L, Kisseleva T, Brenner DA, Duffield JS. Pericytes and Perivascular Fibroblasts Are the Primary Source of Collagen-Producing Cells in Obstructive Fibrosis of the Kidney. *Am J Pathol.* 2008;173(6):1617–27.
25. Shih H-M, Wu C-J, Lin S-L. Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. *J Formos Med Assoc.* 2018;117(11):955–63.
26. Schelling JR. Tubular atrophy in the pathogenesis of chronic kidney disease progression. *Pediatr Nephrol.* 2016;31(5):693–706.
27. Hodgkins KS, Schnaper HW. Tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(6):901–9.
28. Bello AK, Alrukhaimi M, Ashuntantang GE, Basnet S, Rotter RC, Douthat WG, et al. Complications of chronic kidney disease: current state, knowledge gaps, and strategy for action. *Kidney Int Suppl.* 2017;7(2):122–9.
29. Snively CS, Gutierrez C. Chronic Kidney Disease: Prevention and Treatment of Common Complications. *AFP.* 2004;70(10):1921–8.
30. Thomas R, Kanso A, Sedor JR. Chronic Kidney Disease and Its Complications. *Prim Care.* 2008;35(2):329–vii.
31. WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity [Internet]. WHO. World Health Organization; [citado 27 de Abril de 2020]. Disponível em: <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin/en/>
32. Stauffer ME, Fan T. Prevalence of Anemia in Chronic Kidney Disease in the United States. *PLOS ONE.* 2014;9(1):e84943.
33. Nakhoul G, Simon JF. Anemia of chronic kidney disease: Treat it, but not too aggressively. *CCJM.* 2016;83(8):613–24.
34. Astor BC, Muntner P, Levin A, Eustace JA, Coresh J. Association of Kidney Function With Anemia: The Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988–1994). *Arch Intern Med.* 2002;162(12):1401–8.

35. Zadrazil J, Horak P. Pathophysiology of anemia in chronic kidney diseases: A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2015;159(2):197–202.
36. KDIGO 2012: Diagnosis and evaluation of anemia in CKD. *Kidney Int Suppl.* 2012;2(4):288–91.
37. Nakanishi T, Kimura T, Kuragano T. The Hepcidin-Anemia Axis: Pathogenesis of Anemia in Chronic Kidney Disease. *Contrib Nephrol.* 2019;198:124–34.
38. Babitt JL, Lin HY. Mechanisms of Anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(10):1631–4.
39. Zhang Y, Wang L, Dey S, Alnaeeli M, Suresh S, Rogers H, et al. Erythropoietin Action in Stress Response, Tissue Maintenance and Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2014;15(6):10296–333.
40. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol.* 2011;589(Pt 6):1251–8.
41. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Reviews.* 2013;27(1):41–53.
42. Ribeiro SPN. Anemia and high therapeutic doses of recombinant human erythropoietin in chronic kidney disease - a linkage of risk? [Internet]. 2016 [citado 23 de Março de 2020]. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/91761>
43. Santos-Silva A, Ribeiro S, Reis F, Belo L. Hepcidin in chronic kidney disease anemia. *Vitam Horm.* 2019;110:243–64.
44. Babitt JL, Lin HY. Molecular Mechanisms of Hepcidin Regulation: Implications for the Anemia of CKD. *Am J Kidney Dis.* 2010;55(4):726–41.
45. Gafter-Gvili A, Schechter A, Rozen-Zvi B. Iron Deficiency Anemia in Chronic Kidney Disease. *Acta Haematol.* 2019;142(1):44–50.
46. Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, et al. Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int.* 2009;75(9):976–81.
47. Raj DS, Pecoits-Filho R, Kimmel PL. Chapter 17 - Inflammation in Chronic Kidney Disease. Em: Kimmel PL, Rosenberg ME, editores. *Chronic Renal Disease* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2015 [citado 29 de Abril de 2020]. p. 199–212. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124116023000172>
48. Hayat A, Haria D, Salifu MO. Erythropoietin stimulating agents in the management of anemia of chronic kidney disease. *Patient Prefer Adherence.* 2008;2:195–200.
49. Malyszko J, Mysliwiec M. Hepcidin in Anemia and Inflammation in Chronic Kidney Disease. *KBR.* 2007;30(1):15–30.
50. Ueda N, Takasawa K. Impact of Inflammation on Ferritin, Hepcidin and the Management of Iron Deficiency Anemia in Chronic Kidney Disease. *Nutrients.* 2018;10(9):1173.

51. Yilmaz MI, Yilmaz MI, Solak Y, Covic A, Goldsmith D, Kanbay M. Renal Anemia of Inflammation: The Name Is Self-Explanatory. *BPU*. 2011;32(3):220–5.
52. Goicoechea M, Martin J, Sequera P de, Quiroga JA, Ortiz A, Carreño V, et al. Role of cytokines in the response to erythropoietin in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1998;54(4):1337–43.
53. Vanholder R, Glorieux G, Smet RD, Lameire N. New insights in uremic toxins. *Kidney Int*. 2003;63:S6–10.
54. Nangaku M, Eckardt K-U. Pathogenesis of renal anemia. *Semin Nephrol*. 2006;26(4):261–8.
55. Lau WL, Savoj J, Nakata MB, Vaziri ND. Altered microbiome in chronic kidney disease: systemic effects of gut-derived uremic toxins. *Clin Sci*. 2018;132(5):509–22.
56. Atkinson MA, Warady BA. Anemia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2018;33(2):227–38.
57. Bonomini M, Del Vecchio L, Sirolli V, Locatelli F. New Treatment Approaches for the Anemia of CKD. *Am J Kidney Dis*. 2016;67(1):133–42.
58. KDIGO 2012: Use of iron to treat anemia in CKD. *Kidney Int Suppl*. 2012;2(4):292–8.
59. Roger SD. Practical considerations for iron therapy in the management of anaemia in patients with chronic kidney disease. *Clin Kidney J*. 2017;10(Suppl 1):i9–15.
60. KDIGO 2012: Use of ESAs and other agents* to treat anemia in CKD. *Kidney Int Suppl*. 2012;2(4):299–310.
61. KDIGO 2012: Red cell transfusion to treat anemia in CKD. *Kidney Int Suppl*. 2012;2(4):311–6.
62. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*. 1997;2:d12-26.
63. Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E. Markers of Inflammation. Em: DeWitt JC, Rockwell CE, Bowman CC, editores. *Immunotoxicity Testing: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer; 2018 [citado 1 de Maio de 2020]. p. 57–79. (Methods in Molecular Biology). Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8549-4_5
64. Silverstein DM. Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease. *Pediatr Nephrol*. 2009;24(8):1445–52.
65. Cobo G, Lindholm B, Stenvinkel P. Chronic inflammation in end-stage renal disease and dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(suppl_3):iii35–40.
66. Akchurin OM, Kaskel F. Update on Inflammation in Chronic Kidney Disease. *BPU*. 2015;39(1–3):84–92.
67. Mihai S, Codrici E, Popescu ID, Enciu A-M, Albulescu L, Necula LG, et al. Inflammation-Related Mechanisms in Chronic Kidney Disease Prediction, Progression, and Outcome [Internet]. Vol. 2018, *Journal of Immunology Research*. Hindawi; 2018 [citado 4 de Junho de 2020]. p. e2180373. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/2180373/>

68. Zoccali C, Vanholder R, Massy ZA, Ortiz A, Sarafidis P, Dekker FW, et al. The systemic nature of CKD. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(6):344–58.
69. Underwood CF, Hildreth CM, Wyse BF, Boyd R, Goodchild AK, Phillips JK. Uraemia: an unrecognized driver of central neurohumoral dysfunction in chronic kidney disease? *Acta Physiol.* 2017;219(1):305–23.
70. Levick SP, Murray DB, Janicki JS, Brower GL. Sympathetic Nervous System Modulation of Inflammation and Remodeling in the Hypertensive Heart. *Hypertension.* 2010;55(2):270–6.
71. Di Lullo L, Gorini A, Russo D, Santoboni A, Ronco C. Left Ventricular Hypertrophy in Chronic Kidney Disease Patients: From Pathophysiology to Treatment. *Cardiorenal Med.* 2015;5(4):254–66.
72. Meuwese CL, Meuwese CL, Carrero JJ, Stenvinkel P. Recent Insights in Inflammation-Associated Wasting in Patients with Chronic Kidney Disease. *Hemodialysis.* 2011;171:120–6.
73. Carrero JJ, Stenvinkel P, Cuppari L, Ikizler TA, Kalantar-Zadeh K, Kaysen G, et al. Etiology of the Protein-Energy Wasting Syndrome in Chronic Kidney Disease: A Consensus Statement From the International Society of Renal Nutrition and Metabolism (ISRNM). *J Ren Nutr.* 2013;23(2):77–90.
74. Gupta J, Mitra N, Kanetsky PA, Devaney J, Wing MR, Reilly M, et al. Association between Albuminuria, Kidney Function, and Inflammatory Biomarker Profile in CKD in CRIC. *CJASN.* 2012;7(12):1938–46.
75. Amdur RL, Feldman HI, Gupta J, Yang W, Kanetsky P, Shlipak M, et al. Inflammation and Progression of CKD: The CRIC Study. *CJASN.* 2016;11(9):1546–56.
76. Tripepi G, Mallamaci F, Zoccali C. Inflammation markers, adhesion molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: searching for the best risk marker by multivariate modeling. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16 Suppl 1:S83-88.
77. Sun J, Axelsson J, Machowska A, Heimbürger O, Bárány P, Lindholm B, et al. Biomarkers of Cardiovascular Disease and Mortality Risk in Patients with Advanced CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(7):1163–72.
78. Hager MR, Narla AD, Tannock LR. Dyslipidemia in patients with chronic kidney disease. *Rev Endocr Metab Disord.* 2017;18(1):29–40.
79. Tannock L. Dyslipidemia in Chronic Kidney Disease [Internet]. Endotext. 2000 [citado 23 de Junho de 2020]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305899/>
80. Tsimihodimos V, Mitrogianni Z, Elisaf M. Dyslipidemia Associated with Chronic Kidney Disease. *Open Cardiovasc Med J.* 2011;5:41–8.
81. Yang M, Fox CH, Vassalotti J, Choi M. Complications of Progression of CKD. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2011;18(6):400–5.
82. Hruska KA, Seifert M, Sugatani T. Pathophysiology of the Chronic Kidney Disease – Mineral Bone Disorder (CKD-MBD). *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;24(4):303–9.

83. Neyra JA, Hu MC. α Klotho and Chronic Kidney Disease. Em: Vitamins & Hormones [Internet]. Elsevier; 2016 [citado 25 de Junho de 2020]. p. 257–310. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0083672916000212>
84. Waziri B, Duarte R, Naicker S. Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD): Current Perspectives. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2019;12:263–76.
85. Wesseling-Perry K, Salusky IB. Chronic Kidney Disease: Mineral and Bone Disorder in Children. *Semin Nephrol*. 2013;33(2):169–79.
86. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl*. 2017;7(1):1–59.
87. Tunbridge MJ, Jardine AG. Cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Medicine*. 2019;47(9):585–90.
88. Marx N, Noels H, Jankowski J, Floege J, Fliser D, Böhm M. Mechanisms of cardiovascular complications in chronic kidney disease: research focus of the Transregional Research Consortium SFB TRR219 of the University Hospital Aachen (RWTH) and the Saarland University. *Clin Res Cardiol*. 2018;107(S2):120–6.
89. Sarnak Mark J., Levey Andrew S., Schoolwerth Anton C., Coresh Josef, Culleton Bruce, Hamm L. Lee, et al. Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease. *Hypertension*. 2003;42(5):1050–65.
90. Ross L, Banerjee D. Cardiovascular complications of chronic kidney disease: Editorial. *Int J Clin Pract*. 2013;67(1):4–5.
91. Cozzolino M, Mangano M, Stucchi A, Ciceri P, Conte F, Galassi A. Cardiovascular disease in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(Suppl 3):iii28–34.
92. Yu HT. Progression of Chronic Renal Failure. *Arch Intern Med*. 2003;163(12):1417–29.
93. Fogo AB. Mechanisms of progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2007;22(12):2011–22.
94. Tangri N, Stevens LA, Griffith J, Tighiouart H, Djurdjev O, Naimark D, et al. A Predictive Model for Progression of Chronic Kidney Disease to Kidney Failure. *JAMA*. 2011;305(15):1553–9.
95. Zhong J, Yang H-C, Fogo AB. A perspective on chronic kidney disease progression. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;312(3):F375–84.
96. Flury S, Kistler AD. [(How) can progression of chronic kidney diseases be retarded?]. *Ther Umsch*. 2018;75(6):345–53.
97. De Vriese AS, Fervenza FC. Con: Biomarkers in glomerular diseases: putting the cart before the wheel? *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(6):885–90.
98. Gentile G, Remuzzi G. Novel Biomarkers for Renal Diseases? None for the Moment (but One). *J Biomol Screen*. 2016;21(7):655–70.
99. Bennett MR, Devarajan P. Chapter 1 - Characteristics of an Ideal Biomarker of Kidney Diseases. Em: Edelstein CL, editor. *Biomarkers of Kidney Disease* [Internet]. San

Diego: Academic Press; 2011 [citado 2 de Maio de 2020]. p. 1–24. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123756725100015>

100. Lopez-Giacoman S, Madero M. Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage. *World J Nephrol.* 2015;4(1):57–73.
101. Rysz J, Gluba-Brzózka A, Franczyk B, Jabłonowski Z, Ciałkowska-Rysz A. Novel Biomarkers in the Diagnosis of Chronic Kidney Disease and the Prediction of Its Outcome. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8):1702.
102. Bagshaw SM, Bellomo R. Cystatin C in acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care.* 2010;16(6):533–9.
103. Inker LA, Levey AS. Knowing your GFR—when is the number not (exactly) the number? *Kidney Int.* 2019;96(2):280–2.
104. Ku E, Xie D, Shlipak M, Hyre Anderson A, Chen J, Go AS, et al. Change in Measured GFR Versus eGFR and CKD Outcomes. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(7):2196–204.
105. Wasung ME, Chawla LS, Madero M. Biomarkers of renal function, which and when? *Clin Chim Acta.* 2015;438:350–7.
106. Stevens LA, Levey AS. Measured GFR as a Confirmatory Test for Estimated GFR. *JASN.* 2009;20(11):2305–13.
107. Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, Eckfeldt JH, Feldman HI, Greene T, et al. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N Engl J Med.* 2012;367(1):20–9.
108. Stevens LA, Coresh J, Schmid CH, Feldman HI, Froissart M, Kusek J, et al. Estimating GFR Using Serum Cystatin C Alone and in Combination With Serum Creatinine: A Pooled Analysis of 3,418 Individuals With CKD. *Am J Kidney Dis.* 2008;51(3):395–406.
109. Ford SM. Chapter 14 - Conventional and emerging renal biomarkers. Em: Gupta RC, editor. *Biomarkers in Toxicology* [Internet]. Boston: Academic Press; 2014 [citado 18 de Junho de 2020]. p. 261–7. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124046306000142>
110. Ferguson MA, Waikar SS. Established and emerging markers of kidney function. *Clin Chem.* 2012;58(4):680–9.
111. Delanaye P, Cavalier E, Pottel H. Serum Creatinine: Not So Simple! *Nephron.* 2017;136(4):302–8.
112. Shemesh O, Golbetz H, Kriss JP, Myers BD. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney Int.* 1985;28(5):830–8.
113. Taglieri N, Koenig W, Kaski JC. Cystatin C and Cardiovascular Risk. *Clin Chem.* 2009;55(11):1932–43.
114. Fliser D, Ritz E. Serum cystatin C concentration as a marker of renal dysfunction in the elderly. *Am J Kidney Dis.* 2001;37(1):79–83.

115. Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: A meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2002;40(2):221–6.
116. Peralta CA, Shlipak MG, Judd S, Cushman M, McClellan W, Zakai NA, et al. Detection of Chronic Kidney Disease With Creatinine, Cystatin C, and Urine Albumin-to-Creatinine Ratio and Association With Progression to End-Stage Renal Disease and Mortality. *JAMA.* 2011;305(15):1545–52.
117. Ferguson TW, Komenda P, Tangri N. Cystatin C as a biomarker for estimating glomerular filtration rate. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;24(3):295–300.
118. Al Musaimi O, Abu-Nawwas AH, Al Shaer D, Khaleel NY, Fawzi M. Influence of age, gender, smoking, diabetes, thyroid and cardiac dysfunctions on cystatin C biomarker. *Semergen.* 2019;45(1):44–51.
119. Zhai J-L, Ge N, Zhen Y, Zhao Q, Liu C. Corticosteroids Significantly Increase Serum Cystatin C Concentration without Affecting Renal Function in Symptomatic Heart Failure. *Clin Lab.* 2016;62(1–2):203–7.
120. Chen HH. Beta Trace-Protein versus Cystatin C: Which is a Better Surrogate Marker of Renal Function versus Prognostic Indicator in Cardiovascular Diseases? *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(7):859–60.
121. Donadio C, Bozzoli L. Urinary β -trace protein. *Medicine.* 2016;95(49):e62837.
122. Donadio C, Lucchesi A, Ardini M, Donadio E, Giordani R. Serum levels of beta-trace protein and glomerular filtration rate--preliminary results. *J Pharm Biomed Anal.* 2003;32(4–5):1099–104.
123. Inker LA, Tighiouart H, Coresh J, Foster MC, Anderson AH, Beck GJ, et al. GFR Estimation Using β -Trace Protein and β 2-Microglobulin in CKD. *Am J Kidney Dis.* 2016;67(1):40–8.
124. White CA, Allen CM, Akbari A, Collier CP, Holland DC, Day AG, et al. Comparison of the new and traditional CKD-EPI GFR estimation equations with urinary inulin clearance: A study of equation performance. *Clin Chim Acta.* 2019;488:189–95.
125. Donadio C. Serum and urinary markers of early impairment of GFR in chronic kidney disease patients: diagnostic accuracy of urinary β -trace protein. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299(6):F1407–1423.
126. Ning M, Mao X, Niu Y, Tang B, Shen H. Usefulness and limitations of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the assessment of kidney diseases. *J Lab Precis Med [Internet].* 2018 [citado 16 de Maio de 2020];3(1). Disponível em: <http://jlpn.amegroups.com/article/view/3964>
127. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, Donato V, Campo S, Fazio MR, et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Progression of Chronic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(2):337–44.
128. Smith ER, Lee D, Cai MM, Tomlinson LA, Ford ML, McMahon LP, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin may aid prediction of renal decline in patients with non-proteinuric Stages 3 and 4 chronic kidney disease (CKD). *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(6):1569–79.

129. Lobato GR, Lobato MR, Thomé FS, Veronese FV. Performance of urinary kidney injury molecule-1, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, and N-acetyl- β -D-glucosaminidase to predict chronic kidney disease progression and adverse outcomes. *Braz J Med Biol Res.* 2017;50(5):e6106.
130. Mitsnefes MM, Kathman TS, Mishra J, Kartal J, Khoury PR, Nickolas TL, et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2007;22(1):101–8.
131. Gharishvandi F, Kazerouni F, Ghanei E, Rahimipour A, Nasiri M. Comparative Assessment of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Cystatin C as Early Biomarkers for Early Detection of Renal Failure in Patients with Hypertension. *Iran Biomed J.* 2015;19(2):76–81.
132. Nickolas TL, Forster CS, Sise ME, Barasch N, Solá-Del Valle D, Viltard M, et al. NGAL (Lcn2) monomer is associated with tubulointerstitial damage in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2012;82(6):718–22.
133. Basturk T, Sari O, Koc Y, Eren N, Isleem M, Kara E, et al. Prognostic significance of NGAL in early stage chronic kidney disease. *Minerva Urol Nefrol.* 2017;69(3):307–12.
134. Castillo-Rodriguez E, Fernandez-Prado R, Martin-Cleary C, Pizarro-Sánchez MS, Sanchez-Niño MD, Sanz AB, et al. Kidney Injury Marker 1 and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Chronic Kidney Disease. *NEF.* 2017;136(4):263–7.
135. Timmeren M van, Heuvel M van den, Bailly V, Bakker SJL, Goor H van, Stegeman CA. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. *J Pathol.* 2007;212(2):209–17.
136. Peralta CA, Katz R, Bonventre JV, Sabbisetti V, Siscovick D, Sarnak M, et al. Associations of Urinary Levels of Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) With Kidney Function Decline in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Kidney Dis.* 2012;60(6):904–11.
137. Jungbauer CG, Uecer E, Stadler S, Birner C, Buchner S, Maier LS, et al. N-acetyl- β -D-glucosaminidase and kidney injury molecule-1: New predictors for long-term progression of chronic kidney disease in patients with heart failure. *Nephrology.* 2016;21(6):490–8.
138. Dubin RF, Judd S, Scherzer R, Shlipak M, Warnock DG, Cushman M, et al. Urinary Tubular Injury Biomarkers Are Associated With ESRD and Death in the REGARDS Study. *Kidney Int Rep.* 2018;3(5):1183–92.
139. Zhou L-T, Lv L-L, Pan M-M, Cao Y-H, Liu H, Feng Y, et al. Are Urinary Tubular Injury Markers Useful in Chronic Kidney Disease? A Systematic Review and Meta Analysis. *PLOS ONE.* 2016;11(12):e0167334.
140. Price RG. The role of NAG (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity. *Clin Nephrol.* 1992;38 Suppl 1:S14-19.
141. Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Kimura K. [L-type fatty acid binding protein (L-FABP) and kidney disease]. *Rinsho Byori.* 2014;62(2):163–70.
142. Kamijo-Ikemori A, Ichikawa D, Matsui K, Yokoyama T, Sugaya T, Kimura K. [Urinary L-type fatty acid binding protein (L-FABP) as a new urinary biomarker

promulgated by the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan]. *Rinsho Byori*. 2013;61(7):635–40.

