

MESTRADO

ANÁLISES CLÍNICAS

Chronic Kidney Disease

**Molecular Mechanisms of Hypoxia and Inflammation in the
Development of Anaemia in Kidney Disease**

Ana Sofia Gonçalves Abreu

M

2020





Chronic Kidney Disease

Molecular Mechanisms of Hypoxia and Inflammation in the Development of Anaemia in Kidney Disease

Monografia do 2.º Ciclo de Estudos conducente ao grau de
Mestre em Análises Clínicas apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto

Ana Sofia Gonçalves Abreu

Trabalho realizado sob orientação da Professora Doutora Alice Santos Silva e
coorientação da Doutora Maria João Valente

Julho de 2020

Agradecimentos

Quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Alice Santos Silva, por aceitar orientar a minha monografia, por me ter dado oportunidade de aprender a trabalhar no laboratório de bioquímica, pela ajuda incondicional, pelo conhecimento transmitido, pelo tempo disponibilizado, e que dessa forma tornou possível a realização da minha Monografia. Agradeço também pelas opiniões e críticas que permitiram a realização de um trabalho melhor, a sua ajuda foi imprescindível, um Muito Obrigada.

À Doutora Maria João Valente, agradeço pelo apoio incansável, pela dedicação para comigo, por se ter disponibilizado para me ensinar muito sobre o trabalho em laboratório, pelo conhecimento transmitido, pelos conselhos e sugestões que foram muito úteis para melhorar a monografia. Foi uma ajuda preciosa.

À minha família, agradeço pelo apoio, pela paciência e persistência e por acreditarem sempre em mim.

Ao meu namorado, por todo o apoio, amizade, motivação e compreensão, por estar sempre presente em todas as fases da minha vida.

A todos os meus amigos, pelo apoio e incentivo, por me ajudarem e por estarem sempre disponíveis para mim.

A todos, o meu muito obrigada.

Resumo

A doença renal crónica (DRC) desenvolve-se quando ocorrem anomalias na estrutura renal e/ou perda da função renal, demonstradas quando a taxa de filtração glomerular (TFG) é inferior a 60 mL/min/1,73 m². A lesão renal gradual leva à adaptação dos rins progressivamente, de forma a assegurar as necessidades do organismo, o que resulta numa última fase na perda da arquitetura renal normal e hipoxia. Em condições normais, o rim produz e regula a concentração de eritropoietina (EPO) mas, em condições patológicas, é incapaz de o fazer, o que resulta na diminuição da produção de EPO. A anemia é uma das complicações mais comuns da DRC, e é causada principalmente pela diminuição dos níveis de EPO.

A deficiência de ferro também desempenha um papel significativo na anemia e especificamente na produção de EPO. Isto pode dever-se à deficiência absoluta de ferro ou a uma deficiência funcional. Muitos outros fatores foram reconhecidos como as causas da diminuição da EPO, incluindo toxinas urémicas, inflamação, stress oxidativo, e aumento dos níveis de hepcidina. Todos estes fatores contribuem para a progressão e evolução da anemia, que por sua vez potenciam o seu agravamento, conduzindo a um ciclo vicioso. No rim adulto, a secreção de EPO é induzida pela hipoxia através dos fatores induzíveis de hipoxia (HIFs), em particular HIF-2, que é um regulador importante da produção de EPO no rim e fígado.

O conhecimento sobre a regulação da EPO e do recetor, EPOR, a via de sinalização de oxigénio por HIFs, os fatores de transcrição induzíveis de hipoxia, os mecanismos moleculares de regulação da hepcidina, bem como da inflamação, permitiram o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da anemia por DRC. Atualmente, para além das terapias comuns, tais como agentes estimulantes da eritropoiese e suplementos de ferro, os estabilizadores HIF e inibidores de Prolil hidroxilase, parecem ser boas estratégias terapêuticas.

Palavras-Chave: Doença Renal Crónica; Anemia De Doença Crónica; Hipoxia; Inflamação

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) develops when abnormalities of kidney structure and/or loss of renal function occur, shown by a glomerular filtration rate (GFR) of less than 60 mL/min/1.73 m². The gradual renal injury leads to progressive kidney adjustments, to ensure the needs of the organism, which ultimately results in the loss of normal renal architecture and hypoxia. Under normal conditions, kidney produces and regulates the concentration of erythropoietin (EPO) but, under pathological conditions, it is incapable of doing so, resulting in a decrease in EPO production. Anaemia is one of the most common complications of CKD, and is primarily caused by the decreased levels of EPO.

Iron deficiency also plays a significant role in anaemia and specifically in EPO production. This may be due to absolute iron deficiency or a functional deficiency.

Many other factors have been recognized as the causes of the EPO decrease, including uremic toxins, inflammation, oxidative stress, and increased levels of hepcidin. All these factors contribute to the progression and evolution of anaemia, which in turn potentiate their aggravation, leading to a vicious cycle.

In adult kidney, EPO secretion is induced by hypoxia through the hypoxia inducible factors (HIFs), in particular HIF-2, which is a major regulator of the EPO production in the kidney and liver.

The knowledge about the regulation of EPO and its receptor, EPOR, the HIF oxygen sensing pathway, hypoxia-inducible transcription factors, molecular mechanisms of hepcidin regulation, as well as of inflammation, have allowed the development of new therapeutic approaches for the treatment of CKD anaemia.

Currently, in addition to common therapies, such as erythropoiesis-stimulating agents and iron supplements, HIF stabilizers and Prolyl hydroxylase inhibitors, appear to be good therapeutic strategies.

Key words: Chronic Kidney Disease; Anaemia Of Chronic Disease; Hypoxia; Inflammation

Index

Agradecimientos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Figures Index	viii
Tables Index	ix
List Of Abbreviations	x
1. Introduction	1
2. Chronic Kidney Disease	2
2.1 Definition and Classification	2
2.1.1 National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative	2
2.1.2 Kidney Disease Improving Global Outcomes	2
2.2 Epidemiology and Etiology	3
2.3 Mechanisms/Pathophysiology	5
3. Anaemia in Chronic Kidney Disease	7
3.1 Erythropoiesis and erythropoietin	8
3.1.1 Regulation EPO-EPOR	9
3.1.2 Renal EPO-producing cells	10
3.2 Hypoxia adaptive mechanism	11
3.2.1 Hypoxia-inducible transcription factors	12
3.2.2 HIF-1α and HIF-2α target genes	13
3.2.3 The HIF oxygen sensing pathway	14
3.2.4 Prolyl hydroxylase domain	16
3.3 Iron disturbances	16
3.3.1 Iron deficiencies in CKD	18
3.3.2 Hepcidin	19
3.4 Inflammation	22
3.4.1 Mechanism of inflammation	25
3.4.2 Markers of inflammation in CKD	26

3.4.3 Anaemia of Chronic Disease	28
4. Treatment.....	30
4.1 Erythropoiesis-stimulating agents	31
4.2 Iron supplements	32
4.3 New target drugs under development	33
5. Conclusions.....	35
6. Bibliographic References	36

Figures Index

Figure 1 The Kidney Disease Improving Global Outcomes guidelines for classification of chronic kidney disease, based on GFR (G1–G5) and albuminuria (A1–A3) levels (12). ...	3
Figure 2 Annual incidence of end-stage renal disease in different countries (23).....	5
Figure 3 Prevalence rates of end-stage renal disease in different countries (23).	5
Figure 4 Pathogenesis of chronic kidney disease (31).....	7
Figure 5 Stages of erythroid differentiation (40).	8
Figure 6 The three main EPO signalling pathways (51).	9
Figure 7 Renal EPO-producing cells under normal condition and hypoxia (66).....	11
Figure 8 Examples of direct transcriptional HIF targets with relevance to kidney function (95).	14
Figure 9 Regulation of the stability and transcription activity of HIF (102).	15
Figure 10 Haem and non-haem iron absorption pathways in duodenal enterocytes (121). DMT1 – Divalent metal Transporter 1; HCP1 - Haem Carrier Protein 1	17
Figure 11 Systemic iron homeostasis (121).....	18
Figure 12 Regulation mechanisms of hepcidin expression on and by the iron signalling pathway (125).	20
Figure 13 The main molecular mechanisms of hepcidin regulation (144).....	22
Figure 14 Causes and consequences of inflammation in chronic kidney disease (158). .	24
Figure 15 Inflammation mechanism by Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) (156).....	25
Figure 16 Pathophysiological mechanisms underlying anaemia of chronic disease (210).	29
Figure 17 Flow chart for treatment patient with chronic kidney disease anaemia (215)...	31

Tables Index

Table 1 Stages of chronic kidney disease according to Kidney Disease Outcomes Quality Initiative 2002 guidelines (9).....	2
Table 2 Common chronic kidney disease risk categories and risk factors (19, 20).....	4
Table 3 Factors that contribute to chronic inflammatory status in chronic kidney disease (145).....	23
Table 4 Main available ESAs and respective side effects.....	32
Table 5 Oral and parenteral preparations from iron (224).....	32
Table 6 Characteristics of HIF-PH inhibitors under development (216).	33

List Of Abbreviations

ACD - Anaemia of Chronic Disease
AKT - Protein Kinase B
Bcl-XL - B-cell Lymphoma Extra Large
BFU-E - Burst-Forming Unit-Erythroid
bHLH - Basic Helix-Loop-Helix
BMP - Bone Morphogenetic Protein
BMPR - Bone Morphogenetic Protein Receptor
CBP - CREB Binding Protein
CFU-E - Colony-Forming Unit-Erythroid
CKD - Chronic Kidney Disease
CRP - C Reactive Protein
CVD - Cardiovascular Disease
DAMP - Damage-Associated Molecular Patterns
DMT1 - Divalent Metal Transporter 1
ECM - Extracellular Matrix
EPO - Erythropoietin
EPOR - EPO Receptor
ERK - Extracellular-Signal-Regulated Kinase
ESA - Erythropoiesis-Stimulating Agent
ESRD - End-Stage Renal Disease
FIH - Factor Inhibiting HIF
FPN - Ferroportin
GDF15 - Growth Differentiation Factor 15
GDP - Guanosine diphosphate
GFR - Glomerular Filtration Rate
GLUT1 - Glucose Transporter 1
Hb - Haemoglobin
HFE - Human Iron Regulator Protein
HIF - Hypoxia Inducible Factor

HIF-PHI - Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors

HJV - Hemojuvelin

HRE - Hypoxia-Response Element

HSCs - Hematopoietic Stem Cells

IFN- γ - Interferon gamma

IGF1 - Insulin-Like Growth Factor I

IL - Interleukin

IV - Intravenous

JAK2 - Janus Kinase 2

KDIGO - Kidney Disease Improving Global Outcomes

KDOQI - Kidney Disease Outcomes Quality Initiative

KLF1 - Krueppel-like factor 1

LPS - Lipopolysaccharide

MAPK - Mitogen Activated Protein Kinases

MEK - Mitogen activated protein kinase

MEPs - Megakaryocytic-Erythroid Progenitors

MMP - Matrix Metalloproteinases

NDD - Not Dependent on Dialysis

NF- κ B - Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK - Natural Killer

NKF - National Kidney Foundation

NLR - NOD-like receptor

NO - Nitric Oxide

PAS - Per-Arnt-Sim

PHD - Prolyl Hydroxylase Domain

PI3K - Phosphoinositide 3-kinases

PRR - Pattern Recognition Receptors

pVHL - Von Hippel–Lindau tumor suppressor

RAAS - Renin-Angiotensin-Aldosterone System

RAGE - Receptor for Advanced Glycation Endproducts

RAS - Rat Sarcoma

RBC - Red Blood Cell

REPC - Renal EPO-producing cells

rhEPO - Recombinant human EPO

ROS - Reactive Oxygen Species

RRT - Renal Replacement Therapy

SCF - Stem Cell Factor

SCN - Sickie Cell Nephropathy

sHJV - Soluble Hemojuvelin

STAT5 - Signal Transducer and Activator of Transcription 5

TAD-C - Trans-activating domain C

Tf - Transferrin

TfR - Transferrin Receptor

TGF- β - Transforming Growth Factor- β

TLR - Toll-like Receptors

TMPRSS6 - Transmembrane Serine Protease 6

TNF- α - Tumour Necrosis Factor alpha

TREM-1 - Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells

TSAT - Transferrin Saturation

TWSG1 - Twisted Gastrulation BMP Signaling Modulator 1

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor

1. Introduction

The kidneys are a pair of organs located outside the peritoneal cavity, on each side of the spine, which play a very important role. A kidney contains over 1 million functioning units, the nephrons, composed of glomerulus and renal tubules (1). The kidneys are the body's primary excretory organs, as they function as blood filters that drain waste products, while retaining other valuable blood components. When the kidneys are damaged, they start losing their ability to filter blood, allowing the leakage of some blood components into urine. Acute kidney disease appears suddenly and has a high possibility of recovering, while chronic kidney disease (CKD) appears slowly and is less likely to recover (2).

CKD is defined by abnormalities of kidney structure and/or function, usually associated to a glomerular filtration rate (GFR) of less than 60 mL/min per 1.73 m²; increased markers of kidney function, commonly creatinine and/or cystatin C, for more than 3 months, with implications on health (2, 3). CKD results in decreased urine production and may progress to kidney failure, with build-up of waste products in the blood and body tissues.

CKD is frequently accompanied by haematological, biochemical and physiological changes, namely, decreased red blood cell (RBC) (4), a decline in GFR (5), albuminuria, among many others.

CKD is a global public health problem that is often associated to a higher risk for cardiovascular diseases, the major cause of death in these patients (6). Actually, the most common causes for CKD are diabetes and hypertension, two well-known Cardiovascular Disease (CVD) risk factors. In the 2017's Global Burden of Disease Study, kidney disease was the 16th most common cause of death, accounting for 1.23 million deaths worldwide. Between 2007 and 2017, the prevalence of kidney disease increased by 33.7% globally, affecting about 700 million people, worldwide (7).

The complications of CKD, such as anaemia, bone disease, heart disease, hyperphosphatemia, hyperkalaemia and fluid build-up, leads to a decrease in the quality of life of patients, contribute to the increase their morbidity and mortality rates and to accelerate the progression of CKD to renal failure (8).

Anaemia is a common complication of CKD that often develops early, worsening with the evolution of the disease. Erythropoietin (EPO) deficiency, due to the decrease in its production by the failing kidneys, is the primary cause of anaemia in CKD patients (4). EPO is the hormone responsible for the modulation of erythropoiesis regulating the proliferation and differentiation of the erythroid cells.

In the last few years, other factors have been recognized as contributors for CKD anaemia, including uremic toxins, inflammation, decreased availability of iron for erythropoiesis, increased levels of hepcidin, among others (4).

This work will focus on CKD anaemia and address the molecular mechanisms triggered by hypoxia and inflammation associated to this type of anaemia.

2. Chronic Kidney Disease

2.1 Definition and Classification

2.1.1 National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative

The guidelines for definition and classification of CKD were introduced by the National Kidney Foundation (NKF) Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI), in 2002 (9). According to these guidelines, CKD is defined as either kidney damage or decreased kidney function (decreased GFR) for 3 or more months, and disease classification is based on five categories (Stage 1 – Stage 5) (Table 1). Kidney damage is defined as structural or functional abnormalities of the kidney, initially without decreased GFR that can decrease over time, with progression of CKD. Markers of kidney damage include abnormalities in the composition of the blood and/or urine (such as proteinuria) or abnormalities in imaging tests (9).

Table 1 Stages of chronic kidney disease according to Kidney Disease Outcomes Quality Initiative 2002 guidelines (9).

	GFR (mL/min/1,73m ²)	Marker of Kidney Damage	Description
Stage 1	≥90	Present	Normal or increased
Stage 2	60-89	Present	Mild
Stage 3	30-59	-	Moderate
Stage 4	15-29	-	Severe
Stage 5	<15	-	Kidney failure

2.1.2 Kidney Disease Improving Global Outcomes

More recently, the Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines, defined CKD as abnormalities of kidney structure and/or function, present for over 3 months, with implications for health; CKD is classified based on the cause of the disease, GFR category, and albuminuria category (Figure 1) (10).

GFR and albuminuria are used to classify CKD, considering that GFR is a well-established marker of renal excretory function and albuminuria is an indicator of renal barrier dysfunction (glomerular injury) (11).

This KDIGO 2D matrix includes the level of albuminuria (ratio albumin/creatinine (in mg per g) divided into three categories, A1, A2, and A3) (2, 10, 12). It also includes GFR, classified into 6 categories, G1 to G5 with G3 split into 3a and 3b. These categories describe the risk of patients with CKD to progress to adverse outcomes (2, 10, 12)

			Persistent albuminuria categories			
			A1 Normal to mildly increased <30 mg/g <3 mg/mmol	A2 Moderately increased 30–300 mg/g 3–30 mg/mmol	A3 Severely increased >300 mg/g >30 mg/mmol	
GFR categories (mL/min/1.73 m ²)	G1	Normal or high	>90			
	G2	Mildly decreased	60–89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45–59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30–44			
	G4	Severely decreased	15–29			
	G5	Kidney failure	<15			
Low risk Moderately increased risk High risk Very high risk						

Figure 1 The Kidney Disease Improving Global Outcomes guidelines for classification of chronic kidney disease, based on GFR (G1–G5) and albuminuria (A1–A3) levels (12).

GFR – Glomerular Filtration Rate

2.2 Epidemiology and Etiology

CKD is an enormous public health issue that continues to inexorably rise. It affects in high scale Asia, Australia, USA and several European countries (13-16).

In the last years, CKD prevalence increased in the developed countries, as well as in developing countries. This increase was mainly due to ageing of the population and to the increasing prevalence of obesity, diabetes and hypertension (Table 2) (17).

The major causes of CKD change globally, but the most common primary diseases causing CKD and consequently end-stage renal disease (ESRD) are type 2 diabetes mellitus, which affect 30-50 % of the patients (3), secondly hypertension, affecting 27,2% of the patients, then primary glomerulonephritis that affects 8,2% (3). The less common causes are chronic tubulointerstitial nephritis that affects 3,6%, and hereditary or cystic diseases that affect 3,1% of the patients. Sick Cell Nephropathy (SCN) affect almost 1% (3, 18).

Table 2 Common chronic kidney disease risk categories and risk factors (19, 20).

Risk category	Risk factors
Susceptibility	Older age, reduction in kidney mass, low birth weight, family history of CKD, US racial or minority status
Initiation	Diabetes, hypertension, autoimmune disease, systemic infections; urinary tract infections, stones, or obstruction; drug toxicity
Progression	Higher proteinuria, hypertension, poor glycaemic control in diabetes, smoking, obesity, dyslipidaemia, cardiovascular disease, high dietary-protein intake, decreased nephron number.
End-stage decline	Lower dialysis dose, temporary vascular access for haemodialysis, anaemia, lower serum albumin, late referral to nephrologist, mineral and bone disorders, metabolic acidosis

The intertwined nature of risk factors and comorbid illnesses complicate the characterization of CKD. These terms are often used interchangeably, due to the continuous and progressive nature of this disease. Some patients may have risk factors for developing CKD, while others may have risk factors contributing to the progression of CKD. Some comorbid illnesses are risk factors for both the initiation and the progression of disease. However, some risk factors are simply nonmodifiable patient's characteristics. Table 2 presents common risk categories and associated factors (19).

The incidence and prevalence of CKD differ substantially across countries (Figures 2 and 3) and regions. More than 80% of all patients receiving treatment for ESRD are estimated to be in affluent countries, with large elderly populations and universal access to health care (21). The lowest bars reported from poor countries are largely due to non-acceptance of the patients into renal replacement therapy (RRT) programmes, while in higher-income countries, the numbers of patients being accepted for RRT are rising strikingly (22, 23).

In Portugal, the incidence and prevalence of CKD is extremely high, when compared to other European countries (Figure 3); and CKD was ranked as the 9th leading cause of death, by the Portuguese Institute for Health Metrics and Evaluation, in 2017 (24). The incidence and prevalence of ESRD and RRT varies significantly among European countries, with Portugal presenting the highest number of patients per million population (1824 pmp) receiving RRT by the end of 2013 (25).

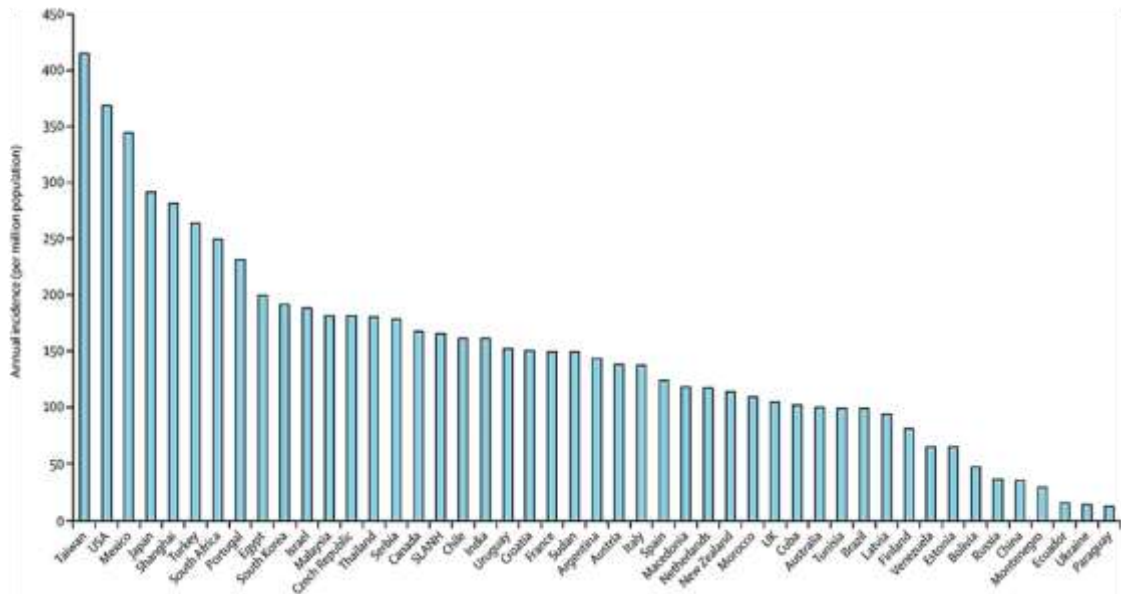


Figure 2 Annual incidence of end-stage renal disease in different countries (23).

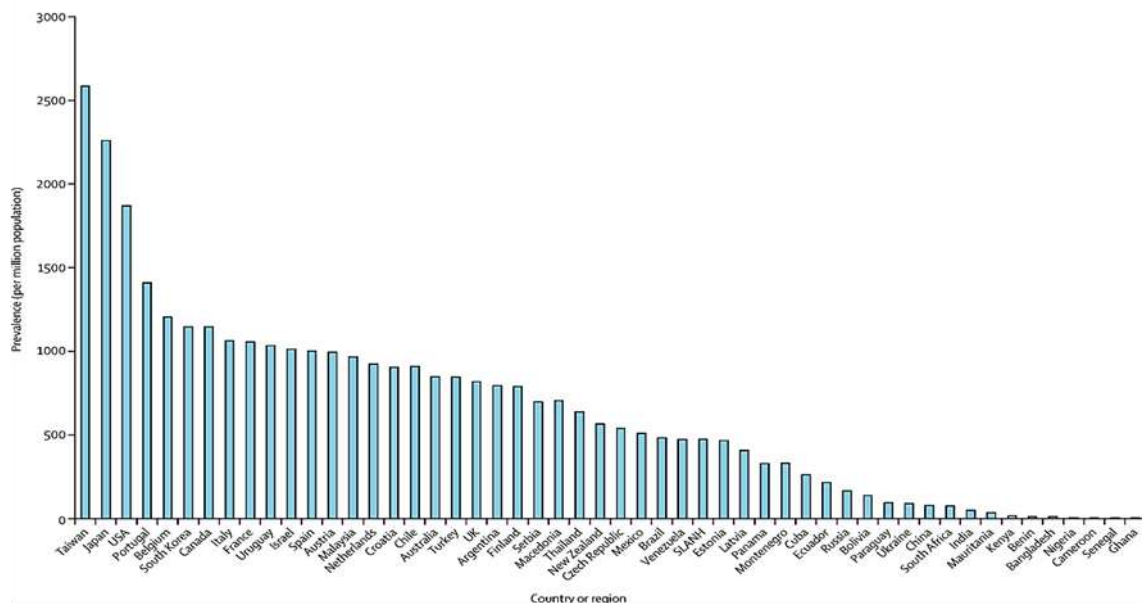


Figure 3 Prevalence rates of end-stage renal disease in different countries (23).

2.3 Mechanisms/Pathophysiology

The gradual renal injury makes the kidney to adjust progressively, to ensure the needs of the organism. In the presence of immunologic reactions, tissue hypoxia and ischaemia, exogenous agents like drugs, endogenous substances like glucose or paraproteins, and genetic defects, the kidney loses the ability to perform its functions (26). However, the nephrons can survive the initial aggression or increase their functional capacity, to surpass

the absence of the injured nephrons and ensure a relative stability of the organism, even in the most advanced stages of CKD.

Regardless of the underlying cause, glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis are common in the population with CKD (26). These pathological modifications result in loss of normal renal architecture, tubular atrophy, microvascular capillary rarefaction, and hypoxia. These changes lead to the loss of GFR and, finally, when the kidney is very injured, to ESRD.

Nephron loss

When the kidney experiences glomerular or tubular injuries, nephron loss could occur. Glomerular injuries may result from inflammation, thrombogenesis, primary podocyte dysfunction or vascular injury (27). To compensate nephron loss and maintain GFR, the remnant, intact nephrons must increase their activity, either by increasing their functionally or by increasing their mass (hypertrophy and hyperfiltration) (11). Nevertheless, this mechanism has long-term side effects, as the remaining nephrons become weaker and renal function deteriorates (Figure 4).

Fibrosis

Renal fibrosis is described by disproportionate production and deposition of extracellular matrix proteins (ECM), mainly in the renal interstitium. After nephron loss, nonspecific wound-healing responses lead to interstitial fibrosis.

The secretion of proinflammatory and profibrotic mediators (as occurs in patients with albuminuria, diabetes or glycosuria) activate the proximal tubular epithelial cells, promoting interstitial inflammation and fibrosis (28). Interstitial fibrosis appears to ultimately lead to nephron injury through the promotion of renal ischaemia (28), although, as in other organs, scar formation could also mechanically stabilize the remaining nephrons (29). The increased tubular transport capacity of remnant nephrons also involves anaerobic metabolism, intracellular acidosis and endoplasmic reticulum stress, which promote secondary tubular cell injury (30, 31).

Adaptation Mechanism

After kidney injury, the surviving nephrons are able to increase their filtration and excretion rates, in order to guarantee an adequate balance of solute, water and acid-base. It is known that patients with CKD are vulnerable to oedema formation and acute volume overload, hyperkalaemia, hyponatremia and azotaemia, due to the alterations in kidney function and decreased number of viable nephrons (32). Initially, sodium balance is preserved by

increasing fractional excretion of sodium by the nephrons. Acid excretion is maintained until late stages of CKD (stages 4 and 5), by increasing tubular ammonia synthesis, which gives an adequate buffer for hydrogen in the distal nephron (32). Afterwards, a considerable decrease in distal bicarbonate regeneration results in hyperchloremic metabolic acidosis. Further nephron loss leads to retention of organic ions, such as sulphates, which results in an anion gap metabolic acidosis (32).