143. Fassett RG, Venuthurupalli SK, Gobe GC, Coombes JS, Cooper MA, Hoy WE. Biomarkers in chronic kidney disease: a review. *Kidney Int*. 2011;80(8):806–21.
144. Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A, Yamanouchi M, Hirata Y, Ishimitsu T, et al. Urinary liver-type fatty acid binding protein as a useful biomarker in chronic kidney disease. *Mol Cell Biochem*. 2006;284(1–2):175–82.
145. Nielsen SE, Sugaya T, Hovind P, Baba T, Parving H-H, Rossing P. Urinary Liver-Type Fatty Acid-Binding Protein Predicts Progression to Nephropathy in Type 1 Diabetic Patients. *Diabetes Care*. 2010;33(6):1320–4.
146. Khatir DS, Bendtsen MD, Birn H, Nørregaard R, Ivarsen P, Jespersen B, et al. Urine liver fatty acid binding protein and chronic kidney disease progression. *Scand J Clin Lab Invest*. 2017;77(7):549–54.
147. Hsu C-Y, Xie D, Waikar SS, Bonventre JV, Zhang X, Sabbiseti V, et al. Urine biomarkers of tubular injury do not improve on the clinical model predicting chronic kidney disease progression. *Kidney Int*. 2017;91(1):196–203.
148. Fedak D, Kuźniewski M, Fugiel A, Wiecek-Surdacka E, Przepiórkowska-Hoyer B, Jasik P, et al. Serum uromodulin concentrations correlate with glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease. *Pol Arch Intern Med*. 2016;995–1003.
149. Prajczek S, Heidenreich U, Pfaller W, Kotanko P, Lhotta K, Jennings P. Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease progression. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(6):1896–903.
150. Lhotta K. Uromodulin and chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res*. 2010;33(5):393–8.
151. Steubl D, Block M, Herbst V, Nockher W, Schlumberger W, Satanovskij R, et al. Plasma Uromodulin Correlates With Kidney Function and Identifies Early Stages in Chronic Kidney Disease Patients. *Medicine*. 2016;95(10):2–9.
152. Leiherer A, Muendlein A, Saely CH, Brandtner EM, Geiger K, Fraunberger P, et al. The value of uromodulin as a new serum marker to predict decline in renal function. *J Hypertens*. 2018;36(1):110–118.
153. Lv L, Wang J, Gao B, Wu L, Wang F, Cui Z, et al. Serum uromodulin and progression of kidney disease in patients with chronic kidney disease. *J Transl Med*. 2018;16:316.
154. Heerspink HJL, Gansevoort RT. Albuminuria Is an Appropriate Therapeutic Target in Patients with CKD: The Pro View. *CJASN*. 2015;10(6):1079–88.
155. Ntrini T, Papasotiriou M, Balta L, Kalavrizioti D, Vamvakas S, Papachristou E, et al. Biomarkers in Progressive Chronic Kidney Disease. Still a Long Way to Go. *Prilozi*. 2019;40(3):27–39.
156. Asanuma K. [The role of podocyte injury in chronic kidney disease]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2015;38(1):26–36.

157. Kravets I, Mallipattu SK. The Role of Podocytes and Podocyte-Associated Biomarkers in Diagnosis and Treatment of Diabetic Kidney Disease. *J Endocr Soc.* 2020;4(4):1–11.
158. Kostovska I, Tosheska-Trajkovska K, Cekovska S, Spasovski G, Labudovic D. Nephric and Podocalyxin - New Podocyte Proteins for Early Detection of Secondary Nephropathies. *BANTAO Journal.* 2017;14:11–6.
159. Akankwasa G, Jianhua L, Guixue C, Changjuan A, Xiaosong Q. Urine markers of podocyte dysfunction: a review of podocalyxin and nephric in selected glomerular diseases. *Biomark Med.* 2018;12(8):927–35.
160. ElShaarawy A, Behairy MA, Bawady SA, Abdelsattar HA, Shadad E. Urinary podocin level as a predictor of diabetic kidney disease. *J Nephrol.* 2018;8(3):e26–e26.
161. Hanamura K, Tojo A, Fujita T. Urinary and glomerular podocytes in patients with chronic kidney diseases. *Clin Exp Nephrol.* 2014;18(1):95–103.
162. Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Boeger SM, Cooke JP, Fliser D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function—a meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(9):2446–51.
163. Oliva-Damaso E, Oliva-Damaso N, Rodriguez-Esparragon F, Payan J, Baamonde-Laborda E, Gonzalez-Cabrera F, et al. Asymmetric (ADMA) and Symmetric (SDMA) Dimethylarginines in Chronic Kidney Disease: A Clinical Approach. *Int J Mol Sci.* 2019;20(15):3668.
164. Konya H, Miuchi M, Satani K, Matsutani S, Yano Y, Tsunoda T, et al. Asymmetric dimethylarginine, a biomarker of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *World J Exp Med.* 2015;5(2):110–9.
165. Fliser D, Kronenberg F, Kielstein JT, Morath C, Bode-Böger SM, Haller H, et al. Asymmetric Dimethylarginine and Progression of Chronic Kidney Disease: The Mild to Moderate Kidney Disease Study. *JASN.* 2005;16(8):2456–61.
166. Raptis V, Kapoulas S, Grekas D. Role of asymmetrical dimethylarginine in the progression of renal disease. *Nephrology.* 2013;18(1):11–21.
167. Ravani P, Tripepi G, Malberti F, Testa S, Mallamaci F, Zoccali C. Asymmetrical Dimethylarginine Predicts Progression to Dialysis and Death in Patients with Chronic Kidney Disease: A Competing Risks Modeling Approach. *JASN.* 2005;16(8):2449–55.
168. Lajer M, Tarnow L, Jorsal A, Teerlink T, Parving H-H, Rossing P. Plasma Concentration of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) Predicts Cardiovascular Morbidity and Mortality in Type 1 Diabetic Patients With Diabetic Nephropathy. *Diabetes Care.* 2008;31(4):747–52.
169. Schlesinger S, Sonntag SR, Lieb W, Maas R. Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine as Risk Markers for Total Mortality and Cardiovascular Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *PLoS ONE.* 2016;11(11):e0165811.
170. Emrich IE, Zawada AM, Martens-Lobenhoffer J, Fliser D, Wagenpfeil S, Heine GH, et al. Symmetric dimethylarginine (SDMA) outperforms asymmetric dimethylarginine

- (ADMA) and other methylarginines as predictor of renal and cardiovascular outcome in non-dialysis chronic kidney disease. *Clin Res Cardiol*. 2018;107(3):201–13.
171. Zewinger S, Kleber ME, Rohrer L, Lehmann M, Triem S, Jennings RT, et al. Symmetric dimethylarginine, high-density lipoproteins and cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2017;38(20):1597–607.
 172. Fornai F, Carrizzo A, Forte M, Ambrosio M, Damato A, Ferrucci M, et al. The inflammatory protein Pentraxin 3 in cardiovascular disease. *Immun Ageing*. 2016;13(1):25.
 173. Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol*. 2018;9:754.
 174. Kunes P, Holubcova Z, Kolackova M, Krejsek J. Pentraxin 3 (PTX 3): An Endogenous Modulator of the Inflammatory Response [Internet]. Vol. 2012, *Mediators of Inflammation*. Hindawi; 2012 [citado 31 de Maio de 2020]. p. e920517. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2012/920517/>
 175. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Jhangri GS, Curhan G. Biomarkers of inflammation and progression of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2005;68(1):237–45.
 176. Adejumo OA, Okaka EI, Okwuonu CG, Iyawe IO, Odujoko OO. Serum C-reactive protein levels in pre-dialysis chronic kidney disease patients in southern Nigeria. *Ghana Med J*. 2016;50(1):31–8.
 177. Kugler E, Cohen E, Goldberg E, Nardi Y, Levi A, Krause I, et al. C reactive protein and long-term risk for chronic kidney disease: a historical prospective study. *J Nephrol*. 2015;28(3):321–7.
 178. Fu EL, Franko MA, Obergfell A, Dekker FW, Gabrielsen A, Jernberg T, et al. High-sensitivity C-reactive protein and the risk of chronic kidney disease progression or acute kidney injury in post-myocardial infarction patients. *Am Heart J*. 2019;216:20–9.
 179. Sjöberg B, Qureshi AR, Heimbürger O, Stenvinkel P, Lind L, Larsson A, et al. Association between levels of pentraxin 3 and incidence of chronic kidney disease in the elderly. *J Intern Med*. 2016;279(2):173–9.
 180. Valente MJ, Rocha S, Coimbra S, Catarino C, Rocha-Pereira P, Bronze-da-Rocha E, et al. Long Pentraxin 3 as a Broader Biomarker for Multiple Risk Factors in End-Stage Renal Disease: Association with All-Cause Mortality. *Mediators Inflamm*. 2019;2019:e3295725.
 181. Nauta AJ, De Haij S, Bottazzi B, Mantovani A, Borrias MC, Aten JAN, et al. Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3. *Kidney Int*. 2005;67(2):543–53.
 182. Speeckaert MM, Speeckaert R, Carrero JJ, Vanholder R, Delanghe JR. Biology of human pentraxin 3 (PTX3) in acute and chronic kidney disease. *J Clin Immunol*. 2013;33(5):881–90.
 183. Tong M, Carrero JJ, Qureshi AR, Anderstam B, Heimbürger O, Bárány P, et al. Plasma Pentraxin 3 in Patients with Chronic Kidney Disease: Associations with Renal Function, Protein-Energy Wasting, Cardiovascular Disease, and Mortality. *CJASN*. 2007;2(5):889–97.

184. Lee R, Shin M-H, Kim H-N, Lee Y-H, Choi S-W, Ahn H-R, et al. Relationship between plasma pentraxin 3 level and risk of chronic kidney disease in the Korean elderly: the Dong-gu study. *Int Urol Nephrol*. 2017;49(11):2027–33.
185. Su H, Lei C-T, Zhang C. Interleukin-6 Signaling Pathway and Its Role in Kidney Disease: An Update. *Front Immunol*. 2017;8:405.
186. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(Suppl 2):S3.
187. Dai L, Golembiewska E, Lindholm B, Stenvinkel P. End-Stage Renal Disease, Inflammation and Cardiovascular Outcomes. *Contrib Nephrol*. 2017;191:32–43.
188. Lee BT, Ahmed FA, Hamm LL, Teran FJ, Chen C-S, Liu Y, et al. Association of C-reactive protein, tumor necrosis factor- α , and interleukin-6 with chronic kidney disease. *BMC Nephrol*. 2015;16:17.
189. Al-Lamki RS, Mayadas TN. TNF receptors: signaling pathways and contribution to renal dysfunction. *Kidney Int*. 2015;87(2):281–96.
190. Moreira JM, da Silva AN, Marciano Vieira ÉL, Teixeira AL, Kummer AM, Simões e Silva AC. Soluble tumor necrosis factor receptors are associated with severity of kidney dysfunction in pediatric chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2019;34(2):349–52.
191. Xun C, Zhao Y. Potential Role of Soluble TNF- α Receptors in Diagnosis of Patients with Chronic Kidney Disease. *Ann Clin Lab Sci*. 2017;47(3):310–4.
192. Neiryneck N, Glorieux G, Schepers E, Verbeke F, Vanholder R. Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor 1 and 2 Predict Outcomes in Advanced Chronic Kidney Disease: A Prospective Cohort Study. *PLoS One*. 2015;10(3):e0122073.
193. Carlsson AC, Larsson TE, Helmersson-Karlqvist J, Larsson A, Lind L, Ärnlov J. Soluble TNF Receptors and Kidney Dysfunction in the Elderly. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(6):1313–20.
194. Sanz AB, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD, Ucero AC, Egido J, Ruiz-Ortega M, et al. TWEAK and the progression of renal disease: clinical translation. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(Suppl 1):i54–62.
195. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ortiz A. TWEAK, a multifunctional cytokine in kidney injury. *Kidney Int*. 2011;80(7):708–18.
196. Burkly LC. TWEAK/Fn14 axis: The current paradigm of tissue injury-inducible function in the midst of complexities. *Semin Immunol*. 2014;26(3):229–36.
197. Carrero JJ, Ortiz A, Qureshi AR, Martín-Ventura JL, Bárány P, Heimbürger O, et al. Additive effects of soluble TWEAK and inflammation on mortality in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(1):110–8.
198. Poveda J, Tabara LC, Fernandez-Fernandez B, Martin-Cleary C, Sanz AB, Selgas R, et al. TWEAK/Fn14 and Non-Canonical NF- κ B Signaling in Kidney Disease. *Front Immunol*. 2013;4:447.
199. Ahmed RM, Khalil MA, Ibrahim AH, Eid HM, Abdelbasset WK, Soliman GS. Clinical value of soluble urokinase type plasminogen activator receptors in chronic kidney disease. *Medicine*. 2019;98(38):e17146.

200. Shuai T, Yan P, Xiong H, Huang Q, Zhu L, Yang K, et al. Association between Soluble Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Levels and Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2019;2019:6927456.
201. Hamie L, Daoud G, Nemer G, Nammour T, Chediak AE, Uthman IW, et al. SuPAR, an emerging biomarker in kidney and inflammatory diseases. *Postgrad Med J*. 2018;94(1115):517–24.
202. Tummalapalli L, Nadkarni GN, Coca SG. Biomarkers for predicting outcomes in chronic kidney disease: *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2016;25(6):480–6.
203. Mansour SG, Puthumana J, Coca SG, Gentry M, Parikh CR. Biomarkers for the detection of renal fibrosis and prediction of renal outcomes: a systematic review. *BMC Nephrol*. 2017;18(1):72.
204. Stepczynska A, Schanstra JP, Mischak H. Implementation of CE-MS-identified proteome-based biomarker panels in drug development and patient management. *Bioanalysis*. 2016;8(5):439–55.
205. Good DM, Zürbig P, Argilés À, Bauer HW, Behrens G, Coon JJ, et al. Naturally Occurring Human Urinary Peptides for Use in Diagnosis of Chronic Kidney Disease. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(11):2424–37.
206. Pontillo C, Mischak H. Urinary peptide-based classifier CKD273: towards clinical application in chronic kidney disease. *Clin Kidney J*. 2017;10(2):192.
207. Argilés À, Siwy J, Duranton F, Gayrard N, Dakna M, Lundin U, et al. CKD273, a New Proteomics Classifier Assessing CKD and Its Prognosis. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e62837.

Relatório de Estágio

Marisa Fernandes Lagoa

Mestrado em Análises Clínicas

Estágio realizado sob a orientação de:

Dr^a Eduarda Figueiredo do Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa
Porto

Dr^a La Salete Robles do laboratório La Salete Robles

Julho de 2020

Resumo

O presente relatório refere-se ao estágio realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. No estágio de 400 horas, foram abordadas as valências de química clínica, imunologia e hematologia, no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa Porto, sob a orientação da Dr^a Eduarda Figueiredo; enquanto o estágio em microbiologia foi realizada no laboratório La Salette Robles, em Famalicão, sob a orientação da Dr^a La Salette Robles.

Este relatório descreve de uma forma sucinta as atividades realizadas no laboratório como o controlo de qualidade, os parâmetros analíticos avaliados, equipamentos utilizados, fundamento dos métodos e interpretação dos resultados relativamente a cada valência.

Palavras-chave: Química Clínica; Imunologia; Hematologia; Microbiologia;

Abstract

This report refers to the internship carried out under the master's degree in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy of the University of Porto. In the 400-hour internship, clinical chemistry, immunology and hematology were addressed at the Germano de Sousa Laboratory Medicine Center Porto, under the guidance of Dr. Eduarda Figueiredo; while the internship in microbiology was carried out at La Salette Robles laboratory, in Famalicão, under the guidance of Dr. La Salette Robles.

This report briefly describes the activities carried out in the laboratory like quality control, the analytical parameters evaluated, the equipment used, the basis of the methods and the interpretation of the results in relation to each area of work.

Keywords: Clinical Chemistry; Immunology; Hematology; Microbiology.

Agradecimentos

Após a realização do meu estágio não poderia deixar de agradecer a toda a equipa de trabalho do CML-GS Porto e do laboratório La Salette Robles por todo o apoio que demonstraram, simpatia e pela transmissão de conhecimentos ao longo do processo de trabalho que vão contribuir para melhorar as minhas competências técnicas na área de análises clínicas. Em especial, quero expressar o meu agradecimento à Dr.^a Eduarda Figueiredo pela sua orientação, disponibilidade e apoio; à Dra. La Salette Robles pela orientação e pela oportunidade em realizar o estágio no seu laboratório, apesar das circunstâncias complicadas em que nos encontramos; e por último, agradeço também ao Dr. Pedro Machado pela dedicação e pela ajuda fundamental na minha aprendizagem na microbiologia.

A todos,

Um muito obrigado.

Índice

Resumo	ii
Abstract.....	ii
Agradecimentos	iii
Índice	iv
Índice de tabelas	vii
Índice de figuras	viii
Lista de abreviaturas e símbolos	ix
Introdução	1
Fase pré-analítica.....	3
Colheita de amostras.....	3
Colheita de sangue.....	4
Colheita de urina	5
Colheita de fezes	5
Colheita de outros produtos biológicos	6
Controlo de qualidade interno (CQI).....	6
Avaliação externa da qualidade (AEQ).....	6
Imunologia.....	7
Imunologia no <i>Liaison XL</i> :	7
Tipos de Imunoensaios por quimiluminescência	9
Imunoensaio indireto com quimiluminescência.....	9
Imunoensaio de sanduíche com quimiluminescência	10
Imunoensaio competitivo com quimiluminescência	11
Imunoensaio de captura de Ig M por quimiluminescência.....	11
Módulo de imunologia no <i>Atellica</i>	12
Deteção de <i>Treponema pallidum</i>	16
RPR.....	16
TPHA	17
Teste de <i>Rose Bengal</i>	18

Teste da mononucleose infecciosa (MI)	18
Reação de <i>Widal</i>	18
Reação de <i>Wahler Rose</i>	18
Pesquisa de fator reumatóide (látex)	19
Reação de <i>Weil Félix</i>	19
Bioquímica.....	19
Fotometria.....	19
Imuno-turbidimetria.....	20
Módulo de Química no <i>Atellica</i>	21
Potenciometria	23
Ionograma.....	24
Eletroforese de proteínas séricas	24
Pesquisa de hCG na urina- teste de gravidez	26
Urina tipo II	27
Drogas de abuso	29
Sangue oculto nas fezes.....	29
Hematologia.....	30
Hemograma	30
Eritrograma	30
Leucograma	32
Plaquetograma.....	33
Princípio do método	33
Esfregaços sanguíneos.....	36
Velocidade de sedimentação	37
Hemoglobina glicada	38
Coagulação	40
Tempo de protrombina	40
Tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT)	41
Fibrinogénio	41

Citometria de fluxo	41
Imunofenotipagem.....	42
Populações linfocitárias em casos HIV positivo	43
Determinação do HLA-B27	44
Microbiologia.....	45
Meios de cultura.....	45
Urina	48
Fezes.....	50
Exsudado uretral.....	50
Exsudado vaginal e vagino-retal	51
Exsudado purulento.....	51
VITEK 2 Compact	51
GRAM.....	53
Coloração de <i>Ziehl-Neelsen</i>	54
Prova da catalase.....	55
Prova da oxidase	55
Pesquisa de ovos /parasitas fecais	56
Bibliografia	57

Índice de tabelas

Tabela 1- Principais tubos de colheita de sangue	4
Tabela 2- Programas de AEQ.....	7
Tabela 3- Parâmetros analisados no <i>Liaison XL</i>	8
Tabela 4- Parâmetros analisados no <i>Atellica Solution</i> – Módulo de Imunologia.....	13
Tabela 5- Parâmetros analisados no <i>Atellica Solution</i> –Módulo de Química.....	21
Tabela 6- Ionograma realizado no <i>Atellica Solution</i> –Módulo de Química.....	24
Tabela 7- Proteínas analisadas na eletroforese	26
Tabela 8- Métodos usados para o exame físico-químico da urina	27
Tabela 9- Elementos encontrados no sedimento urinário	28
Tabela 10 -Parâmetros avaliados num eritrograma	31
Tabela 11- Classificação morfológica da anemia.....	32
Tabela 12- Parâmetros avaliados num leucograma.....	32
Tabela 13-Possíveis causas de trombocitose e trombocitopenia	33
Tabela 14-Metodologia utilizada pelo <i>Sysmex XE-2100</i>	34
Tabela 15- Antígenos pesquisados na imunofenotipagem	43
Tabela 16-Painel específico para casos HIV positivo.....	44
Tabela 17- Meios de cultura utilizados	45
Tabela 18- Cartas de identificação no <i>Vitek 2 compact</i>	52
Tabela 19- Cartas para antibiograma no <i>Vitek 2 compact</i>	52