Once GFR declines below a critical level, CKD often progresses to ESRD. Several studies showed that activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) pathway and increased production of transforming growth factor- β (TGF- β) contribute to renal fibrosis (32).

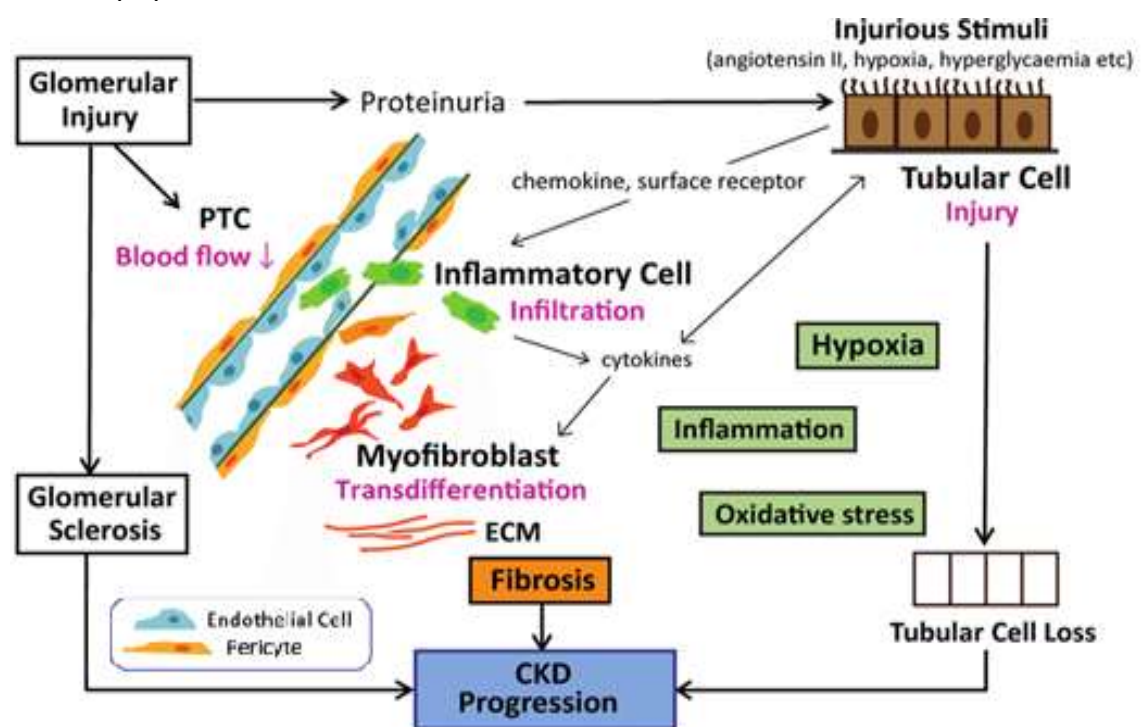


Figure 4 Pathogenesis of chronic kidney disease (31).

CKD – Chronic Kidney Disease; ECM – Extracellular Matrix; PTC – Peritubular Cells.

3. Anaemia in Chronic Kidney Disease

The RBC mass is essential for an efficient supply of oxygen to the tissues. This is a result of the balance between the removal of senescent cells from circulation and the production and release of new cells from the bone marrow, which is mediated by a negative feedback loop based on the renal production of EPO. The EPO regulates erythropoiesis through interaction with specific EPO receptors (EPOR) on bone marrow erythroid progenitors. Some other factors, such as iron, vitamin B12, and folic acid are also necessary for an adequate erythropoiesis.

Anaemia is a frequent result of the progression of CKD, and is mainly due to the reduction of EPO synthesis by failing kidneys (33). It is usually associated with reduced EPO blood levels, hypoxia, oxidative stress and alterations in iron homeostasis.

After EPO binding to EPOR, a signal is triggered which promotes growth, hinders apoptosis and stimulates the differentiation of erythroid progenitors to increase RBC mass (34).

According to the 2012 KDIGO guidelines on anaemia, diagnosis of anaemia, in adults, is defined by haemoglobin (Hb) levels below 13,0 g/dL in males, and below 12,0 g/dL in females (12).

3.1 Erythropoiesis and erythropoietin

The stem cells that originate both the myeloid and lymphoid lineages of blood cells are called hematopoietic stem cells (HSCs) (Figure 5). With an increased expression of GATA binding factor-1 and decreased expression of the transcription factor PU.1, HSCs differentiate into megakaryocytic-erythroid progenitors (MEPs) (35). Under the control of the krueppel-like factor 1 (KLF1), MEPs differentiate into burst-forming unit-erythroid (BFU-E), the first erythroid progenitor (36). Proliferation of BFU-E is promoted by stem cell factor (SCF) and insulin-like growth factor I (IGF1) (37). The next stage of erythroid progenitors is the colony-forming unit-erythroid (CFU-E), which are rapidly dividing cells that express EPOR (38). They progressively lose their sensitivity to SCF and IGF1 and become very responsive to EPO (39). CFU-E give rise to the proerythroblast that will differentiate to basophilic erythroblast, polychromatophilic erythroblast and orthochromatic erythroblast by successive mitosis; the latter will undergo enucleation, producing the reticulocytes that are released in blood circulation, where they will finish their maturation process, losing their nucleus and organelles, to form the mature erythrocytes (40).

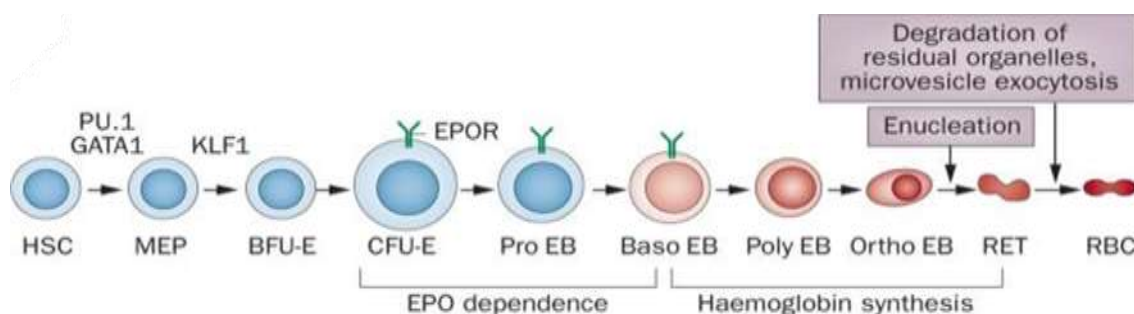


Figure 5 Stages of erythroid differentiation (40).

BFU-E - Burst-Forming Unit-Erythroid; CFU-E - Colony-Forming Unit-Erythroid; EB - Erythroblast; EPO(R) – Erythropoietin (receptor); HSC - Hematopoietic Stem Cell; KLF1- Krueppel-Like Factor 1; MEP - Megakaryocytic-Erythroid Progenitor; RET – Reticulocyte; RBC – Red Blood Cell..

3.1.1 Regulation EPO-EPOR

As mentioned before, the production of RBCs depends on both EPO and EPOR. EPOR is a transmembrane glycoprotein, which is expressed on late-BFU-E, CFU-E, and on erythroblasts.

Renal EPO secretion is induced by hypoxia through the hypoxia inducible factors (HIF) and EPO transcriptional activators (41, 42).

The attachment of EPO to EPOR induces a conformational change in EPOR. After the binding, the EPO–EPOR complex is activated and internalized, to trigger erythropoiesis; however, if in excess, these complexes are degraded by lysosomes, leading to consumption of circulating EPO. Thus, this mechanism also provides a negative feedback to reduce EPO blood level and avoid overproduction of RBCs (43-45).

Since EPOR lacks intrinsic tyrosine kinase activity, it requires an accessory tyrosine kinase - Janus Kinase 2 (JAK2) -, responsible for initiating a cascade signalling pathway (46). The JAK2 interacts with EPOR at the juxtamembrane region and a conformational change is induced by the binding of EPO to EPOR (47, 48), which brings the JAK2 molecules into close proximity, resulting in their transphosphorylation (49). The activation of JAK2 results in the phosphorylation of tyrosine residues in EPOR, subsequently activating three major signal transduction pathways: JAK2/signal transducer and activator of transcription 5 (JAK2/STAT5), rat sarcoma/mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (RAS/MEK/ERK), and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway (50) (Figure 6).

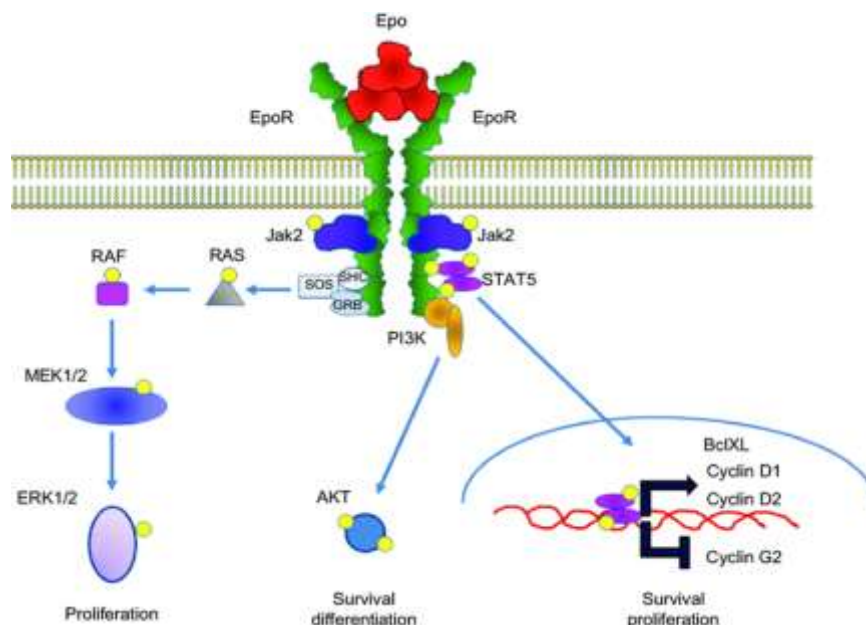


Figure 6 The three main EPO signalling pathways (51).

AKT - Protein Kinase B; BclXL- B-Cell Lymphoma-Extra Large; Epo(R) – Erythropoietin (receptor); ERK1/2 - Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1 and 2; GRB - Growth Factor Receptor;

Jak2 - Janus Kinase 2; MEK1/2 - Mitogen-Activated Protein kinase 1 and 2; RAF - Rapidly Accelerated Fibrosarcoma; RAS - Ras GTPase; SHC - Src homology domain containing; SOS - Son Of Sevenless ; STAT5 - Signal transducer and activator of transcription 5.

JAK2/STAT5 – The pathway JAK2/STAT5 is activated in erythroid cells (52). The activation of JAK2 induces the direct binding of STAT5 to EPOR cytoplasmic domain. Consequently phosphorylation occurs by JAK2, which precedes to STAT5 dimerization and translocation to the nucleus (53). Through STAT-specific binding domains, the STAT5 dimer interacts with DNA, activating genes like cyclin D1 and B-cell lymphoma-- Extra Large (Bcl-XL), causing downstream effects on cell cycle control and resistance to apoptosis.

RAS/MEK/ERK – The MEK/ERK pathway is responsible for inducing EPOR phosphorylation through adaptor proteins, which in turn activate RAS by Guanosine diphosphate (GDP) removal (54). Activated RAS then induces a kinase cascade, activating the MEK/ERK pathway.

PI3K – Activation of the PI3K pathway involves phosphorylation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI3K), which then activates phosphoinositide-dependent kinase 1 leading to phosphorylation of protein kinase B (AKT), a serine-threonine kinase. The activation of AKT is crucial to inhibit apoptosis and cell survival (51, 55, 56).

3.1.2 Renal EPO-producing cells

In the kidney, the cortical interstitial fibroblasts are responsible for the production of EPO, also known as renal EPO-producing cells (REPC) (57). REPC include the peritubular fibroblast-like interstitial cells, in the inner cortex (predominantly juxtamedullary region) and in the outer medulla (58, 59), as well as proximal and distal convoluted tubules and cortical collecting ducts (60).

REPC are hypersensitive to variations in oxygen concentration (O_2) and, under hypoxic conditions, their number in the kidneys increases according to the degree of hypoxia, causing a more extensive distribution all over the entire cortex and outer medulla (61-64).

The REPC pool size correlates directly with the total level of renal EPO transcription, meaning that the highest level of *EPO* transcription corresponds to a rising concentration of EPO (62). Under pathologic conditions, this process fails, resulting in the incapacity of renal interstitial fibroblasts to synthesize EPO, which will lead to inadequate EPO production and, consequently, to anaemia. A kidney injury is characterized by phenotypic changes in the REPC, which adopt myofibroblastoid features and reduce the EPO gene expression (65, 66) (Figure 7).

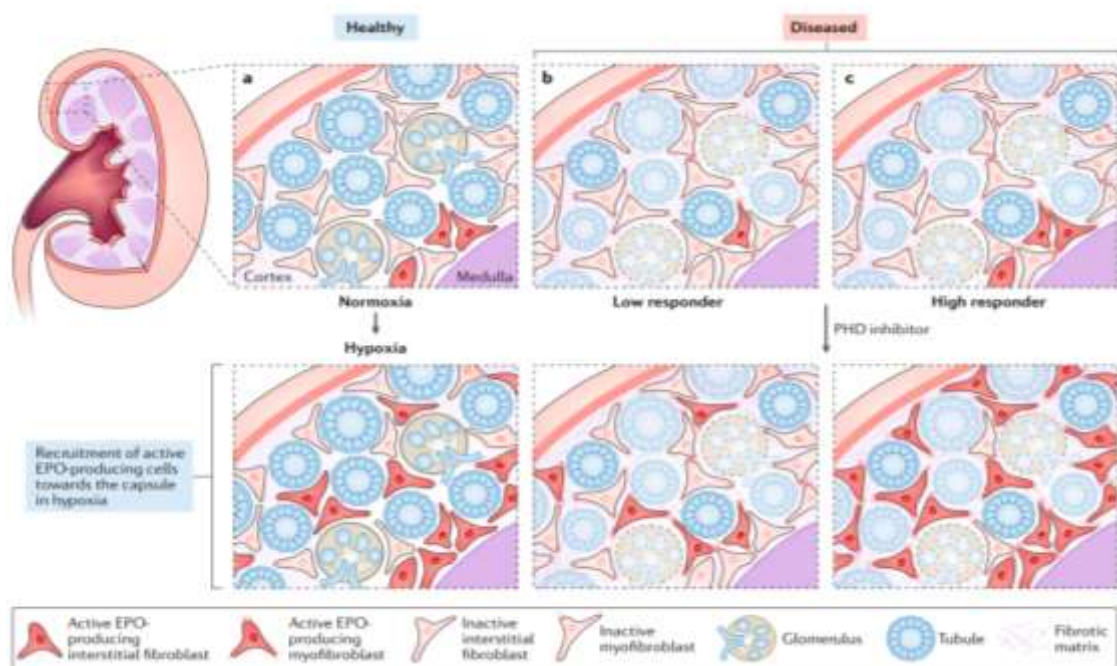


Figure 7 Renal EPO-producing cells under normal condition and hypoxia (66).

EPO - Erythropoietin; PHD - Prolyl Hydroxylase Domain.

3.2 Hypoxia

The kidneys are physiologically considered hypoxic, due to low tissue oxygen tensions, despite the elevated oxygen supply, especially in the renal medulla. The main reason derives from the architecture of the renal vasculature, which is a parallel arrangement of arterial and venous vessels (67). An increased level of hypoxia in CKD leads to disease progression and worsens prognosis.

The initial injury in the glomerular structure impairs the peritubular capillary flow. These changes in blood flow, impair the supply of oxygen and nutrients, due to microvascular insufficiency, and leads to oxidative stress that may cause further damage to vascular endothelial cells (68).

Oxygen is important for mitochondrial biological processes, required for the synthesis of the appropriate amount of energy for cell maintenance and metabolism. Therefore, the cellular response in case of insufficient oxygen supply must be precisely regulated. In this case, there are specific molecules (HIFs) that play a crucial role in the adaptive response to hypoxia (69-71).

Some studies showed that the lack of HIF in genetic mouse models results in anaemia, whereas impaired regulation of its activity results in erythrocytosis (72-76).

Other studies on CKD reveal that the function of HIF may be suppressed by factors such as oxidative stress and uraemia, which can underlie the pathogenesis of both CKD and secondary problems, as CKD anaemia (68).

The main HIFs and their target genes, the HIF oxygen sensing pathway, and the main domains of prolyl hydroxylase will be further described.

3.2.1 Hypoxia-inducible transcription factors

The HIF, major regulator of hypoxic adaptation, is a heterodimeric basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor that pertains to the Per-Arnt-SIM (PAS) family of transcription factors. It involves an O₂-sensitive α -subunit (three isoforms- 1 α , 2 α , 3 α) and a constitutively expressed β -subunit, also recognized as the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (77-79). These subunits (α -subunit and β -subunit) together form the HIF-1, HIF-2 and HIF-3 transcriptional complexes (80). HIF-1 α and HIF-2 α are the most studied α -subunits, and they show identical functional domain structures. HIF-1 α and HIF-2 α comprise DNA binding and dimerization domains at their N-terminal and transactivation domains at their C-terminal (TAD-C). On the other hand, it is known that HIF-3 α has high similarity to HIF-1 α and HIF-2 α within the bHLH and PAS domains but, lacks TAD-C. HIF-1 α and HIF-2 α share 48% sequence identity and are structurally similar (81). However, their expression patterns are different, resulting in the regulation of different target genes. In general, HIF-1 α regulates the early adaptation process to hypoxia, whereas HIF-2 α expression begins after persistent hypoxic conditions (82, 83). As a mechanism to prevent damage, HIFs are activated together in renal injury/hypoxia, leading to the expression of the genes required to maintain cell balance.

3.2.2 HIF-1 α and HIF-2 α target genes

HIF is involved in the regulation of a multitude of biological processes that are relevant to kidney function under physiological and pathological conditions, such as iron metabolism, energy metabolism, pH regulation, apoptosis, proliferation, vasomotor regulation, and angiogenesis.

The HIF-1 α is known as an essential and remarkable regulator in the hypoxic response. It is essential to ensure the survival during hypoxic conditions (80). The various HIF isoforms are expressed in the kidneys, but they aren't expressed in the same cell type. While the HIF-1 α is mostly expressed in tubules and interstitial cells, the HIF-2 α is fundamentally present in peritubular endothelial cells, mesangial cells and fibroblasts (73).

The HIF-1 and HIF-2 have the ability to bind to the same hypoxia-response element (HRE) consensus sequence in the regulatory regions of the target genes, but the fact that they bind to DNA does not necessarily correspond to increased transcriptional activity, which means that post-DNA binding mechanisms may be necessary for transactivation (84).

Usually, HIF-1 induces expression of genes that encode glucose metabolism enzymes, such as phosphofructokinase and lactate dehydrogenase A (85, 86); it also induces the expression of genes involved in pH regulation (87), genes that promote apoptosis and genes involved in iron metabolism (85, 88) (Figure 8).

In contrast, HIF-2 induces the expression of genes exclusively implicated in cell invasion, such as matrix metalloproteinases (MMPs), the stem cell factor OCT-3/4, EPO gene and cyclin D1 (85, 88, 89).

Additionally, it has also been shown that HIF-2 regulates, in the absence of HIF-1, some enzymes involved in the glycolytic pathway. However, other studies reveal that HIF-1 is capable to activate some MMPs, suggesting that under some conditions, HIF-1 α and HIF-2 α can replace specific functions (10, 90).

HIF-1 and HIF-2, in addition to the genes that each encode, they also encode common target genes, such as glucose transporter 1 (GLUT1) and the vascular endothelial growth (VEGF) factor A (85, 86).

Concluding, HIF-1 plays an important role in metabolism controlling (91), fibrosis, cell death, and inflammation (92), although the underlying mechanisms are less clear. HIF-2 is a major regulator of the EPO production in the kidney and liver (93) and vessel remodelling in diseases (EPO gene and VEGF respectively) (94-96).

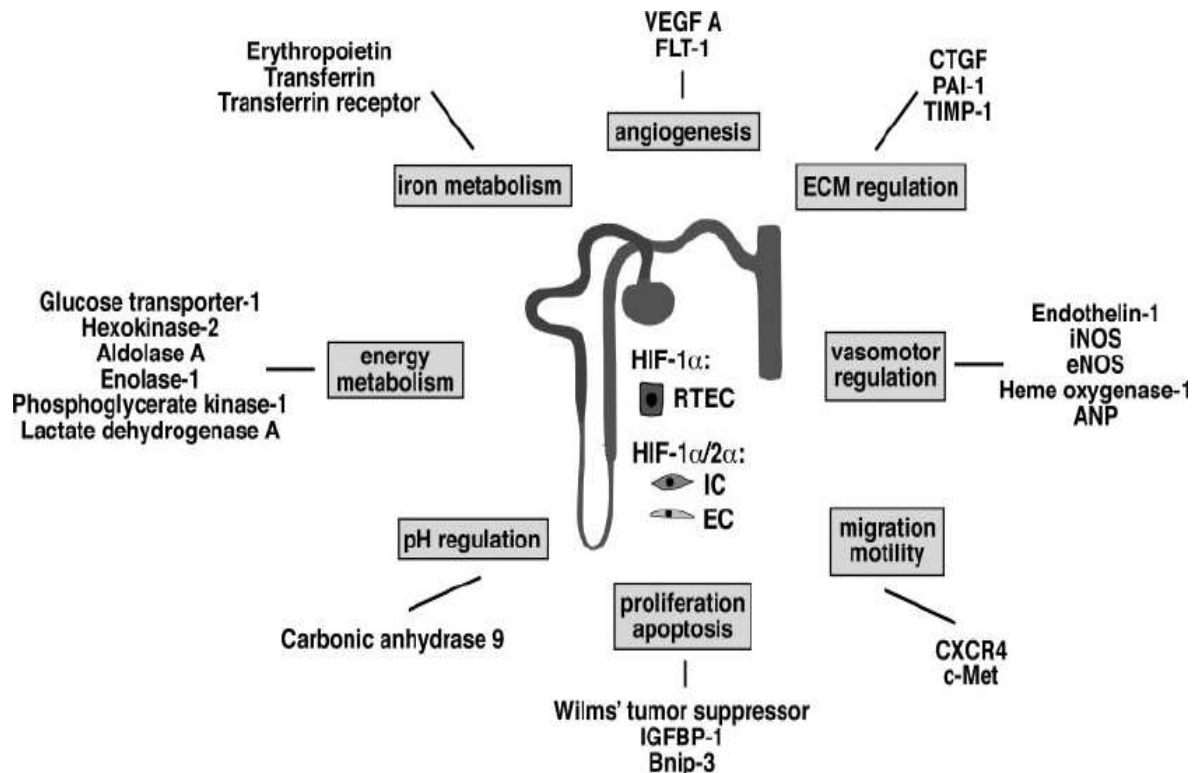


Figure 8 Examples of direct transcriptional HIF targets with relevance to kidney function (95).

ANP - Atrial Natriuretic Peptide; Bnip-3 - BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3; c-Met, Tyrosine Kinase Receptor for Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor; CXCR4 - Chemokine Receptor 4; CTGF - Connective Tissue Growth Factor; EC - Endothelial Cell; ECM - Extracellular Matrix; eNOS - endothelial Nitric Oxide Synthase; FLT-1 - Fetal Liver Tyrosine Kinase-1; IC - Interstitial Cell; IGFBP-1 - Insulin Growth Factor Binding Protein-1; iNOS - inducible Nitric Oxide Synthase; PAI-1 - Plasminogen Activator Inhibitor-1; RTEC - Renal Tubular Epithelial Cell; TIMP-1 - Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1; VEGF A - Vascular Endothelial Growth Factor A.

3.2.3 The HIF oxygen sensing pathway

Under normoxia conditions, the prolyl hydroxylase domain (PHD) proteins hydroxylate HIF- α using oxygen molecules as substrates. Following the prolyl hydroxylation, a hydroxylated HIF- α recruits the von Hippel–Lindau protein (pVHL), a substrate recognition component of the E3-ubiquitin ligase, which form a complex and consequently activates ubiquitination. This complex causes a rapid degradation of the HIF1- α by the proteasome (97, 98). The PHD2 is a key regulator of the HIF- α expression (99), and the factor inhibiting HIF (FIH) is also an important oxygen-sensitive enzyme for HIF regulation.

Under normoxia conditions, in order to avoid recruitment of CREB-binding protein (CBP)/p300 coactivators, whose function is to increase gene expression by binding to transcription factors, the FIH establishes a link to HIF- α that results in the hydroxylation of

an asparaginyl residue and consequently prevents the transcriptional activity of HIF(100, 101).

Therefore, PHDs control the level of stability and expression of HIF- α through a dual mechanism: by FIH, an asparaginyl hydroxylase enzyme, and by the formation of a proteasome (Figure 9).

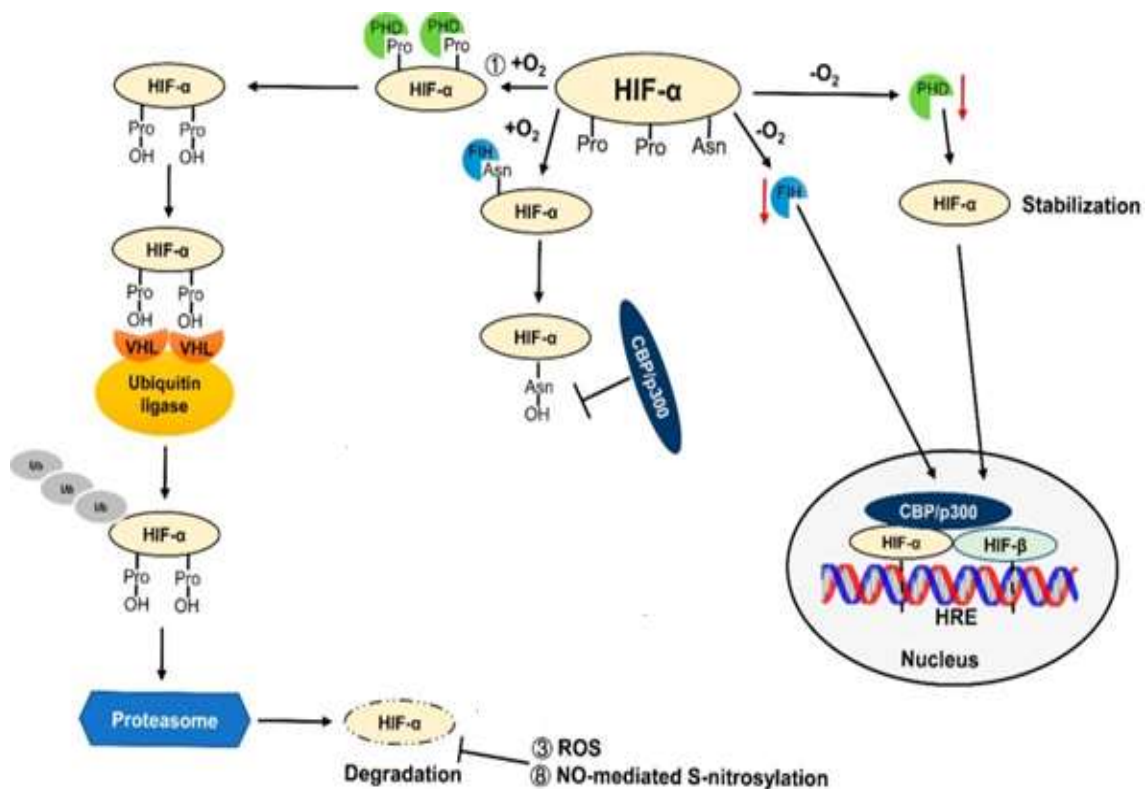


Figure 9 Regulation of the stability and transcription activity of HIF (102).