Índice de figuras

Figura 1- <i>Liaison XL (Diasorin)</i>	8
Figura 2- Princípio do imunoensaio indireto com quimiluminescência.....	10
Figura 3- Imunoensaio de sanduíche	11
Figura 4- Imunoensaio competitivo	11
Figura 5 -Imunoensaio de captura de Ig M	12
Figura 6- <i>Atellica Solution (Siemens Healthineers)</i>	12
Figura 7 - Exemplo de resultados de teste TPHA quantitativo	17
Figura 8- <i>MINICAP (Sebia)</i>	25
Figura 9- Perfil eletroforético normal de proteínas séricas.....	25
Figura 10 - Teste de gravidez na urina.....	27
Figura 11- <i>AutionMax AX-4030 (Arkray)</i> à direita e <i>SediMax (A. MENARINI Diagnostics)</i> à esquerda.....	27
Figura 12- <i>Sysmex XE-2100 (Sysmex Corporation)</i>	34
Figura 13- Diagrama de dispersão do canal diferencial de leucócitos.....	35
Figura 14-Método de detecção de fluxo envolvente de corrente contínua.....	36
Figura 15-Ves-Matic Cube 200 (A.MENARINI diagnostics).....	37
Figura 16- Ves-Matic Cube 30 (A.MENARINI diagnostics).....	38
Figura 17 - <i>Premier Hb921 (A.MENARINI diagnostics)</i>	39
Figura 18 - Esquema de HPLC por afinidade ao boronato.....	39
Figura 19 - BCS XP (<i>Siemens</i>).....	40
Figura 20 - <i>FACSCalibur (Becton-Dickinson)</i>	42
Figura 21 -Resultado positivo no teste confirmatório usando <i>Kit HLA-B27</i>	44
Figura 22- <i>VITEK 2 compact (Biomérieux)</i>	48
Figura 23- Galeria <i>Mycoplasma IST 2</i>	48
Figura 24- Infecção urinária por <i>Enterococcus faecalis</i> com 10^7 UFC/mL.....	49
Figura 25- Contaminação da amostra de urina por <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	50
Figura 26- Bactérias gram-positivas (<i>Staphylococcus aureus</i>)	53
Figura 27- Bactérias gram-negativas (<i>Escherichia coli</i>)	54
Figura 28- Coloração de <i>Ziehl-Neelsen</i>	54
Figura 29- Prova da catalase.....	55
Figura 30- Prova da oxidase	55
Figura 31- Procedimento de concentração ovos/parasitas fecais.....	56

Lista de abreviaturas e símbolos

Ac- anticorpo(s)

Ac anti-HBc–anticorpos anti-antigénio do core do vírus da hepatite B

Ac anti-HBe–anticorpos anti-antigénio de replicação viral do vírus da hepatite B

Ac anti-HBs–anticorpos anti-antigénio de superfície do vírus da hepatite B

AEQ- avaliação externa de qualidade

ALT-alanina aminotransferase

APC-*active chromoprotein* (cromoproteína ativada)

AST-aspartato aminotransferase

aTTP- *activated partial thromboplastin time* (tempo de tromboplastina parcial ativada)

AVC- acidente vascular cerebral

B.A.A.R -bactéria(s) álcool-ácido resistente(s)

BD- bilirrubina direta

BI- bilirrubina indireta

BT- bilirrubina total

CA 125 – antigénio 125

CA 15-3 – antigénio 15-3

CA 19-9 – antigénio 19-9

CC- corrente continua

CD- *cluster of differentiation* (cluster de diferenciação)

CEA - *carcinoembryonic antigen* (antigénio carcinoembrionário)

CF- citometria de fluxo

CML- GS- centro de medicina laboratorial germano de sousa

CMV-citomegalovírus

CQI- controlo de qualidade interno

DCV- doença cardiovascular

EBV–*epstein-barr virus* (vírus *epstein-barr*)

ECAT-External quality Control of diagnostic Assays and Tests

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

EUCAST- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FFUP–faculdade de farmácia da universidade do porto

FITC - *fluorescein isothiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína)

FR- fator reumatóide

FSC- *forward scatter* (dispersão frontal)

FSH–*follicle-stimulating hormone* (hormona foliculoestimulante)

FTA-ABS -*fluorescent treponemal antibody absorption* (anticorpos treponémicos fluorescentes com absorção)

HAV–*hepatitis A virus* (vírus da hepatite A)

Hb- hemoglobina

HbA1c -hemoglobina glicada

HBV–*hepatitis B virus* (vírus da hepatite B)

hCG–*human chorionic gonadotropin* (gonadotropina coriônica humana)

HCV–*hepatitis C virus* (vírus da hepatite C)

HDL –*high density lipoprotein* (lipoproteína de elevada densidade)

HIV–*human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

HLA-B27 - human leukocyte antigen B27 (Antigénio leucocitário humano B27)

HPLC- *high performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de elevado desempenho)

IFCC- *the international federation of clinical chemistry and laboratory medicine*

Ig- imunoglobulina

INR- *international normalized ratio* (razão normalizada internacional)

INSA- Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

ISI- *international sensitivity index* (index de sensibilidade internacional)

ITU–infecções do trato urinário

LCR- líquido cefalorraquidiano

LDH–*lactate dehydrogenase* (lactato desidrogenase)

LDL –*low density lipoprotein* (lipoproteína de baixa densidade)

LH–*luteinizing hormone* (hormona luteinizante)

LMA- leucemia mielóide aguda

LMC- leucemia mielóide crónica

LSR- La Salete Robles

MCHC–*mean corpuscular hemoglobin concentration* (concentração de hemoglobina corpuscular média)

MCH–*mean corpuscular hemoglobin* (hemoglobina corpuscular média)

MCV–*mean corpuscular volume* (volume corpuscular média)

MHC- *major histocompatibility complex* (complexo major de histocompatibilidade)

NGSP- *national glycohemoglobin standardization program* (programa nacional de padronização de glico-hemoglobina)

PE- *phycoerythrin* (ficoeritrina)

PerCP- *peridinin chlorophyll protein* (complexo proteico peridina-clorofila)

PSA- *prostate specific antigen* (antígeno específico da próstata)

PTGO–prova de tolerância à glicose oral

PTH–*parathyroid hormone* (paratormona)

RDW –*red cell distribution width* (largura de distribuição dos eritrócitos)

RF- radiofrequência

RIQAS -*Randox International Quality Assessment Scheme*

RPR–*rapid plasma reagin*- reagina plasmática rápida

SLS- *sodium lauryl sulfate*- (lauril sulfato de sódio)

SSC –*side scatter* (dispersão lateral)

T₃-triiodotironina

T₄- tiroxina

Tg–tiroglobulina

TP –tempo de protrombina

TPHA–*Treponema pallidum haemagglutination* (hemaglutinação de *Treponema pallidum*)

TPO–*thyroid peroxidase* (tiroperoxidase)

TSA- teste de suscetibilidade a antibióticos

TSH–*thyroid stimulating hormone* (hormona estimuladora da tiroide)

UFC- unidade formadora de colónias

UK NEQAS–*united kingdom national external quality assessment service* (serviço nacional de avaliação externa da qualidade do Reino Unido)

UV- ultravioleta

VS–velocidade de sedimentação

Introdução

Atualmente, os exames laboratoriais desempenham um papel essencial nos cuidados de saúde, contribuindo para um correto diagnóstico, monitorização, prognóstico e prevenção da doença. Por essa razão, é essencial garantir a qualidade dos resultados que dependem das atividades executadas ao longo de todo o processo analítico. Esse processo é composto por 3 fases: fase pré-analítica que envolve todos os procedimentos desde a solicitação da análise até ser feita a análise propriamente dita; fase analítica corresponde à análise da amostra, envolvendo o controlo de qualidade e a validação técnica dos resultados por parte dos responsáveis por cada setor; fase pós-analítica que consiste na validação biopatológica dos resultados pelos especialistas e só posteriormente será entregue os resultados ao utente/médico (1).

O seguinte relatório refere-se ao estágio curricular realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Este estágio serviu para consolidar e complementar os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos nas aulas e para adquirir competências na prática laboratorial na execução dos procedimentos necessários para o processamento de amostras.

O estágio foi, na sua maioria, realizado no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa (CML-GS) Porto, sob a orientação da responsável de qualidade Dr^a Eduarda Figueiredo, no qual foram abordadas as áreas de química clínica, imunologia e hematologia. Devido à pandemia por COVID-19, não foi possível estagiar no serviço de microbiologia do CML-GS para concluir as 450h inicialmente estabelecidas. No entanto, foi possível realizar a microbiologia no laboratório La Salette Robles (LSR), em Famalicão, o suficiente para concluir 400h de estágio. No CML-GS passei pelos vários setores do laboratório realizando cerca de 75h na triagem, 75h na química e imunologia, 75h na citometria de fluxo, 75h na hematologia e 38 h na urianálise. No laboratório LSR realizei 62h na microbiologia.

Na minha passagem por cada setor, integrei-me na rotina dos mesmos, manuseie os equipamentos, acompanhei a receção das amostras, realizei os controlos internos, participei no processamento das amostras e acompanhei a validação técnica dos resultados. Tudo isto permitiu que me integrasse no funcionamento global, organização e metodologias de um laboratório.

Este relatório pretende descrever de uma forma sucinta as atividades que são realizadas diariamente no laboratório como o controlo de qualidade, os parâmetros

analíticos avaliados, equipamentos utilizados, fundamento dos métodos e interpretação dos resultados relativamente a cada valência.

Fase pré-analítica

A Fase Pré-analítica abrange todos os procedimentos que decorrem desde a solicitação das análises pelo clínico ou pelo utente a título particular até à amostra estar pronta para a sua análise laboratorial propriamente dita. O pedido deve vir com informação clínica relevante, para uma melhor orientação na realização do exame. O utente é informado, verbalmente ou por escrito, sobre possível período de jejum, dieta a seguir, como efetuar a sua colheita ou outras exigências e particularidades necessárias. No dia da colheita, identifica-se o utente e confirma-se se este seguiu as exigências necessárias para a realização da colheita. Dependendo da amostra, a colheita pode ser feita pelo próprio paciente ou por um profissional especializado, mas deve-se confirmar sempre a identificação do paciente para evitar amostras mal identificadas.

Após a colheita das amostras, os produtos biológicos devem ser enviados para o laboratório o mais rapidamente possível e o transporte deve ser realizado de forma a conservar a viabilidade dos produtos biológicos, pois permitirá assegurar a qualidade dos resultados.

Através do *software* Appolo, todas as amostras são identificadas com etiquetas de código de barras nos postos de colheita que posteriormente serão triadas no laboratório, assegurando sempre a rastreabilidade das amostras. Através do código de barras é sempre possível aceder à informação essencial da identificação do doente, identificação da amostra, grau de urgência no processamento e análises a efetuar.

Na triagem do CML-GS Porto faz-se a receção de amostras provenientes de postos de colheita e hospitais; verifica-se a qualidade dos produtos biológicos, realiza-se a centrifugação e separação em alíquotas; confirma-se se as colheitas foram efetuadas para os tubos corretos de acordo com as análises pedidas; se necessário, enviam-se as amostras para outros laboratórios do grupo.

Colheita de amostras

Dependendo do tipo de amostras seleciona-se o recipiente/tubo apropriado a utilizar para colher e transportar.

Nas seguintes situações as amostras não se encontram conformes e poderão ser rejeitadas no momento da triagem (2,3):

- Amostras sem identificação ou mal identificadas;
- Amostras que não estejam nas devidas condições (amostras coaguladas, hemolisadas, lipémicas);

- Volume insuficiente ou inadequado de amostras;
- Amostra errada para o estudo a ser efetuado;
- Amostras colhidas em tubos/recipientes inadequados;
- Utilização de anticoagulante errado;
- Condições de transporte e de armazenamento inadequadas (ex.: temperatura, tempo, outras);
- Amostra contaminada, a verter ou suja;

Alguns destes critérios levam à imediata rejeição da amostra (ex. a amostra mal identificada, tubo de colheita inadequado), pois causam o incorreto processamento da amostra. Outros, (ex. hemólise, lipemia) vão depender das análises a efetuar porque podem ou não interferir com os resultados. No segundo caso, são apenas registradas como ocorrências para no final ajudar na interpretação dos resultados; se interferir com os resultados pede-se para repetir a colheita.

Colheita de sangue

Na colheita de sangue são usados tubos com tampas de cores diferentes que ajudam a diferenciar a presença/ausência de anticoagulantes ou aditivos e as proporções dos anticoagulantes consoante as exigências das análises laboratoriais (tabela 1). Deve se ter em atenção a proporção sangue/anticoagulante colhendo sangue até à marca designada no tubo e deve-se inverter suavemente os tubos para homogeneizar o anticoagulante com o sangue, pois o incumprimento destas condições pode causar falsos resultados (2).

Tabela 1- Principais tubos de colheita de sangue

Tubo de colheita	Anticoagulante/aditivo	Tipo de Amostra	Uso laboratorial
	Gel de separação e ativador de coágulo	Soro	Bioquímica e Sorologia Ativador de coágulo acelera o processo de coagulação. Após a centrifugação, o gel de separação serve de barreira entre o coágulo de sangue e o soro.
	EDTA	Sangue total, Plasma	Hematologia O EDTA é o melhor anticoagulante para quase todas as análises hematológicas porque é o que melhor preserva a morfologia das

			células sanguíneas. O EDTA liga-se a íons de cálcio no sangue formando um sal não ionizável.
	Citrato de Sódio	Plasma, Sangue total	Hematologia – Coagulação Usado na proporção 1:9 de sangue; permite conservar os fatores de coagulação lábeis. Atua ao combinar-se com o cálcio no sangue formando assim um composto de cálcio não ionizado. Usado também para hemogramas.
	Fluoreto de sódio ou Oxalato de potássio	Plasma	Bioquímica Previne a glicose e por isso é utilizado para doseamentos de glicose, lactato e para a PTGO.

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético; PTGO- prova de tolerância à glicose oral; Adaptado de (2,4)

Colheita de urina

A colheita de urina é na maioria das vezes realizada pelo próprio paciente. No entanto, no caso de pacientes acamados ou imobilizados pode ser necessário cateterização ou aspiração suprapúbica enquanto que nos bebês podem ser utilizados sacos coletores (5).

Existem 3 tipos de urina que podem ser colhidas (5):

- Urina tipo II: primeira urina da manhã; serve para realizar a urianálise ou análise microscópica devido à sua maior concentração.
- Urina ocasional: colhida a qualquer hora do dia; mais fácil de obter; pode ser usado para detectar determinados analitos na urina.
- Urina de 24 horas –Recolhida toda a urina durante 24h; serve para quantificar substâncias que sofrem variação na excreção ao longo do dia.

Colheita de fezes

A colheita de fezes pode ser realizada a qualquer altura ou ao longo de alguns dias (refrigeradas conforme necessário). O doente deverá colocar a amostra do tamanho de uma noz num recipiente estéril e seco.

Colheita de outros produtos biológicos

A colheita do líquido cefalorraquidiano, ascítico, pleural, sinovial entre outros, é realizada por um médico.

Controlo de qualidade interno (CQI)

O controlo de qualidade interno é um conjunto de procedimentos intralaboratoriais que devem ser cumpridos para detetar, reduzir, corrigir algum problema no processo analítico e, dessa forma, assegurar a qualidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos nas amostras. No CQI são analisadas amostras-controlo com valores analíticos conhecidos, funcionando como referência do que deve estar dentro dos critérios de aceitação.

Se o valor do controlo estiver dentro dos limites esperados, os resultados das amostras nessa série estão validos. Caso esteja fora, é preciso recalibrar e, de seguida, executar o controlo e posteriormente as amostras. É através do gráfico de *levey-jennings*, presente nos equipamentos, que se pode observar os resultados do controlo facilitando a visualização de erros, tendências e para documentar as ações corretivas realizadas ao longo do tempo para manter a qualidade das séries analíticas (6).

O CQI é geralmente feito diariamente, após a calibração ou então quando o resultado de muitos doentes está a parecer inadequado. Os controlos apresentam geralmente 3 níveis diferentes dos analitos (baixo, médio e alto) ou então normal e anormal dependendo do parâmetro ou da técnica utilizada.

Quanto à calibração dos sistemas analíticos, são realizadas quando há mudança do lote dos reagentes ou quando há erros sistemáticos no controlo interno. Pode ser pedida periodicamente pelo equipamento para o operador colocar lá o calibrador ou ser efetuada automaticamente pelo equipamento, como acontece no *Atellica* porque armazena e refrigera o controlo internamente. É essa execução periódica da calibração e a manutenção dos equipamentos que permite que estes mantenham boas condições de funcionamento.

Avaliação externa da qualidade (AEQ)

A AEQ é um programa em que várias amostras controlo são analisadas periodicamente nas mesmas condições que as amostras dos doentes. Posteriormente, os seus resultados são comparados com outros laboratoriais que estão a usar o mesmo método

e/ou equipamento. A avaliação obtida será analisada pela direção técnica que, juntamente com cada responsável da área laboratorial, irá aplicar ações corretivas caso o resultado de algum parâmetro não esteja dentro dos critérios de aceitação.

O CML-GS Porto participa nos programas de AEQ descritos na tabela 2:

Tabela 2- Programas de AEQ

Programa de AEQ	Parâmetros
SEQC <i>Sociedad Española de Medicina de Laboratorio</i>	Bioquímica e Imunologia
UK- NEQAS <i>UK National External Quality Assessment Scheme</i>	Hemoglobina glicada e Microbiologia
DEQAS <i>Vitamin D External Quality Assessment Scheme</i>	25-Hidroxivitamina D
RIQAS <i>Randox International Quality Assessment Scheme</i>	Para o painel ToRCH (toxoplasma, rubéola, citomegalovírus)
INSA Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge	Coagulação
ECAT <i>External quality Control of diagnostic Assays and Tests</i>	

Imunologia

No CML-GS Porto são utilizados 2 equipamentos para as análises imunológicas Atellica e *Liaison XL*, sendo que o Atellica também realiza análises bioquímicas. Além disso, são realizadas algumas técnicas sorológicas manuais.

Imunologia no *Liaison XL*:

O aparelho *Liaison XL* (*Diasorin*) (figura 1) é usado para pesquisar ou dosear alguns anticorpos e a vitamina D no soro ou plasma, apresentados na tabela 3, através de

imunoensaios por quimiluminescência com uma fase sólida de micropartículas paramagnéticas (8,9).



Figura 1- *Liaison XL (Diasorin)*

Adaptado de (9)

Tabela 3- Parâmetros analisados no *Liaison XL*

Analito	Tipo de Imunoensaio por quimiluminescência	Interpretação dos resultados
Ac. Anti-CMV (IgM)	Indireto	IgM (+) e IgG (-): Infecção aguda primária ou infecção secundária.
Ac. Anti-CMV (IgG)	Indireto	IgM (+) e IgG (+): Resultado sugestivo de infecção (avaliar avidéz da IgG para distinguir infecção primária da secundária). IgM (-) e IgG (+) imunidade provável/infecção latente. IgM (-) e IgG (-) sem infecção ou infecção muito recente.
Ac. Anti-Tiroperoxidase (anti-TPO)	Sanduíche	Estes autoanticorpos desenvolvem-se contra a hemoproteína presente na membrana celular das células tiroideias causando a sua inflamação, dano tecidual e perda de função.
Ac. Anti-Tiroglobulina (Anti-Tg)	Sanduíche	Positivo em casos de tiroidite autoimune crónica ou doença de graves
Ac. Anti-Rubéola (IgM)	Captura de Ig M	Ig M (+) e Ig G (+/-): Infecção aguda recente.

Ac. Anti-Rubéola (IgG)	Indireto	Ig M (-) e Ig G (+): imunidade provável através da vacina ou infecção antiga. Num recém-nascido, significa que as IgG são provenientes da mãe. Ig M (-) e Ig G (-): sem infecção ou infecção muito recente.
Ac. Anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (IgM)	Captura de Ig M	Ig M (+) e Ig G (-): Sugestivo de infecção aguda. Repetir em 2 semanas e se continuar assim, é considerado falso positivo. Nos recém-nascidos significa uma infecção congênita. Ig M (+) e Ig G (+): infecção recente ou reativação IgM (-) e Ig G (+): imunidade provável/infecção à + de 6 meses IgM (-) e Ig G (-): sem infecção ou infecção muito recente
Ac. Anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (IgG)	Indireto	
25-Hidroxitamina D	Sanduíche	Vitamina D aumenta a absorção de cálcio no intestino e aumenta a concentração de cálcio no sangue. Toxicidade resulta em hipercalcemia. A diminuição (Insuficiência ou deficiência) causa osteomalacia/raquitismo e aumenta o risco de desenvolver doenças crônicas.

Ac- anticorpos; CMV- citomegalovírus; Ig- imunoglobulina; Adaptado de (8,10,11)

Tipos de Imunoensaios por quimiluminescência

Imunoensaio indireto com quimiluminescência

A amostra é colocada sobre a fase sólida revestida com antígenos (ou anticorpos, dependendo do analito) e deixa-se incubar com a amostra para ver se há formação de um imunocomplexo (figura 2). Depois adiciona-se um anticorpo conjugado com uma molécula luminescente (ex. isoluminol), dirigido ao analito, e deixa-se incubar. Após cada incubação é feito um ciclo de lavagem para retirar todo o material que não se ligou. Depois adicionam-se os reagentes iniciadores para induzir a reação quimiluminescência. A intensidade da luz gerada será diretamente proporcional à quantidade de complexos presentes na amostra (8).

Quimiluminescência acontece quando o eletrão da molécula luminescente recebe energia resultante de uma reação química e salta para uma camada com nível energético maior. Quando o eletrão regressar ao seu estado basal emite luz. Adicionam-se os reagentes iniciadores que contém uma enzima, geralmente a peroxidase, para catalisar a reação química (12).

Nos equipamentos em que contactei apenas é realizada a quimiluminescência direta, ou seja, apenas são usados marcadores luminescentes para produzir a luz detetada (12).

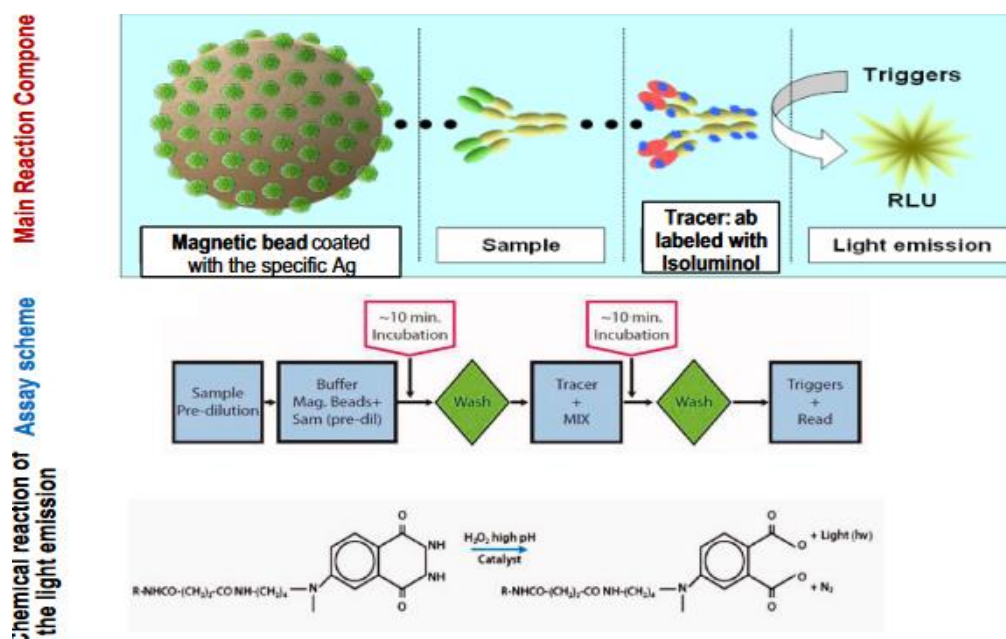


Figura 2- Princípio do imunoensaio indireto com quimiluminescência

Adaptado de (12)

Imunoensaio de sanduíche com quimiluminescência

Nesta técnica, deixa-se a incubar a fase sólida revestida com anticorpos/antígenos específicos para o analito e, se o analito estiver presente, formam um complexo. É adicionado um anticorpo primário conjugado com uma molécula luminescente que se ligará ao complexo e deixa-se incubar. É possível também utilizar um anticorpo secundário conjugado com outra molécula luminescente, que se liga ao primário, como é o caso nos ensaios realizados no Atellica (figura 3) (13). Depois adicionam-se os reagentes iniciadores para induzir a reação quimiluminescência.

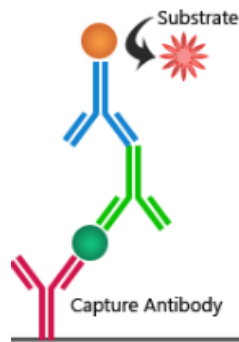


Figura 3- Imunoensaio de sanduíche

Adaptado de (14)

Imunoensaio competitivo com quimiluminescência

Num ensaio competitivo, o analito da amostra vai competir com um analito conjugado com um marcador luminescente pelos anticorpos (ou antígenos específicos, dependendo do analito) que estão a revestir a fase sólida. Se o soro do doente não tem o analito, o analito conjugado consegue ligar-se aos anticorpos (figura 4). Por isso, a quantidade de analito conjugado que se liga ao anticorpo é indiretamente proporcional à concentração do analito na amostra (14,15).

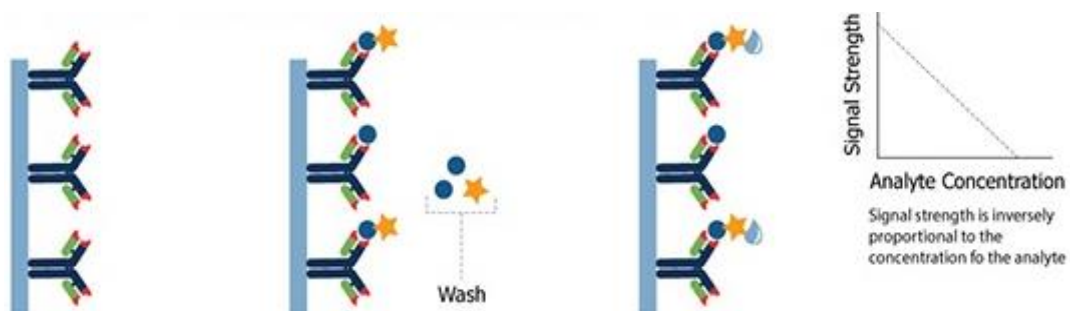


Figura 4- Imunoensaio competitivo

Adaptado de (15)

Imunoensaio de captura de Ig M por quimiluminescência

Um imunoensaio por captura é usado para detetar sobretudo Ig M, mas também pode ser usado para procurar Ig G. Neste ensaio, utiliza-se anticorpos anti- Ig M humana a revestir a fase sólida para se ligar às Ig M do soro do doente. De seguida, é adicionado o antígeno específico para aquela Ig M e, posteriormente, um anticorpo conjugado com a molécula luminescente que se liga ao antígeno (figura 5) (16).

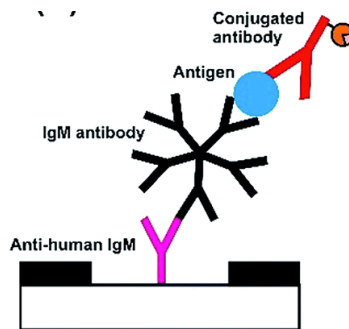


Figura 5 -Imunoensaio de captura de Ig M

Adaptado de (17)

A quantidade de Ig M presente será diretamente proporcional à quantidade de luz emitida pela molécula luminescente (8).

Módulo de imunologia no *Atellica*

O *Atellica Solution* da *Siemens Healthineers* (figura 6) é uma mini-cadeia constituído por 2 módulos:

- Módulo de química -CH 930 – capaz de efetuar testes fotométricos (UV e Visível), turbidimétricos e potenciométricos. Tem também integrado um multisensor de eletrólitos, capaz de dosear eletrólitos (cloro, potássio e sódio). Este módulo pode analisar soro, plasma, LCR, urina e sangue total.
- Módulo de imunologia- IM 1600- Determina os diversos parâmetros imunológicos (tabela 4) utilizando ensaios quimiluminescentes com diversos princípios de ligação de anticorpos. Este modulo pode analisar soro, plasma, líquido amniótico, urina e sangue total.



Figura 6- *Atellica Solution* (*Siemens Healthineers*)

Adaptado de (18)

Basta colocar as amostras nas raques do equipamento que este irá ler o código de barras e saberá para que módulo enviar as amostras, dependendo das análises requisitadas.

Este equipamento possui um sistema de análise de qualidade do soro que identifica e avisa quanto ao grau de hemólise, icterícia e lipemia que a amostra apresenta, pois estes são possíveis interferentes dos resultados.

Tabela 4- Parâmetros analisados no *Atellica Solution* – Módulo de Imunologia

Analito	Utilidade	Princípio do método
Alfa-feto proteína	É uma proteína sintetizada sobretudo no fígado fetal (só é normal estar alta no feto e na grávida). Pode também aumentar com doenças hepáticas e tumores.	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência
CA-125	Presente nas células cancerígenas. Útil no diagnóstico e monitorização do tratamento de cancro dos ovários.	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência
CA 15-3	Antigénio presente nas células mamárias. Aumentado sobretudo no cancro da mama. Permite monitorizar a evolução da doença.	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência
CA 19-9	Antigénio aumentado sobretudo no cancro do pâncreas, mas também cancros do sistema digestivo gastrointestinais. Permite monitorizar a evolução da doença.	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência
CEA	Proteína encontrada em tecidos embrionários. Quando está aumentado nos adultos pode indicar a presença de cancro principalmente do cólon.	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência
PSA Livre PSA complexado (PSAc)	Proteína produzida pela próstata. Auxilia na distinção entre o cancro da próstata, a doença prostática benigna ou prostatite. PSAc aumentado é indicativo de cancro.	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência
anti-HAV (Ig M)	HAV causa hepatite aguda, uma doença aguda no fígado. Se positivo tem infeção aguda. (IgM podem estar presentes durante 6 meses).	Imunoensaio de captura de IgM por quimiluminescência
anti-HAV (Ig totais)	Útil no diagnóstico de hepatite A recentes, antigas ou na deteção de anti-HAV após a vacinação.	Imunoensaio competitivo por quimiluminescência

anti-HBc (Ig M) (antigénio core do HBV)	É o 1º anticorpo produzido contra o HBV que coincide com inícios de sintomas. Útil no diagnóstico de hepatite viral aguda.	Imunoensaio de captura de IgM por quimiluminescência
anti-HBc (Ig totais)	Junto com as IgM anti-HBc, vai permitir distinguir hepatite B aguda da crónica porque as IgG nunca vão desaparecer.	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência
Antigénios HBs (antigénio de superfície da hepatite B)	Útil no <i>screening</i> de HBV porque é o primeiro indicativo de infeção aguda e aparece antes dos sintomas. Desaparece com o tratamento.	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência
Anti-HCV (Ig G)	Se as IgG estão presentes há infeção atual ou passada por HCV. Se negativo não houve exposição ou está em período de incubação. (Se o resultado for positivo, fazer confirmação por immunoblot)	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência
HIV (antigénio p24 + anticorpos anti-HIV 1 e 2)	Pesquisa-se o antigénio p24 e Ac para detetar infeção inicial. O p24 desaparece quando os Ac aparecem. (Se o resultado for positivo, fazer confirmação por immunoblot)	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência
Estradiol	Permite a ovulação, gravidez e favorece uma estrutura óssea saudável. Útil na avaliação da função dos ovários e para a monitorização do desenvolvimento folicular na terapia de reprodução assistida.	Imunoensaio competitivo por quimiluminescência
Ferritina	É uma proteína que armazena ferro nas células sobretudo do fígado. A sua redução é sinal de deficiência em ferro e o seu aumento é sinal de sobrecarga de ferro.	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência
Folato	É essencial para síntese de DNA. Encontra-se diminuída em situações de anemia macrocítica, neuropatia e desnutrição.	Imunoensaio competitivo por quimiluminescência

FSH	Hormonas produzidas pela hipófise. FSH estimula o crescimento e a maturação dos folículos e produção de espermatozoides. LH estimula a produção de estrogénios ou de testosterona e determina a ovulação.	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência
LH	FSH e LH aumentam com a menopausa e com insuficiência ovariana/testicular primária. Diminuem com insuficiência ovárica/testicular secundária.	
T3 livre T3 total T4 livre T4 total	Hormonas produzidas pela tireoide que podem andar livres ou complexadas. A sua produção é estimulada pela hipófise e hipotálamo. Útil no diagnóstico e monitorização do tratamento da doença da tireoide. Aumentam no hipertireoidismo e diminuem em hipotireoidismo.	Imunoensaio competitivo por quimiluminescência
Insulina	Hormona produzida no pâncreas. Auxilia no diagnóstico e no tratamento de diabetes <i>mellitus</i> e hipoglicemia. Está diminuída em caso de diabetes e aumentada em casos de hipoglicémia.	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência
Progesterona	Hormona que ajuda a preparar o útero para a gravidez. É produzida pelo corpo lúteo e placenta. Ajuda a determinar a causa de infertilidade, data da ovulação, gravidez ectópica ou aborto.	Imunoensaio competitivo por quimiluminescência
Prolactina	Hormona produzida pela hipófise que estimula a produção de leite. Aumenta durante a gravidez, após nascimento do bebé, casos de prolactoma, entre outros.	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência
β- HCG	Proteína produzida pela placenta por alguns tumores de células germinativas. Permite diagnosticar a gravidez, ajuda a indicar e monitorizar gravidez atópica e cancro.	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência

TSH	Hormona produzida pela hipófise que estimula produção de hormonas tiroideias. Usada no diagnóstico das perturbações tiroideias ou hipofisárias.	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência
Testosterona	Útil no diagnóstico e monitorização do tratamento de distúrbios androgénicos como disfunção erétil, infertilidade ou puberdade prematura, ou tardia, virilização nas mulheres e síndrome do ovário policístico.	Imunoensaio competitivo por quimiluminescência
Vitamina B12	É essencial para síntese de DNA. Encontra-se diminuída em situações de anemia macrocítica, neuropatia, desnutrição.	Imunoensaio competitivo por quimiluminescência
PTH	Hormona libertada pela paratireoide. Estimula o aumento de cálcio no sangue e a ativação da vitamina D. Permite diagnosticar hiper e hipotireoidismo e ajuda a confirmar a paratiroidectomia.	Imunoensaio de sanduíche por quimiluminescência

Ac- anticorpo; ALT-alanina aminotransferase ; AST-aspartato aminotransferase; CEA - antígeno carcinoembrionário; HAV-vírus da hepatite A; HBV-vírus da hepatite B; hCG-gonadotropina coriónica humana; HCV-vírus da hepatite C; HIV-vírus da imunodeficiência humana; Ig- imunoglobulina; LDH-lactato desidrogenase; LH-hormona luteinizante; PSA- antígeno específico da próstata; PTH-paratormona; T3-triiodotironina; T4- tiroxina; Adaptado de (19)

Deteção de *Treponema pallidum*

A sífilis é uma infeção crónica causada por *Treponema pallidum*, uma bactéria do grupo das espiroquetas capaz de ser transmitida sexual ou verticalmente durante a gravidez. Esta doença é composta por 3 fases (primária, secundária e terciária) e se não for tratada, avança para a fase seguinte (10).

Os métodos de diagnóstico da doença no CML-GS Porto consistem na pesquisa de anticorpos anti-treponémicos, através de duas provas serológicas: RPR e TPHA.

RPR

Rapid plasma reagin (RPR) é um teste não treponémico qualitativo e semi-quantitativo para a deteção de anticorpos (também designados reaginas) no soro ou plasma humano. Se os anticorpos estiverem presentes na amostra haverá uma floculação com o reagente que contém antígenos de cardiolipinas (extraídas do coração de boi) porque são semelhantes aos antígenos da bactéria e para além disso, contém também micropartículas de carvão ativado para facilitar a visualização (20).

No caso de dar positivo, são observadas macroscopicamente a presença de flóculos negros sobre a placa de teste e prossegue-se para o teste semi-qualitativo com a preparação de 5 diluições com soro fisiológico para determinar o título (20).

Poderá resultar em falsos positivos em situações de lepra, lúpus eritematoso, mononucleose infetante, malária, vacina, pneumonia viral, entre outros (20). Sempre que der positivo e o doente não tem histórico da doença, prossegue-se para o teste serológico TPHA para ajudar a eliminar a possibilidade de ser falso positivo.

O RPR é um teste ideal para o seguimento da resposta ao tratamento, pois a diminuição do título indica o sucesso do tratamento.

TPHA

Treponema Pallidum Hemagglutination Assay (TPHA) é um teste treponémico qualitativo e quantitativo para a deteção de anticorpos anti-*Treponema pallidum* no soro humano.

Neste teste utiliza-se uma suspensão de eritrócitos aviários revestidos com antígenos de *T. pallidum* que irão aglutinar com os anticorpos no soro de doentes com sífilis. Primeiro começa-se por fazer o teste qualitativo usando apenas 3 poços. No poço 1 faz-se a diluição do soro, no poço 2 faz-se o controlo negativo e no poço 3 faz-se o teste. Quando há aglutinação no poço 3 forma-se uma distribuição uniforme de células aglutinadas enquanto que se não houver reação forma-se um botão compacto no fundo do poço ou um anel com o centro muito pequeno. Se o resultado é positivo, realiza-se o teste quantitativo (figura 7), através da diluição sucessiva da amostra para obter o título de anticorpos (1/80 no poço 3; 1/160 no poço 4; 1/320 no poço 5; 1/640 no poço 6; etc.) (21).

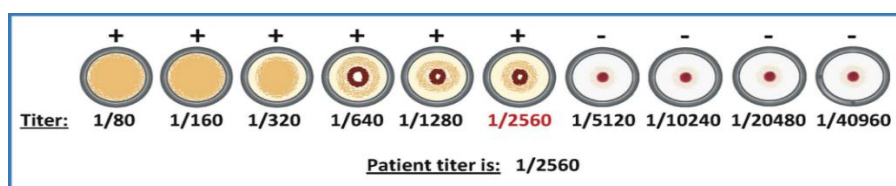


Figura 7 - Exemplo de resultados de teste TPHA quantitativo

Adaptado de (22)

Eventualmente poderão aparecer alguns falsos positivos em caso de lepra, deficiências do tecido conjuntivo ou mononucleose infecciosa (21). Para confirmar um resultado positivo num doente sem histórico, a amostra é enviada para outro laboratório do grupo GS, onde será realizado o teste treponémico *Fluorescent Treponemal Antibody Absortion* (FTA-ABS).

Teste de *Rose Bengal*

Brucella é um género de bactérias que infeta humanos através do contacto direto com animais infetados ou pela ingestão de carne, ou leite. No CML-GS Porto é utilizado um teste qualitativo, que pesquisa anticorpos específicos no soro humano, para *Brucella abortus*, *melitensis*, *bovis* ou *suis*. Quando os anticorpos reagem com o antígeno Rose Bengal no reagente forma-se uma aglutinação (23).

Teste da mononucleose infecciosa (MI)

Mononucleose é uma infeção causada sobretudo pelo vírus *Epstein-Barr* (EBV). Frequentemente apresenta sintomas (fadiga, febre, gânglios linfadenopatia, dor de garganta...) em adolescentes e adultos, mas em crianças costuma ser assintomático (10).

No diagnóstico da MI realiza-se um teste semi-quantitativo de hemaglutinação em látex para procurar anticorpos heterófilos (IgM) que são desenvolvidos em 90% dos doentes com MI. Faz-se reagir o soro do doente com o reagente que contém eritrócitos de cavalo. Se os anticorpos estiverem presentes haverá aglutinação (20).

Este teste ajuda a detetar casos de MI, mas não permite distinguir se a causa é o EBV. Para além disso, pode apresentar falsos negativos, visto que 10% dos doentes não tem anticorpos heterófilos e falsos positivos porque estes anticorpos podem aparecer associados a outras doenças (11).

Reação de *Widal*

A reação de *Widal* é um teste qualitativo que serve para detetar anticorpos anti-*Salmonella enterica* num tubo ou cartão-teste e que auxilia no diagnóstico da febre tifoide ou paratifoide. Usam-se reagentes que contém suspensões de antígenos H(flagelares) e O (somáticos) dos serotipos *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi A, B, C para ver se aglutinam com os anticorpos (24).

O teste de *Widal* não serve para distinguir entre infeções agudas e infeções antigas por isso, o melhor método de diagnóstico é a hemocultura (10).

Reação de *Waller Rose*

O fator reumatóide são anti-imunoglobulinas, na sua maioria Ig M, desenvolvidos contra a porção Fc das Ig G do próprio doente. Servem de indicativo de algumas doenças autoimunes sobretudo de artrite reumatóide e síndrome de *Sjogren* mas também pode estar presente noutras doenças do tecido conjuntivo e até mesmo em pessoas saudáveis (25).

O teste de *Waller Rose* consiste num teste rápido de hemaglutinação em que se faz reagir o soro do doente com eritrócitos de ovelha revestidos com Ig G de coelho anti-ovelha. Se os anticorpos estiverem presentes haverá aglutinação (26).

Pesquisa de fator reumatóide (látex)

Semelhante ao *Waller Rose*, este teste também serve para encontrar o fator reumatóide. Neste caso, usam-se partículas de látex do reagente que foram revestidas com gamaglobulinas humanas (27). Quando a suspensão de látex é misturada com o soro e se observa aglutinação deverá ser confirmado o resultado com a pesquisa do fator reumatóide por imunoturbidimetria.

Reação de Weil Félix

As *Rickettsias* são bactérias intracelulares causadoras de febre, transmitidas ao Homem por vetores artrópodes. Na reação de *Weil-Felix* utilizam-se suspensões de antígenos de *Proteus* para a deteção de anticorpos anti-*Rickettsia*, isto porque, algumas espécies de *Proteus* têm antígenos somáticos iguais aos da *Rickettsia* (28). Os anticorpos estão presentes quando aglutinar com antígenos de *Proteus* (OX19, OX2, OXK) presentes nos reagentes (24). É utilizado este teste para auxiliar no diagnóstico da infeção, no entanto, não é um método sensível nem específico, podendo ocorrer reações cruzadas (28).

Bioquímica

A secção de bioquímica utiliza o *Minicap* para eletroforese de proteínas séricas e o *Atellica* para todos os outros parâmetros químicos realizados no soro (tabela 5). Além disso, fazem-se análises à urina e pesquisa de sangue oculto nas fezes.

No modulo de química do *Atellica* são usados métodos fotométricos para dosear analitos através de ensaios enzimáticos no espectro do visível e ultravioleta (UV), bem como ensaios turbidimétricos.

Fotometria

A fotometria consiste na medição da quantidade de luz absorvida por uma amostra (absorvância), num determinado comprimento de onda. Faz se incidir na amostra um feixe de luz no ultravioleta, visível ou infravermelha, seleccionando o comprimento de onda através de um filtro. O analito que está na amostra será misturado com um reagente,

levando à formação de um complexo. A capacidade de a amostra absorver a luz vai ser lida por um detetor (7) .

Este método tem por base a Lei de *Lambert-Beer* que relaciona a quantidade de luz absorvida com a concentração de analito. Quanto mais luz for absorvida, maior será a concentração do analito (7).

A fotometria no *Atellica* foi utilizada para detetar a quantidade de luz após ensaios colorimétricos (no espectro do visível), no ultravioleta e enzimáticos.

- Ensaios colorimétricos- será medida a intensidade da cor produzida após o analito reagir com o reagente (7).
- Ensaios no ultravioleta- há formação de um composto de absorção de UV (abaixo dos 400 nm) entre o analito e o reagente (7).
- Ensaios enzimáticos - neste caso, o analito ou é uma enzima, ou é utilizado uma enzima para catalisar a reação química. A absorvância é lida por fotómetro no espectro visível ou no UV (7).

Imuno-turbidimetria

A imuno-turbidimetria é uma técnica utilizada para diversas análises quantitativas, que mede a diminuição na transmissão da luz depois de atravessar uma amostra. O analito presente na amostra é misturado com os reagentes na qual se formará um imunoprecipitado insolúvel formando uma turvação. A luz que incide na amostra sofrerá dispersão, reflexão e absorção da luz, chegando menos luz ao detetor que se encontra a 180° da amostra. Quanto maior for a concentração do analito, mais turva será a amostra, por conseguinte, menor a quantidade de luz que chega ao detetor (29).