CBP - CREB-binding protein; FIH - Factor Inhibiting HIF; HIF - Hypoxia-Inducible Factor; HRE - Hypoxia Response Element; NO – Nitric Oxide; PHD - Prolyl Hydroxylase Domain; ROS - Reactive Oxygen Species; VHL - von Hippel–Lindau protein.

On the other hand, under hypoxia conditions, increased cytoplasmic HIF- α concentrations, due to decreased intracellular oxygen tension or decreased PHD, leads to the formation of a heterodimer between HIF- α and HIF-1 β , which is translocated into the nucleus and binds to the consensus enhancer via HREs, which in turn upregulates downstream target genes. The representative downstream genes include VEGF, EPO, GLUT1, and haem oxygenase 1, which protect the cell from hypoxia by promoting neovascularization, erythropoiesis, and glycolysis and by decreasing oxidative stress, respectively (102).

3.2.4 Prolyl hydroxylase domain

Inside cells, adequate levels of oxygen trigger a rapid degradation of HIF α subunits by PHDs enzymes. Three types of PHD are known, the isoforms PHD1, PHD2 and PHD3 (103-105). All isoforms are expressed in renal tubular epithelial cells (106), but PHD1 is only expressed in the nucleus, while PHD2 is expressed in the cytoplasm, and PHD3 can be found both in the nucleus and cytoplasm (107).

Each isoform has different functions. PHD2 is a key regulator of HIF- α expression (99), while the relative abundance of PHD3 and PHD1 can determine the selectivity of HIF-1 α and HIF-2 α expression (108).

In order to perform their activity and function, PHDs require iron binding at an active site and oxygen as a co-substrate, as they are 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases (109). Therefore, a decrease in iron and/or oxygen levels within cells inhibit PHD-dependent proline hydroxylation of HIF- α subunits resulting in HIF- α stabilization.

Under hypoxia conditions, there is an increase of reactive oxygen species (ROS) production in the mitochondria, which results in the accumulation of HIF-1 α and consequently HIF stabilization (110, 111).

Investigations have revealed that nitric oxide (NO) also regulates the PHD activity. Some authors suggest that NO compete with O₂ for binding to the active site Fe (II) (112), and other showed that exposure to high doses of NO stabilizes HIF-1 α (113).

3.3 Role of iron in anaemia

Iron is a highly abundant element in nature and, physiologically, is defined as an essential micronutrient. It is essential for appropriate erythropoiesis, oxygen transport (in haemoglobin), oxidative metabolism and immune system function (114).

Changes in iron homeostasis, such as iron deficiency or iron excess, can have harmful consequences on organ function (like liver and kidney) and on metabolic functions (115).

The body has a residual capacity to secrete iron, through epithelial desquamation and the regulation of iron metabolism is mainly achieved by adjusting the intestine absorption, although limited by the receptor capacity (116).

Iron deficiency anaemia is a common complication in CKD patients; it may result from poor iron diet, from blood loss, due to regular monitoring of patients or to loss in dialysis procedure; or from an altered iron absorption, due to chronic inflammation, leading to absolute or functional iron deficiency, respectively.

Iron metabolism

The typical diet contains 15–20 mg of iron, in haem (10%) and non-haem / ionic (90%) forms, from which 1–2 mg is absorbed daily, mostly at the duodenum, through the apical surface of the enterocytes. The non-haem iron present in the intestinal lumen is absorbed into the enterocytes through the divalent metal ion transporter 1 (DMT1) (117). Once DMT1 has not the ability for transporting ferric iron, it must be reduced to ferrous iron. The responsible elements for this reduction reaction are the brush border ferric reductase, the duodenal cytochrome b (118) and also ascorbic acid. According to the biological needs, the iron may stay sequestered within the enterocyte in the ferritin form and lost with the senescence of the enterocyte, or it may move to the basolateral membrane, being transported by the transmembrane ferroportin (FPN). Since iron cannot bind to plasma transferrin (Tf) as Fe^{2+} , it has to be oxidized by hephaestin, after what two molecules of iron link to one of transferrin, entering into the bloodstream (119, 120).

The haem iron from the diet is quickly absorbed through the enterocyte membrane protein, haem carrier protein 1, and released within the enterocyte by the heme-oxygenase-1, until loss due to enterocyte senescence, or absorption (Figure 10) (121).

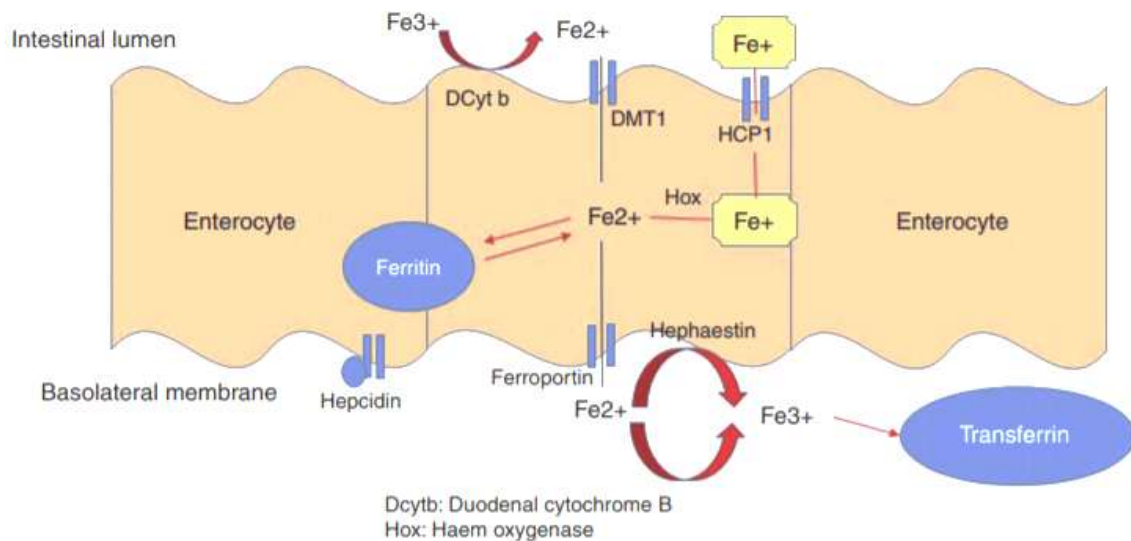


Figure 10 Haem and non-haem iron absorption pathways in duodenal enterocytes (121).
DMT1 – Divalent metal Transporter 1; HCP1 - Haem Carrier Protein 1

To deliver iron to every cell, Tf-2Fe^{3+} links to Tf receptor (TfR) 1 that are present in every cell type including hepatocytes. The liver enzyme ceruloplasmin also plays a crucial role in iron transport, for the re-oxidation of hepatic Fe^{2+} to Fe^{3+} , when the mobilization of liver iron storages is necessary (Figure 11). In addition, the iron released from senescent

phagocytosed erythrocytes within the macrophages, is stored in these cells as ferritin and may be recycled for synthesis of haem proteins, as haemoglobin.

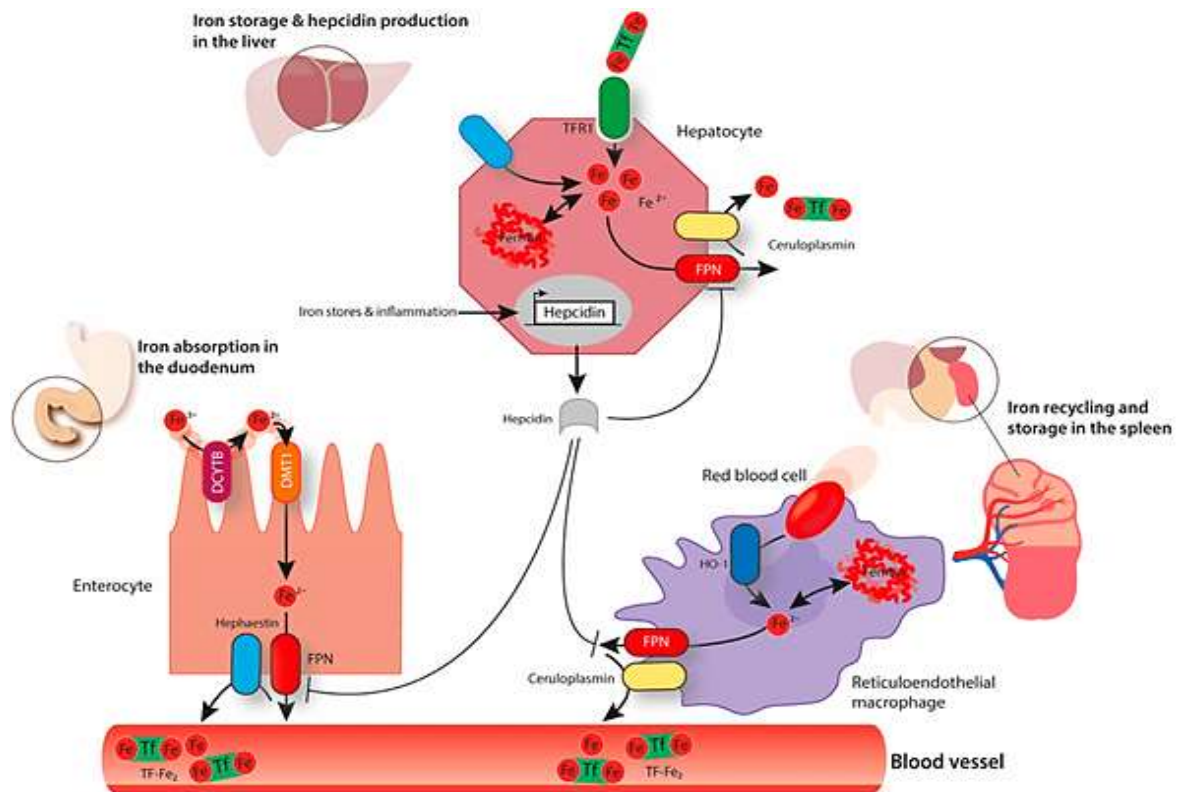


Figure 11 Systemic iron homeostasis (121).

DCYTB - Duodenal Cytochrome B; DMT1 - Divalent Metal Transporter 1; FPN - Ferroportin; HO-1 - Haem oxygenase 1; Tf - Transferrin; TFR1 -Transferrin Receptor Protein 1.

Therefore, depending on the iron requirements, it can be mobilized from iron stores or stored within cells, namely macrophages and hepatocytes, in the ferritin form.

Hepcidin is a hormone with a fundamental role in iron absorption and mobilization from iron stores. It is produced by hepatocytes, and its expression is controlled by numerous factors, such as, transferrin saturation (TSAT), inflammation, erythropoiesis, hypoxia and erythropoietin (122). In the following topic, hepcidin function will be explained in detail.

3.3.1 Iron deficiencies in CKD

Many investigations have demonstrated that patients with CKD have several abnormalities in iron homeostasis. Patients on haemodialysis have increased iron losses (between 1 to 3 grams per year), due to chronic bleeding (from platelet dysfunction associated with uraemia), frequent phlebotomy and due to blood retention in the dialysis apparatus (123). Moreover, these patients also have impaired dietary iron absorption, due to increased levels

of hepcidin. When CKD patients show low levels of both iron and ferritin, they have absolute iron deficiency, also known as true iron deficiency (124).

Some patients with long-term CKD may have functional iron deficiency, characterized by insufficient circulating iron for erythropoiesis; however, these patients have normal or increased iron stores. Thus, these patients have low/normal serum TSAT (a measure of circulating iron), normal or high serum ferritin, and low serum iron (4), which frequently, results from the underlying inflammatory state associated to CKD (124).

Several studies showed that this functional impairment is mainly caused by an excess of the key iron-regulating hormone hepcidin (4, 125). Cytokines released during the inflammation process, like interleukin (IL) - 6, induce hepcidin transcription, apparently as a mechanism to sequester iron from invading pathogens, leading to the sequestration of iron and consequently to hypoferremia (125).

3.3.2 Hepcidin

The hormone hepcidin is constituted by 25-amino-acid peptide, which plays a critical role in the iron homeostasis. Recently, hepcidin has emerged as a key mediator in the disruption of iron metabolism, contributing to the anaemia of CKD (126).

As shown in Figure 11, hepcidin plays an important role in iron metabolism, by controlling iron uptake in the duodenum and controlling iron retention in macrophages, which are involved in the recycling of iron from senescent erythrocytes.

Under inflammatory conditions or high transferrin saturation, hepcidin is highly expressed by hepatocytes, and released into the bloodstream. After binding to FPN on the membrane surface of the enterocytes, hepatocytes and macrophages, the complex FPN-hepcidin is internalized and degraded, leading to decreased iron absorption and mobilization from hepatic and macrophagic iron stores (127, 128). Therefore, the interaction between hepcidin and FPN determines the concentration of circulating iron, available for erythropoiesis.

Hepcidin reacts to different stimulus (physiological or pathological); its expression increases in response to iron overload (129) and decreases in response to anaemia, hypoxia and enhanced erythropoiesis and erythropoietin levels (130, 131) (Figure 12).

In the inflammatory process, the inflammatory cytokine IL-6 is released, which causes an increase in hepcidin gene expression, as shown in some studies with mice and humans (132). Patients with CKD, presenting a low-grade inflammation, show higher levels of the hepcidin precursor, prohepcidin (133-135), and elevated levels hepcidin (136). Researchers have proposed that hepcidin is responsible for the functional iron deficiency and anaemia,

linking inflammation and anaemia in CKD patients, and therefore, appears as an emerging marker of functional iron deficiency (125, 126, 130, 137).

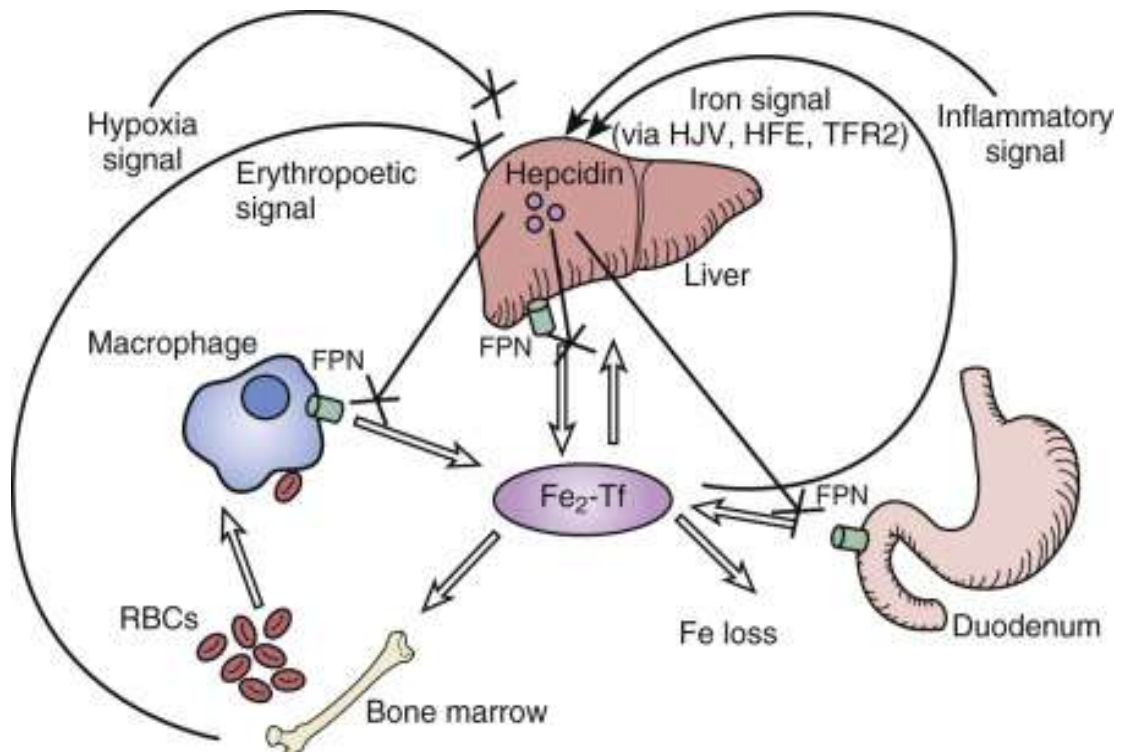


Figure 12 Regulation mechanisms of hepcidin expression on and by the iron signalling pathway (125).

FPN – Ferroportin; HJV – Hemojuvelin; Tf – Transferrin; TFR2 – Transferrin Receptor 2; RBCs – Red Blood Cells.

Molecular mechanisms regulating hepcidin synthesis

Three molecular pathways are found to be involved in the regulation of hepcidin synthesis: JAK/STAT3, Bone morphogenetic protein (BMP)/SMAD and homeostatic iron regulator protein (HFE)/TfR2 pathways (Figure 13).

JAK/STAT3

Acute-phase response (due to inflammatory stimulus or infection) leads to an increased release of IL-6 by the inflammatory cells, that binds to a complex of IL-6 receptor α and gp130 (138). The IL-6 ligand-receptor interaction results in the activation of JAKs that phosphorylate STAT proteins (139). After phosphorylation by JAKs, the STAT3 transcription factor binds to cognate motifs in the hepcidin promoter and increases hepcidin transcription (140).

BMP/SMAD

In response to increased cellular iron concentration, follows an increase in hepcidin gene expression, which generates a negative feedback that retains iron in cells and impedes iron absorption.

This pathway, is mainly regulated by BMP receptor (BMPR) and the SMAD signal pathway, which together control hepcidin transcription (141) (142). In the presence of elevated circulating iron (high TSAT), there is an increase in BMP-6 expression, which plays an important role in the BMP / SMAD pathway (142). After released, BMP6 interacts with BMPR and hemojuvelin (HJV) to form a complex, initiating the SMAD pathway (Figure 13). The SMAD pathway includes phosphorylation reactions of SMAD1, SMAD5, and SMAD8. After phosphorylation, the pSMADs/SMAD4 complex is formed, with subsequent complex translocation to the nucleus to activate the expression of the hepcidin gene (142, 143).

HFE/TfR2

When there is a rise in circulating iron, in the form of Tf-2Fe³⁺ a second iron signal may be triggered. The Tf-2Fe³⁺ binds to TfR1 and displaces HFE (Figure 13) that interacts with TfR2 to form the HFE/TfR2 complex. This complex activates hepcidin transcription via HJV/BMP/SMAD or ERK/MAPK signal pathways.

Moreover, HJV can be cleaved by furin or by the transmembrane serine protease 6 (TMPRSS6) to form soluble HJV (sHJV), which can selectively inhibit BMP-induced hepcidin expression (125, 144).

Under hypoxic conditions, HIF-1 can also regulate furin and TMPRSS6.

Erythropoiesis, enhanced by increased EPO production, may also control hepcidin expression, by stimulating the expression of growth differentiation factor 15 (GDF15), which acts together with the twisted gastrulation protein (TWSG1) to inhibit hepatic hepcidin expression through by inhibition of the BMP/SMAD pathway (125, 141, 144).

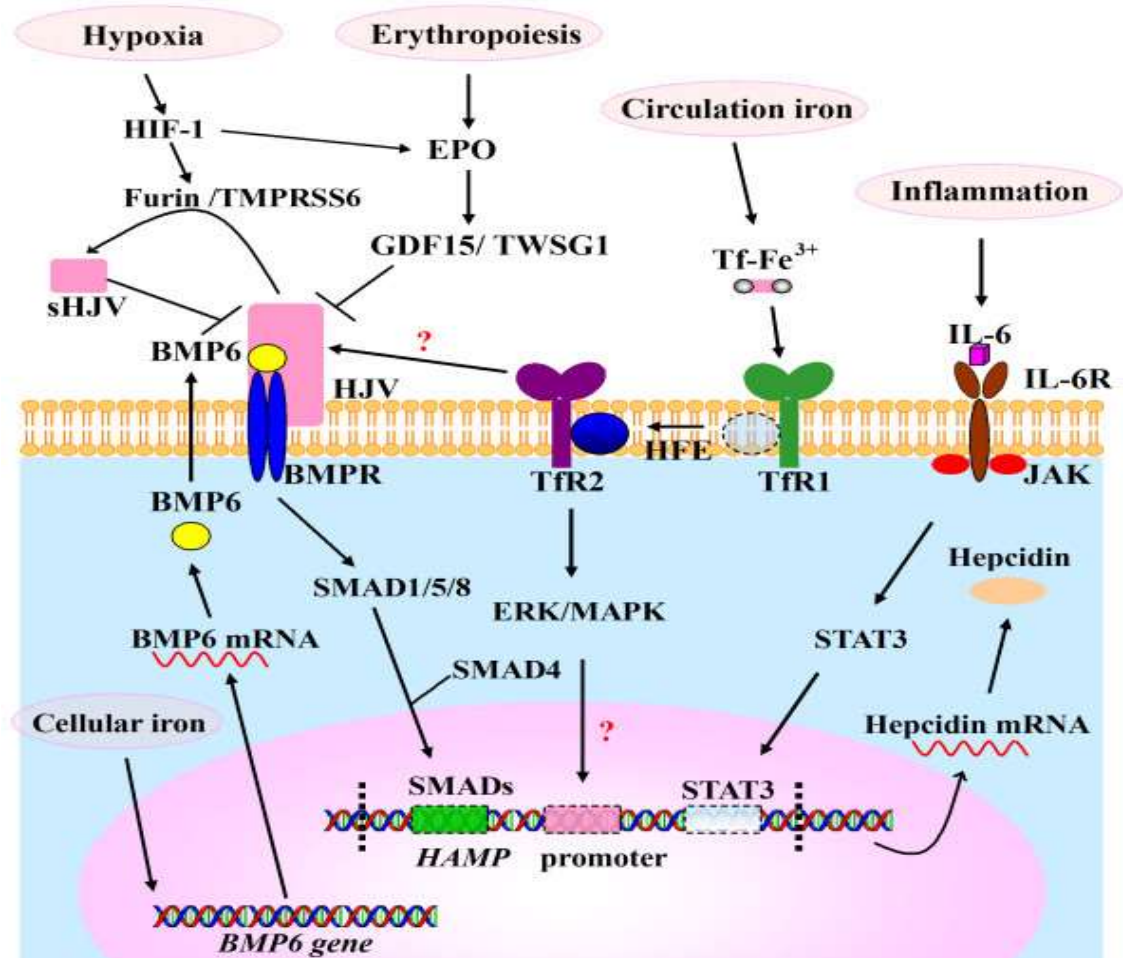


Figure 13 The main molecular mechanisms of hepcidin regulation (144).

BMP6- Bone Morphogenetic Protein 6; BMPR - Bone Morphogenetic Protein (receptor); EPO - Erythropoietin; ERK - Extracellular-Signal-Regulated Kinase; GDF-15 - Growth Differentiation Factor 15; HIF-1 - Hypoxia-inducible factor 1; (s)HJV – (soluble) hemojuvelin; JAK - Janus Kinase; IL-6(R) – interleukin-6 (receptor); MAPK - Mitogen Activated Protein Kinases; STAT3 - Signal Transducer and Activator of Transcription 3; Tf(R) – transferrin (receptor); TMPRSS6 - Transmembrane Serine Protease 6; TWSG1 - Twisted Gastrulation BMP Signalling Modulator 1.

3.4 Inflammation

Under normal conditions, inflammation is a protective response to the various damaging stimulus (such as hypoxia, infection, oxidative stress, tissue damage). However, in CKD patients, inflammation becomes maladaptive, uncontrolled, and persistent, being exacerbated in ESRD, and particularly, in haemodialysis patients.

The persistent inflammation in CKD has been accepted as a major contributor to the development of atherosclerotic cardiovascular disease (145), rheumatoid arthritis, osteoporosis, and it also known as a predictor of cardiovascular disease and mortality (145-147).

Inflammation in CKD is defined as the consequence of multiple factors (Figure 14) that, in long term, result in the uremic syndrome, a terminal clinical manifestation of kidney failure. Uremic syndrome produces reactive species from oxidative (148) and carbonyl stress (149), which are highly proinflammatory.

In spite of the contribution of the decreased renal clearance for the higher levels of circulating cytokines, their production is also increased in CKD patients (150). Additionally, the inflammatory process may be also influenced by genetic and epigenetic conditions, intestinal dysbiosis (151), chronic and recurrent infections and obesity (Table 3) (152). As referred, inflammation leads to increased production of cytokines, such as IL-1, IL-6, TNF- α and interferon- γ (IFN- γ) that inhibit the release of iron from iron stores (through an increase in hepcidin synthesis triggered by IL-6); they also inhibit EPO production, reducing erythropoiesis and, therefore, contribute to the development and/or worsening of CKD anaemia.

Table 3 Factors that contribute to chronic inflammatory status in chronic kidney disease (145).

Factors	
Exogenous factors	Dialysis Membranes and Venous Catheters
Cellular factors	Oxidative Stress and Cellular Senescence
Tissue factors	Hypoxia, Fluid Overload and Sodium Overload
Microbial factors	Immune Dysfunction and Gut Dysbiosis
Uremic toxins	Indoxyl Sulphate, Advanced Glycation end products and Calcioprotein Particles

Uremic toxins

Uremic toxins include urea, β 2 microglobulin, p-cresol acid, and other nitrogenated products, which, in normal conditions, are filtered and excreted by the kidneys, but in CKD they accumulate in the bloodstream.

In CKD patients, a low GFR and an increase of uremic toxins concentration, lead to negative interactions with different biological functions, and can induce oxidative stress in a variety of cells, such as renal tubular cells (153, 154).

Oxidative Stress

An important factor in the pathophysiology of CKD is oxidative stress. The cause of oxidative stress is related to the fact that proximal renal tubules contain many mitochondria, and during kidney damage, free radicals and other prooxidant products are produced.

The accumulation of uremic toxins due to the loss of kidney function, the increase in the generation of mitochondrial ROS from mitochondrial dysfunction, and the consequent depletion of antioxidant defenses are the main factors responsible for oxidative stress and consequently progression of CKD contributing to pathogenesis of cardiovascular and atherosclerotic diseases in CKD (155).