Módulo de Química no *Atellica*

Tabela 5- Parâmetros analisados no *Atellica Solution* –Módulo de Química

Fotometria visível (colorimetria)		
Albumina		Serve para avaliar função hepática e renal. É uma proteína importante para manter a pressão osmótica. Pode estar elevada em casos de desidratação. É produzida no fígado e filtrada pelo glomérulo podendo estar diminuída quando há patologias hepáticas, renais ou por dietas hipoproteicas.
Bilirrubina (BD)	direta	Bilirrubina é o produto da destruição do grupo heme da hemoglobina. A bilirrubina indireta (BI) é conjugada pelo fígado com ácido glucorónico, resultando na BD que será excretada na biliar. Encontra-se aumentada quando há obstrução biliar e hepatite aguda.
Bilirrubina (BT)	total	Auxilia no diagnóstico de patologias hepáticas, biliares ou de anemia hemolítica. Através do doseamento da BT e BD podemos determinar a BI. A BI está elevada em caso de lesão hepática ou aumento da degradação da hemoglobina.
Cálcio (Total)		Serve para o diagnóstico de doenças paratiroideias, ósseas e renais. Hipocalcemia está associada a hipoalbuminémia, doença renal crónica, deficiência em vitamina D e hipoparatiroidismo. Hipercalcemia está associado sobretudo a hiperparatiroidismo, cancro nos ossos.
Ferro		Diagnóstico e tratamento de anemias por deficiência de ferro (está diminuído) e hemocromatose (está aumentado)
Magnésio		Diagnóstico e tratamento de hipomagnesemia (ex. perdas de Mg pelo trato gastrointestinal, ou pelos rins) e hipermagnesemia (ex. toma de antiácidos e falha renal)
Proteínas urinárias		Proteinúria acontece em situações de lesão renal provocadas sobretudo por diabetes e hipertensão arterial.
Fotometria UV		
Fósforo inorgânico		Serve para diagnóstico e tratamento de hipofosfatemia (associada a dieta pobre em fósforo, má absorção, desequilíbrio ácido-base, falta de vit. D, hiperparatiroidismo, excesso de insulina) e hiperfosfatemia (causada por consumo excessivo de fósforo, hipoparatiroidismo e disfunção renal).

Ensaaios enzimáticos no visível	
Ácido úrico	Ácido úrico resulta da degradação das purinas (presente nos ácidos nucleicos). Quando aumentado no sangue pode causar gota ou ser sinal de uma neoplasia.
Alanina aminotransferase (ALT)	As transaminases são enzimas presentes no fígado que servem de marcador de lesão hepática especialmente de casos de hepatites.
Aspartato aminotransferase (AST)	Geralmente a ALT aumenta mais do que a AST, mas em caso de hepatite alcoólica, cirrose e neoplasia hepática é ao contrário.
Amilase	Enzima produzida pelo pâncreas. Encontra-se aumentada quando à lesão pancreática.
Colesterol LDL	Lipoproteína relacionada com arteriosclerose porque transporta colesterol do fígado para os tecidos.
Colesterol HDL	É uma lipoproteína que transporta colesterol dos tecidos até ao fígado diminuindo o risco de distúrbios lipídicos. Quando está baixo existe risco de doenças cardiovasculares, arteriosclerose, doenças hepáticas e renais.
Colesterol Total	O estudo dos parâmetros do colesterol (HDL, LDL e total) servem para diagnóstico e monitorização do tratamento de distúrbios que envolvem colesterol em excesso no sangue e distúrbios metabólicos dos lípidos e lipoproteínas.
Fosfatase Alcalina	É uma enzima encontrada sobretudo no fígado (nas células que formam os ductos biliares) e nos ossos (indicativo de formação óssea). Útil no diagnóstico doenças hepatobiliares e ósseas.
Gama-GT	Enzima hepática mais sensível na deteção problemas nos ductos biliares e é útil na avaliação de pacientes com alcoolismo.
Triglicéridos	A maioria dos triglicéridos encontram-se armazenados no tecido adiposo. Níveis altos de triglicéridos no sangue estão associados a maior risco de DCV. Útil no diagnóstico de diabetes <i>mellitus</i> , doença renal, e doenças que envolvem o metabolismo de lípidos.
Ensaaios enzimáticos UV	
Creatina Quinase	Enzima presente sobretudo no coração, cérebro e músculos esqueléticos. Útil no diagnóstico de enfarte do miocárdio e doenças musculares.

Dióxido de carbono (CO ₂)	Serve para avaliar o equilíbrio ácido- base. Aumenta em casos de alcalose metabólica e acidose respiratória. Diminui em casos de acidoses metabólicas e alcaloses respiratórias.
Glucose	Parâmetro alterado quando há distúrbios do metabolismo dos carboidratos. Aumenta em casos de diabetes <i>mellitus</i> e diminui em casos de hipoglicemia e sobredosagem de insulina.
Lactato Desidrogenase (LDH)	Serve como marcador geral de lesão celular. É uma enzima presente no interior das células e libertada quando estas são lesadas ou destruídas.
Ureia	Produto do metabolismo das proteínas no fígado e excretado na urina. Aumenta com doenças renais, dieta hiperproteica e diminui no caso de lesão hepática e desnutrição.
imuno-turbidimetria	
Anticorpos anti-streptolisina O (ASO)	Anticorpos produzidos em resposta a streptolisina O, uma toxina presente em infecções por <i>Streptococcus</i> hemolítico do grupo A. Esta bactéria é capaz de causar faringites e levar a complicações como febre reumática e glomerulonefrite.
Fator reumatóide	Autoanticorpos desenvolvidos em doenças autoimunes principalmente artrite reumatóide.
Micro-albuminúria	É um indicador precoce de doença renal, pois pequenas quantidades de albumina começam a ser eliminadas na urina antes de haver lesão renal evidente.
Proteína C reativa	Encontra-se no sangue em casos de infecção e inflamação, mas não ajuda a indicar o local. Permite também avaliar o tratamento anti-inflamatório.
Transferrina	Proteína que se liga e transporta o ferro no sangue. Transferrina alta indica deficiência em ferro. Pode estar baixa em casos de hemocromatose, doenças crônicas, anemias hemolíticas e sideroblásticas, e para diferenciar terá de ser avaliado outros parâmetros (saturação de transferrina, ferro e ferritina).

Adaptado de (30,31)

Potenciometria

A potenciometria é um método utilizado para doseamento de iões através da diferença de potencial (voltagem) entre dois elétrodos.

Os elétrodos, o específico e o de referência, são condutores metálicos que estão em contacto com soluções eletrolíticas. O eletrodo seletivo mede o ião na amostra (Na, K, Cl) e compara-se o seu potencial elétrico com o do eletrodo de referência que é composto por cloreto de prata e possui sempre o mesmo potencial. A diferença de potencial gerada será proporcional ao logaritmo da atividade do eletrólito na amostra, sendo que essa relação é calculada pela equação de *Nernst* (29).

Ionograma

Na tabela 6 encontra-se descrito quais os eletrólitos doseados por potenciometria em amostras de soro, plasma ou urina (30):

Tabela 6- Ionograma realizado no *Atellica Solution*—Módulo de Química

Eletrólitos	Utilidade
Sódio	Eletrólito presente sobretudo no exterior das células. Útil no diagnóstico e monitorização do tratamento de desequilíbrio de eletrólitos e secreção inadequada de hormonas antidiuréticas. Hiponatremia pode aparecer com doença renal, deficiência mielocorticóide, diarreia, desidratação e toma de diuréticos. Hipernatrémia pode acontecer com desidratação, diabetes insipidus, síndrome de <i>Cushing</i> , entre outros (32).
Potássio	Eletrólito presente sobretudo no interior das células que estimula a contração muscular e mantém equilíbrio ácido-base. Hipocalémia pode acontecer com perdas gastrointestinais e diuréticos. Hipercalémia pode acontecer sobretudo em caso de doença renal, hiperglicemia, e toma de medicamentos (33).
Cloro	Útil no diagnóstico e monitorização de tratamento de distúrbios metabólicos e de eletrolíticos. Hipocloremia acontece em situações de acidose metabólica, vômitos, insuficiência cardíaca ou alcalose metabólica. Hipercloremia acontece em casos doença renal, desidratação, acidose metabólica, diarreia e acidose respiratória (11).

Eletroforese de proteínas séricas

No laboratório são realizadas eletroforeses capilares das proteínas séricas através do autoanalisador *Minicap* da *Sebia* (figura 8). Na eletroforese capilar usa-se um tubo de sílica com um buffer alcalino no interior. Quando se faz aplicar uma corrente elétrica, as proteínas vão sofrer uma separação de acordo com a sua carga elétrica, pH e fluxo eletrosmótico através do buffer. Os catiões vão migrar para o eletrodo negativo e os aniões para o eletrodo

positivo. A detecção direta das proteínas é feita através da medição da absorvência a 200 nm no cátodo do capilar (34).



Figura 8-MINICAP (Sebia)

Adaptado de (34)

Esta técnica é uma análise de rotina que fornece informações sobre a concentração e composição de proteínas, pois estas podem alterar-se em condições fisiológicas e patológicas (tabela 7). Um soro normal tem seis frações proteicas que se apresentam num gráfico por ordem de mobilidade decrescente (Figura 9).

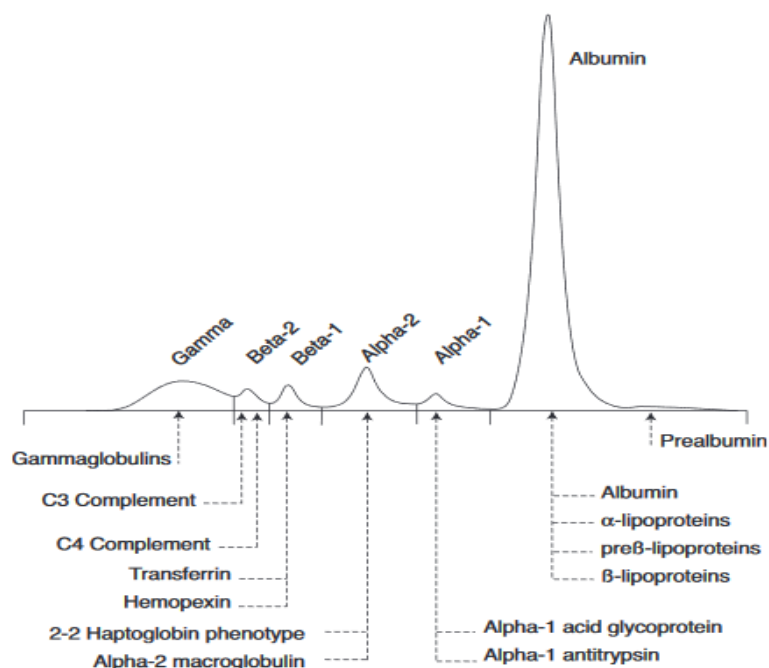


Figura 9- Perfil eletroforético normal de proteínas séricas

Adaptado de (35)

Tabela 7- Proteínas analisadas na eletroforese

Frações proteicas	Significado clínico
Albumina	É a proteína mais abundante encontrada no plasma. É produzida no fígado; aumenta em situações de desidratação e diminui quando há lesão hepática, há lesão renal, inflamação ou gravidez.
α-1 Globulinas	α1-antitripsina, α1-glicoproteína ácida, α1-fetoproteína Aumenta com infecções, processos inflamatórios, neoplasias malignas e gravidez; diminuída em casos de síndrome nefrótica e deficiências genéticas nalguma proteína deste grupo.
α-2 Globulinas	Haptoglobulina, ceruloplasmina, α2-macroglobulina O seu aumento é indicativo de inflamação, gravidez, síndrome nefrótica; A sua diminuição pode estar associada a doença de Wilson; lesão hepática; anemia megaloblástica.
β Globulinas	β1 (transferrina, β-2 (C3 e C4), β-lipoproteína Aumenta com a gravidez, anemia ferripriva, hipotireoidismo, cirrose biliar e doença de <i>Cushing</i> . Diminui quando à falta de proteínas na dieta.
γ Globulinas	Fibrinogénio, Imunoglobulinas, PCR Elevada quando há inflamações crónicas, infecções, amiloidose, cirrose ou algumas neoplasias. Diminuída no caso de hipogamaglobulinemias e ausente em agamaglobulinemias.

PCR- proteína C reativa; Adaptado de (31,36)

Pesquisa de hCG na urina- teste de gravidez

A gonadotrofina coriónica humana (hCG) é uma hormona libertada pela placenta durante a gravidez, sendo depois excretada na urina, após 5-15 dias desde que a gravidez começa (37). Além de confirmar gravidez, o valor de hCG pode estar aumentada quando há neoplasias trofoblásticas ou não trofoblásticas (11).

É realizado o teste com um *kit* rápido qualitativo (figura 10) em que a amostra migra por capilaridade através da membrana onde se liga a anticorpos anti-hCG monoclonais conjugado com partículas de ouro. Este complexo desloca-se para a zona T (teste) onde será imobilizado por anticorpos formando uma linha rosa que indica resultado positivo. As partículas de ouro que não ligaram na zona teste formam a linha de controlo, quer haja hCG na amostra ou não. Se a hCG está ausente o conjugado só será imobilizado na zona C (controlo) pelos anticorpos anti-camundongo, formando a linha rosa no controlo (37).

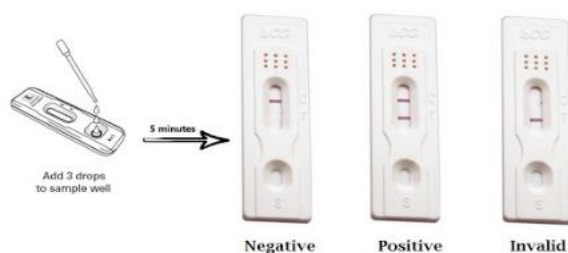


Figura 10 - Teste de gravidez na urina
Adaptado de (38)

Urina tipo II

A Urina Tipo II inclui primeiro o exame químico da urina, realizado no *AutionMax* e depois é encaminhada para o *SediMax*, que está acoplado (figura 11), para a análise ao sedimento urinário.



Figura 11- *AutionMax* AX-4030 (Arkray) à direita e *SediMax* (A. MENARINI Diagnostics) à esquerda

Adaptado de (39)

No exame físico-químico coloca-se uma tira teste na urina que deteta a ausência ou presença de bilirrubina, urobilinogênio, corpos cetônicos, creatinina, nitritos e hemoglobina; quantifica a glucose, proteínas e leucócitos; mede o pH; determina a cor e a densidade da amostra. Na tabela 8 encontra-se descrito o funcionamento do método para cada parâmetro.

Tabela 8- Métodos usados para o exame físico-químico da urina

Método	Parâmetro	Funcionamento do método
Nefelometria	Aspeto da urina (grau de turvação)	Mede a intensidade do feixe de luz que é disperso numa determinada direção após passar na amostra. Essa dispersão depende da relação entre o tamanho das partículas na amostra e o comprimento de onda da luz incidente. Quanto mais intensa for a luz detetada, mais turva está a urina.

Refratometria	Densidade	Consiste em medir o desvio que a luz sofre quando passa de um meio para a urina. Quanto mais densa for, maior é o índice de refração.
Refletância	pH; glicose; nitritos; urobilinogénio; sangue; cetonas; proteínas; leucócitos; e bilirrubina; cor	A refletância é uma fotometria que mede a luz refletida pela amostra. A luz incide nos quadrados da tira onde se dá a reação entre a urina e os reagentes. Essa reação química provoca mudança de cor o que fará variar a luz refletida pelas tiras.

Adaptado de (29,40)

No sedimax, as amostras são centrifugadas e captadas imagens do sedimento ao microscópio que depois são enviadas para o computador. O equipamento faz a contagem de leucócitos, eritrócitos, bactérias, leveduras, células epiteliais, cristais, cilindros e espermatozoides, para posteriormente o seu resultado, juntamente com o resultado do exame químico, ser avaliado pelo operador.

O estudo microscópico do sedimento é um estudo importante para avaliar a função renal. Neste estudo, é possível encontrar eritrócitos, leucócitos, cristais, cilindros, células epiteliais do trato urinário, microrganismos (leveduras, bactérias e parasitas), espermatozoides e filamentos de muco. A tabela 9 apresenta o significado clínico de elementos frequentemente encontrados no sedimento urinário.

Tabela 9- Elementos encontrados no sedimento urinário

Elementos	Significado clínico
Eritrócitos	Sinal de lesão renal ou trato urinário
Leucócitos	Sugestivo de infecções urinárias ou renais
Células de descamação	Sem significado clínico.
Células do epitélio renal	Presente em lesão renal
Cilindros- compostos sobretudo pela Tamm-Horsfall libertada pelas tubulares renais. Por vezes, certos elementos podem estar incorporados no cilindro.	
Cilindros Hialino	Apenas compostos pela matriz formada pela muco-proteína Tamm-Horsfall. Podem não ter significado clínico

	quando aparecer em pessoas saudáveis, mas também aparece em caso de doença renal.
Cilindros eritrocitários	Contém eritrócitos no interior. Estão associados ao sangramento renal.
Cilindros leucocitários	Contém leucócitos no interior. Estão associados à infecção renal.
Cristais - A sua presença em grande número pode indicar a formação de cálculos e doenças metabólicas. Também pode aparecer em indivíduos saudáveis, mas em menor quantidade.	
Cristais de oxalato de cálcio	Aparece na urina ácida e por vezes na básica. Aumentado devido ao consumo de alimentos que contém ácido oxálico. Causam cálculos renais.
Cristais de ácido úrico	Presentes na urina ácida. Estes cristais depositam-se nos tecidos causando gota.
Cristais de trifosfato triplo de amónia e magnésio	Presentes na urina básica e neutra. Pode causar cálculos renais.

Adaptado de (41)

Drogas de abuso

São pesquisadas na urina, através de um *kit* rápido baseado em imunocromatografia, algumas drogas de abuso: cocaína, benzodiazepinas, canabinóides, anfetaminas e opioides.

Quando a droga e o seu metabolito estão presentes na urina irão competir com conjugados antígeno-droga para se ligar a uma quantidade limitada de anticorpos conjugados com corante. Estando a droga presente, irá impedir que os conjugados antígeno-droga se liguem aos anticorpos o que faz com que num resultado positivo apareça apenas uma banda na zona do controlo. Caso a droga em questão não esteja presente ou esteja abaixo do limite de deteção, os anticorpos estarão disponíveis para reagir com os conjugados droga-proteína presentes no teste dando origem a uma banda na região de teste e outra no controlo (42).

Sangue oculto nas fezes

A pesquisa de sangue oculto nas fezes é um teste utilizado no rastreio de cancro colorretal e na deteção de outros distúrbios que possam causar hemorragias no trato gastrointestinal (11). Para isso, é realizado um teste imunocromatográfico qualitativo, em 3 amostras de fezes, para detetar hemoglobina, sem ser necessário a realização de uma dieta

especial. Se presente, a Hb irá ligar-se a anticorpos conjugados com partículas de ouro e juntos irão migrar por capilaridade. Serão imobilizados por anticorpos anti-Hb na zona T formando uma linha rosa nessa zona, indicativo de um resultado positivo. Se a Hb está ausente, só se forma uma linha rosa na zona C (controlo), necessária para a validação do resultado do teste (43).

A colheita para este teste não deve ser realizada durante o período menstrual ou em situações de hemorroides (11).

Hematologia

Na secção de hematologia são realizados hemogramas (com ou sem contagem de plaquetas), a determinação da velocidade de sedimentação (VS), a observação microscópica de esfregaços de sangue periférico, quantificação de hemoglobina glicada (Hb A1c) e o estudo da coagulação.

São colhidas amostras de sangue num tubo com anticoagulante EDTA para se fazer o hemograma, velocidade de sedimentação e a quantificação de hemoglobina glicada. Para o estudo da coagulação, e em certos casos para o hemograma, colhe-se sangue para um tubo com anticoagulante citrato trisódico.

Hemograma

O hemograma é das análises mais solicitadas no laboratório, pois existem imensas patologias que induzem alterações nas células do sangue, possibilitando o diagnóstico, prognóstico e monitorização do tratamento de uma doença (44).

Num hemograma são quantificados os eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito, calculados os índices eritrócitários e fornecidas informações sobre a sua morfologia e por vezes a presença de inclusões ou possíveis formas imaturas.

Eritrograma

Os eritrócitos são células anucleadas bicôncavas que contêm hemoglobina (Hb) no interior. A Hb é a proteína transportadora de oxigénio e dióxido de carbono necessários para as trocas gasosas das células. Os índices que definem o tamanho e conteúdo de hemoglobina nos eritrócitos são calculados pelo equipamento de forma automática através dos resultados de hemoglobina, hematócrito e nº de eritrócitos. Estes índices são importantes para diagnóstico e diferenciação de uma anemia (44).

Os parâmetros avaliados no eritrograma encontram-se descritos na tabela 10.

Tabela 10 -Parâmetros avaliados num eritrograma

Parâmetro			Observações
Nº de eritrócitos			Permite avaliar situações de anemia ou policitemia.
Hemoglobina			Indicador de anemia quando está diminuída. Aumentada em policitemias.
Hematócrito			Proporção do volume que eritrócitos ocupam no volume total de sangue. Há valores baixos nas anemias, hemorragias, falha da medula óssea, destruição dos eritrócitos, neoplasias. Valores elevados devem-se a desidratação, eritrocitose e policitemia vera.
Volume Globular Médio (VGM)			Avaliação do tamanho dos eritrócitos. Permite ajudar a classificar anemia quando ao tamanho dos eritrócitos.
Hemoglobina média (HGM)	Globular		Avalia a quantidade média de hemoglobina presente nos eritrócitos. Permite ajudar a classificar anemia quando à cor dos eritrócitos.
Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)			Concentração de hemoglobina presente nos eritrócitos.
Varição do Tamanho dos Eritrócitos (RDW)			Coefficiente de variação da distribuição do volume dos eritrócitos. Valores elevados refletem anisocitose (eritrócitos de tamanhos diferentes).

Adaptado de (44)

Se o VGM é abaixo do valor de referência é porque os eritrócitos são mais pequenos (microcíticos) causado por um defeito na síntese de Hb. Por outro lado, o VGM aumentado indica eritrócitos macrocíticos, sendo causado por um defeito na maturação do núcleo. Se estiverem com tamanho normal diz-se que são normocíticos (44).

A HGM e a CHGM estão relacionadas com o conteúdo de hemoglobina nos eritrócitos permitindo classificar em anemia hipocrômica, normócromica e hiperocrômica. Geralmente os eritrócitos são hipocrômicos quando a concentração de Hb está abaixo dos valores normais (CHCM diminuída). Se tiverem valores normais são normocrômicos e se tiverem valores elevados são hiperocrômicos (44). Na tabela 11 são apresentados os tipos de anemias com base na classificação morfológica e as possíveis patologias associadas.

Tabela 11- Classificação morfológica da anemia

Tipo de anemia	Possível patologia
Anemia microcítica e hipocrômica	Deficiências em ferro, talassemia, anemia das doenças crônicas, intoxicação por chumbo, anemia sideroblástica.
Anemia normocítica e normocrômica	Anemias hemolíticas, doença crônica, insuficiência da medula óssea, anemia pós-hemorragica aguda.
Anemia macrocítica e normocrômica	Anemia megaloblástica (défice de vitamina B12 e/ou folato), anemia não megaloblástica (alcoolismo, anemia aplástica, síndromes mielodisplásicas).

Adaptado de (44,45)

Leucograma

Os leucócitos são células nucleadas do sistema imunitário, capazes de nos defenderem contra microrganismos e antígenos estranhos ao organismo e que, portanto, se encontram alterados em infecções, inflamações, leucemias, entre outras situações (46).

Num hemograma há diferenciação de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos) indicando o valor absoluto e a sua percentagem. Estes parâmetros poderão fornecer informações úteis para o diagnóstico dependendo de que população de leucócitos está aumentada/diminuída (tabela 12) (46).

Tabela 12- Parâmetros avaliados num leucograma

Leucócitos	Alterações nos leucócitos	Possíveis patologias associadas
Neutrófilos	Neutrófila	Infeções bacterianas agudas e crônicas, algumas infeções víricas, fúngicas, parasitárias; inflamações agudas e crônicas; leucemias; síndromes mieloproliferativas.
	Neutropenia	Infeções virais, bacterianas, fúngicas, parasitárias, medicamentos.
Eosinófilos	Eosinofilia	Infeção parasitária, alergias, doenças cutâneas, hipersensibilidades medicamentosas.
Basófilos	Basófila	LMC, LMA, síndromes mieloproliferativas.
Linfócitos	Linfocitose	Infeções bacterianas, virais, malária, tabagismo.
	Linfopenia	SIDA, infeções agudas, alguns linfomas.
Monócitos	Monocitose	Malária, inflamações crônicas, infeções crônicas, exercício, leucemias e síndromes mieloproliferativas.

LMA-leucemia mielóide aguda; LMC- leucemia mielóide crónica; Adaptado de (46)

Plaquetograma

As plaquetas são fragmentos celulares resultantes de megacariócitos com um papel importante no processo de hemostase porque levam à formação de um tampão de coágulo para impede a perda de sangue. Quando seu número diminui (trombocitopenia) ou estão disfuncionais, há maior risco de sangramento excessivo e de equimoses. Em situações em que há mais plaquetas que o normal (trombocitose) existe risco aumentado de trombose (47). Na tabela 13 encontram-se descritas possíveis causas de trombocitopenia e trombocitose.

Tabela 13-Possíveis causas de trombocitose e trombocitopenia

Alteração do nº de plaquetas	Possíveis patologias associadas
Trombocitose	Síndromes mieloproliferativas (trombocitose essencial, policitemia vera, mielofibrose primária), inflamação, infecções, hemorragias, hipoesplenismo ou esplenectomia.
Trombocitopenia	Síndromes mielodisplásicas, síndrome de <i>Bernard-Soulier</i> , quimioterapia, púrpura trombocitopénica trombótica, anemia hemolítica, neoplasias linfoproliferativas; medicamentos, infecções virais e bacterianas, doenças autoimunes, hiperesplenismo.

Adaptado de (47)

Por vezes, há situações de pseudotrombocitopenia devido à incorreta contagem automática. Isto porque, pode-se formar agregados plaquetários potenciados pelo anticoagulante EDTA. Nessas situações há necessidade de observar o esfregaço sanguíneo ao microscópio para ver se existem esses agregados. Se estiverem presentes, pede-se nova colheita, mas desta vez para tubo de citrato.

Princípio do método

Onde estagiei, os hemogramas são realizados através do *Sysmex XE-2100* (figura 12) que utiliza varias tecnologias (tabela 14): citometria de fluxo fluorescente, corrente continua em conjugação com radiofrequência, fluxo envolvente de corrente continua e colorimetria (48). Após a aspiração, as amostras são divididas em diferentes canais onde o sangue vai contactar com os respetivos reagentes que podem causar lise ou corar as células dependendo da metodologia.



Figura 12- *Sysmex XE-2100 (Sysmex Corporation)*
Adaptado de (48)

Tabela 14-Metodologia utilizada pelo *Sysmex XE-2100*

Metodologia	Parâmetro
Citometria de fluxo	Leucócitos (e sua diferenciação) Plaquetas
RF-CC	Granulócitos imaturos
Fluxo envolvente de CC	Eritrócitos Plaquetas
Colorimetria -SLS	Hemoglobina

CC-corrente contínua; RF-radiofrequência; SLS- lauril sulfato de sódio;
Adaptado de (48,49)

Citometria de fluxo (CF)

O *Sysmex XE-2100* deteta três tipos de informações por CF (método que será explicado melhor mais à frente): *forward scatter* (FSC), *side scatter* (SSC) e fluorescência. Através da CF obtém-se informação para diferenciar múltiplas populações celulares, no entanto, no CML-GS Porto apenas se obtém informações quanto a leucócitos e plaquetas.

A FSC fornece informações sobre o tamanho das células; a SSC permite ajudar a diferenciá-las através da sua complexidade intracelular; a marcação fluorescente, com afinidade para ácidos nucleicos, permite identificar a maturidade das células. Os sinais produzidos pelas células são analisados e apresentados num diagrama de dispersão, como está apresentado na figura 13 (48,49) .

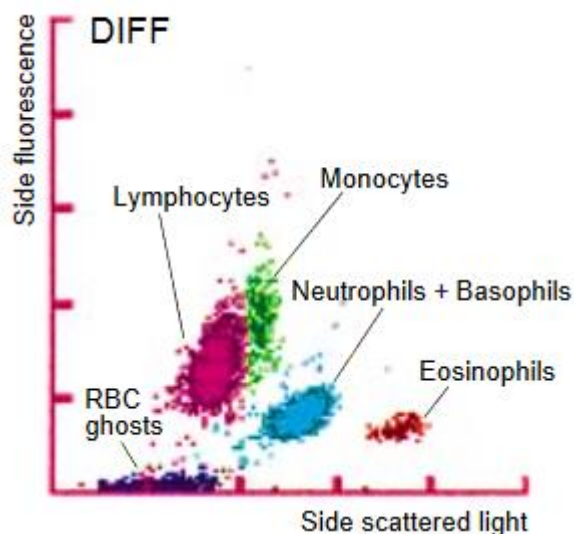


Figura 13- Diagrama de dispersão do canal diferencial de leucócitos

Adaptado de (49)

Método Colorimétrico

O sistema XT-2100 usa o reagente lauril sulfato de sódio (SLS), livre de cianeto, para quantificar a hemoglobina. A amostra é conduzida para um compartimento onde contacta com o SLS, provocando lise de eritrócitos e leucócitos. O SLS vai se ligar ao grupo heme da hemoglobina formando um complexo que será analisado fotometricamente. A absorvância medida será proporcional à concentração de hemoglobina na amostra.

Com este método obtêm-se valores fiáveis de hemoglobina, evitando interferências causadas por leucocitose e/ou lipemia que tipicamente podem influenciar os métodos fotométricos de sangue total (48).

Método RF-CC

A utilização da corrente contínua (CC) e da radiofrequência (RF) permite a quantificação de granulócitos imaturos. Uma parte do sangue aspirado é misturada com a solução eletrolítica e depois atravessam uma pequena abertura entre dois elétrodos, onde há a passagem de uma CC e de RF (49).

A resistência à corrente contínua entre os elétrodos varia à medida que as células passam através da abertura. Esta resistência provoca uma alteração do pulso elétrico proporcional ao tamanho da célula sanguínea (44).

O tamanho das células e as suas densidades vão permitir identificar os granulócitos imaturos dependendo das alterações na corrente e de radiofrequência respetivamente. Ou seja, quanto maior a célula ou quanto maior a sua densidade, maior será o impulso gerado (44,49).

Método de detecção de fluxo envolvente de corrente contínua

O *Sysmex* utiliza o método de detecção de fluxo envolvente de CC para quantificar os eritrócitos e plaquetas. Uma parte do sangue aspirado é misturada com o diluente numa razão pré-estabelecida. Essa mistura será conduzida para a câmara de detecção onde as células passarão através de uma pequena abertura, como se observa na figura 14. As células serão conduzidas à abertura através do fluxo envolvente de diluente e alinham-se uma a uma, o que permite menos erros nas contagens. De cada lado da abertura, passa a corrente contínua e quando houver resistência dessa CC é porque passou uma célula, sendo que quanto maior for a alteração do pulso elétrico, maior é a célula que passou (48,50).

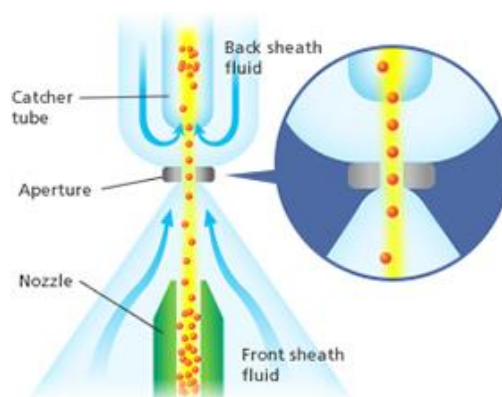


Figura 14-Método de detecção de fluxo envolvente de corrente contínua

Adaptado de (48)

A contagem de plaquetas é realizada por dois métodos diferentes de forma a aumentar a exatidão dos resultados. Em amostras em que os eritrócitos são microcíticos ou existem plaquetas maiores a exatidão do método da CC é diminuída devido à sobreposição destas populações. Por isso, também se realiza a contagem de plaquetas por citometria de fluxo, pois existe menor sobreposição das populações (51).

Esfregaços sanguíneos

Dependendo do resultado do hemograma pelo analisador automático, pode haver necessidade de observação microscópica do esfregaço de sangue periférico como, por exemplo em casos de trombocitopenia, eosinofilia, anisocitose (variação no tamanho normal dos eritrócitos) e possibilidade de presença de células imaturas. Para corar o esfregaço usa-se uma coloração de *Leishman* na qual se usa uma mistura com corante ácido (eosina) e um corante básico (azul de metileno). Mais tarde coloca-se água tamponada a pH

7, depois água da torneira e deixa-se secar. Após esta coloração será possível observar as características morfológicas das células e fazer a fórmula leucocitária.

Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) funciona como um marcador de fase aguda de inflamação não específico em que se avalia a rapidez com que os eritrócitos sedimentam num determinado tempo. Na sedimentação observa-se três fases: a formação de *rouleaux* de eritrócitos; precipitação dos agregados numa velocidade relativamente constante; compactação dos eritrócitos no fundo do tubo (52).

Além de situações de inflamação, também pode estar aumentada quando há infecções, anemias ou neoplasias e encontra-se fisiologicamente mais alta nas mulheres e idosos. A VS pode estar baixa quando há alguma anomalia com os eritrócitos, leucocitose, policitemia ou algumas anormalidades com as proteínas, pois faz com que os eritrócitos demorem mais a sedimentar (52).

Apesar da baixa especificidade deste teste, pode ser útil na monitorização de algumas doenças como artrite temporal, polimialgia reumática e linfoma de Hodgkin (52).

No laboratório que estagiei é usado sobretudo o *Ves Matic Cube 200* (figura 15), mas também pode ser utilizado o *Ves Matic Cube 30* (figura 16) como alternativa, para avaliar a VS em sangue colhido para tubo de EDTA. Os *Ves Matic Cube 30* e *200* utilizam o método de *westergren* modificado para avaliar a VS (53). O equipamento homogeneiza os tubos, faz a primeira leitura através de um leitor ótico-eletrónico e deixa repousá-los verticalmente durante 20 minutos. Ao fim desse tempo, faz a segunda leitura e regista a sedimentação para imprimir os resultados. O espaço em milímetros em que há visível sedimentação de eritrócitos é a velocidade de sedimentação dada em mm/h (54).



Figura 15-Ves-Matic Cube 200 (A.MENARINI diagnostics)

Adaptado de (53)



Figura 16- Ves-Matic Cube 30 (A.MENARINI diagnostics)

Adaptado de (53)

No caso de a quantidade de amostra ser insuficiente ou o equipamento não conseguir ler adequadamente a amostra (por causa das etiquetas que interferem com a leitura ótica), são realizadas as VS pelo método manual, que é o método de referência. Usa-se uma pipeta graduada descartável para arrastar o sangue para cima e espera-se 1h para que os eritrócitos sedimentem.

Hemoglobina glicada

O estudo da hemoglobina glicada (HbA1c) serve para avaliar a quantidade média de HbA que forma uma glicação não enzimática e irreversível com a glicose presente no sangue durante os últimos 120 dias (tempo médio de vida dos eritrócitos). Esta informação vai ser útil para diagnóstico e monitorização do tratamento dos diabetes *mellitus* porque quanto maior a concentração de glicose no sangue nessa altura, maior o valor de Hb glicada (55).

Pessoas com resultado de HbA1c $\geq 6,5\%$ e glicemia de jejum elevada são diagnosticadas com diabetes *mellitus*. No entanto, se apenas for feito o doseamento da HbA1c numa pessoa assintomática, deverá ser confirmado com uma segunda análise (1 ou 2 semanas depois) (56).

É importante ter em conta que o valor pode estar alterado se houver elevado *turnover* eritrocitário, transfusões, hemoglobinopatias, entre outras situações (55).

O equipamento usado no laboratório para a deteção da hemoglobina glicada é o *Premier Hb9210* da A. *MENARINI diagnostics* (figura 17), que utiliza a técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) por afinidade ao boronato em sangue total com EDTA.



Figura 17 - Premier Hb921 (A.MENARINI diagnostics)

Adaptado de (57)

A HbA1c ao passar na coluna vai ligar-se ao borato lá presente, enquanto que todos os outros tipos de hemoglobinas (ou seja, não glicadas) serão eluídas. Depois de saírem da coluna, passam no detetor que emite sinal elétrico provocando o primeiro pico no cromatograma (figura 18). Após a saída completa das Hb não glicadas é colocado um contra-ligante para competir pelo local de ligação do borato. A HbA1c irá desligar do borato, eluindo para fora da coluna, formando o segundo pico no gráfico (58,59).

Os resultados de HbA1c devem ser apresentados em mmol de HbA1c/mol de Hb, unidades indicadas pela *international federation of clinical chemistry and laboratory medicine* (IFCC); e em percentagem, indicado por *national glycohemoglobin standardization program* (NGSP) (56).

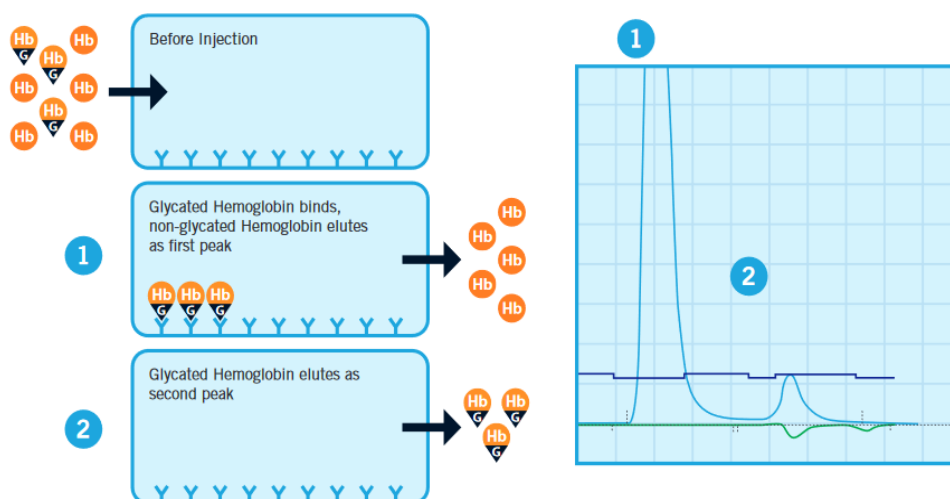


Figura 18 - Esquema de HPLC por afinidade ao boronato

Adaptado de (58)

Coagulação

Se se suspeitar de um problema na hemostase, para além da contagem de plaquetas, são pedidos o tempo de protrombina (PT) e o tempo de tromboplastina parcial ativado (APTT). No laboratório CML-GS Porto apenas são analisados estes dois parâmetros e o fibrinogénio, através do analisador BCS XP da *Siemens* (figura 19). Este analisador utiliza turbidimetria contando o tempo desde a mistura do preparado até à formação de um coágulo de fibrina (60).



Figura 19 - BCS XP (*Siemens*)

Adaptado de (61)

Tempo de protrombina

O tempo de protrombina está relacionado com a via extrínseca da cascata de coagulação e a via comum, permitindo encontrar alterações nos fatores X, VII, II, V e no fibrinogénio. Caso haja deficiência de algum fator ou falta de vitamina K haverá um aumento no tempo de protrombina (62).

PT consiste na adição de uma tromboplastina tecidual a plasma colhido para tubo com citrato de sódio, seguida da adição de cálcio para começar a contar o tempo de demora a coagulação. Após incubação destes elementos, a amostra começa a ficar cada vez mais turva, reduzindo a intensidade de luz que chega ao detetor devido à formação do coágulo de fibrina (63).

Este teste é utilizado sobretudo no controlo da terapêutica com anticoagulantes orais que os doentes hipocoagulados fazem para prevenir fenómenos trombóticos. Os resultados são referidos como *International Normalized Ratio* (INR), que é igual à razão entre o PT do doente e o PT de referência elevado ao *International Sensitivity Index* (ISI). O ISI é um fator de correção que permite padronizar os resultados obtidos em relação ao valor de referência da tromboplastina (62). Com base no valor de INR e consoante a patologia do doente (AVC, enfarte miocárdio, tromboembolismo prótese valvular, entre outros) é realizado pelos médicos especialistas um esquema de medicação para o paciente saber a

quantidade de medicação que tem a fazer diariamente e quando deverá voltar a fazer o controlo.

Tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT)

Serve para avaliar a via intrínseca da cascata de coagulação e a via comum testando os fatores XII, XI, IX, VIII X, II, fibrinogénio, pré-caliceína e cininogénio de alto peso molecular. Deficiência nalgum destes fatores, tratamento com heparina, doses elevadas de anticoagulantes orais, doença hepática levará a um teste aPTT aumentado (62).

Consiste em contar o tempo que demora a haver a formação de coagulo de fibrina, na presença dos fosfolípidos e de um ativador de superfície que ativa o fator XII e a pré-caliceína, começando a cascata. O princípio de determinação é semelhante ao TP (62).

A medição do APTT é muito utilizada para monitorizar o tratamento com heparina.

Fibrinogénio

O fibrinogénio (ou fator I) está envolvido na porção final da cascata de coagulação, convertendo fibrinogénio em fibrina insolúvel, quando a trombina o ativa.

É quantificado através do método de *Clauss*, no qual se adiciona trombina em excesso e conta-se o tempo até formar o coágulo. Quanto mais rápido for, mais fibrinogénio se encontra na amostra (60,62).

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo (CF) é uma técnica que permite analisar vários parâmetros intrínsecos a partículas em suspensão como fragmentos de DNA, partículas virais ou bactérias, no entanto, no CLM-GS esta técnica é apenas para analisar células humanas.

O citómetro utilizado é o *FACSCalibur* da *Becton-Dickinson* (figura 20), capaz de detetar a dispersão de luz frontal (FSC), a dispersão lateral (SSC) e quatro fluorocromos (FITC, PE, PerCP e APC) ao mesmo tempo.



Figura 20 -*FACSCalibur (Becton-Dickinson)*

Adaptado de (64)

Cada célula presente na suspensão com *FACSFlow* vai passar em frente a um laser. Cada célula tem tamanho e complexidade que as distingue e identifica, o que leva à produção de um padrão de luz dispersado característico que será lido por múltiplos detetores. A FSC corresponde à quantidade de luz dispersada que chegou ao detetor em frente às células e é proporcional ao tamanho da célula. O SSC é a quantidade de luz que chega ao detetor posicionado a 90° relativamente ao eixo do feixe e reflete a granularidade e complexidade celular. Além disso, são usados anticorpos conjugados com fluorocromos que se ligam a antígenos nas células e após a célula passar em frente ao feixe de luz, irá excitar os fluorocromos causando emissão de luz (fluorescência), servindo para imunofenotipar as populações de células (65).

Imunofenotipagem

São utilizados painéis de anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície ou citoplasmáticos nas células para identificar as diversas subpopulações celulares. A combinação de marcadores expressos pelas células irá ajudar na identificação da doença e no prognóstico.

Esta técnica permite ajudar a diagnosticar:

- doenças linfoproliferativas B, T e NK (natural-killer);
- hemoglobinúria paroxística noturna;
- leucemias;
- síndromes mielodisplásicas e mieloproliferativas;
- linfomas;
- mieloma múltiplo;
- gamapatia monoclonal de significado indeterminado;
- doenças autoimunes;
- hipogamaglobulinémia;

- entre outras.