As result of the oxidative process, certain biomolecules are oxidized and cause changes in its structure and function (156).

This oxidative stress can promote inflammation as a result of the direct activation of the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) signalling pathway by ROS, while the release of pro-inflammatory cytokines induces an increase in ROS generation from recruited inflammatory cells (such as phagocytes) and via the stimulation of the inducible nitric oxide synthase, thus perpetuating a vicious and deleterious cycle between oxidative stress and the inflammatory response (157) (Figure 14).

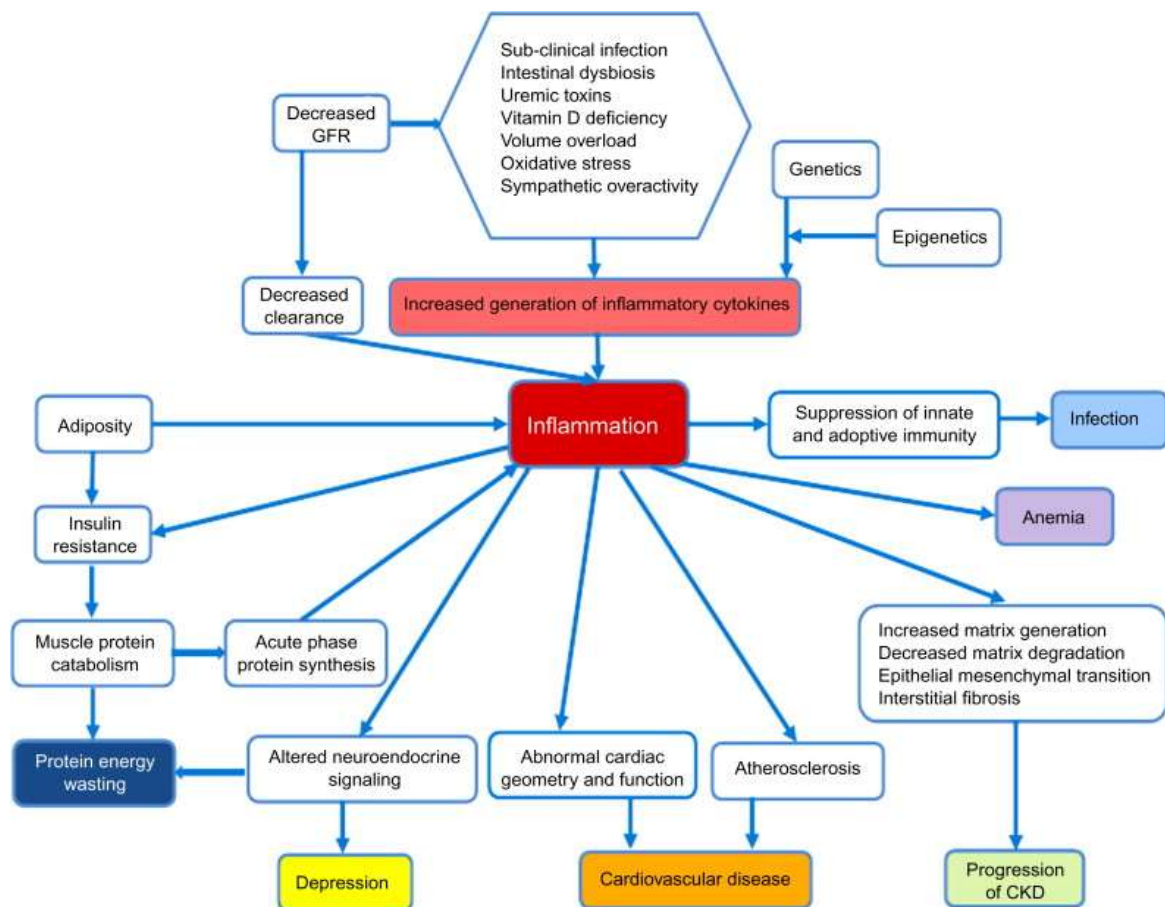


Figure 14 Causes and consequences of inflammation in chronic kidney disease (158).

CKD – Chronic Kidney Disease; GFR – Glomerular Filtration Rate.

3.4.1 Mechanism of inflammation

Inflammation is a complex process controlled by several factors. Following cellular stress, cell death, or conditions that affect cell stability, such as hypoxia or oxidative stress, signalling molecules are released, the damage-associated molecular patterns (DAMPs). DAMPs promote and exacerbate inflammatory responses through interactions with pattern recognition receptors (PRRs) (159, 160), such as Toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors (NLRs) (161, 162) and the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) (163). This interaction (DAMPs-PRRs) triggers signalling cascades downstream and leads to the production of proinflammatory cytokines, such as IL-1, IL-6, and Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (164, 165) (Figure 15).

Pattern Recognition Receptors

RAGE is a transmembrane receptor, present in cells like macrophages, natural killer (NK), and endothelial cells. RAGE interacts with numerous DAMPs, such as advanced glycation endproducts and high mobility group protein B1, an intracellular DNA-binding protein (158, 163), leading to the activation of NF- κ B and the mitogen activated protein kinases (MAPKs), which result in increased expression of pro-inflammatory cytokines (166). Some PAMPs bind to TLRs, which are capable to stimulate and intensify the inflammatory response by increasing the activation of NF- κ B (167). Another PRR is the triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1), which is a regulator of inflammatory responses acting synergistically with the TLR signalling pathway (168). TREM-1 is mostly found in myeloid cells, such as monocytes, macrophages, and granulocytes such as neutrophils (169).

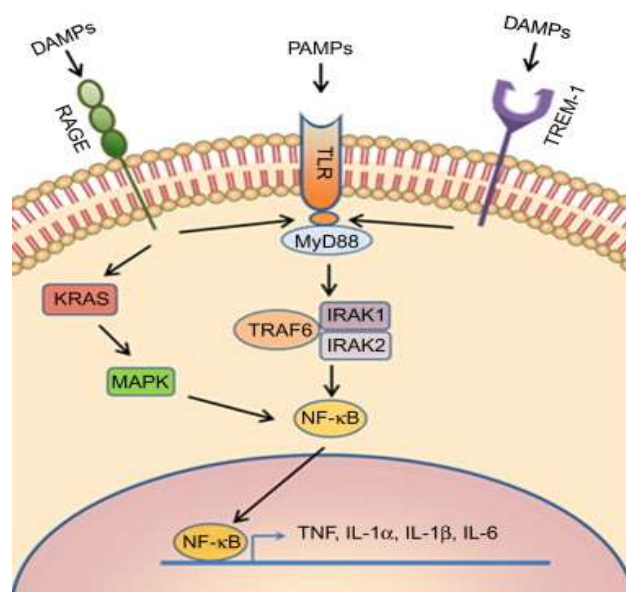


Figure 15 Inflammation mechanism by Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) (156).

Interleukin ; IRAK -IL-1 receptor-associated kinase; KRAS - Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; MAPK - Mitogen Activated Protein Kinases; MyD88 - myeloid differentiation primary response 88 protein; NF-κB - Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; PAMPs - Pathogen associated molecular patterns; RAGE - Receptor for Advanced Glycation End Products; TLR - Toll-like Receptor; TNF - Tumour Necrosis Factor; TRAF6 - TNF Receptor Associated Factor 6; TREM-1 - Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells.

3.4.2 Markers of inflammation in CKD

CKD is associated with higher levels of inflammatory mediators, which are important contributing factors to the development or worsening of anaemia, and may favour EPO resistance in case of recombinant human EPO (rhEPO) treatment of CKD anaemia (170, 171); they may also contribute to decrease EPO production (172), and to increase the production of hepcidin (125). Inflammation contributes to CKD anaemia through several ways. It can directly inhibit erythropoiesis, due to the inhibitory effect of IL-6, IL-1, TNF-α and IFN-γ (173-176). Several studies have showed that ESRD patients have an exacerbated inflammatory response, presenting high levels of inflammatory markers, namely, C Reactive Protein (CRP), IL-1, IL-6 and TNF-α (146, 177-179). These increased levels of inflammatory markers have been associated with reduced survival in these patients.

CRP

CRP is an acute-phase inflammatory protein, a member of the pentraxin family, and the prototypical biomarker of inflammation in CKD. In CKD patients, CRP was also associated to atherosclerotic cardiovascular disease, and has been proposed as a predictor of CKD evolution and mortality risk (180-182). Under the stimulus of inflammatory cytokines, particularly IL-6, CRP is produced by hepatocytes, rising in about 2 to 8 hours after the injury, reaching a peak around 48 hours later (183, 184).

CRP has a suitable profile, for monitorization of the inflammatory status, namely stability over time and absence of circadian variation; thus, the most measured inflammatory marker in patients with CKD (184).

TNF-α

TNF-α is a transmembrane protein, with pro-inflammatory activity, which was initially linked with the killing of tumoral cells (184). TNF-α has an important role in the inflammatory response, and it is one of the cytokines involved in the acute phase reaction. TNF-α is mainly produced by macrophages and monocytes (185), although it can be also

synthesized by lymphocytes, neutrophils, adipocytes, among others (184, 186) . This cytokine promotes immune kidney damage and participates in T cell activation. TNF- α is involved in several biological functions (such as lipid metabolism, coagulation), however, its crucial role is centred in the innate and adaptive immunity and apoptotic processes (187). The release of TNF- α increases significantly in response to lipopolysaccharide (188), other bacterial products, and IL-1, which leads to a rapid immune reaction (189). This release is primarily protective, however, when exacerbated, TNF- α can be deleterious (128, 190, 191). It was also shown that anaemia of chronic diseases is linked to TNF- α increase, because this cytokine inhibits erythropoiesis (192).

IL-1

The cytokine IL-1 has important biological functions related to the inflammatory response, to cell growth and tissue repair (193). (194).

IL-1 is synthesized by several cell types, including macrophages, monocytes, neutrophils, B and T lymphocytes (195).

Together, IL-1 and TNF- α , can inhibit EPO expression *in vitro* (172). This seems to be due to the cytokine-mediated formation of ROS, which affects the affinities of transcription factors and damages REPCs (172), which could result in anaemia.

IL-6

IL-6 is a signalling molecule, produced in response to certain stimulus, such as LPS, IL-1, TNF- α , ROS, infections, and tissue injury. The release of IL-6 contributes to the defence of the host by promoting acute phase responses (by increasing synthesis of CRP), haematopoiesis and immunological reactions (196).

IL-6 is produced by macrophages, monocytes, mesothelial cells, fibroblasts, adipocytes, and lymphocytes, among others (184).

The high plasma level of IL-6 commonly observed in patients with CKD is related to oxidative stress, chronic inflammation and to decreased GFR (197). In patients with ESRD, haemodialysis further leads to an increase in inflammatory responses and, consequently, an increased production of IL-6 (198, 199).

In addition, the increase in IL-6 leads to exacerbation of inflammation, as well as complications such as cardiovascular diseases (200).

IFN- γ

IFN- γ , another pro-inflammatory cytokine, has an important role in innate and adaptive immunity (201). It is typically secreted by activated T cells and NK cells and can promote the activation of macrophages during an immune response (201, 202).

Studies have shown that an increase in IFN- γ inhibits erythropoiesis by decreasing EPO production and increasing iron absorption. This is due to the ability of IFN- γ to upregulate the expression of the divalent metal transporter 1 (203), which increases the iron uptake in enterocytes and monocytes or macrophages, causing iron retention (201).

3.4.3 Anaemia of Chronic Disease

Anaemia of Chronic Disease (ACD) has a multifactorial etiology, and is prevalent in several chronic disorders, such as heart disease and CKD, in which there is an increase of pro-inflammatory cytokines. It is, usually, a normocytic normochromic anaemia, showing low/normal serum iron concentrations and normal ferritin levels.

Following specific chronic stimuli, an increase in pro-inflammatory cytokines occurs. These cytokines induce deregulation of iron homeostasis, of erythroid progenitor cells differentiation, of EPO synthesis and of RBC longevity, culminating in the development of anaemia (204). The central cause of ACD is the increased levels of hepcidin in the circulation (199), however, other factors may be involved, depending on each patient and subjacent disease.

CKD patients usually suffer from a chronic inflammatory state, and although anaemia of CKD is mostly attributed to EPO deficiency (loss of renal function), the accumulation of evidence favours a more complex pathogenesis, involving other factors, such as oxidative stress, hypoxia and increased production of cytokines (205, 206).

For an adequate erythropoiesis, a coordination of iron availability and cell proliferation is necessary in the successive stages of maturation.

However, in inflammatory states, this coordination does not work, due to increased hepcidin production promoted by IL-6 that degrades ferroportin, required for the efflux of iron. Iron is then retained in enterocytes and macrophages, leading to functional iron deficiency, which in turn disrupts iron metabolism. Therefore, inflammation compromises the synthesis of haem and, consequently, impairs erythropoiesis (207, 208).

On the other hand, TNF- α and IL-1 may inhibit EPO production, whereas TNF- α , INF- γ and IL-6 may directly suppress the erythroid progenitor cell proliferation (172, 209) (Figure 16).

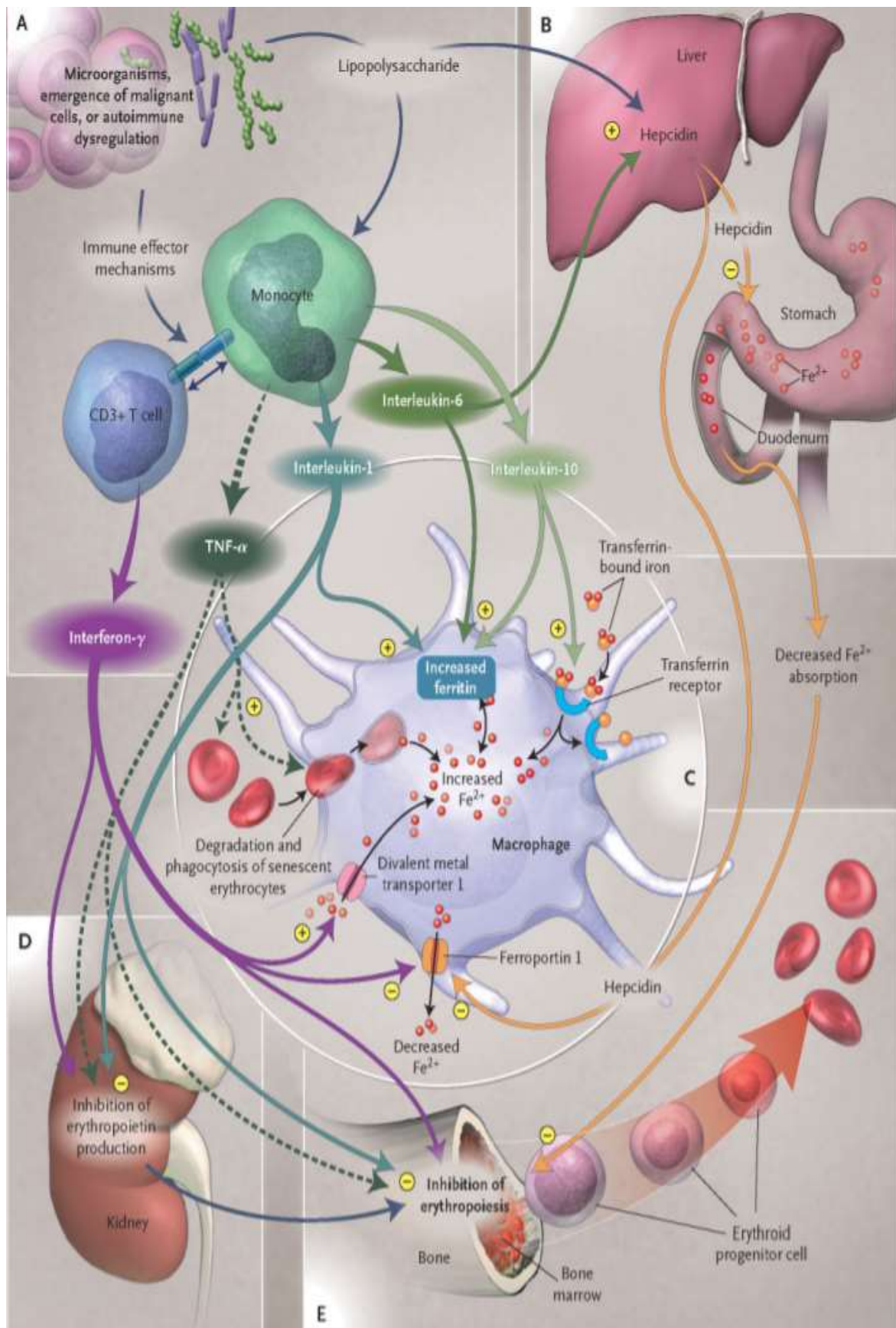


Figure 16 Pathophysiological mechanisms underlying anaemia of chronic disease (210).

4. Treatment

As kidney function decreases, CKD becomes more severe, leading to the development of anaemia that worsens with renal failure. In CKD patients, the development of anaemia may occur in stages 2 and 3, is common in stage 4 and always present in end stage renal disease, and particularly enhanced in patients on dialysis (211). The major cause of CKD anaemia is the deficit in EPO, although several other factors may contribute to its development/worsening, like uremic toxins and pro-inflammatory cytokines. Although anaemia management in CKD patients may slow its progression to ESRD, therapeutic approaches that target anaemia remain limited. Before 1989, anaemia treatment consisted of iron supplements and blood transfusions. As this therapy could lead to some complications, such as iron overload that could favour infections, and allosensitization, further investigations were carried out. Thus, in 1989, the first erythropoiesis stimulating agent (ESA), epoetin, was approved (212), followed by other analogues. However, several studies showed that the use of high ESAs doses appeared to have serious negative consequences, such as an increased risk for cardiovascular events. KDIGO 2012 guidelines refer that ESAs are given only when all causes of anaemia, such iron deficiency and inflammatory states have been corrected (12).

According to the guidelines, adults receive iron supplementation when TSAT is $\leq 30\%$ and ferritin ≤ 500 ng/mL, however, children receive iron supplementation when TSAT is $\leq 20\%$ and ferritin ≤ 100 ng/mL (12).

ESAs should be administered only after reaching an adequate iron level and only when Hb levels are $< 9,0$ g / dL, with a target $< 11,5$ g / dL (12).

Current treatment of CKD anaemia (stages 4, 5 and ESRD patients) consists of a combination of an injectable ESAs with oral or intravenous (IV) iron supplementation, depending on the state of each patient (Figure 17). About 5-10% CKD patients do not respond to treatment with ESA which results in the development of resistance. These patients are referred to as ESA hyporesponders which is an unfavourable prognostic factor. The inability to reach the adequate Hb value and the administration of higher doses of ESA (without exceeding 50% of the base value of rhEPO dose), are associated with increased risks and therefore it is necessary to develop new alternatives for the treatment of anaemia in the CKD. More recently, due to the need of others treatment strategies, new therapies have been developed (212). For example, hypoxia-inducible factor prolyl-hydroxylase domain inhibitors (HIF-PHI) are a new therapeutic intervention for the management of CKD anaemia (213, 214).

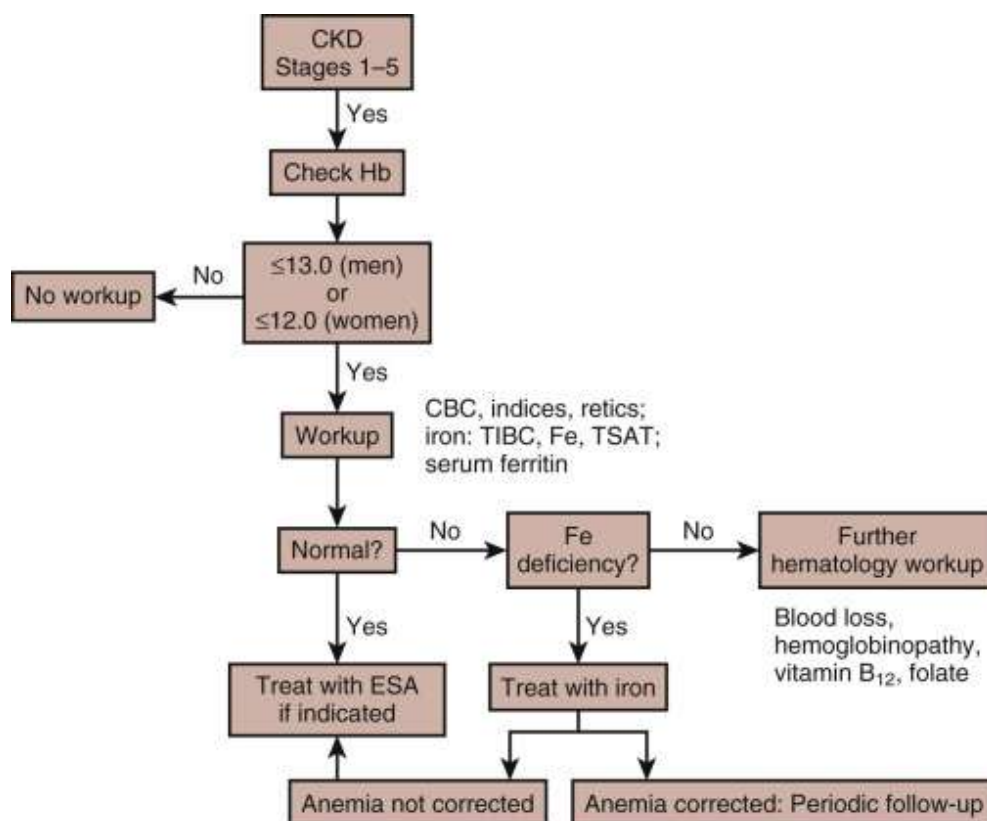


Figure 17 Flow chart for treatment patient with chronic kidney disease anaemia (215).

CBC - Complete Blood Count; CKD - Chronic Kidney Disease; Hb - Haemoglobin; ESA - Erythropoiesis Stimulating Agent; TIBC - Total Iron-Binding Capacity; TSAT - Transferrin Saturation.

4.1 Erythropoiesis-stimulating agents

ESAs are defined as a heterogeneous class of drugs that stimulate erythropoiesis through stimulation of the EPOR (216). With the advent of recombinant EPO, RBC transfusions were reduced. In fact, ESAs are the primary treatment of anaemia in CKD. Clinical practice guidelines from KDIGO (2012), recommends keeping target goals for haemoglobin levels at 11-12 g/dL (12).

Administration of ESAs such as epoetin alfa and epoetin beta (first-generation), or darbepoetin (second-generation) is the standard treatment for patients with renal anaemia (217, 218).

Although ESAs are effective, they have side effects, such as the increase in cardiovascular and thrombotic risk, especially in hyporesponsive patients (219, 220), requiring higher doses of ESAs to achieve correction of the anaemia. To overcome these and other side effects of ESAs (Table 4), new drugs are under development.

Table 4 Main available ESAs and respective side effects.

ESA	Administration route	Side Effects
First Generation		
Epoetin-alfa/beta	Subcutaneous or IV	Blurred vision, myalgia, breathlessness, and fever
Second generation		
Darbepoetin-alfa	Subcutaneous or IV	Increase risk of cardiovascular problems
Third Generation		
CERA (Continuous erythropoietin receptor activator)	Subcutaneous (ND) or IV (D)	Hypertension, diarrhoea, and headache

4.2 Iron supplements

CKD patients undergoing ESA therapy, usually require iron supplements to overcome absolute or functional iron deficiencies. Iron supplementation is important to ensure that erythropoiesis occurs effectively in case of a reduced iron mobilization from iron stores, due to the underlying inflammatory state; and, to treat an absolute iron deficiency (221, 222). Iron supplementation can be administered orally or intravenously. Oral iron forms are less expensive, however, IV iron is more effective, as it gives a faster response and is better tolerated (223). Various iron salts are available for oral intake, as listed in Table 5. Ferrous sulfate, which provides 65 mg of elemental iron per 200 mg, is the most widely used. The main disadvantages of oral iron preparations are their side effects, low adhesion and limited absorption by the intestine (224). Various IV iron preparations are available (Table 5). IV iron makes iron available more quickly as it does not pass through the intestinal barrier, although it requires greater clinical supervision (224). IV iron is usually administered to ESRD on dialysis, before ESAs therapy. Intramuscular preparations are the less used. To avoid iron overload and its adverse effects, serum iron markers should be monitored.

Table 5 Oral and parenteral preparations from iron (224).

Oral Preparations	Intravenous Preparations	Intramuscular Preparations
Ferrous Sulfate	Iron dextran	Iron Sorbitol Citrate
Ferrous Fumarate	Iron dextrin	
Ferrous Gluconate	Iron Hidroxysaccharate	
Ferrous Succinate	Iron Sodium Gluconate	
Iron polymaltose		
Polysaccharide-iron complex		

4.3 New target drugs under development

Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitors

HIF-PHI or HIF stabilizers can cause an increase in the production of endogenous EPO and, indirectly, reduce serum levels of hepcidin, representing a potential new therapeutic intervention in the treatment of anaemia.

HIF-PHI inhibit the action of the PHD enzymes by binding to their active site, mimicking hypoxic conditions; thus, the HIF α subunit is not degraded, activating the HIF system. There are currently four HIF-PHI that are in clinical trials (roxadustat, daprodustat, vadadustat and molidustat) (Table 6). HIF-PHI are administered *per os*, unlike ESAs, which are administered via IV or subcutaneously.

Oral HIF-PHI such as roxadustat (FG-4592) and vadadustat (AKB-6548), have been tested and shown positive results in CKD (dialysis and nondialysis) patients (225-227). Daprodustat and molidustat are also in experimental development.

Table 6 Characteristics of HIF-PH inhibitors under development (216).

Generic Name	Investigational Name	Sponsor	Half-Life, h	Dosing Frequency	Investigational Status
Roxadustat	FG-4592	FibroGen, Astellas, & AstraZeneca	12-13	3 $\times$ /week	Phase III
Vadadustat	AKB-6548	Akebia	4.5	Daily	Phase III
Daprodustat	GSK-1278863	GlaxoSmithKline	4	Daily	Phase II (US) Phase III (Japan)
Molidustat	BAY 85-3934	Bayer	NA	Daily	Phase II

Roxadustat

A phase IIa study tested the effectiveness of the response (haemoglobin variation) and the safety of roxadustat in individuals with CKD not dependent on dialysis (NDD-CKD) (226). This study included 116 NDD-CKD individuals with Hb $\leq$ 11,0 g/dL. The 116 individuals were divided into different groups, treated with different doses of roxadustat (0,7; 1,0; 1,5 and 2,0 mg/Kg), and the placebo group. Roxadustat transiently and moderately increased endogenous EPO and reduced hepcidin levels. Adverse events were similar in the roxadustat and placebo groups (226).