É possível analisar a partir de:

- Sangue periférico;
- Aspirado de medula óssea;
- Líquidos de derrame (pleural, pericárdico, ascítico);
- Líquido Cefalorraquidiano (LCR);
- Produtos de lavado (bronco-alveolar, vesical, etc.);
- Biópsias (gânglios)

Existem muitos marcadores celulares que podem ser utilizados, uns são mais específicos do que outros para determinadas células. Na tabela 15 encontram-se os marcadores celulares mais utilizados no laboratório para a imunofenotipagem:

Tabela 15- Antígenos pesquisados na imunofenotipagem

Marcadores celulares	Onde se encontram
CD3	Linfócitos T
CD4	Linfócitos T <i>helper</i>
CD8	Linfócitos T citotóxicos
CD16 e CD56	Células <i>Natural Killer</i>
CD19	Linfócitos B
CD38 e CD138	Plasmócitos
CD45	Leucócitos

CD- cluster de diferenciação; Adaptado de (66)

Populações linfocitárias em casos HIV positivo

Visto que, através de um hemograma não é possível diferenciar as populações linfocíticas, é necessário realizar a imunofenotipagem dos linfócitos T por citometria.

Nos doentes imunocomprometidos com HIV é essencial a monitorização da evolução da doente bem como a sua terapêutica. Por essa razão, foi frequente aparecer no laboratório amostras para se fazer o estudo das populações dos linfócitos T *helper* e T citotóxicos. Nestes casos, adiciona-se ao sangue do doente (colhido num tubo com EDTA) os anticorpos marcados com fluorocromos apresentados na tabela 16.

Tabela 16-Painel específico para casos HIV positivo

Anticorpo dirigido a: Fluorocromo	
CD45	FITC
CD8	PE
CD3	PerCP
CD4	APC

APC-cromoproteína ativada; CD- cluster de diferenciação; FITC - isotiocianato de fluoresceína; HIV-vírus da imunodeficiência humana; PE-ficoeritrina; PerCP- complexo proteico peridina-clorofila

Nos doentes com HIV, é normal aparecerem uma diminuição do número de linfócitos T CD4+, visto que o vírus infeta e destrói esses linfócitos, levando à imunodeficiência. Os parâmetros importantes a avaliar são a quantidade de TCD4+ e a razão entre CD4+ e CD8+ (em casos normais estará numa razão 2:1 e em casos de imunodeficiências estará alterada) (46).

Determinação do HLA-B27

Diariamente apareciam no laboratório determinações do antígeno *human leukocyte antigen* B27 (HLA-B27) para se fazer no sangue total. HLA-B27 é um antígeno complexo major de histocompatibilidade (MHC) tipo 1 na superfície de linfócitos T presente em 90% dos doentes com espondilite anquilosante, uma doença autoimune que causa inflamação nas articulações e tecidos conjuntivos. A sua determinação pode ser realizada por dois testes. Um dos testes, utiliza anticorpos monoclonais anti-HLA-B27 conjugado com FITC e o anti-HLA-B7 conjugado com PE, pois a mistura dos dois permite ajudar a distinguir a presença de reações cruzadas. No caso deste resultado dar positivo ou indeterminado faz-se o teste confirmatório (figura 21). O teste confirmatório é quantitativo e usa anticorpos anti-HLA-B27 FITC e anti-CD3 PE (67–69).

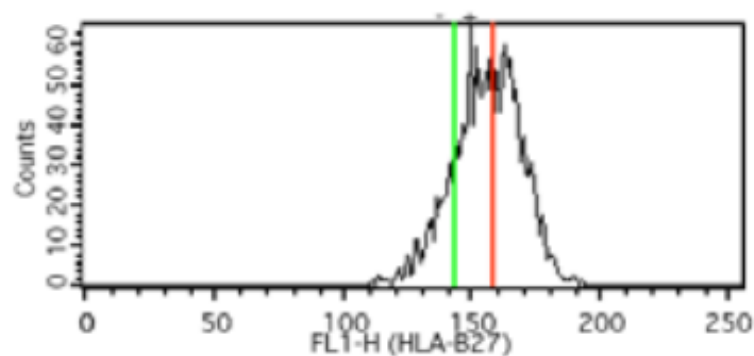


Figura 21 -Resultado positivo no teste confirmatório usando *Kit* HLA-B27

Adaptado de (68)

Microbiologia

No Laboratório La Salette Robles (LSR), realizam-se análises microbiológicas a diversas amostras (urina, fezes, expetoração, esperma, e exsudados de feridas, uretrais, vaginais, nasais, etc.) de forma a aferir a presença de infecção por bactérias, fungos ou parasitas patogénicos.

Meios de cultura

Como cada organismo tem determinados requisitos para o seu crescimento (combinação adequada de nutrientes, temperatura e presença/ausência de oxigénio) é preciso semear uma porção das amostras em meios de cultura adequados e incubar de forma a fornecer esses requisitos.

Os meios de cultura (seletivos, diferenciais, cromogéneos ou de enriquecimento) permitem isolar e identificar as bactérias, e por vezes fungos, que possam estar a causar infecção. Posteriormente, se houver crescimento valorizável, avança-se para o antibiograma.

Na Tabela 17 estão indicados os meios de cultura utilizados no serviço de microbiologia do laboratório LSR, a sua respetiva finalidade e para que amostras são utilizados.

Tabela 17- Meios de cultura utilizados

Meio de cultura	Características	Produto(s) biológico(s)
Gelose chromID CPS Elite	É um meio cromogéneo, seletivo e diferencial que permite a contagem microbiana de bactérias através de métodos de inoculação padronizados e a identificação presuntiva de: <i>Escherichia coli</i> ; <i>Enterococcus</i> spp.; grupo <i>proteae</i> (<i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Morganella</i> spp.) e do grupo KESC (<i>Klebisella</i> spp., <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp.)	Urina, fezes, exsudados, expetoração

Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)	Meio enriquecido, diferencial e não seletivo. Possibilita o isolamento e detecção da maioria dos microrganismos exigentes (e.g. estreptococos, <i>S. pneumoniae</i>). Contém sangue desfibrinado que ajuda a diferenciar o tipo de hemólise provocada por algumas bactérias (α , β e γ).	Urina, exsudados, expetoração
Gelose de Chocolate PolyViteX (PVX)	Meio enriquecido e não seletivo. Permite isolar bactérias fastidiosas como a <i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp., <i>Streptococcus pneumoniae</i> . Contém sangue com eritrócitos hemolisados, tornando disponíveis nutrientes intracelulares como o fator X (hemina) e V (NAD- Nicotinamida adenina dinucleótido).	Urina, exsudados, expetoração
Gelose de Chocolate PolyViteX VCAT3	É um meio enriquecido e seletivo. O meio VCA3 é uma modificação do meio PVX, por conter vários antibióticos e antifúngicos. Ideal para isolar <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> , em amostras polimicrobianas, quando incubadas sobre atmosfera controlada de CO ₂ .	Exsudados uretrais e vaginais, Expetoração
Gelose ChromID Strepto B	Meio cromogénico seletivo utilizado para detetar <i>Streptococcus</i> do grupo B/ <i>Streptococcus agalactiae</i> em grávidas. Neste meio, <i>S. agalactiae</i> forma colónias rosas/vermelhas.	Exsudado vagino- retal
Gelose Gardnerella (GAR)	Meio de isolamento seletivo para <i>Gardnerella vaginalis</i> . A presença de sangue humano facilita o crescimento desta bactéria e permite a observação da sua β - hemólise. Os antibióticos presentes no meio inibem a maioria dos contaminantes Gram (-) bem como das leveduras.	Exsudado vaginal
Gelose Salmonella e Shigella (SS)	Meio seletivo e diferencial para bacilos patogénicos entéricos. A lactose presente no meio permite distinguir bactérias fermentadoras como <i>E.coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> (colónias rosa	Fezes

	avermelhadas) das não fermentadoras (colónias incolores) como a <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. É também possível distinguir bactérias produtoras de sulfureto de hidrogénio (H ₂ S) como é o caso da <i>Salmonella</i> spp., (com ou sem centro preto), das bactérias não produtoras como a <i>Shigella</i> spp. (sem centro preto). A inibição de microrganismos Gram (+) é obtida através de uma mistura de sais biliares e corantes.	
Gelose Campylosel agar (CAM)	Meio seletivo para o isolamento de <i>Campylobacter</i> intestinal (principalmente <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>). Contém sangue de carneiro para favorecer o seu crescimento. Os agentes antibióticos e antifúngicos presentes no meio inibem a maioria dos contaminantes bacterianos e fúngicos.	Fezes
Candida	Meio cromogénico para o isolamento seletivo de leveduras. Permite a identificação direta de <i>Candida albicans</i> (colónias azuis); diferenciação presuntiva de um grupo de espécies <i>C. tropicalis</i> , <i>C. lusitaniae</i> e <i>C. kefyr</i> (colónias rosa).	Urina, expectoração, exsudados
Gelose Chapman 2 (MSA2)	Isolamento seletivo de estafilococos. O elevado teor de cloreto de sódio no meio limita o desenvolvimento de certas bactérias que não os estafilococos. Os microrganismos que fermentam o manitol, como <i>Staphylococcus aureus</i> , dão colónias amarelas.	expectoração, exsudados

Adaptado de (70)

Após a inoculação das amostras, os meios de cultura são colocados na estufa a 37°C durante 24h (ou mais, depende dos casos) em meio de aerobiose ou anaerobiose (no caso de COS, PVX, VCAT3 e GAR), consoante as necessidades dos microrganismos a pesquisar. No dia seguinte, os meios de cultura são observados e é feita a contagem do número de colónias. O exame cultural permite confirmar uma infeção e, juntamente com as provas complementares de identificação (colorações de gram ou Ziehl-Neelsen e provas de catalase e oxidase), fazer a identificação presuntiva das colónias. Depois faz-se a identificação e o antibiograma, através do *VITEK 2 compact* (figura 22).



Figura 22- VITEK 2 compact (Biomérieux)
Adaptado de (71)

Para *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* utiliza-se a galeria Mycoplasma IST 2 (figura 23) que faz a identificação, contagem indicativa e antibiograma destes microrganismos.

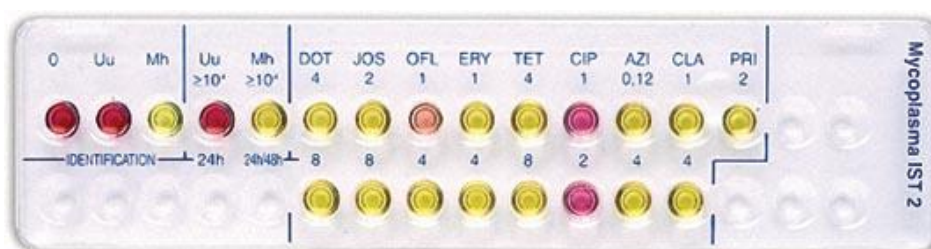


Figura 23- Galeria Mycoplasma IST 2

Neste exemplo, há presença de *Ureaplasma* spp. com $\geq 10^4$ UFC/mL; há sensibilidade a todos os fármacos exceto ofloxacina, que tem sensibilidade intermédia, e ciprofloxacina, que é resistente. Adaptado de (72)

Urina

As infecções do trato urinário (ITU) são das infecções mais frequentes no Homem. ITU são normalmente causadas por bactérias da microbiota intestinal saprófita, que invadem o trato urinário, geralmente por via ascendente, através da uretra. O agente etiológico mais frequentemente é a *Escherichia coli*, mas outras bactérias como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus saprophyticus* e *Proteus mirabilis* também são frequentes (73).

As amostras de urina, são semeadas primeiro em CPS e, se os resultados do sedimento urinário não estiverem concordantes com o resultado do exame cultural em CPS, também se semeia em COS e PVX, e faz-se coloração de gram. Para semear, recorre-se a

ansas esterilizadas e calibradas para determinar o número de UFC (unidade formadora de colônias) por mililitro (UFC/mL) através do número de colônias que cresce na placa. Nas outras amostras que são processadas, a quantidade de colônias apenas pode ser descrita como escassa, moderada ou abundante visto que não se semeia uma quantidade conhecida.

Nem todo o crescimento bacteriano deve ser valorizado uma vez que podemos estar perante uma simples contaminação, causada por uma incorreta colheita. Se o crescimento de uma cultura pura for $\geq 10^5$ UFC/mL confirma-se a infecção, como se observa na figura 24.

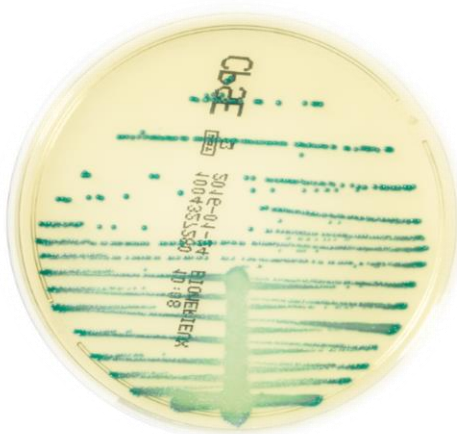


Figura 24- Infecção urinária por *Enterococcus faecalis* com 10^7 UFC/mL
Adaptado de (74)

Se houver crescimento bacteriano $< 10^5$ UFC/mL ou presença de vários tipos de colônias- indicativo de contaminação (figura 25) - dá-se a conclusão do exame bacteriológico. No entanto, o crescimento poderá ser valorizado se houver contexto clínico que o justifique como os resultados do sedimento urinário (número de células epiteliais, leucocitúria e hematúria), tipo de colheita da urina, a sintomatologia, entre outros.

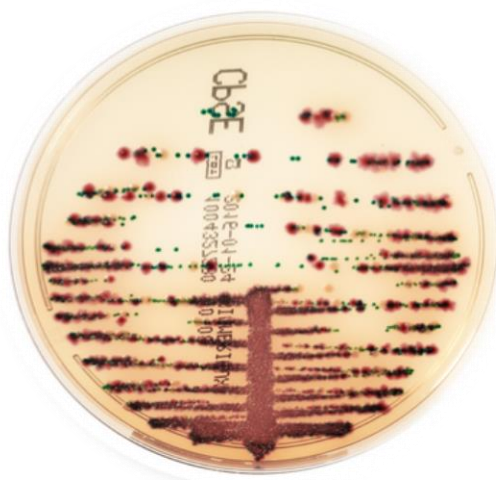


Figura 25- Contaminação da amostra de urina por *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*
Adaptado de (74)

Fezes

O trato gastrointestinal possui uma microbiota vasta e diversa, constituída principalmente por *Enterobacteriaceae* e microrganismos anaeróbios. No laboratório LSR, por rotina é feita a pesquisa e identificação de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter jejuni/coli*. Para isso, são semeadas amostras em 3 meios, CPS, SS e CAM. Os microrganismos que forem valorizados serão identificados e fazem antibiograma no *Vitek 2 compact*.

Nas coproculturas, dependendo do pedido, podem ser realizadas em 1 ou 3 amostras.

Exsudado uretral

Alguns agentes patogênicos frequentemente associados às uretrites são: *Chlamydia trachomatis*; *Ureaplasma* spp.; *Mycoplasma hominis*; *Neisseria gonorrhoeae*; *Trichomonas vaginalis*; e *Candida* spp. (75).

O exame do exsudado uretral auxilia o diagnóstico das infecções genitais. No laboratório LSR, o exame é orientado para a detecção sobretudo de *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida* spp. e *Trichomonas vaginalis*. Os meios utilizados para exsudados uretrais são o CPS, COS, VCAT3 e CAN; além disso, realiza-se a coloração de gram e exame a fresco. Caso exista desenvolvimento de bactérias patogênicas é feita a identificação e respectivo

antibiograma. Eventualmente, poderá ser pesquisado *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* spp., de acordo com a informação clínica disponível ou se houver prescrição médica.

Exsudado vaginal e vagino-retal

O exame do exsudado vaginal auxilia no diagnóstico nas infecções genitais, podendo ser realizada pesquisa de:

- *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida* spp. e *Trichomonas vaginalis*- é realizada a coloração de Gram, exame a fresco e sementeira para os meios de CPS, COS, GAR, VCAT e CAN.

- *Streptococcus agalactiae*; - se só for pedido a pesquisa desta bactéria, normalmente como exame de rotina nas grávidas, semeia-se o exsudado vagino-retal em meio StreptoB e COS.

- *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* spp.- identificados através da galeria Mycoplasma IST2.

Exsudado purulento

Os exsudados purulentos podem ser profundos ou superficiais. A metodologia para o estudo microbiológico de exsudados purulentos deve ter em consideração: o local da infecção, pois, frequentemente, são os microrganismos da flora local que conduzem à formação de exsudados purulentos; história clínica; tipo de infecção; e como foi colheita. Frequentemente, os exsudados profundos são causados por microrganismos anaeróbios enquanto os superficiais são causados por estafilococos (e.g. *S. aureus*) e estreptococos (e.g. *Streptococcus pyogenes*) (76).

O procedimento padrão estabelecido pelo laboratório para este tipo de amostras é a coloração de Gram e sementeira em CPS, COS, PVX e CAN. É importante saber interpretar se o crescimento é valorizável ou é resultado de contaminação.

VITEK 2 Compact

O sistema Vitek 2 Compact da *BioMérieux* permite identificar bactérias e fungos e testar a sua sensibilidade a antibióticos. Para isso, são utilizados cartões teste com vários substratos que vão permitir avaliar as atividades metabólicas das bactérias e, assim, permitir a sua identificação; outros cartões, contêm diluições padronizadas de antibióticos para a realização do antibiograma, onde o equipamento regista a concentração mínima inibitória (CMI), bem como a sua sensibilidade ou resistência para cada fármaco.

Apesar de o equipamento ter a capacidade de avaliar outros tipos de cartas, apenas as cartas apresentadas na tabela 18 e tabela 19 é que são utilizadas no laboratório LSR.

Tabela 18- Cartas de identificação no *Vitek 2 compact*

Cartas para Identificação		Exemplos
GP-ID	Identificação de bactérias Gram positivas	<i>Enterococcus</i> spp., <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.
GN-ID	Identificação de bactérias Gram negativas	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> spp., <i>Yersinia</i> spp., <i>Brucella</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Vibrio</i> spp.

Tabela 19- Cartas para antibiograma no *Vitek 2 compact*

Cartas para Antibiograma	
AST-N373	Para Bactérias fermentadoras aeróbias (e.g. <i>Pseudomonas</i> spp.)
AST-N359	<i>Enterobacteriaceae</i>
AST- P586	<i>Enterococcus</i> spp. e <i>S. agalactiae</i>
AST- P648	<i>Staphylococcus</i> spp.

Vitek 2 compact tem por base a colorimetria e turbidimetria, detetando alterações na cor e na turvação nos diferentes poços. É preparado uma suspensão bacteriana a partir de uma cultura pura em 3mL de solução salina (0,45% NaCl) com uma turvação entre 0,55 e 0,65 McFarland. Colocam-se as cartas no equipamento e as suspensões e este compara os resultados com a sua base de dados para encontrar um microrganismo com o mesmo padrão de resultados. Se os resultados não forem conhecidos, ele indica uma lista de possíveis microrganismos possíveis ou simplesmente avisa da impossibilidade em identificar o microrganismo. Os valores da CMI de cada antibiótico são interpretados com base nas normas da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST),

dizendo se a bactéria é resistente ou sensível a cada fármaco testado. O equipamento é também capaz de detectar as bactérias produtoras de β -lactamases de espectro alargado.

GRAM

A coloração de Gram permite distinguir a maioria das bactérias em dois grupos, Gram (+) e Gram (-) com base na composição da sua parede celular. As bactérias gram (+) tem uma parede celular espessa, composta sobretudo por peptidoglicanos, enquanto as gram (-) tem poucos peptidoglicanos (77).

Começa-se por usar o corante cristal de violeta que irá corar ambos os grupos. De seguida aplica-se o lugol, o mordente que reforça a ligação do cristal violeta às células. Em terceiro lugar, coloca-se um descolorante que remove o cristal violeta das Gram (-), por dissolução dos lípidos da sua parede, enquanto as gram (+) permanecem coradas. Em último, aplica-se o corante secundário (safranina) que corará as Gram (-). No fim do processo, as bactérias de Gram (+) (figura 26), que retiveram o corante primário, coram de roxo, enquanto as de Gram (-) (figura 27), que retiverem o corante secundário, coram de rosa (77).