A phase III study was conducted on 305 patients undergoing long-term dialysis. The effects of roxadustat and epoetin alfa were compared (204 in the roxadustat group and 101 in the

epoetin alfa group) (228).Roxadustat increased the Tf level and maintained the serum iron concentration. At week 27 of treatment, the decrease in total cholesterol was greater with roxadustat than with epoetin alfa, as well as the decrease in low-density lipoprotein cholesterol. Roxadustat was associated with an average hepcidin reduction of 30,2 ng/mL compared to 2,3 ng/mL in the epoetin alfa group. Hyperkalaemia and upper respiratory infection occurred more frequently in the roxadustat group, and hypertension occurred more frequently in the epoetin alfa group.

More recently, in a phase III trial, 154 anaemic patients with CKD were randomly assigned. All patients had a Hb level of 7,0 – 10,0 g/dL at baseline (229). These patients were administrated with roxadustat or placebo three times a week, for 8 weeks. Patients treated with roxadustat had a higher mean Hb level than those in the placebo group, after 8 weeks. During the 18-week open-label phase of the trial, roxadustat was associated with continued efficacy. Other findings included a reduction in hepcidin levels and stable iron indices (despite restricted IV iron supplementation) (229).In summary, Roxadustat, developed by FibroGen/Astellas/AstraZeneca, is currently in phase III of clinical trials. The studies have shown that administration of roxadustat promotes erythropoiesis, increasing RBC production and maintaining plasma levels of EPO within or near the normal range in CKD (dialysis and nondialysis) patients, even in the presence of inflammation, and without requiring supplementary intravenous iron (225, 226, 230, 231).

Vadadustat

Akebia is currently developing AKB-6548, which is directed to treat anaemia in CKD stages 3 and 4.

In a phase IIb trial, vadadustat demonstrated a significant improvement in Hb levels, compared with placebo, in 138 patients with CKD-NDD (stages 3–5) for 20 weeks; an increase in reticulocytes and total iron-binding capacity, as well as a decrease in hepcidin and ferritin concentration, were also observed (232).

Daprodustat

Two phase IIa studies were conducted to analyse the relationship between the dose of GSK 1278863 (0,5; 2 or 5 mg) and the Hb increase, in patients with CKD anaemia without dialysis and on dialysis (233). In CKD-NDD patients, GSK1278863 produced dose-dependent effects on Hb levels, with the highest dose resulting in an average increase of 1 g/dL at week 4. In dialysis patients, treatment with GSK1278863 maintained the mean Hb

concentrations after the exchange of recombinant human erythropoietin. In both studies, the effects on Hb occurred with elevations of endogenous EPO and without clinically significant elevations in plasma concentrations of VEGF (233).

5. Conclusions

The kidneys are potent chemical factories that remove waste products from the organism, release hormones that regulate blood pressure and control the production of RBCs. However, in CKD these functions are decreased or even lost, due to kidney damage. Consequently, accumulation of waste products occurs, RBC levels decrease, and ROS and uremic toxins accumulate. The accumulation of waste products is responsible for inflammation and oxidative stress. Renal dysfunction result in EPO decrease and the bone marrow produces fewer RBCs, causing anaemia. Anaemia is a common problem for CKD patients, and its presence is associated with an increased risk of morbidity and mortality. Additionally, the inflammatory state, present in CKD patients at all stages, leads to the release of ROS and cytokines that contribute to oxidative stress and to inhibitory effects on EPO production, respectively. These cytokines also interfere with iron absorption and inhibits the release of iron from iron stores, further aggravating the anaemia. CKD patients, due loss of renal mass or function, have an EPO production reduced, which is reflected in a decrease in RBC production. The kidney is particularly vulnerable to reductions in oxygen tension, triggering adaptive mechanisms to hypoxia; the mechanism controlled by HIF system appears to be effective when the periods of hypoxia are short; when hypoxia persists, these mechanisms lead to other adaptive responses, such as recruitment of inflammatory cells, with production and secretion of inflammatory factors, renal fibrosis, further aggravating hypoxia. In general, HIF-1 α manages the initial adaptation of the hypoxia process, while HIF-2 α expression starts after prolonged hypoxia conditions. Both HIFs lead to the expression of a variety of adaptive genes important in anaemia response. There are several response mechanisms related to hypoxia and inflammation in kidney disease. Many mechanisms have been exhaustively studied, while others are still under study. Knowledge of these mechanisms may be the key to the development of better treatments. It is known that inflammation and hypoxia play a very important role in CKD anaemia, and, therefore, can be targeted to delay CKD progression. Therefore, understanding the cellular and molecular mechanisms involved in CKD anaemia may be important for the development of new drugs, improving treatment efficacy and reducing side effects.

6. Bibliographic Reference

1. Eckardt KU, Coresh J, Devuyst O, Johnson RJ, Kottgen A, Levey AS, et al. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet*. 2013;382(9887):158-69.
2. Chapter 1: Definition and classification of CKD. *Kidney Int Suppl* (2011). 2013;3(1):19-62.
3. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet*. 2017;389(10075):1238-52.
4. Babitt JL, Lin HY. Mechanisms of anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(10):1631-4.
5. Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS. Assessing kidney function--measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med*. 2006;354(23):2473-83.
6. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1459-544.
7. Roth GA, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1736-88.
8. Hannedouche T, Fouque D, Joly D. Complications métaboliques en insuffisance rénale chronique : hyperphosphatémie, hyperkaliémie et anémie. *Néphrologie & Thérapeutique*. 2018;14(6):6S17-6S25.
9. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*. 2002;39(2 Suppl 1):S1-266.
10. Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M, et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells. *Faseb j*. 2004;18(12):1462-4.
11. Romagnani P, Remuzzi G, Glasscock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, et al. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17088.
12. Kidney Disease: Improving Global O. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. New York, NY: Nature Publ. Group; 2013.
13. Zeeuw D, Hillege HL, de Jong PE. The kidney, a cardiovascular risk marker, and a new target for therapy. *Kidney Int Suppl*. 2005(98):S25-9.
14. Chen J, Wildman RP, Gu D, Kusek JW, Spruill M, Reynolds K, et al. Prevalence of decreased kidney function in Chinese adults aged 35 to 74 years. *Kidney Int*. 2005;68(6):2837-45.

15. Hallan SI, Coresh J, Astor BC, Asberg A, Powe NR, Romundstad S, et al. International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(8):2275-84.
16. Chadban SJ, Briganti EM, Kerr PG, Dunstan DW, Welborn TA, Zimmet PZ, et al. Prevalence of kidney damage in Australian adults: The AusDiab kidney study. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(7 Suppl 2):S131-8.
17. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *Jama*. 2007;298(17):2038-47.
18. Aeddula NR BK. Sick Cell Nephropathy StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): June 24, 2019.
19. Braun L, Sood V, Hogue S, Lieberman B, Copley-Merriman C. High burden and unmet patient needs in chronic kidney disease. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2012;5:151-63.
20. Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt KU, et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int*. 2007;72(3):247-59.
21. White SL, Chadban SJ, Jan S, Chapman JR, Cass A. How can we achieve global equity in provision of renal replacement therapy? *Bull World Health Organ*. 2008;86(3):229-37.
22. Jha V. Current status of chronic kidney disease care in southeast Asia. *Semin Nephrol*. 2009;29(5):487-96.
23. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013;382(9888):260-72.
24. (IHME) IfHMaE. Portugal Seattle, WA: University of Washington; 2018 [Available from: <http://www.healthdata.org/Portugal>].
25. Kramer A, Pippias M, Stel VS, Bonthuis M, Abad Diez JM, Afentakis N, et al. Renal replacement therapy in Europe: a summary of the 2013 ERA-EDTA Registry Annual Report with a focus on diabetes mellitus. *Clin Kidney J*. 2016;9(3):457-69.
26. Matovinović MS. 1. Pathophysiology and Classification of Kidney Diseases. *EJIFCC*. 2009;20(1):2-11.
27. Schnaper HW. Remnant nephron physiology and the progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2014;29(2):193-202.
28. Schnaper HW. The Tubulointerstitial Pathophysiology of Progressive Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2017;24(2):107-16.
29. Kaissling B, Lehir M, Kriz W. Renal epithelial injury and fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(7):931-9.

30. Peired A, Angelotti ML, Ronconi E, la Marca G, Mazzinghi B, Sisti A, et al. Proteinuria impairs podocyte regeneration by sequestering retinoic acid. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(11):1756-68.
31. Yamaguchi J, Tanaka T, Nangaku M. Recent advances in understanding of chronic kidney disease. *F1000Research*. 2015;4.
32. Kerri L. Cavanaugh TAl. Chronic Kidney Disease. Andreoli and Carpenter's Cecil Essentials of Medicine: Elsevier; 2016.
33. Singh AK. Erythropoiesis. *Textbook of Nephro-Endocrinology* 2018. p. 207-15.
34. Hedley BD, Allan AL, Xenocostas A. The role of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents in tumor progression. *Clin Cancer Res*. 2011;17(20):6373-80.
35. Burda P, Laslo P, Stopka T. The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis. *Leukemia*. 2010;24(7):1249-57.
36. Frontelo P, Manwani D, Galdass M, Karsunky H, Lohmann F, Gallagher PG, et al. Novel role for EKLF in megakaryocyte lineage commitment. *Blood*. 2007;110(12):3871-80.
37. Koury MJ, Sawyer ST, Brandt SJ. New insights into erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2002;9(2):93-100.
38. Gregory CJ, Eaves AC. Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. *Blood*. 1977;49(6):855-64.
39. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*. 1995;83(1):59-67.
40. Koury MJ, Haase VH. Anaemia in kidney disease: harnessing hypoxia responses for therapy. *Nat Rev Nephrol* 2015;11(7):394-410.
41. Haase VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;299(1):F1-13.
42. Yoon D, Ponka P, Prchal JT. Hypoxia. 5. Hypoxia and hematopoiesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;300(6):C1215-22.
43. Sawyer ST, Krantz SB, Goldwasser E. Binding and receptor-mediated endocytosis of erythropoietin in Friend virus-infected erythroid cells. *J Biol Chem*. 1987;262(12):5554-62.
44. Gross AW, Lodish HF. Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *J Biol Chem*. 2006;281(4):2024-32.
45. Chapel S, Veng-Pedersen P, Hohl RJ, Schmidt RL, McGuire EM, Widness JA. Changes in erythropoietin pharmacokinetics following busulfan-induced bone marrow ablation in sheep: evidence for bone marrow as a major erythropoietin elimination pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;298(2):820-4.

46. Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell*. 2001;8(6):1327-38.
47. Narhi LO, Aoki KH, Philo JS, Arakawa T. Changes in conformation and stability upon formation of complexes of erythropoietin (EPO) and soluble EPO receptor. *J Protein Chem*. 1997;16(3):213-25.
48. Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science*. 1999;283(5404):990-3.
49. Lu X, Gross AW, Lodish HF. Active conformation of the erythropoietin receptor: random and cysteine-scanning mutagenesis of the extracellular juxtamembrane and transmembrane domains. *J Biol Chem*. 2006;281(11):7002-11.
50. Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol*. 2005;15(3):146-55.
51. Elliott S, Sinclair AM. The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. *Biologics*. 2012;6:163-89.
52. Sawyer ST, Penta K. Association of JAK2 and STAT5 with erythropoietin receptors. Role of receptor phosphorylation in erythropoietin signal transduction. *J Biol Chem*. 1996;271(50):32430-7.
53. Silva M, Benito A, Sanz C, Prosper F, Ekhterae D, Nunez G, et al. Erythropoietin Can Induce the Expression of Bcl-xL through Stat5 in Erythropoietin-dependent Progenitor Cell Lines. *J Biol Chem*. 1999;274:22165-9.
54. Chen C, Sytkowski AJ. Erythropoietin activates two distinct signaling pathways required for the initiation and the elongation of c-myc. *J Biol Chem*. 2001;276(42):38518-26.
55. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation. *Science*. 1998;282(5392):1318.
56. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell*. 1999;96(6):857-68.
57. Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Nicholls LG, Tan CC, et al. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int*. 1993;44(5):1149-62.
58. Asada N, Takase M, Nakamura J, Oguchi A, Asada M, Suzuki N, et al. Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3981-90.

59. Pan X, Suzuki N, Hirano I, Yamazaki S, Minegishi N, Yamamoto M. Isolation and characterization of renal erythropoietin-producing cells from genetically produced anemia mice. *PLoS One*. 2011;6(10):e25839.
60. Nagai T, Yasuoka Y, Izumi Y, Horikawa K, Kimura M, Nakayama Y, et al. Reevaluation of erythropoietin production by the nephron. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;449(2):222-8.
61. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood*. 1988;71(2):524-7.
62. Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S, Yamamoto M. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood*. 2008;111(10):5223-32.
63. Souma T, Yamazaki S, Moriguchi T, Suzuki N, Hirano I, Pan X, et al. Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(10):1599-616.
64. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev*. 2013;27(1):41-53.
65. Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG, Johnson MH, Ratcliffe PJ. The interstitial response to renal injury: fibroblast-like cells show phenotypic changes and have reduced potential for erythropoietin gene expression. *Kidney Int*. 1997;52(3):715-24.
66. Schödel J, Ratcliffe PJ. Mechanisms of hypoxia signalling: new implications for nephrology. *Nat Rev Neph*. 2019;15(10):641-59.
67. Eckardt K-U, Bernhardt WW, Weidemann A, Warnecke C, Rosenberger C, Wiesener MM, et al. Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Kidney Int*. 2005;68:S46-S51.
68. Tanaka T. Expanding roles of the hypoxia-response network in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2016;20(6):835-44.
69. Fu Q, Colgan SP, Shelley CS. Hypoxia: The Force that Drives Chronic Kidney Disease. *Clin Med Res*. 2016;14(1):15-39.
70. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2007;117(12):3810-20.
71. Hirakawa Y, Tanaka T, Nangaku M. Renal Hypoxia in CKD; Pathophysiology and Detecting Methods. *Front Physiol*. 2017;8(99).
72. Leonard MO, Cottell DC, Godson C, Brady HR, Taylor CT. The role of HIF-1 alpha in transcriptional regulation of the proximal tubular epithelial cell response to hypoxia. *J Biol Chem*. 2003;278(41):40296-304.
73. Nangaku M, Eckardt KU. Hypoxia and the HIF system in kidney disease. *J Mol Med (Berl)*. 2007;85(12):1325-30.

74. Chen HH, Chen TW, Lin H. Pravastatin attenuates carboplatin-induced nephrotoxicity in rodents via peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated heme oxygenase-1. *Mol Pharmacol*. 2010;78(1):36-45.
75. Park SK, Dadak AM, Haase VH, Fontana L, Giaccia AJ, Johnson RS. Hypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha): role of cytoplasmic trapping of HIF-2alpha. *Mol Cell Biol*. 2003;23(14):4959-71.
76. Cummins EP, Taylor CT. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch*. 2005;450(6):363-71.
77. Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(2):189-204.
78. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999;15:551-78.
79. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*. 2005;2005(306):re12.
80. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5510-4.
81. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr*. 1998;7(3):205-13.
82. Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci*. 2012;37(9):364-72.
83. Bartoszewska S, Kochan K, Piotrowski A, Kamysz W, Ochocka RJ, Collawn JF, et al. The hypoxia-inducible miR-429 regulates hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human endothelial cells through a negative feedback loop. *Faseb j*. 2015;29(4):1467-79.
84. Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J, et al. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem*. 2009;284(25):16767-75.
85. Wang V, Davis DA, Haque M, Huang LE, Yarchoan R. Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha in HEK293T cells. *Cancer Res*. 2005;65(8):3299-306.
86. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol*. 2003;23(24):9361-74.
87. Grabmaier K, MC AdW, Verhaegh GW, Schalken JA, Oosterwijk E. Strict regulation of CAIX(G250/MN) by HIF-1alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2004;23(33):5624-31.

88. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2011;12(1):9-22.
89. Rosenberger C, Griethe W, Gruber G, Wiesener M, Frei U, Bachmann S, et al. Cellular responses to hypoxia after renal segmental infarction. *Kidney Int*. 2003;64(3):874-86.
90. Fujiwara S, Nakagawa K, Harada H, Nagato S, Furukawa K, Teraoka M, et al. Silencing hypoxia-inducible factor-1 α inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. *Int J Oncol*. 2007;30(4):793-802.
91. Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*. 2007;129(1):111-22.
92. Liu J, Wei Q, Guo C, Dong G, Liu Y, Tang C, et al. Hypoxia, HIF, and Associated Signaling Networks in Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5).
93. Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, Simon MC. Acute postnatal ablation of Hif-2 α results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(7):2301-6.
94. Skuli N, Liu L, Runge A, Wang T, Yuan L, Patel S, et al. Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood*. 2009;114(2):469-77.
95. Skuli N, Majmundar AJ, Krock BL, Mesquita RC, Mathew LK, Quinn ZL, et al. Endothelial HIF-2 α regulates murine pathological angiogenesis and revascularization processes. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1427-43.
96. Haase V. Hypoxia-inducible factors in the kidney. 2015.
97. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001;292(5516):468-72.
98. Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med*. 2011;365(6):537-47.
99. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *Embo j*. 2003;22(16):4082-90.
100. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*. 2001;15(20):2675-86.
101. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*. 2002;295(5556):858-61.
102. Shu S, Wang Y, Zheng M, Liu Z, Cai J, Tang C, et al. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Kidney Injury and Repair. *Cells*. 2019;8(3):207.

103. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001;294(5545):1337-40.
104. Schofield CJ, Zhang Z. Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol*. 1999;9(6):722-31.
105. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001;107(1):43-54.
106. Soilleux EJ, Turley H, Tian YM, Pugh CW, Gatter KC, Harris AL. Use of novel monoclonal antibodies to determine the expression and distribution of the hypoxia regulatory factors PHD-1, PHD-2, PHD-3 and FIH in normal and neoplastic human tissues. *Histopathology*. 2005;47(6):602-10.
107. Schödel J, Klanke B, Weidemann A, Buchholz B, Bernhardt W, Bertog M, et al. HIF-Prolyl Hydroxylases in the Rat Kidney: Physiologic Expression Patterns and Regulation in Acute Kidney Injury. *Am J Pathol*. 2009;174(5):1663-74.
108. Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*. 2004;279(37):38458-65.
109. Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, master regulators of the hypoxia response. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013;208(2):148-65.
110. Chandel NS. Detection of oxygen-sensing properties of mitochondria. *Methods Enzymol*. 2002;352:31-40.
111. Chandel NS, Schumacker PT. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol (1985)*. 2000;88(5):1880-9.
112. Chowdhury R, Flashman E, Mecinovic J, Kramer HB, Kessler BM, Frapart YM, et al. Studies on the reaction of nitric oxide with the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase domain 2 (EGLN1). *J Mol Biol*. 2011;410(2):268-79.
113. Berchner-Pfannschmidt U, Tug S, Kirsch M, Fandrey J. Oxygen-sensing under the influence of nitric oxide. *Cell Signal*. 2010;22(3):349-56.
114. Zager RA. Parenteral iron compounds: potent oxidants but mainstays of anemia management in chronic renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1 Suppl 1:S24-31.
115. Ganz T, Nemeth E. Iron Balance and the Role of Heparin in Chronic Kidney Disease. *Semin Nephrol*. 2016;36(2):87-93.
116. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*. 2010;142(1):24-38.

117. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. 1997;388(6641):482-8.
118. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*. 2001;291(5509):1755-9.
119. Munoz M, Garcia-Erce JA, Remacha AF. Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homeostasis. *J Clin Pathol*. 2011;64(4):281-6.
120. Munoz M, Villar I, Garcia-Erce JA. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol*. 2009;15(37):4617-26.
121. Barragán-Ibañez G, Santoyo-Sánchez A, Ramos-Peñafiel C. Iron deficiency anaemia. *Revista Médica Del Hospital General De México*. 2015;79:112-8.
122. Neves J, Haider T, Gassmann M, Muckenthaler M. Iron Homeostasis in the Lungs—A Balance between Health and Disease. *Pharmaceuticals*. 2019;12:5.
123. Besarab A. Anemia of renal disease in diseases of kidney and urinary tract. *Diseases of the Kidney and Urinary Tract*, 7th edn Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Company. 2001:2719-34.
124. Locatelli F, Aljama P, Barany P, Canaud B, Carrera F, Eckardt KU, et al. Revised European best practice guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19 Suppl 2:ii1-47.
125. Babitt JL, Lin HY. Molecular mechanisms of hepcidin regulation: implications for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis*. 2010;55(4):726-41.
126. Ganz T. Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:29-35, 507.
127. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science*. 2004;306(5704):2090.
128. Delaby C, Pilard N, Goncalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood*. 2005;106(12):3979-84.
129. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*. 2001;276(11):7811-9.

130. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest.* 2002;110(7):1037-44.
131. Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood.* 2006;108(12):3730-5.
132. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest.* 2004;113(9):1271-6.
133. Taes YE, Wuyts B, Boelaert JR, De Vriese AS, Delanghe JR. Prohepcidin accumulates in renal insufficiency. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(4):387-9.
134. Malyszko J, Malyszko JS, Hryszko T, Pawlak K, Mysliwiec M. Is hepcidin a link between anemia, inflammation and liver function in hemodialyzed patients? *Am J Nephrol.* 2005;25(6):586-90.
135. Costa E, Pereira BJ, Rocha-Pereira P, Rocha S, Reis F, Castro E, et al. Role of prohepcidin, inflammatory markers and iron status in resistance to rhEPO therapy in hemodialysis patients. *Am J Nephrol.* 2008;28(4):677-83.
136. Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, Higuchi M, Yamaya H, Umehara H, et al. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood.* 2006;108(4):1381-7.
137. Andrews NC. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. *J Clin Invest.* 2004;113(9):1251-3.
138. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003;374(Pt 1):1-20.
139. Carbia-Nagashima A, Arzt E. Intracellular proteins and mechanisms involved in the control of gp130/JAK/STAT cytokine signaling. *IUBMB Life.* 2004;56(2):83-8.
140. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood.* 2006;108(9):3204-9.
141. Core AB, Canali S, Babitt JL. Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis. *Fronti Pharmacol.* 2014;5(104).
142. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet.* 2006;38(5):531-9.
143. Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P, et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* 2005;2(6):399-409.
144. Kong W-N, Gao G, Chang Y-Z. Hepcidin and sports anemia. *Cell Biosci.* 2014;4:19.

145. Cobo G, Lindholm B, Stenvinkel P. Chronic inflammation in end-stage renal disease and dialysis. *Nephrol Dialysis Transplant*. 2018;33(suppl_3):iii35-iii40.
146. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulter F, Diczfalussy U, Wang T, Berglund L, et al. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int*. 1999;55(5):1899-911.
147. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1999;55(2):648-58.
148. Kim HJ, Vaziri ND. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;298(3):F662-71.
149. Aveles PR, Criminacio CR, Goncalves S, Bignelli AT, Claro LM, Siqueira SS, et al. Association between biomarkers of carbonyl stress with increased systemic inflammatory response in different stages of chronic kidney disease and after renal transplantation. *Nephron Clin Pract*. 2010;116(4):c294-9.
150. Rosengren BI, Sagstad SJ, Karlsen TV, Wiig H. Isolation of interstitial fluid and demonstration of local proinflammatory cytokine production and increased absorptive gradient in chronic peritoneal dialysis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;304(2):F198-206.
151. Evenepoel P, Poesen R, Meijers B. The gut-kidney axis. *Pediatr Nephrol*. 2017;32(11):2005-14.
152. 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. *J Immunol Res*. 2018;2018:2180373.
153. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argiles A, Baurmeister U, Brunet P, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int*. 2003;63(5):1934-43.
154. Niwa T. Uremic toxicity of indoxyl sulfate. *Nagoya J Med Sci*. 2010;72(1-2):1-11.
155. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int*. 2002;62(5):1524-38.
156. Liakopoulos V, Roumeliotis S, Gorny X, Dounousi E, Mertens PR. Oxidative Stress in Hemodialysis Patients: A Review of the Literature. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:3081856.
157. Gyurászová M, Gurecká R, Bábíčková J, Tóthová Ľ. Oxidative Stress in the Pathophysiology of Kidney Disease: Implications for Noninvasive Monitoring and Identification of Biomarkers. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:5478708.
158. Kimmel PL, Rosenberg ME. Chronic renal disease 2019.
159. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):279-89.

160. Feldman N, Rotter-Maskowitz A, Okun E. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Res Rev.* 2015;24(Pt A):29-39.
161. Schaefer L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem.* 2014;289(51):35237-45.
162. Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol.* 2008;214(2):161-78.
163. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl).* 2005;83(11):876-86.
164. Guo H, Callaway JB, Ting JPY. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 2015;21(7):677-87.
165. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 2002;10(2):417-26.
166. van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis.* 2008;11(1):91-9.
167. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290(3):C917-24.
168. Sharif O, Knapp S. From expression to signaling: roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection. *Immunobiology.* 2008;213(9-10):701-13.
169. Tammaro A, Derive M, Gibot S, Leemans JC, Florquin S, Dessing MC. TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. *Pharmacol Ther* 2017;177:81-95.
170. Kovesdy CP. How can erythropoietin-stimulating agent use be reduced in chronic dialysis patients: Can reduction of inflammation improve ESA dose response? *Semin Dial.* 2013;26(5):540-2.
171. Wagner M, Alam A, Zimmermann J, Rauh K, Koljaja-Batzner A, Raff U, et al. Endogenous erythropoietin and the association with inflammation and mortality in diabetic chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(7):1573-9.
172. Jelkmann W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J Interferon Cytokine Res.* 1998;18(8):555-9.
173. Means RT, Jr., Krantz SB. Inhibition of human erythroid colony-forming units by gamma interferon can be corrected by recombinant human erythropoietin. *Blood.* 1991;78(10):2564-7.

174. Wang CQ, Udupa KB, Lipschitz DA. Interferon-gamma exerts its negative regulatory effect primarily on the earliest stages of murine erythroid progenitor cell development. *J Cell Physiol.* 1995;162(1):134-8.
175. Rusten LS, Jacobsen SE. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha directly inhibits human erythropoiesis in vitro: role of p55 and p75 TNF receptors. *Blood.* 1995;85(4):989-96.
176. Thawani N, Tam M, Chang KH, Stevenson MM. Interferon-gamma mediates suppression of erythropoiesis but not reduced red cell survival following CpG-ODN administration in vivo. *Exp Hematol.* 2006;34(11):1451-61.
177. Stenvinkel P, Alvestrand A. Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy. *Semin Dial.* 2002;15(5):329-37.
178. Owen WF, Lowrie EG. C-reactive protein as an outcome predictor for maintenance hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1998;54(2):627-36.
179. Kimmel PL, Phillips TM, Simmens SJ, Peterson RA, Weihs KL, Alleyne S, et al. Immunologic function and survival in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1998;54(1):236-44.
180. Levin A, Djurdjev O, Beaulieu M, Er L. Variability and risk factors for kidney disease progression and death following attainment of stage 4 CKD in a referred cohort. *Am J Kidney Dis.* 2008;52(4):661-71.
181. 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.
182. Kalantar-Zadeh K. Inflammatory marker mania in chronic kidney disease: pentraxins at the crossroad of universal soldiers of inflammation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007;2(5):872-5.
183. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Fabra R, Trullenque R, Heinrich PC. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology.* 1990;12(5):1179-86.
184. Himmelfarb J, Ikizler TA. Chronic kidney disease, dialysis, and transplantation : A Companion to Brenner and Rector's The Kidney. 4 ed 2019.
185. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, et al. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature.* 1985;316(6028):552-4.
186. 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.
187. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000;118(2):503-8.
188. van der Bruggen T, Nijenhuis S, van Raaij E, Verhoef J, Sweder van Asbeck B. Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor Alpha Production by Human Monocytes Involves the Raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 Pathway. *Infect Immun.* 1999;67(8):3824.