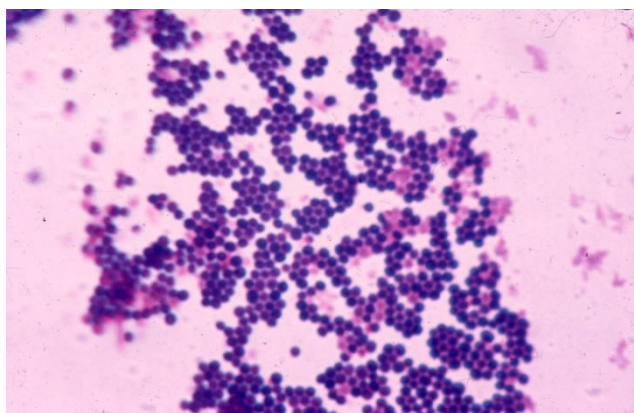


Figura 26- Bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*)

Adaptado de (78)

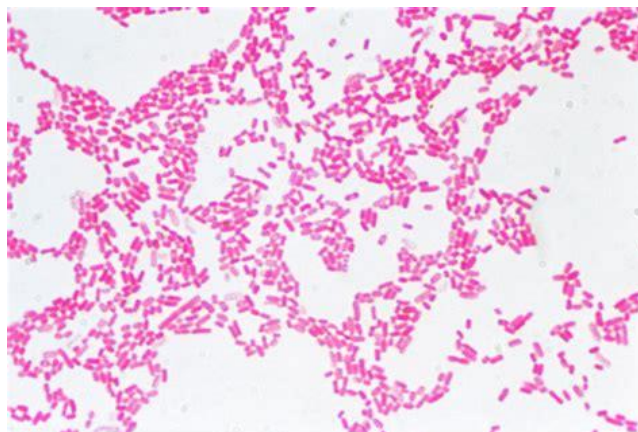


Figura 27- Bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*)
Adaptado de (79)

Coloração de Ziehl-Neelsen

As micobactérias apresentam uma parede rica em lípidos, nomeadamente ácidos micólicos, que lhes conferem resistência à coloração/descoloração por soluções álcool-ácido, como a de gram. Por essa razão, as micobactérias, como *Mycobacterium tuberculosis*, são designadas por bactérias álcool-ácido resistentes (b.a.a.r) e é necessário a realização da coloração de Ziehl-Neelsen para as observar ao microscópio. Nesta coloração, adiciona-se o corante primário (fucsina fenicada) e fornece-se calor para possibilitar a passagem do corante para o interior de todas as células, corando-as de rosa-avermelhado. De seguida, faz-se a descoloração com álcool-acido, para decorar todos os microrganismos exceto b.a.a.r, ficando os b.a.a.r da cor da fucsina e o restante com a cor do corante de contraste, o azul de metileno (figura 28) (77).

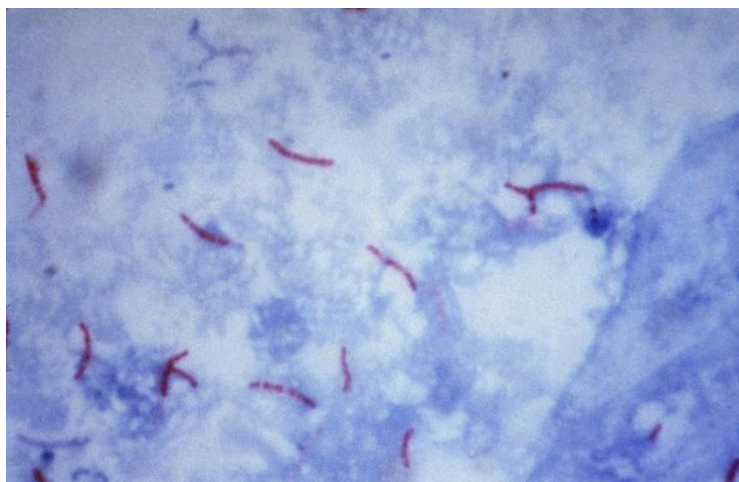
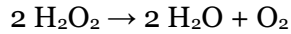


Figura 28- Coloração de Ziehl-Neelsen
Adaptado de (80)

Prova da catalase

A catalase é uma enzima intracelular que decompõe o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em água e oxigénio, segundo a seguinte reação:



A prova da catalase é usado para distinguir entre cocos gram (+), sobretudo entre estreptococos (catalase negativa) e estafilococos (catalase positiva). Os microrganismos catalase positiva libertam oxigénio, observado pela libertação de bolhas, quando é colocado duas gotas de H₂O₂ na lamina com colónias (figura 29) (77).

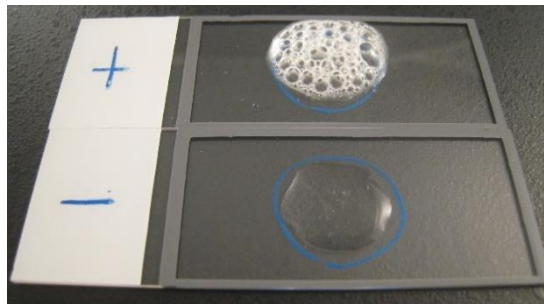


Figura 29- Prova da catalase

Adaptado de (81)

Prova da oxidase

De forma a determinar a presença da enzima citocromo oxidase nas bactérias, é colocada uma porção do substrato dicloreto de tetrametil-*p*-fenilenodiamina num papel de filtro e adicionam-se as bactérias em análise. Se a bactéria possuir a enzima, reage com o substrato formando indofenol e o papel fica com a cor roxa após, aproximadamente, 10 segundos (figura 30).

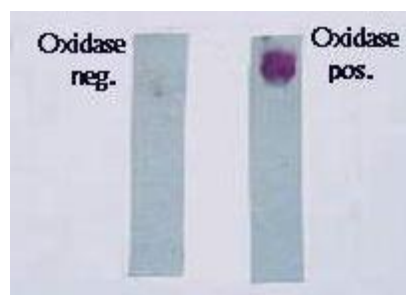


Figura 30- Prova da oxidase

Adaptado de (82)

Esta prova é usada em amostras com bacilos Gram (-) para diferenciar a família das *Enterobacteriaceae* que são oxidase negativa, de bacilos oxidase positiva, tal como *Pseudomonas* spp. (76).

Pesquisa de ovos /parasitas fecais

Em caso de suspeita clínica de parasitose intestinal, o exame parasitológico de fezes é fundamental para identificar ovos de helmintas, cistos ou trofozoítos de protozoários e/ou vermes. Para tal, concentra-se a amostra pelo método da sedimentação por centrifugação de *Ritchie* (simplificado), através de um *kit* comercial.

Forma-se uma suspensão de fezes e formalina 10% no tubo de mistura de amostra e depois adiciona-se um tampão. Enrosca-se o tubo de filtração e inverte-se o sistema de mistura de amostra e de sedimentação, como ilustrado na figura 31. Após centrifugação, observa-se o sedimento ao microscópio (83).

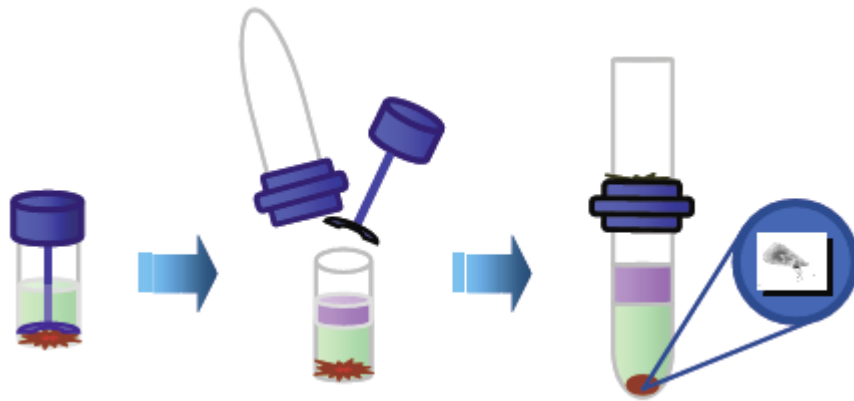


Figura 31- Procedimento de concentração ovos/parasitas fecais

Adaptado de (83)

Bibliografia

1. Normas para o Laboratório Clínico- Sistema de Gestão da Qualidade dos Laboratórios [Internet]. 2003. Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/qualidade/nlc_2003_14339334165cacd92cbob8b.pdf
2. McPherson RA, Pincus MR. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 23.^a ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2017a. 24–26 p.
3. CML-GS. Critérios de rejeição de amostras.
4. BD Vacutainer blood collection tubes [Internet]. Disponível em: <https://www.bd.com/en-us/offerings/capabilities/specimen-collection/blood-specimen-collection/venous-collection/bd-vacutainer-blood-collection-tubes>
5. The Basics of Specimen Collection and Handling of Urine Testing [Internet]. [citado 19 de Maio de 2020]. Disponível em: <https://www.bd.com/en-us/offerings/capabilities/specimen-collection/vacutainer-educational-services-and-materials/labnotes/labnotes-14-2-2004>
6. Cooper G. Basic Lessons in Laboratory Quality Control- QC Workbook [Internet]. Bio-Rad Laboratories; 2008. Disponível em: https://www.qcnet.com/Portals/50/PDFs/QCWorkbook2008_Juno8.pdf
7. Dasgupta A, Wahed A. Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control: A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice. USA: Elsevier; 2014. 1–6 p.
8. DiaSorin. Manual de utilização do LIAISON XL. 2019.
9. DiaSorin [Internet]. Disponível em: <https://www.diasorin.com>
10. CDC: Centers of Disease Control and Prevention [Internet]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/>
11. Mayo Clinic Laboratories [Internet]. Disponível em: <https://www.mayocliniclabs.com>
12. Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? Auto Immun Highlights. 2017;8(1):9.
13. Cox KL, Devanarayan V, Kriauciunas A, Manetta J, Montrose C, Sittampalam S. Immunoassay Methods. Em: Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [citado 15 de Março de 2020]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/>
14. ELISA fundamental principle, How it works [Internet]. [citado 15 de Março de 2020]. Disponível em: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle>

15. ELISA Crash Course: The Major Types [Internet]. [citado 15 de Março de 2020]. Disponível em: <http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/363338-ELISA-Crash-Course-The-Major-Types/>
16. Bellini WJ, Helfand RF. The challenges and strategies for laboratory diagnosis of measles in an international setting. *J Infect Dis.* 2003;187 Suppl 1:S283-290.
17. Oliveira KA, Damasceno D, Oliveira CR de, Silveira LA da, Oliveira AE de, Coltro WKT. Dengue diagnosis on laser printed microzones using smartphone-based detection and multivariate image analysis. *Anal Methods.* 1 de Setembro de 2016;8(35):6506–11.
18. Siemens Healthineers [Internet]. [citado 15 de Março de 2020]. Disponível em: <https://www.siemens-healthineers.com/>
19. Siemens Healthcare Diagnostics. Atellica IM Analyzer- Biblioteca de documentos [Internet]. 2017 [citado 2 de Fevereiro de 2020]. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/>
20. Human Diagnostics Worldwide. Infectious Mononucleosis Quick Test - Folheto informativo do kit. 2016.
21. Human Diagnostics Worldwide. Syphilis TPHA liquid-hemagglutination test - Folheto informativo do kit [Internet]. Human-de; 2017. Disponível em: <http://www.human-de.com/data/gb/vr/lx-tpha.pdf>
22. Treponema pallidum Hemagglutination (TPHA) Test | SpringerLink [Internet]. [citado 15 de Março de 2020]. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-77694-1_5
23. Biomérieux. Folheto informativo do kit Brucelloslide. 2003.
24. Omega Diagnostics. Micropath Antigens/ febrile antigen kit- Folheto informativo do kit [Internet]. 2013. Disponível em: <http://www.omegadiagnostics.com/portals/o/english.pdf>
25. Ingegnoli F, Castelli R, Gualtierotti R. Rheumatoid Factors: Clinical Applications. *Dis Markers.* 2013;35(6):727–34.
26. Omega Diagnostics. Avitex- Waller Rose- Folheto informativo do kit [Internet]. Disponível em: <http://www.omegadiagnostics.com/portals/o/portuguese-od113.pdf>
27. BioSystems. Rheumatoid factors Latex – SLIDE-Folheto informativo do kit. 2019.
28. Weil-Felix Test - A Diagnostic Tool for Rickettsial Diseases [Internet]. [citado 16 de Março de 2020]. Disponível em: <https://austinpublishinggroup.com/clinical-pathology/fulltext/ajcp-v4-id1046.php>
29. McPherson RA, Pincus MR. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 33.^a–59.^a ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2017b. 234 p.
30. Siemens Healthcare Diagnostics. Atellica CH Analyzer- Biblioteca de documentos [Internet]. 2017 [citado 2 de Fevereiro de 2020]. Disponível em: <https://doclib.siemens-healthineers.com/>

31. Burtis C, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6^a edição. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2008. 286–450 p.
32. Braun MM, Barstow C, Pyzocha N. Diagnosis and Management of Sodium Disorders: Hyponatremia and Hypernatremia. AFP. 2015;91(5):299–307.
33. Viera AJ, Wouk N. Potassium Disorders: Hypokalemia and Hyperkalemia. AFP. 2015;92(6):487–95.
34. Minicap Protein(E) 6 | Sebia en-EN [Internet]. [citado 18 de Março de 2020]. Disponível em: <https://www.sebia.com/en-EN/produits/minicap-proteine-6>
35. Minicap (Sebia)- Manual de utilização [Internet]. 2013. Disponível em: [http://www.illexmedical.com/files/Sebia%20inserts/CAPILLARYS_PROTEIN\(E\)_6.pdf](http://www.illexmedical.com/files/Sebia%20inserts/CAPILLARYS_PROTEIN(E)_6.pdf)
36. O’Connell T, Horita TJ, Kasravi B. Understanding and Interpreting the Serum Protein Electrophoresis. AFP. 2005;71(1):105–12.
37. Laboquick. Laboquick pregnancy test -Folheto informativo do kit. 2008.
38. Giri D. Urine Pregnancy Test (UPT): Principle, Procedure, Interpretation and Limitations [Internet]. LaboratoryTests.org. 2017 [citado 18 de Março de 2020]. Disponível em: <http://laboratorytests.org/urine-pregnancy-test/>
39. HealthManagement.org. Radiology Management, ICU Management, Healthcare IT, Cardiology Management, Executive Management [Internet]. HealthManagement.org. [citado 18 de Março de 2020]. Disponível em: <https://healthmanagement.org/products/view/automatic-urine-analyzer-aution-max-menarini-diagnostics>
40. Arkray. AutionMax AX-4030- Manual de utilização do equipamento.
41. Sediment JA of MTEC of the SIU. Urinary Sediment Examination. Japanese Journal of Medical Technology. 2017;66(J-STAGE-1):51–85.
42. Xiamen Boson Biotech. Folheto informativo dos kits rápidos de cocaína, benzodiazepinas, opióides, anfetaminas e canabinóides na urina humana.
43. Biomérieux. Folheto informativo do kit BIONEXIA FOB plus (fecal occult blood) test. 2014.
44. Keohane EM, Smith LJ, Walenga JM. Rodak’s Hematology: Clinical Principles And Application. 5.^a ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2016a. 212–252 p.
45. Hoffbrand AV, Moss PAH. Fundamentos em Hematologia. 6.^a ed. artmed; 2013. 71 p.
46. McKenzie SB, Williams JL. Clinical Laboratory Hematology. 3.^a ed. USA: Pearson; 2015a. 423–459 p.
47. McKenzie SB, Williams JL. Clinical Laboratory Hematology. 3.^a ed. USA: Pearson; 2015b. 704–720 p.
48. Sysmex Corporation. Soluções diagnósticas - Sysmex España [Internet]. [citado 19 de Março de 2020]. Disponível em: <https://www.sysmex.es/n/es-pt/>

49. Inoue H. Overview of Automated Hematology Analyzer XE-2100. *Sysmex J.* 1999;9:58–64.
50. Sheath flow DC detection method [Internet]. [citado 20 de Março de 2020]. Disponível em: https://www.sysmex.co.jp/en/rd/history_awards/history/history02_2.html
51. Walters J, Garrity P. Performance Evaluation of the Sysmex XE-2100 Hematology Analyzer. *Lab Hematol.* 2000;6:83–92.
52. Brigden ML. Clinical Utility of the Erythrocyte Sedimentation Rate. *AFP.* 1999;60(5):1443–50.
53. DIESSE VES-MATIC CUBE FAMILY [Internet]. [citado 20 de Março de 2020]. Disponível em: <https://www.menarinidiag.pt/pt-pt/home/produtos-para-laborat%C3%B3rio/hematologia/velocidade-de-sedimenta%C3%A7%C3%A3o-globular/diesse-ves-matic-cube-family>
54. Perovic E, Bakovic L, Valcic A. Evaluation of Ves-Matic Cube 200--an automated system for the measurement of the erythrocyte sedimentation rate. *Int J Lab Hematol.* 2010;32(1 Pt 2):88–94.
55. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical Chemistry-Principles, Techniques, and Correlations.* 8.^a ed. Philadelphia; 2018. 777–780 p.
56. DGS. Norma da direção geral de saúde- Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus [Internet]. 2011. Disponível em: <https://www.dgs.pt/programa-nacional-para-a-diabetes/circulares-normas-e-orientacoes/norma-da-direccao-geral-da-saude-n-0022011-de-14012011-pdf.aspx>
57. Trinity Biotech Premier Hb9210 - HbA1c Analyzer - Diagnostic Tests and Clinical Products, Analyzers and Instruments [Internet]. [citado 19 de Outubro de 2020]. Disponível em: <https://www.fishersci.com/shop/products/trinity-biotech-premier-hb9210-hplc-hba1c-analyzer-hplc-system/22140171>
58. Trinity Biotech. Premier Hb9210 Brochure-The Premier Choice for HbA1c Testing [Internet]. 2016. Disponível em: <http://www.trinitybiotech.com/wp-content/uploads/2015/02/Premier-Hb9210-Brochure-2016.pdf>
59. John WG, Little R, Sacks DB, Weykamp C, Lenters-Westra E, Hornsby T, et al. Multicentre evaluation of the Premier Hb9210 HbA1c analyser. *CCLM.* 2015;53(2):319–327.
60. Siemens Healthcare Diagnostics. BCS XP- Manual de utilização do equipamento.
61. BCS XP System [Internet]. [citado 19 de Outubro de 2020]. Disponível em: <https://www.siemens-healthineers.com/hemostasis/systems/bcs-xp-system>
62. Lourenço DM. Avaliação Laboratorial da Hemostasia. Em: *Tratado de Hematologia* [Internet]. p. 583–90. Disponível em: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjSs6ao6u3qAhVABGMBHZKXDnoQFjAAegQIBBAB&url=https%3A%2F%2Fedisciplinas.usp.br%2Fmod%2Fresource%2Fview.php%3Fid%3D1683058&usg=AOvVaw2AVo2yFYcdhwKe7v3s4loe>

63. Keohane EM, Smith LJ, Walenga JM. Rodak's Hematology: Clinical Principles And Application. 5.^a ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2016b. 773 p.
64. Citometria de fluxo. Em: Wikipédia, a enciclopédia livre [Internet]. 2019 [citado 19 de Outubro de 2020]. Disponível em: https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Citometria_de_fluxo&oldid=56893425
65. Barnett D, Walker B, Landay A, Denny TN. CD4 immunophenotyping in HIV infection. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(11 Suppl):S7-15.
66. Protocolo de imunofenotipagem do CML-GS Porto.
67. Cytognos. Folheto informativo do kit HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE [Internet]. 2019. Disponível em: <http://www.ida.gen.tr/hla-b27-hla-b7-kit-urundetay>
68. BD Biosciences. Folheto informativo do kit HLA-B27 [Internet]. 2018. Disponível em: <https://www.bdbiosciences.com/ds/is/tds/23-2563.pdf>
69. Zeng Y, Hiti A, Moranville S, Vicent G, Chavira S, Indig M de A, et al. Human HLA-B27 typing using the BD™ HLA-B27 kit on the BD FACSVia™ system: A multicenter study. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94(5):807–13.
70. Biomérieux. Folhetos informativos dos meio de cultura [Internet]. 2014. Disponível em: www.biomerieux.com/techlib
71. VITEK® 2 COMPACT Routine Microbial Identification for Food Applications [Internet]. bioMérieux industrial microbiology. [citado 19 de Outubro de 2020]. Disponível em: <https://www.biomerieux-industry.com/products/vitek-2-compact-routine-microbial-identification-food-applications>
72. Идентификация и определение чувствительности : Mycoplasma IST 2 [Internet]. [citado 19 de Julho de 2020]. Disponível em: <http://www.uspekh.ru/medical/index.php/home/katalog/laboratornaya-diagnostica/identeficacia-opredelenie-chuvstvitenosti/mycoplasma-ist-2-medical>
73. Yarbrough ML, Wallace MA, Marshall C, Mathias E, Burnham C-AD. Culture of Urine Specimens by Use of chromID CPS Elite Medium Can Expedite Escherichia coli Identification and Reduce Hands-On Time in the Clinical Laboratory. *J Clin Microbiol*. 2016;54(11):2767–73.
74. bioMérieux - Culture Media | product - CHROMID® CPS® Elite [Internet]. [citado 19 de Outubro de 2020]. Disponível em: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/9-chromid-cps-elite>
75. Young A, Wray AA. Urethritis [Internet]. StatPearls. 2020 [citado 19 de Julho de 2020]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537282/>
76. Fonseca AB et al. Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia- Programa Nacional de Controlo da Infecção – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. 2004.
77. Murray PR, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover KC. Medical microbiology. 7.^a ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2013. 109–119 p.

78. Ahmad U. Staphylococcus Aureus [Internet]. MBBS Study Stuff. 2013 [citado 19 de Outubro de 2020]. Disponível em: <https://mbbsstudystuff.wordpress.com/2013/10/07/staphylococcus-aureus/>
79. Lm Of The Gram-negative Bacteria E. Coli by Dr.rosalind King/science Photo Library [Internet]. Fine Art America. [citado 19 de Outubro de 2020]. Disponível em: <https://fineartamerica.com/featured/lm-of-the-gram-negative-bacteria-e-coli-drrosalind-kingscience-photo-library.html>
80. Tankeshwar A. Ziehl-Neelsen technique (AFB Staining): Principle, Procedure and reporting [Internet]. Learn Microbiology Online. 2013 [citado 19 de Outubro de 2020]. Disponível em: <https://microbeonline.com/ziehl-neelsen-technique-principle-procedure-reporting/>
81. Biomedicina UCÀ. Um Convite à Biomedicina: Identificação de bactérias - Catalase e Coagulase [Internet]. Um Convite à Biomedicina. 2011 [citado 19 de Outubro de 2020]. Disponível em: <https://umconviteabiomedicina.blogspot.com/2011/04/identificacao-de-bacterias-catalase-e.html>
82. oxidase test [Internet]. [citado 19 de Outubro de 2020]. Disponível em: https://www.uaz.edu.mx/histo/pathology/ed/ch_9b/path/oxidase3.jpg
83. Epitope Diagnostics, Inc. Folheto informativo do kit de concentração de ovos/parasitas fecais. 2017.