189. Jevnikar AM, Brennan DC, Singer GG, Heng JE, Maslinski W, Wuthrich RP, et al. Stimulated kidney tubular epithelial cells express membrane associated and secreted TNF α . *Kidney Int.* 1991;40(2):203-11.
190. Knight EL, Rimm EB, Pai JK, Rexrode KM, Cannuscio CC, Manson JE, et al. Kidney dysfunction, inflammation, and coronary events: a prospective study. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(7):1897-903.
191. Pereira BJ, Shapiro L, King AJ, Falagas ME, Strom JA, Dinarello CA. Plasma levels of IL-1 beta, TNF alpha and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1994;45(3):890-6.
192. Johnson RA, Waddelow TA, Caro J, Oliff A, Roodman GD. Chronic exposure to tumor necrosis factor in vivo preferentially inhibits erythropoiesis in nude mice. *Blood.* 1989;74(1):130-8.
193. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519-50.
194. Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol.* 2016;17(8):906-13.
195. Kurt-Jones EA, Virgin HWt, Unanue ER. Relationship of macrophage Ia and membrane IL 1 expression to antigen presentation. *J Immunol.* 1985;135(6):3652-4.
196. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016295-a.
197. Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Barany P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, et al. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis.* 2003;41(6):1212-8.
198. Takahashi T, Kubota M, Nakamura T, Ebihara I, Koide H. Interleukin-6 gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients undergoing hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ren Fail.* 2000;22(3):345-54.
199. Caglar K, Peng Y, Pupim LB, Flakoll PJ, Levenhagen D, Hakim RM, et al. Inflammatory signals associated with hemodialysis. *Kidney Int.* 2002;62(4):1408-16.
200. Su H, Lei C-T, Zhang C. Interleukin-6 Signaling Pathway and Its Role in Kidney Disease: An Update. *Front Immunol.* 2017;8:405-.
201. Billiau A. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol.* 1996;62:61-130.
202. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:749-95.
203. Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood.* 2003;101(10):4148-54.
204. Weiss G, Ganz T, Goodnough LT. Anemia of inflammation. *Blood.* 2019;133(1):40-50.

205. Yu ASL, Chertow GM, Luyckx VA, Marsden PA, Skorecki K, Taal MW, et al. Classification and Management of Chronic Kidney Disease In: Elsevier, editor. Brenner & Rector's The kidney 2020. p. 1946-76.
206. Elliott J, Mishler D, Agarwal R. Hyporesponsiveness to Erythropoietin: Causes and Management. *Advances in Chronic Kidney Disease*. 2009;16(2):94-100.
207. Icardi A, Paoletti E, De Nicola L, Mazzaferro S, Russo R, Cozzolino M. Renal anaemia and EPO hyporesponsiveness associated with vitamin D deficiency: the potential role of inflammation. *Nephrol Dialysis Transplant*. 2013;28(7):1672-9.
208. Yilmaz MI, Yilmaz MI, Solak Y, Covic A, Goldsmith D, Kanbay M. Renal Anemia of Inflammation: The Name Is Self-Explanatory. *Blood Purif*. 2011;32(3):220-5.
209. Goicoechea M, Martin J, de Sequera P, 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.
210. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of Chronic Disease. *N Engl J Med*. 2005;352(10):1011-23.
211. McFarlane SI, Chen S-C, Whaley-Connell AT, Sowers JR, Vassalotti JA, Salifu MO, et al. Prevalence and Associations of Anemia of CKD: Kidney Early Evaluation Program (KEEP) and National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. *Am J Kidney Dis*. 2008;51(4):S46-S55.
212. Coyne DW, Goldsmith D, Macdougall IC. New options for the anemia of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2017;7(3):157-63.
213. Nagel S, Talbot NP, Mecinović J, Smith TG, Buchan AM, Schofield CJ. Therapeutic Manipulation of the HIF Hydroxylases. *Antioxid Redox Signal*. 2009;12(4):481-501.
214. Maxwell PH. A new approach to treating renal anaemia. *Nature Rev Nephrol*. 2019;15(12):731-2.
215. Brenner BM, Rector FC. Brenner & Rector's the kidney. Philadelphia, Pa.: Saunders; 2004.
216. Gupta N, Wish JB. Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors: Potential New Treatment for Anemia in Patients With CKD. *Am J Kidney Dis*. 2017;69(6):815-26.
217. Fishbane S, Nissenson AR. Anemia management in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2010(117):S3-9.
218. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol*. 2007;78(3):183-205.
219. Besarab A, Bolton WK, Browne JK, Egrie JC, Nissenson AR, Okamoto DM, et al. The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. *N Engl J Med*. 1998;339(9):584-90.
220. Haase VH. HIF-prolyl hydroxylases as therapeutic targets in erythropoiesis and iron metabolism. *Hemodial Int*. 2017;21 Suppl 1(Suppl 1):S110-S24.

221. Mircescu G, Garneata L, Capusa C, Ursea N. Intravenous iron supplementation for the treatment of anaemia in pre-dialyzed chronic renal failure patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(1):120-4.
222. Silverberg DS, Iaina A, Peer G, Kaplan E, Levi BA, Frank N, et al. Intravenous iron supplementation for the treatment of the anemia of moderate to severe chronic renal failure patients not receiving dialysis. *Am J Kidney Dis*. 1996;27(2):234-8.
223. Tolkien Z, Stecher L, Mander AP, Pereira DIA, Powell JJ. Ferrous Sulfate Supplementation Causes Significant Gastrointestinal Side-Effects in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One*. 2015;10(2):e0117383.
224. Macdougall IC. Strategies for iron supplementation: Oral versus intravenous. *Kidney Int*. 1999;55:S61-S6.
225. Provenzano R, Besarab A, Wright S, Dua S, Zeig S, Nguyen P, et al. Roxadustat (FG-4592) Versus Epoetin Alfa for Anemia in Patients Receiving Maintenance Hemodialysis: A Phase 2, Randomized, 6- to 19-Week, Open-Label, Active-Comparator, Dose-Ranging, Safety and Exploratory Efficacy Study. *Am J Kidney Dis*. 2016;67(6):912-24.
226. Besarab A, Provenzano R, Hertel J, Zabaneh R, Klaus SJ, Lee T, et al. Randomized placebo-controlled dose-ranging and pharmacodynamics study of roxadustat (FG-4592) to treat anemia in nondialysis-dependent chronic kidney disease (NDD-CKD) patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(10):1665-73.
227. Martin ER, Smith MT, Maroni BJ, Zuraw QC, deGoma EM. Clinical Trial of Vadadustat in Patients with Anemia Secondary to Stage 3 or 4 Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol*. 2017;45(5):380-8.
228. Chen N, Hao C, Liu B-C, Lin H, Wang C, Xing C, et al. Roxadustat Treatment for Anemia in Patients Undergoing Long-Term Dialysis. *New England Journal of Medicine*. 2019;381(11):1011-22.
229. Chen N, Hao C, Peng X, Lin H, Yin A, Hao L, et al. Roxadustat for Anemia in Patients with Kidney Disease Not Receiving Dialysis. *N Engl J Med*. 2019;381(11):1001-10.
230. Besarab A, Chernyavskaya E, Motylev I, Shutov E, Kumbar LM, Gurevich K, et al. Roxadustat (FG-4592): Correction of Anemia in Incident Dialysis Patients. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(4):1225-33.
231. Provenzano R, Besarab A, Sun CH, Diamond SA, Durham JH, Cangiano JL, et al. Oral Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitor Roxadustat (FG-4592) for the Treatment of Anemia in Patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11(6):982-91.
232. Pergola PE, Spinowitz BS, Hartman CS, Maroni BJ, Haase VH. Vadadustat, a novel oral HIF stabilizer, provides effective anemia treatment in nondialysis-dependent chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2016;90(5):1115-22.

233. Holdstock L, Meadowcroft AM, Maier R, Johnson BM, Jones D, Rastogi A, et al. Four-Week Studies of Oral Hypoxia-Inducible Factor-Prolyl Hydroxylase Inhibitor GSK1278863 for Treatment of Anemia. *Am J Kidney Dis : JASN*. 2016;27(4):1234-44.



Relatório de Estágio Curricular do
Mestrado em Análises Clínicas

Trabalho realizado no Serviço de Patologia Clínica do
Hospital das Forças Armadas - Pólo do Porto, sob orientação científica do Segundo
Sargento Pedro Martins e no Laboratório de Análises Clínicas São Lázaro sob orientação
científica do Doutor Jaime Peliteiro.

Julho de 2020

Agradecimentos

Um obrigado a todos que me apoiaram e tornaram possível a conclusão desta marcante etapa do meu percurso académico.

Ao Major José Lopes, um enorme obrigada pelo apoio incansável, pela amizade, pelo tempo dedicado e pela sua disponibilidade para comigo.

Ao Doutor Duarte Paiva, agradeço por tornar possível a realização de parte deste estágio no Laboratório de Análises Clínicas São Lázaro.

Ao meu orientador Doutor Jaime Peliteiro, um obrigado pela orientação prestada, pela formação, apoio incansável e colaboração bem como pelos conhecimentos transmitidos durante a minha passagem pelo Laboratório de Análises Clínicas São Lázaro.

Ao Major Cirne e ao Major Fidaldo, um obrigado por tudo, pelo apoio e preocupação e por tornarem possível a realização deste estágio no laboratório de Patologia Clínica do HFAR-PP.

Ao Enfermeiro Vasco, pelo aconselhamento na revisão do relatório, pela preocupação e apoio durante a minha passagem pelo HFAR – PP.

Ao Laboratório de Patologia do Hospital das Forças Armadas – Pólo do Porto pela disponibilidade em receber este estágio.

À Professora Doutora Eugénia Pinto, diretora deste curso, pela sua disponibilidade e dedicação.

À minha família, por me apoiarem sempre, em todas as minhas decisões e por acreditarem sempre em mim.

Por último, ao meu namorado, agradeço pelo apoio, dedicação, paciência, ajuda e por estar sempre presente em todas as adversidades da vida.

Índice	
Agradecimentos	ii
Índice.....	iii
Índice de Figuras.....	vi
Índice de Tabelas	ix
1.Introdução.....	1
1.1 O Hospital das Forças Armadas - Pólo do Porto	1
1.2 Serviço de Patologia Clínica	2
2.Controlo de Qualidade	3
2.1 Controlo de Qualidade Interno.....	3
2.2 Controlo de Qualidade Externo	4
3.Hematologia.....	5
3.1 Avaliação Laboratorial	5
3.2 Sysmex XT-2000i	7
3.2.1 Canal HGB	8
3.2.2 Canal RBC/PLT	8
3.2.3 Canal 4 DIFF	9
3.2.4 Canal WBC/BASO.....	11
3.2.5 Canal RET/PLT.....	11
3.3 Alterações do hemograma.....	12
3.4 Esfregaço Sanguíneo	15
3.5 Velocidade de Sedimentação.....	17
3.5.1 VES-MATIC 30.....	18
3.5.2 Avaliação Laboratorial	18
3.6 Hemóstase	20
3.6.1 Sysmex CS-2100i.....	22
4.Imunologia e Endocrinologia	26
4.1 VIDAS.....	27
4.2 IMMULITE® 2000.....	29

4.3 Avaliação Laboratorial	31
4.3.1 Serologia Infeciosa.....	31
4.3.2 Marcadores Tumoraís	32
4.3.3 Marcadores Doenças Autoimunes da Tireoide	35
4.3.4 Marcadores Cardíacos	36
4.3.5 Estudo da fertilidade e gónadas.....	38
4.3.6 Estudo da função da Glândula Tireoide e Paratireoide	40
5. Química Clínica	43
5.1 <i>Olympus AU680</i>	43
5.1.1 Avaliação Laboratorial	46
5.2 <i>MiniCap</i>	60
5.2.1 Eletroforese Capilar	60
5.2.2 Avaliação Laboratorial	62
5.3 <i>CLINITEK Novus</i> TM	63
5.3.1 Urinálise	64
5.3.2 Avaliação Laboratorial	65
6. Microbiologia.....	69
6.1 Exame Cultural.....	69
6.2 Colorações	71
6.2.1 Coloração de Gram	71
6.2.2 Coloração de Kinyoun	71
6.3 Processamento de produtos.....	72
6.3.1 Urina.....	72
6.3.2 Fezes	74
6.3.3 Exsudado vaginal/endocervical/uretral	76
6.4 VITEK® 2 Compact	78
6.5. Espermograma.....	79
6.5.1 SQA- V Gold.....	80
6.5.2 Espermocultura	80

6.6 Outros Produtos	81
7. Casos Clínicos.....	83
8. Conclusão.....	86
9.Referências bibliográficas.....	87
10.Anexos	92
Anexo I – Quadro de Inscrições no Programa Nacional de Avaliação Externa de Qualidade	92
Anexo II -Regras de consenso de Hematologia, Protocolo/Esfregaço de Sangue Periférico.....	95
Anexo III - Estabilidade de parâmetros em amostra (Immulite e VIDAS)	96

Índice de Figuras

Figura 1. Simbologia e heráldica do HFAR (2).	2
Figura 2. Analisador Automático Sysmex XT-2000i presente no setor de hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do HFAR-PP (fotografia obtida no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).	8
Figura 3. Histogramas A) B) obtidos pelo analisador automático Sysmex XT-2000i e respetivos valores obtidos C). (Dados obtidos do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).	9
Figura 4. A) Gráfico de dispersão obtido no canal DIFF, de uma amostra de um indivíduo saudável, onde é possível observar as diferentes populações leucocitárias, B) Gráfico de dispersão obtido no canal DIFF, de um indivíduo com alterações patológicas, onde se verifica leucocitose acentuada. C) Resultados e avisos obtidos referentes ao paciente B.	10
Figura 5. Gráfico de dispersão obtido no canal WBC/BASO. A branco encontram-se os basófilos e a azul os restantes leucócitos. (Fotografia obtida do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).	11
Figura 6. Gráfico de dispersão obtido no canal RET. (Fotografia obtida do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).	12
Figura 7. Representação da técnica para obter esfregaços sanguíneos.(Disponível em Esfregaço).....	16
Figura 8. Representação de um esfregaço sanguíneo e respetivas zonas, cabeça, corpo e cauda. (Disponível em Esfregaço).....	16
Figura 9. Bancada do setor de hematologia onde se realizam os esfregaços sanguíneos. (Fotografia obtida no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).....	17
Figura 10. Analisador de bancada, VES-MATIC 30, presente no laboratório de Patologia Clínica (Fotografia obtida no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).....	18
Figura 11. Modelo clássico da cascata de coagulação.	21
Figura 12. Analisador Automático Sysmex CS-2100i no Laboratório de Patologia Clínica do HFAR-PP. (Fotografia obtida no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)	22
Figura 13. Painel de resultados obtidos pelo equipamento Sysmex CS 2100i. QCCitrol – Controlo interno Nivel 2 (Dados obtidos do sistema no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)	25
Figura 14. Equipamento VIDAS no setor de Imunologia. (Fotografia obtida no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).....	27

Figura 15. Mecanismo de lavagem pela rotação do tubo a grandes velocidades e posterior adição do substrato (último tubo) levando à emissão de luz. (Disponível em Siemens - Immulite)	29
Figura 16. Boletim analítico de um homem de 80 anos diagnosticado com cancro da próstata. (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)	34
Figura 17. Boletim analítico referente a uma paciente do sexo feminino, 91anos, Doente Renal Crónica. (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)	41
Figura 18. Equipamento automático, Olympus AU680, presente no setor de Química Clínica. (Fotografia obtida no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)	43
Figura 19 Exemplo de um boletim analítico do Laboratório de Patologia Clínica com os respetivos valores de referência. (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).....	47
Figura 20. Boletim analítico de um doente renal crónico com os respetivos valores de referência. (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).	48
Figura 21. Exemplo de um boletim analítico com os respetivos valores de referência. (Doente Renal Crónico 71Anos, Homem) (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).	50
Figura 22. Exemplo de um boletim analítico com os respetivos valores de referência. (Doente Renal Crónico, 91Anos, Mulher) (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).	51
Figura 23. Exemplo de um boletim analítico com os respetivos valores de referência. (Doente Renal Crónico, 91Anos, Mulher) (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).	53
Figura 24. Exemplo de um boletim analítico com os respetivos valores de referência (Doente Renal Crónico, 71Anos, Homem) (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).	55
Figura 25. Exemplo de um boletim analítico com os respetivos valores de referência. (Doente Renal Crónico, 91Anos, Mulher) (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)	56
Figura 26. Exemplo de um boletim analítico com os respetivos valores de referência. (Doente Renal Crónico, 91Anos, Mulher) (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)	57

Figura 27. Exemplo de um boletim analítico com os respectivos valores de referência. (DRC, 91Anos, Mulher) (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)	59
Figura 28. Equipamento destinado à realização de eletroforeses, Minicap da Sebia, presente no setor de Química Clínica. (Fotografia obtida no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)	60
Figura 29. Padrão eletroforético normal e as respectivas proteínas presentes nas diferentes bandas.(Disponível em Sebia - MiniCap)	61
Figura 30 Equipamento destinado à realização da análise sumária da urina, CLINITEK Novus (à esquerda) e centrífuga destinada à obtenção do sedimento urinário (direita). (Fotografias obtidas a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)	64
Figura 31. Urocultura, cada placa contém 2 amostras diferentes de urina. No quadrante superior verificou-se o crescimento de Klebsiella spp e no quadrante inferior o crescimento de Escherichia coli. (Fotografia obtida no Serviço de Microbiologia do LACSL)	73
Figura 32. Caldo Selenito, Meio Hektoen (colônias de Salmonella), Meio SS (Colônias de Salmonella centro preto) (Fotografia obtida no Serviço de Microbiologia do LACSL)	75
Figura 33. Meio granada semeado com amostras de exsudado vaginal/perianal. No quadrante superior, com produção de pigmento, encontra-se o controle positivo e no quadrante inferior, uma amostra negativa. (Fotografia obtida no Serviço de Microbiologia do LACSL)	77
Figura 34. Equipamento VITEK® 2 Compact presente no setor de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas S. Lázaro. (Fotografia obtida no Serviço de Microbiologia do LACSL)	78
Figura 35. Equipamento destinado ao espermograma, SQA-V Gold. (Fotografia obtida no Serviço de Microbiologia do LACSL)	80
Figura 36. Resultados obtidos pelo equipamento Sysmex XT-2000i no HFAR-PP.....	83
Figura 37. Resultados obtidos pelo equipamento Sysmex XT-2000i no HFAR-PP.....	83
Figura 38. Resultados obtidos pelo equipamento Sysmex XT-2000i no HFAR-PP.....	84
Figura 39. Resultados obtidos na eletroforese de proteínas de um paciente do sexo masculino com 78anos no HFAR-PP.	85
Figura 40. Resultados obtidos pelo equipamento Clinitek Novus no HFAR-PP.	86

Índice de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros obtidos pelo Equipamento Symex XT-2000i e os respectivos valores de referência (adultos) utilizados no HFAR-PP.	6
Tabela 2. Classificação morfológica da anemia.....	13
Tabela 3. Classificação cinética das anemias	13
Tabela 4. Alteração no leucograma e respectivas causas prováveis.....	14
Tabela 5. Alteração no leucograma e respectivas causas prováveis.....	15
Tabela 6. Valores de referência para a VS utilizados no laboratório de Patologia Clínica.....	19
Tabela 7. Fatores envolvidos nas alterações da VS.....	19
Tabela 8. Classificação das fases da Hemóstase sanguínea.....	20
Tabela 9. Valores de referência para os parâmetros da Coagulação utilizados no HFAR-PP	24
Tabela 10. Parâmetros analisados pelo equipamento VIDAS no laboratório de Patologia Clínica do HFAR-PP e respectivos valores de referência.....	28
Tabela 11. Parâmetros analíticos do IMMULITE 2000 e respectivos valores de referência.....	30
Tabela 12. Parâmetros determinados pelo equipamento Olympus AU680 e o respectivo método.....	44
Tabela 13. Valores de referência das frações das proteínas séricas.....	61
Tabela 14. Principais meios de cultura utilizados no setor de microbiologia.....	70
Tabela 15. Aspetto macroscópico das colónias em Meio CLED.....	73
Tabela 16. Principais parasitas intestinais.....	76
Tabela 17. Cartas utilizadas pelo equipamento VITEK® 2 Compact realizados no laboratório.....	79
Tabela 18. Parâmetros testados no SQA- V Gold segundos critérios da 5ªEdição do manual da OMS	80

Lista de Abreviaturas

Ac - Anticorpo

ADM - Assistência na Doença aos Militares

ADP - Adenosina Difosfato

AFP - Alfafetoproteína

Ag - Antigénio

ALP - Alanina Aminotransferase

AST - Asparto Aminotransferase

ANP - Peptídeo Natriurético Atrial (Atrial Natriuretic Peptide)

ASO - Anti-Streptolisina O

ATP - Adenosina Trifosfato

BASO - Basófilos

BNP - Peptídeo Natriurético Cerebral (Brain Natriuretic Peptide)

CA 125 - Antigénio 125 do Cancro

CA 13-3 - Antigénio 13-3 do Cancro

CA 15-3 - Antigénio 15-3 do Cancro

CA 19-9 - Antigénio 19-9 do Cancro

CEA - Antigénio Carcinoembrionário

CK - Creatinaquinase

CMV - Citomegalovirus

CNP - Peptídeo Natriurético tipo C (Typ C Natriuretic Peptide)

CQE - Controlo de Qualidade Externo

CQI - Controlo de Qualidade Interno

DNA - Acido Desoxirribonucleico

DP - Desvio Padrão

E2 - Estradiol

EAM - Enfarto Agudo do Miocárdio

EDTA K3 - Ácido Etilenodiaminotetracético Tripotássio

ELFA - Enzyme-linked Fluorescent Assay

EOS - Eosinófilos

EP - Embolia Pulmonar

EPO - Eritropoietina

Fbg - Fibrinogénio

FR - Fator Reumatoide

FSC - Dispersão Frontal

FSH - Hormona Folículo Estimulante
GC - Gelose Chocolate
G-CSF - Granulocyte Colony Stimulation Factor
GGT – Gamaglutamiltransferase
GM-CSF - Granulocyte Monocyte Colony Stimulation Factor
GpIb - Glicoproteína Ib/ CD42
GS - Gelose Sangue
HBG - Hemoglobina
HCT - Hematócrito
HDL - Lipoproteína de Alta Densidade
HFAR-PP - Hospital das Forças Armadas - Pólo do Porto
HFR - Reticulócitos de Alta Fluorescência
LH - Hormona Luteinizante
HSC - Célula Tronco Hematopoiética
IC - Insuficiência Cardíaca
Ig - Imunoglobulina
INR - Razão Normalizada Internacional
INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
IPR - Índice de Produção de Reticulócitos
IRF - Fração de Reticulócitos Imaturos
ISE - Eléctrodo Seletivo de Iões
ITU - Infecção do Trato Urinário
IV - Infravermelho
LDH - Lactato Desidrogenase
LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade
LFR - Reticulócitos De Baixa Fluorescência
LYM - Linfócitos
MCH - Hemoglobina Globular Média
MCHC - Concentração De Hemoglobina Globular Média
M-CSF - Monocyte Colony Stimulation Factor
MCV - Volume Globular Médio
MFR - Reticulócitos De Média Fluorescência
MONO - Monócitos
MPV - Volume Plaquetário Médio
NEQAS - United Kingdom External Quality Assessment Schemes
NEU - Neutrófilos

NK - Células Natural Killer
IL - Interleucina
PAF - Provas de Aptidão Física
PCR - Proteína C Reativa
PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PDW - Heterogeneidade da população de plaquetas
PIN - Pacientes de Internamento
PLT - Plaquetas
PMT - Tubo Fotomultiplicador
PNAEQ - Programa Nacional de Avaliação Externa de Qualidade
PRL - Prolina
PSA - Antígeno Específico da Próstata
PST - Pacientes do Serviço de Imunohemoterapia
PSU - Pacientes do Serviço de Urgência
PTH - Paratormona
PVC - Policloreto de Vinil
PXT - Pacientes Externos
RBC - Red Blood Cell
RDW - Heterogeneidade da População de Eritrócitos
RET - Reticulócitos
RIQAS - Randox International Quality Assessment Schemes
SCA - Síndrome Coronária Aguda
SCF - Stem Cell Factor
SFL - Fluorescência Lateral
SLS - Laurilsulfato de sódio
SSC - Dispersão lateral
T4 - Tiroxina
T3 - Triiodotironina
TBG - Thyroxine-Binding Globulin
TE - Tromboembolismo
TEV - Tromboembolismo venoso
TF - Fator Tecidual
Tg - Tiroglobulina
TGF- α - Transforming Growth Factor Alpha
TIBC - Capacidade Total De Ligação Do Ferro
TnI - Troponina I

TP - Tempo de Protrombina
TPO - Trombopoietina
Trf - Transferrina
TSH - Hormona Tiroestimulante
TStat - Taxa Saturação da Transferrina
TPPA - Tempo de Tromboplastina Parcial ativado
TVP - Trombose Venosa Profunda
TxA2 - Tromboxano
UIBC - Capacidade de fixação do ferro não saturada
UV - Ultravioleta
VS - Velocidade de Sedimentação
VSG - Velocidade de Sedimentação Globular
VWF - Fator von Willerdrand
WBC - White Blood Cell

1.Introdução

O Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto disponibiliza uma formação especializada em Saúde Pública que tem como finalidade participar no diagnóstico, na evolução e prevenção das doenças bem como no auxílio da terapêutica. Este ciclo de estudos permite, portanto, um melhor entendimento do diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças, bem como um conhecimento mais profundo dos processos biológicos e fisiológicos do homem.

O Mestrado em Análises Clínicas compreende no seu plano de estudos um estágio de 450 horas que permite, para além da consolidação dos conhecimentos adquiridos, a aquisição de competências que prepara os alunos para integrar a rotina de um Laboratório de Análises Clínicas.

O Estágio iniciou a 04 de novembro de 2019 e terminou a 06 de março de 2020, este realizou-se no serviço de Patologia Clínica do Hospital das Forças Armadas – Pólo do Porto (HFAR-PP) e teve como objetivo a descrição das atividades efetuadas nas diferentes áreas analíticas do laboratório, nomeadamente, Hematologia, Química Clínica e Imunologia e Endocrinologia. A escolha deste local para a realização do estágio deveu-se ao facto de ser militar, ser a forma mais eficaz para concluir o curso, e ser a forma mais rentável para conciliar o trabalho com a vida académica.

A valência de microbiologia foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas São Lázaro (LACSL), em Braga, durante o período de 1 de Junho de 2020 a 22 de junho 2020. Ambos os laboratórios apresentam diversos sistemas automatizados que, diariamente, são calibrados e avaliados com controlos de qualidade internos que asseguram a qualidade dos resultados obtidos para as amostras. O HFAR-PP e o LACSL participam também no Programa Nacional de Avaliação Externa de Qualidade (PNAEQ), que permite avaliar o desempenho interlaboratorial com o objetivo de assegurar a comparabilidade e uniformidade dos resultados.

Pretende-se, neste relatório de estágio, apresentar toda a prática laboratorial e relacioná-la com a formação teórica que o mestrado disponibilizou. Estão descritas as atividades desenvolvidas nos vários setores, os parâmetros analisados e respetivos métodos bem como os diferentes equipamentos utilizados nos respetivos laboratórios.

1.1 O Hospital das Forças Armadas - Pólo do Porto

A construção do hospital teve origem no ano de 1862, em homenagem ao Rei D. Pedro V, sendo batizado por Hospital Rei D. Pedro V. O Hospital Militar D. Pedro V recebeu os primeiros doentes em 1869, quando apenas um terço da construção estava

concluída. Na sequência do golpe republicano de 1910, o hospital passou a designar-se por "Hospital Militar do Porto". Na sequência da reorganização do Exército de 1926, o estabelecimento passou a denominar-se Hospital da 1.^a Região Militar, com a designação de "Hospital Militar Regional N.º 1". Em 1990, em homenagem ao seu fundador, o hospital voltou a incluir o nome do Rei D. Pedro V na sua designação oficial, que passou a ser "Hospital Militar Regional N.º 1 (D. Pedro V)" (1).

No âmbito das novas leis orgânicas de Bases da Organização das Forças Armadas e do Estado-Maior General das Forças Armadas de 2009, o HFAR ficou na dependência do Chefe do Estado-Maior General das Forças Armadas e foi elegida a utilização de uma nova designação, passando de Hospital Militar Regional N.º 1 (D. Pedro V) para Hospital das Forças Armadas - Pólo do Porto (2).

O HFAR - PP é um estabelecimento hospitalar das Forças Armadas situado na Avenida da Boavista, na cidade do Porto. Este tem por missão prestar cuidados de saúde diferenciados aos militares das Forças Armadas, bem como à família militar e aos deficientes das Forças Armadas, podendo, na sequência de acordos que venha a celebrar, prestar cuidados de saúde a outros utentes. A título de curiosidade, o HFAR apresenta uma simbologia única, em que a cruz vermelha, é sinal representativo de socorro, ou seja, a atividade desenvolvida pelo Hospital. O leão marinho alado, retirado da simbologia heráldica do Estado-Maior-General das Forças Armadas, simboliza a capacidade de se movimentar no mar, na terra e no ar, representando, portanto, os três Ramos das Forças Armadas. A vara de esculápio é o símbolo tradicional da medicina, a serpente representa o bem e o mal, simbolizando o combate permanente entre a saúde e a doença. E por fim, a divisa "QUE GLÓRIA ALCANCE POR SABER CUIDAR", exprime o lema e a atividade desenvolvida pelo Hospital (2).



Figura 1. Simbologia e heráldica do HFAR (2).

1.2 Serviço de Patologia Clínica

O Laboratório de Patologia Clínica tem como missão prestar cuidados de saúde a todos os titulares de Assistência na Doença aos Militares (ADM), ou seja, todos os militares das Forças Armadas, deficientes das Forças Armadas, como também aos elementos das Forças de Segurança (Polícia de Segurança Pública e Guarda Nacional Republicana).

O Serviço de Patologia Clínica é responsável pela receção e colheita das amostras de Pacientes de Internamento (PIN), Pacientes Externos (PXT), estes PXT designam-se os

militares que realizam análises de rotina, militares sujeitos a controlo toxicológico e militares sujeitos a controlo para a realização das Provas de Aptidão Física (PAF). Relativamente às amostras provenientes do Serviço de Urgência, estas também se processam neste laboratório e são designadas por Pacientes do Serviço de Urgência (PSU). As amostras provenientes do Serviço de Imunohemoterapia, onde se efetua diariamente o controlo de Pacientes em terapêutica anti-coagulante (PST), são também direcionadas para o laboratório de Patologia Clínica para posteriormente, o patologista responsável, proceder aos ajustes das doses terapêuticas de cada paciente.

O laboratório é ainda responsável por processar as amostras colhidas no Gabinete de Classificação e Seleção, em Vila Nova de Gaia, de jovens que pretendam ingressar no Exército designados por PCS (Provas de Classificação e Seleção). A média do fluxo de amostras diário é de 60 a 75 amostras. As amostras, após processadas, são refrigeradas e conservadas durante sete dias. O Serviço de Patologia, além das suas competências, dispõe também de acordos com dois laboratórios externos para rentabilização de custos, como o Centro Hospitalar do Porto e laboratórios privados. Todos os resultados analíticos são emitidos informaticamente através do software *ClinidataNet* do Hospital, bem como via Internet para a rede do Exército (Gabinete de Classificação e Seleção), para todos os utilizadores autorizados. Os resultados das análises dos laboratórios externos são disponibilizados através do sistema informático ou em suporte de papel, os quais são arquivados em pastas durante 5 anos.

O Laboratório de Patologia Clínica está dividido em quatro setores principais: Hematologia, Química Clínica e Imunologia/Endocrinologia e Microbiologia, este tem como chefe de serviço a Doutora Fátima Sousa, como Técnico Coordenador o Segundo-Sargento Pedro Martins e no seu quadro orgânico conta com mais sete Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica de Análises Clínicas.

2. Controlo de Qualidade

2.1 Controlo de Qualidade Interno

O controlo de qualidade interno (CQI) corresponde a um conjunto de procedimentos postos em prática num laboratório com a finalidade de avaliar os resultados dos exames laboratoriais ao longo de todo o processo analítico (3).

Os resultados do CQI são utilizados para avaliar a precisão de cada método analítico e para validar a operacionalidade do equipamento. Diariamente realiza-se o estudo do CQI, depois da manutenção dos aparelhos e antes de se iniciar a análise das amostras. Os

resultados do CQI são gravados na base de dados do respetivo equipamento e são construídas cartas de controlo no software *Clinidata XXI- Maxdata*. Para a validação de cada parâmetro é necessário ter valores da amostra de controlo aceitáveis. Os critérios de aceitação dos controlos são baseados no intervalo de valores aceitáveis presente nas respetivas bulas e na interpretação das cartas de controlo (cartas de *Levey-Jennings*) de acordo com as Regras de *Westgard* (3). Os limites aceitáveis são $\pm 2DP$ (Desvio Padrão) da média.

O CQI é efetuado também sempre que um novo lote de reagente é utilizado, depois de nova calibração, após manutenção do equipamento ou qualquer alteração nas suas condições de funcionamento. Se o valor do controlo ultrapassar os limites aceitáveis, este é rejeitado, e desta forma procede-se à identificação e resolução do problema, que pode ser pelo facto do controlo se encontrar fora de validade, os reagentes não se encontrarem estáveis, erros na calibração, falta de manutenções ou problema de programação pelo operador.

O CQI é útil pois permite avaliar a precisão dos ensaios, permitindo ao laboratório manter a reprodutibilidade dos resultados, verificar a calibração dos sistemas analíticos e colocar em prática determinadas ações corretivas no caso de ocorrer uma não-conformidade.

2.2 Controlo de Qualidade Externo

O Controlo de Qualidade Externo (CQE) é um controlo interlaboratorial em que o resultado de cada parâmetro realizado no laboratório participante é comparado com a média de consenso do seu grupo, ou seja, é comparado com outros laboratórios de acordo com as metodologias utilizadas nos ensaios (4). Os resultados do laboratório são comparados com os dos outros laboratórios participantes, determinando assim a exatidão dos resultados. Com a participação nos programas de CQE o Laboratório de Patologia Clínica do HFAR-PP assegura que os resultados obtidos dos diversos parâmetros realizados se aproximam ao máximo do valor real dentro de uma variabilidade analítica permitida.

Este controlo permite garantir a reprodutibilidade dos resultados, verificar a calibração dos sistemas analíticos e a ocorrência de não conformidades que desencadearão ações corretivas.

O Laboratório de Patologia Clínica participa no PNAEQ do Instituto Nacional de Saúde “Dr. Ricardo Jorge”, EQAS - *Labquality*, (do inglês, *External Quality Assessment Service*), RIQAS (do inglês, *Randox International Quality Assessment Scheme*).

As fichas de participação nestes programas encontram-se descritas no Anexo I.

3.Hematologia

Hematologia inclui o estudo das células sanguíneas e coagulação. Engloba análises de concentração, estrutura e função das células, os seus precursores na medula óssea e a função das plaquetas e proteínas (5).

Neste setor, são realizados hemogramas, provas de coagulação, determinação de velocidade de sedimentação, coloração e observação ao microscópio do esfregaço de sangue periférico. A amostra utilizada para a determinação da maioria dos parâmetros, no setor de Hematologia, é sangue total colhido em tubos com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético tripotássio (EDTA K³). Para provas de coagulação, são utilizados tubos com anticoagulante citrato de sódio na proporção 1:9 (anticoagulante:sangue), que após centrifugação se obtém o plasma para a determinação dos parâmetros. Para a determinação da velocidade de sedimentação é utilizado o anticoagulante citrato de sódio na proporção 1:4. Os equipamentos e metodologias do âmbito da Hematologia operacionalizados durante o estágio serão descritos neste capítulo do relatório.

3.1 Avaliação Laboratorial

O estudo hematológico caracteriza-se por ser o exame de primeira linha no estudo da função hematológica. Este inclui o hemograma, que faz o estudo qualitativo e quantitativo das células sanguíneas. Permite saber se existem alterações na concentração das células sanguíneas ou se existem alterações na morfologia das células. Além do hemograma, este também inclui o estudo de reticulócitos, os quais são o último precursor eritroide, e é utilizado para se avaliar a atividade da medula óssea. Esta determinação é muito útil na classificação de anemias e para estudar a etiologia da anemia. A contagem das plaquetas permite fazer um estudo da hemóstase primária.

Hemograma

O hemograma inclui a determinação, contagem, análise e relação de diversos parâmetros hematológicos. Os parâmetros incluídos relativamente a leucócitos são a contagem total (WBC) e contagem diferencial: contagem de neutrófilos (NEU), linfócitos (LYM), monócitos (MONO), eosinófilos (EOS) e basófilos (BASO). Em relação aos eritrócitos é determinada a contagem total (RBC), a hemoglobina (HBG), o hematócrito (HCT), o volume corpuscular médio (MCV), a hemoglobina corpuscular média (MCH), a concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) e a heterogeneidade da população de eritrócitos (RDW).

Quanto às plaquetas os parâmetros apresentados incluem a contagem total (PLT), o volume médio plaquetário (MPV) e a heterogeneidade da população de plaquetas (PDW). Os valores de referência utilizados encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros obtidos pelo Equipamento Symex XT-2000i e os respectivos valores de referência (adultos) utilizados no HFAR-PP.

Parâmetro	Designação	Homem	Mulher
WBC	Contagem total de leucócitos	4-10 x 10 ⁹ /L	
RBC	Contagem total de eritrócitos	4,50-5,90 x 10 ¹² /L	4,00-5,20 x 10 ¹² /L
HGB	Concentração de hemoglobina	14-18 g/L	12- 16 g/L
HCT	Valor de hematócrito:	38-52 %	
MCV	Volume Corpuscular Médio	80-99 fL	
MCH *	Hemoglobina Corpuscular Média	27-33 pg	
MCHC *	Concentração de hemoglobina corpuscular média	300-360 g/L	
PLT	Contagem plaquetária total	150-400 x10 ⁹ /L	
NEUT% *	Percentagem de Neutrófilos	40-80 %	
LYMPH% *	Percentagem de Linfócitos	20-40 %	
MONO% *	Percentagem de Monócitos	2-10 %	
EO% *	Percentagem de Eosinófilos	1-6 %	
BASO % *	Percentagem de Basófilos	1 %	
NEUT#	Contagem de Neutrófilos	1,8 – 7,6 x 10 ⁹ /L	
LYMPH#	Contagem de Linfócitos	1,2- 4 x 10 ⁹ /L	
MONO#	Contagem de Monócitos	0,2-1,0 x 10 ⁹ /L	
EO#	Contagem de Eosinófilos	0,04-0,5 x 10 ⁹ /L	
BASO#	Contagem de Basófilos	0,01-0,1 x 1 ⁹ /L	
RDW-SD *	Heterogeneidade da população de eritrócitos	37,0-54,0 fL	
RDW-CV *	Heterogeneidade da população de eritrócitos coeficiente de variação	11,6-14,8 %	
PDW *	Heterogeneidade da população de plaquetas	9,0-17,0 fL	
MPV *	Volume plaquetário médio	7,0- 13,0 fL	
P-LCR *	Razão de Células Grandes / Plaquetas	13,0- 43,0 %	
RET	Contagem de Reticulócitos	25- 75 x 10 ⁹ /L	
IPR*	Índice de Produção de reticulócitos	0,5-2,5 %	
IRF *	Fracção de Reticulócitos Imaturos	1,6- 12,1 %	
LFR	Razão de Reticulócitos de Baixa Fluorescência	87,8-98,0 %	
MFR	Razão de Reticulócitos de Fluorescência Média	1,6 -11,0 %	
HFR	Razão de Reticulócitos de Fluorescência Alta	0,0-1,7%	

*Parâmetros obtidos indiretamente pelo equipamento a partir de cálculos.

Índices Hematimétricos

Para além da contagem total de eritrócitos, determinação do HCT e da HGB, é possível obter indiretamente alguns dos índices eritrocitários. Estes índices fornecem informações importantes relativamente ao tamanho das células e ao seu conteúdo em hemoglobina e, portanto, podem fornecer informação importante no sentido de auxiliar o clínico no diagnóstico da causa da anemia (6).

MCV: Corresponde à média do volume dos RBC, expresso em fentolitros (fL). É um parâmetro muito usado na classificação de anemias, por estar associado a alterações no tamanho dos RBC.

$$MCV = \frac{HCT (L/L)}{RBC (x 10^{12}/L)}$$

MCH: Este parâmetro corresponde ao conteúdo de HGB por RBC, não tendo em conta o volume de cada um. É expressa em pg (picogramas) e obtém-se através da seguinte expressão:

$$MCH = \frac{HGB (g/dL)}{RBC (x 10^{12}/L)}$$

MHCM: Este parâmetro corresponde à concentração média de Hb por RBC e é expresso em gramas/dL. É usado para classificar as anemias morfológicamente. O seu valor pode também ser calculado pela seguinte fórmula:

$$MCHC = \frac{HGB (g/dL)}{HCT (L/L)}$$

3.2 Sysmex XT-2000i

O Sysmex XT-2000i (Figura 2) é um analisador automático de hematologia para diagnóstico *in vitro* que permite fazer a contagem de células hematológicas. O XT-2000i pode analisar e obter resultados de 24 parâmetros de amostras sanguíneas (7). O XT-2000i realiza a análise leucocitária e de reticulócitos com um bloco de deteção ótica baseado na citometria de fluxo, utilizando um laser semiconductor (7).

A contagem de eritrócitos e de plaquetas realiza-se através do detetor de RBC pelo método de Focagem Hidrodinâmica. A concentração de hemoglobina obtém-se através do canal de HGB com base no método de deteção do Lauril Sulfato de Sódio (SLS).

Para a contagem de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e reticulócitos, a amostra é dividida em 5 partes dentro do analisador a fim de executar 5 diluições diferentes, sendo depois encaminhada para os respectivos canais: canal HGB; canal RBC/PLT; canal 4DIFF; canal WBC/BASO e o canal RET/PLT-O.



Figura 2. Analisador Automático Sysmex XT-2000i presente no setor de hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do HFAR-PP (fotografia obtida no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).

3.2.1 Canal HGB

A hemoglobina é um parâmetro de diagnóstico de rotina em cada hemograma. O método de detecção SLS de hemoglobina utiliza como reagente o SLS sem cianeto. Este reagente (*SULFOLYSER*) provoca a hemólise dos eritrócitos e leucócitos presentes na amostra (7). O início da reação dá-se com a alteração da globina, por ação do grupo alquilo hidrofóbico do lauril sulfato de sódio que induz a oxidação do átomo de ferro presente no grupo heme, do estado ferroso (Fe^{2+}) ao estado férrico (Fe^{3+}) formando metahemoglobina. Posteriormente, os grupos hidrofílicos do SLS vão-se ligar à metahemoglobina anteriormente formada, formando um complexo colorido SLS-HGB. No final, realiza-se a leitura para a determinação da HGB pelo método fotométrico, medindo-se a absorção de luz pelo composto colorido a um λ específico, onde absorvância é proporcional à concentração de hemoglobina presente na amostra.

3.2.2 Canal RBC/PLT

A contagem de eritrócitos e plaquetas efetua-se pelo método de impedância elétrica combinado com focagem hidrodinâmica no canal RBC/PLT minimizando assim os fenómenos de coincidência e de recirculação de células.

Antes de introduzida neste canal, uma parte da amostra é separada da restante e misturada com um diluente (CELLPACK) numa razão pré-estabelecida. Uma quantidade definida desta diluição é enviada para a câmara de deteção, passando através de um pequeno orifício, conhecido como abertura onde existem elétrodos, através dos quais passa a corrente contínua. A resistência à corrente contínua entre os elétrodos varia à medida que as células suspensas no diluente passam através da abertura. Esta resistência provoca uma alteração do pulso elétrico que é proporcional ao tamanho da célula. Estes dados elétricos são convertidos em representações gráficas através de curvas de distribuição de volumes e histogramas (Figura 3).

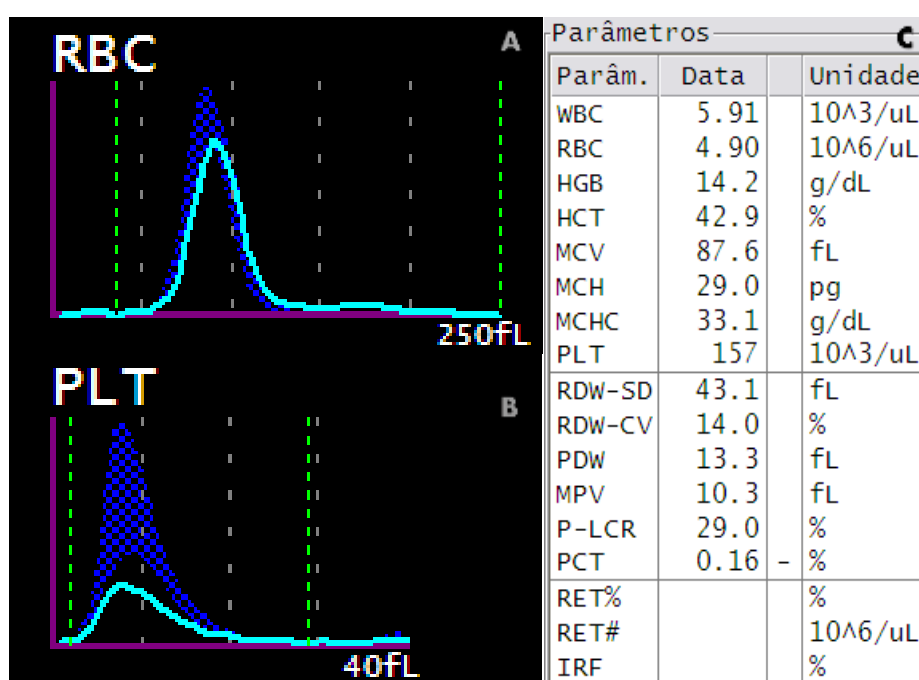


Figura 3. Histogramas A) B) obtidos pelo analisador automático Sysmex XT-2000i e respetivos valores obtidos C). (Dados obtidos do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).

3.2.3 Canal 4 DIFF

Este canal permite efetuar a contagem total e diferencial dos leucócitos, distinguindo entre neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos. A amostra inicialmente é diluída e marcada com um marcador de fluorescência que se liga especificamente aos ácidos nucleicos. Para a determinação dos parâmetros é utilizada a técnica de citometria de fluxo acoplada à fluorescência, que analisa as características das células em suspensão à medida que estas percorrem um fluxo laminar. As células passam uma a uma, alinhadas, as quais são intercetadas por um feixe laser semiconductor provocando dispersão da luz em várias direções.

De acordo com o tipo de dispersão de luz, diferentes características celulares são detetadas:

Dispersão frontal (FSC) - Tamanho Celular

Dispersão lateral (SSC) - Complexidade Celular

Fluorescência lateral (SFL) – Quantidade de RNA/DNA no interior da célula

Os reagentes utilizados por este canal são dois, o *STROMALYSER-4DL*, que provoca a lise do RBC e das PLT e permite a abertura de poros ultramicroscópicos na membrana dos leucócitos, e o *STROMALYSER-4DS*, este contém um marcador fluorescente que se fixa aos ácidos nucleicos.

A combinação destas informações fornece uma imagem concisa e exata de cada célula sanguínea permitindo agrupar as células com propriedades físicas e químicas semelhantes num gráfico de dispersão, em que cada cor igual no gráfico é característica da mesma população (Figura 4).

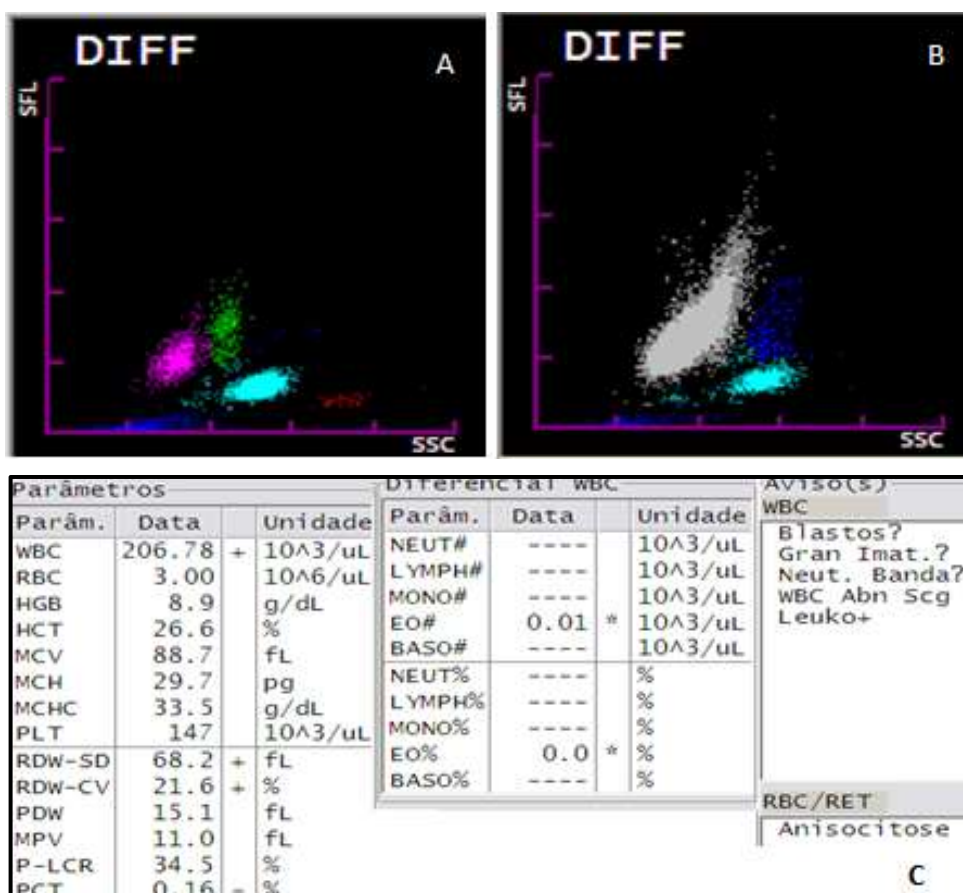


Figura 4. A) Gráfico de dispersão obtido no canal DIFF, de uma amostra de um indivíduo saudável, onde é possível observar as diferentes populações leucocitárias, B) Gráfico de dispersão obtido no canal DIFF, de

um indivíduo com alterações patológicas, onde se verifica leucocitose acentuada. C) Resultados e avisos obtidos referentes ao paciente B.

Gran Imat - granulócitos imaturos; *Neut. Banda* - neutrófilos em banda; *Leuko +* - Leucocitose;

Rosa – Linfócitos; *Verde*- Monócitos; *Azul turquesa*- neutrófilos; *vermelho*- eosinófilos; *azul escuro (zona inferior)* – lixo (ghost); *cinzento* - LUC: large unstained cells (blastos, plasmócitos, linfócitos atípicos). (Fotografia obtida do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).

3.2.4 Canal WBC/BASO

Neste canal ocorre a diferenciação dos basófilos em relação aos restantes glóbulos brancos, através da utilização de um reagente ácido (*Stromatolyser-FB*) que provoca a lise celular dos eritrócitos e reduz os leucócitos apenas ao seu núcleo, com exceção dos basófilos, que resistem a este reagente. Posteriormente, as diferenças resultantes entre os basófilos e as restantes células são analisadas utilizando a informação proveniente da FSC e SSC (Figura 5).

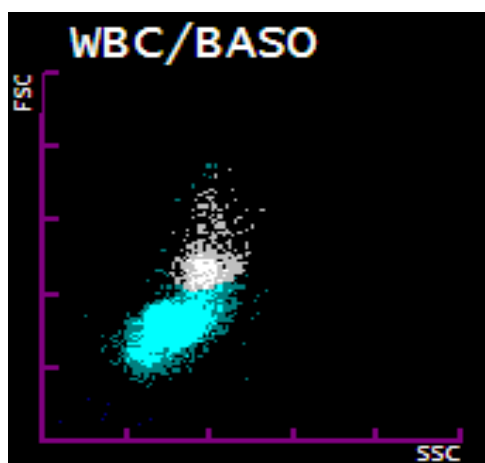


Figura 5. Gráfico de dispersão obtido no canal WBC/BASO. A branco encontram-se os basófilos e a azul os restantes leucócitos. (Fotografia obtida do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).

3.2.5 Canal RET/PLT

Neste canal, o surfactante *RET-SEARCH (II)* perfura ligeiramente as membranas celulares, o que permite a entrada do marcador fluorescente na célula. O marcador fluorescente liga-se aos ácidos nucleicos. Utilizando a dispersão frontal de luz e o sinal de fluorescência, os reticulócitos podem ser distinguidos dos eritrócitos maduros, leucócitos e eritrócitos nucleados. O diagrama de dispersão discrimina os eritrócitos maduros, reticulócitos e plaquetas e calcula a razão de reticulócitos, a contagem de reticulócitos, contagem RBC e de PLT (Figura 6).

Os reticulócitos dividem-se em três categorias, de acordo com a sua intensidade fluorescente, representando diferentes graus de maturação:

LFR (*low fluorescence reticulocytes*, reticulócitos de baixa fluorescência);

MFR (*medium fluorescence reticulocytes*, reticulócitos de média fluorescência);

HFR (*high fluorescence reticulocytes*, reticulócitos de alta fluorescência).

A IRF (*immature reticulocyte fraction*, fração de reticulócitos imaturos) reflete a proporção de reticulócitos imaturos e é calculada pela soma de MFR + HFR. Com recurso aos detetores FSC e SFL, são analisados os RET.

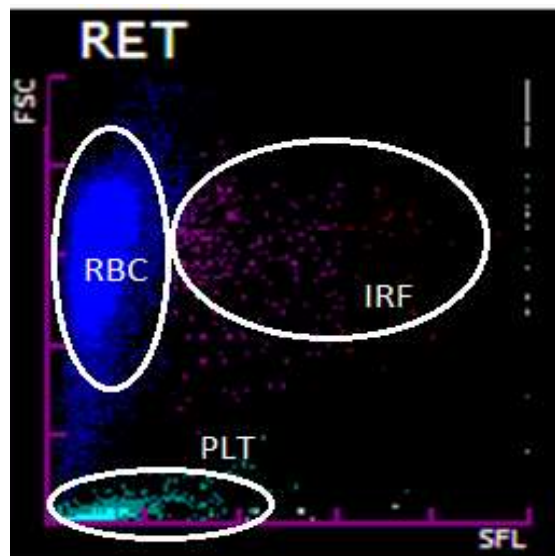


Figura 6. Gráfico de dispersão obtido no canal RET. (Fotografia obtida do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).

3.3 Alterações do hemograma

Em relação aos eritrócitos a patologia mais comum encontrada durante a realização do estágio foi a anemia, sendo esta patologia confirmada quando a [HGB] se encontra abaixo dos valores de referência, nas mulheres, [HGB] < 12g/dL e homens, [HGB] < 13 g/dL. A classificação morfológica é realizada tendo em conta o valor do MCHC e o volume globular médio (MCV) (Tabela 2) e a classificação cinética é realizada com base na contagem de reticulócitos (Tabela 3).

Alterações RBC

Tabela 2. Classificação morfológica da anemia

Classificação Morfológica	Índices	Causas
Anemia macrocítica: -não megaloblástica -megaloblástica	MCV > 99 fL	A anemia macrocítica não megaloblástica está associada a situações de eritropoiese acelerada ou aumento de superfície da membrana dos RBC, com reticulocitose; não existe uma alteração na síntese de DNA. A anemia macrocítica megaloblástica pode resultar de uma deficiência em vitamina B12 e/ou ácido fólico, alterações hereditárias na síntese de DNA, alcoolismo ou tratamento com citostáticos; nestes casos existe uma alteração na síntese/lesão de DNA.
Anemia microcítica Hipocrômica	MCV < 80 fL MCHC < 30,0 g/dL	Alteração da hemoglobinizacão. Pode advir de uma deficiência em ferro (dieta inadequada, hemorragias, aumento das necessidades em ferro), alteração na síntese das cadeias globínicas (talassemias e hemoglobinopatias) ou alteração na síntese do grupo heme e da porfirina (anemia sideroblástica).
Anemia normocítica normocrômica	MCV 80-99 fL	Não existe uma alteração nos índices hematimétricos, podem resultar de: - Perda recente de sangue; - Expansão do volume plasmático (gravidez, cirrose) - Doenças hemolíticas; - Doenças crónicas.

Tabela 3. Classificação cinética das anemias

Classificação Cinética	Reticulócitos	Causas
Hiper-Regenerativa	Aumento RET IPR > 2,5 %	Hemolítica (destruição excessiva) Pós-hemorrágica (perda exagerada)
Hipo-Regenerativa	Diminuição RET IPR < 0,5 %	Aplástica (lesão medular) Hipoplástica (produção inadequada)

Alterações PLT

Uma contagem de PLT superior a 450×10^9 plaquetas/L, designa-se por trombocitose, e uma contagem de PLT inferior a 150×10^9 plaquetas/L, designa-se como trombocitopenia. Quando o número de PLT ou o PDW é inferior ou superior aos valores de referência utilizados pelo laboratório, deve ser repetida a análise e efetua-se uma avaliação microscópica do esfregaço sanguíneo, com o objetivo de confirmar a contagem fornecida pelo equipamento automático. Muitas vezes, um valor baixo de plaquetas pode ocorrer por agregação plaquetária devido ao anticoagulante utilizado (EDTA), ou má homogeneização da amostra quando colhida, o que conduz a uma falsa trombocitopenia. Quando suspeita de agregação provocada por EDTA, pede-se nova colheita de sangue total, mas desta vez em tubo com o anticoagulante citrato de sódio na proporção de 1:4, sendo esta nova amostra analisada.

Alterações WBC

A fórmula leucocitária pode encontrar-se alterada em diversas situações como inflamações, diferentes infeções e neoplasia, ou em determinadas situações fisiológicas, como a gravidez. Uma contagem de WBC superior a 10×10^9 /L, designa-se por Leucocitose (Tabela 4) e uma contagem de WBC inferior a 4×10^9 /L, designa-se como Leucopenia (Tabela 5). Os valores apresentados diferem de laboratório para laboratório, sendo estes os referentes ao Laboratório de Patologia Clínica do HFAR.

Tabela 4. Alteração no leucograma e respetivas causas prováveis.

Leucocitose	Causas
Neutrofilia > $7,5 \times 10^9$ /L	Infeções bacterianas Inflamações necróticas Doenças mieloproliferativas Leucemia mieloide crónica
Eosinofilia > $0,4 \times 10^9$ /L	Alergias Parasitoses Doenças dermatológicas Leucemia eosinofílica crónica Doenças neoplásicas (linfoma de <i>Hodgkin</i>)
Basofilia > $0,1 \times 10^9$ /L	Leucemia Mieloide Crónica Doenças mieloproliferativas (Policitemia Vera, Trombocitopenia Essencial)
Linfocitose > $3,5 \times 10^9$ /L	Infeções agudas Leucemias Linfóide Aguda e Crónica Leucemia Monocítica Aguda

Tabela 5. Alteração no leucograma e respetivas causas prováveis.

Leucopenia	Causas
Neutropenia $< 1,8 \times 10^9/L$	Medicamentos Infecções e viroses Doenças autoimunes Falência medular
Linfopenia $< 1,5 \times 10^9/L$	Falência medular Imunodepressão (HIV) Terapêutica com corticosteroides ou imunossupressores Radioterapia

3.4 Esfregaço Sanguíneo

O exame de um esfregaço sanguíneo inclui o estudo morfológico de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, bem como a contagem diferencial leucocitária. Inclui ainda a “confirmação” dos parâmetros obtidos no estudo quantitativo do hemograma.

No laboratório de Patologia Clínica os médicos patologistas são os responsáveis pela observação dos esfregaços, estes são informados pelos técnicos dos “flags” que o analisador automático detetou e é realizado o esfregaço de sangue periférico de acordo com as regras consenso de hematologia (ver anexo II), ou seja, sempre que algum valor esteja alterado, segundo as regras consenso, procede-se a realização de dois esfregaços por cada doente.

Procedimento

Para a realização do esfregaço sanguíneo, o ideal seria utilizar sangue total sem anticoagulante, de forma a evitar interferências na morfologia dos elementos figurados do sangue. No entanto, como o esfregaço sanguíneo se realiza essencialmente para a confirmação dos resultados obtidos no hemograma, utilizamos o sangue colhido no tubo de colheita com EDTA K³.

Para a realização do esfregaço devemos ter lâminas bem desengorduradas e sem riscos. Com o auxílio de uma micropipeta, coloca-se uma gota de sangue a cerca de 1 cm da extremidade da lâmina e, de imediato, procede-se à sua extensão, a qual é feita com a ajuda de outra lâmina que se apoia com uma inclinação de cerca de 45 graus sobre a que contém a gota de sangue. Recuando um pouco com a segunda lâmina, promove-se o contacto com a gota de sangue, que se espalhará por capilaridade ao longo da linha de contacto e de seguida faz-se a sua extensão, deixando secar (Figura 7).

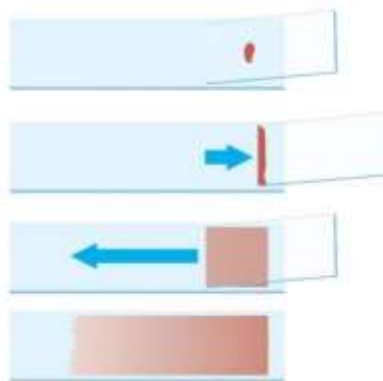


Figura 7. Representação da técnica para obter esfregaços sanguíneos. (Disponível em [Esfregaço](#))

Assim, o esfregaço deve apresentar-se regular e homogéneo, de espessura média, com bordos bem definidos, devendo apresentar uma redução progressiva da espessura no sentido cabeça-corpo-cauda. A cabeça corresponde à primeira zona do esfregaço, de maior espessura, o corpo constitui a maior parte do esfregaço, entre a cabeça e a cauda; a cauda, na zona final do esfregaço, apresenta um aspeto franjado e de espessura reduzida. As lâminas deverão ser marcadas na zona fosca, com o número interno de laboratório atribuído ao doente (Figura 8).

Cabeça: Zona de elevado número de leucócitos (principalmente de linfócitos).
Corpo: É nesta região que os leucócitos, eritrócitos e plaquetas estão distribuídas de forma mais homogénea. É a área de escolha para a análise qualitativa e quantitativa.
Cauda: Zona de elevado número de monócitos e granulócitos, que podem apresentar maior distorção morfológica.

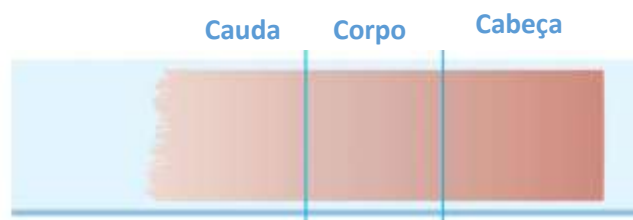


Figura 8. Representação de um esfregaço sanguíneo e respetivas zonas, cabeça, corpo e cauda. (Disponível em [Esfregaço](#))

Coloração Wright

Para a observação microscópica dos elementos figurados do sangue periférico, procedesse à coloração de *Wright*. A coloração de *Wright* é uma técnica de coloração histológica que utiliza uma combinação de corante ácido eosina, (vermelho) que forma um eosinato, e corante básico (azul de metileno). Este corante hematológico faz parte dos corantes designados genericamente de corantes do tipo *Romanowsky*, que correspondem

a soluções alcoólicas com componentes básicos e ácidos, que vão permitir corar de forma distinta os componentes nucleares e citoplasmáticos das células (8). Enquanto o corante



Figura 9. Bancada do setor de hematologia onde se realizam os esfregaços sanguíneos. (Fotografia obtida no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).

básico confere cor azul aos ácidos nucleicos, grânulos basófilos e fracamente os grânulos dos neutrófilos, a eosina confere cor vermelha ou laranja à hemoglobina e aos grânulos eosinófilos. Na Figura 9 esta representado o local onde se realizam os esfregaços.

3.5 Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação eritrocitária (VS), também chamada velocidade de sedimentação globular (VSG) corresponde à velocidade à qual os GV se separam do plasma e se sedimentam em condições laboratoriais controladas, sendo expressa em milímetros por hora (mm/h) (9, 10).

A VS é uma análise de rotina por se encontrar alterada em diversas situações, tais como processos infecciosos e inflamatórios, no entanto, corresponde a uma análise de valor inespecífico, pois uma alteração no seu valor não está associada à presença de uma patologia em concreto (9, 11).

Nestes casos tem interesse diagnóstico e valor prognóstico, permitindo estudar a evolução e a resposta terapêutica a essas situações. Estes processos podem acompanhar-se de modificações no número, forma ou dimensões dos GV ou, ainda, de alterações na composição plasmática, que se traduzirão numa modificação da VS (12).

No presente laboratório o equipamento utilizado para obter este parâmetro é o *Ves-Matic 30* (Figura 10) e na Tabela 6 estão descritos os valores de referência utilizados. O valor da VSG é influenciado substancialmente pela concentração de algumas proteínas, cuja concentração plasmática varia na presença de processos inflamatórios ou de

diferentes patologias (por exemplo, neoplasias). O valor é também afetado por algumas propriedades dos eritrócitos e por anemia (hematócrito) (Tabela 7).

3.5.1 VES-MATIC 30

O VES-MATIC 30 é um analisador desenvolvido e programado para a determinação simultânea da VS em 30 amostras de sangue. Para tal, utilizam-se tubos *Vacu-Code* - tubos de metacrilato com vácuo, secção em T e tampa de borracha de silicone cinzenta. A determinação normal da VSG permite obter resultados que são equivalentes aos calculados usando o método de *Westergren* - 1.^a hora em 28 minutos e 2.^a hora em 46 minutos, incluindo a homogeneização das amostras. No ciclo rápido, o tempo de análise é de 10 minutos e 15 minutos para 1.^a e 2.^a hora respetivamente, incluindo a homogeneização das amostras (13).



Figura 10. Analisador de bancada, VES-MATIC 30, presente no laboratório de Patologia Clínica (Fotografia obtida no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).

3.5.2 Avaliação Laboratorial

São utilizadas amostras de sangue venoso colhidas para tubos especialmente projetados para este fim, Tubo *Vaco-Code* que contêm o anticoagulante citrato de trissódio a 3,8 % (proporção de 1:4), como referido no início do capítulo. Depois de introduzidas as amostras no equipamento, este procede à homogeneização das mesmas, efetuando a primeira leitura quando o prato volta à sua posição original. O leitor ótico, constituído por sensores ótico-eletrónicos, realiza a leitura automática do nível de sangue antes de iniciar a sedimentação, detetando a opacidade da coluna de sangue no tubo de colheita. Aos vinte e oito minutos é efetuada a outra leitura, sendo o resultado obtido pela diferença de

opacidade da coluna de sangue observada entre leituras. Ou seja, este equipamento determina o nível de sedimentação globular e calcula automaticamente o valor da VS em mm/h.

Tabela 6. Valores de referência para a VS utilizados no laboratório de Patologia Clínica.

Gênero	Valores de Referência	
	1ª hora	2ª hora
Masculino	< 10mm	<20mm
Feminino	<15mm	<30mm

Tabela 7. Fatores envolvidos nas alterações da VS.

Fatores	Aumento VS	Diminuição VS
Analíticos	Tubo inclinado Temperatura Erro na diluição/proporção	Diminuição da Temperatura ambiente Tempo prolongado para realização do teste
Terapêutica	Contracetivos orais Heparina	Anti-inflamatórios (Salicato em altas concentrações) Corticosteroides
Fisiológicos e Patológicos	Sexo feminino Idade avançada Gravidez Processos inflamatórios e infecciosos Anemia Macrocitose	Hipofibrinogenemia Hipogamaglobulinemia Drepanocitose Microcitose Esferocitose Leucocitose extrema Anemia Hemolítica

Disponível em : <http://rmmg.org/artigo/detalhes/1520> acessado em 03dec2019

3.6 Hemóstase

A hemóstase é um processo complexo pelo qual o organismo assegura, em permanência, a prevenção das hemorragias espontâneas e permite a manutenção do sangue no estado fluido, ficando confinado ao sistema vascular. Em caso de lesão vascular a hemóstase permite também a rápida paragem da hemorragia levando a uma resposta hemostática apenas no local da lesão. Esta função fisiológica implica o envolvimento do endotélio vascular, das plaquetas, e de proteínas plasmáticas que atuam como fatores de coagulação, ativadores e inibidores de coagulação e da fibrinólise (14). O processo é composto por três fases distintas que se interligam de forma contínua (Tabela 8).

Tabela 8. Classificação das fases da Hemóstase sanguínea.

<i>Tipos de Hemostasia</i>	<i>Mecanismos</i>
Hemóstase primária	Vasoconstrição/ contração do vaso sanguíneo. Formação de um agregado plaquetário e adesão plaquetária.
Hemóstase secundária	Ativação da cascata de coagulação. Deposição e estabilização da rede de fibrina.
Hemóstase terciária	Fibrinólise

Hemóstase primária

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados em forma de disco derivados de megacariócitos. Estas têm um papel fundamental na hemostasia, formando o tampão hemostático inicial (14). As plaquetas apresentam na sua composição dois tipos de grânulos: os grânulos α , que contêm P-Selectina, fibrinogénio, fibronectina, fator V, fator VIII, fator plaquetário IV, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento tumoral- α (TGF- α) e grânulos δ ou grânulos densos, que contêm adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), cálcio, serotonina, histamina e adrenalina (14, 15).

Após lesão vascular, ocorre vasoconstrição, que leva a contração do vaso lesado diminuindo assim o fluxo sanguíneo. Numa segunda fase, o fator de *von Willebrand* (vWf) atua como um mediador entre o colágeno endotelial e os recetores do complexo glicoproteico Ib (GpIb) da superfície promovendo a adesão plaquetária. O tromboxano A2 (TxA2) produzido pelas plaquetas ativadas é responsável por aumentar a agregação plaquetária (14, 15), e juntamente com o ADP aumentam a agregação plaquetária, levando à formação do trombo plaquetário, que sela temporariamente a lesão vascular.

Hemóstase secundária

Para o coágulo se tornar hemostaticamente eficaz é necessário juntar-se ao trombo plaquetário uma rede de fibrina (14). A coagulação do sangue, devido a um conjunto de reações em cascata com ativação de diversas proteínas plasmáticas (fatores de coagulação), permite, portanto, a formação de uma rede de fibrina estável. A teoria clássica da coagulação sanguínea é particularmente útil para a compreensão dos testes de coagulação *in vitro* (14). Tradicionalmente, a coagulação é dividida em três vias distintas, a via extrínseca e intrínseca, em que ambas convergem para a via comum (ativação do fator X).

O fator X ativado, juntamente com seu cofator (fator V), fosfolípidos teciduais, fosfolípidos plaquetários e cálcio forma o complexo de protrombinase que converte protrombina em trombina. Essa trombina cliva ainda mais o fibrinogénio circulante em fibrina insolúvel e ativa o fator XIII, que liga covalentemente os polímeros de fibrina agregados no tampão de plaquetas. Isso cria uma rede de fibrina que estabiliza o coágulo e forma um tampão hemostático secundário definitivo (Figura 11).

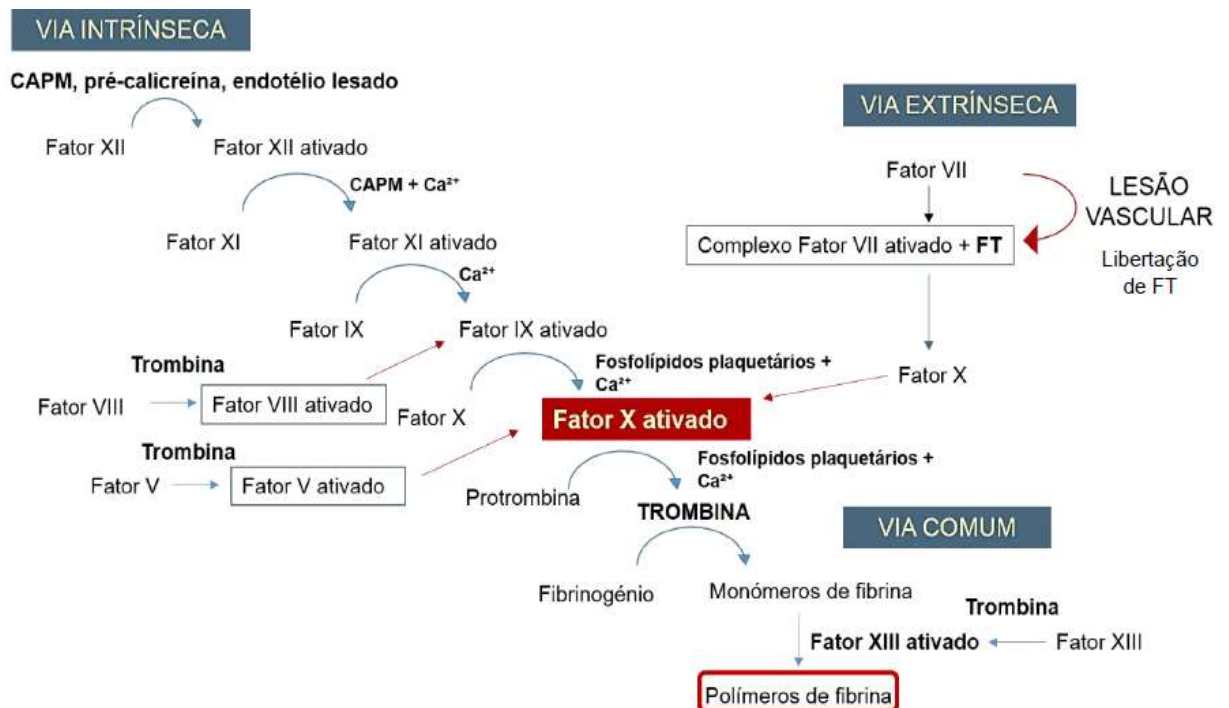


Figura 11. Modelo clássico da cascata de coagulação.

Hemóstase Terciária (Fibrinólise)

A fibrinólise é o processo fisiológico que promove a dissolução do coágulo de fibrina à medida que estes se formam de modo a evitar a obstrução dos vasos sanguíneos por deposições de fibrina. Este processo é mediado por uma enzima proteolítica – a plasmina,

que resulta da ativação do plasminogénio. Os fragmentos resultantes desta reação são depois destruídos por outras proteases ou pelos rins e fígado (16).

3.6.1 Sysmex CS-2100i

O equipamento utilizado para avaliar os parâmetros analíticos da coagulação é o *Sysmex CS-2100i* (Figura 12).

O *CS-2100i* é um sistema totalmente automático de análise da coagulação do sangue para utilização em Diagnóstico *In Vitro*, que pode analisar rapidamente um grande volume de amostras com elevado grau de precisão. Este equipamento analisa amostras utilizando métodos de coagulação para determinação do Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (APTT) e Fibrinogénio (Fbg). Sucintamente, os métodos resumem-se em pipetar uma quantidade fixa de amostra (plasma) e que, após ter sido aquecida durante um determinado período, é adicionado o reagente.

A reação de coagulação é detetada através da alteração na luz transmitida.

O equipamento dispõe de diversas funções incorporadas, incluindo a definição automática de reagente através de código de barras, o processamento prioritário de amostras STAT e o controlo de qualidade. Este equipamento é composto pela unidade principal, pela unidade de processamento de informações e pela unidade pneumática.



*Figura 12. Analisador Automático Sysmex CS-2100i no Laboratório de Patologia Clínica do HFAR-PP.
(Fotografia obtida no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)*

3.6.2 Avaliação Laboratorial

A avaliação laboratorial da hemóstase é possível através de testes simples, suficientemente sensíveis e reprodutíveis, escolhidos de maneira a avaliar as distintas vias. Serão expostos, somente, os testes efetuados no laboratório, ou seja, os que envolvem componentes das duas primeiras fases da hemóstase uma vez que não são realizados testes que estudam o sistema fibrinolítico.

Quando as amostras chegam ao laboratório estas são centrifugadas durante 8 minutos a 2000 RPM, de forma a obter como sobrenadante o plasma. O plasma, como já referido, é o espécime para a realização das provas de coagulação, pois é neste que se encontram os fatores de coagulação e o fibrinogénio. Na Tabela 9 estão descritos os valores de referência utilizados no HFAR – PP.

Tempo de Protrombina (TP)

O TP é um procedimento laboratorial que avalia os fatores da coagulação II, V, VII e X, ou seja, avalia a via extrínseca, sendo que destes, os fatores II, VII e X são vitamina K-dependentes. Os anti-vitamina K, usados no tratamento anticoagulante oral, são antagonistas estruturais da vitamina que impedem a sua ação ao nível do hepatócito durante a síntese dos fatores dela dependentes (17-19). Portanto, o tempo de protrombina está indicado para a monitorização terapêutica com anticoagulantes orais. O TP para além da monitorização de terapêutica com anticoagulantes, é também útil na deteção das deficiências genéticas nos fatores de coagulação da via extrínseca, na deteção das deficiências adquiridas nos fatores de coagulação, e também no controlo da função hepática nas doenças do fígado (20).

Método: A adição de tromboplastina na presença de iões cálcio leva a ativação da via extrínseca da coagulação, como reação inicial a ativação do fator VII. O processo de coagulação é desencadeado mediante incubação do plasma do paciente com quantidades ótimas de tromboplastina e cálcio. Posteriormente à incubação mede-se o tempo que decorre até a formação do coágulo de fibrina, que resulta num valor dado em segundos.

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

O TTPA é um procedimento laboratorial que avalia a via intrínseca (fatores VIII, IX, XI e XII) e a via comum (fibrinogénio, protrombina, fatores V e X) da cascata da coagulação (21). Este teste é utilizado para avaliar perturbações na coagulação (na via intrínseca e na via comum da cascata de coagulação) bem como na monitorização terapêutica de

pacientes sujeitos a uma anticoagulação oral como heparina não fracionada (22). TTPA define o tempo em que a protrombina é convertida em trombina para a formação do coágulo. Quanto maior for esse tempo, maior será o tempo necessário para a coagulação sanguínea.

Método: A incubação da amostra com uma quantidade otimizada de fosfolípidos e um ativador superficial provoca a ativação da via intrínseca. O processo de coagulação é desencadeado com a adição de íons cálcio e é medido o tempo que decorre até a formação do coágulo de fibrina, em segundos.

Concentração de Fibrinogénio

O fibrinogénio (Fator I) é uma glicoproteína sintetizada no fígado, encontra-se presente no plasma e nos grânulos α e está envolvido na etapa final da coagulação (16, 20). Este é convertido em fibrina, sob a ação da trombina. Quando existe lesão vascular, a trombina formada atua sobre o fibrinogénio convertendo-o em monómeros de fibrina que polimerizam espontaneamente, formando uma rede insolúvel de fibrina. Níveis baixos de fibrinogénio podem ser característicos de desordens hereditárias tais como hipofibrinogenemia, afibrinogenemia, disfibrinogenemia e também em doenças hepáticas, coagulação intravascular disseminada e síndromes fibrinolíticas. Níveis elevados podem-se encontrar em indivíduos com diabetes, doenças inflamatórias, entre outras. Este fator de coagulação que está em maior concentração plasmática (200-400 mg/dL).

Método: A enzima trombina é adicionada em excesso à amostra, esta por sua vez, converte a proteína plasmática solúvel fibrinogénio no seu polímero não solúvel, a fibrina. O tempo de coagulação do plasma diluído é inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio no plasma. O tempo de coagulação obtido é comparado posteriormente com uma amostra de fibrinogénio padrão.

Tabela 9. Valores de referência para os parâmetros da Coagulação utilizados no HFAR-PP

Parâmetros	Tempo/Concentração	INR	Atividade %
Tempo de protrombina (TP)	11-14 segundos	1,0-1,3	70 - 100%
Tempo de Tromboplastina parcial ativado (TPPA)	23-32 segundos		
Fibrinogénio (Fib)	200 – 400 mg / dL		

O Laboratório de Patologia Clínica do HFAR-PP recebe um número considerável de pacientes sob terapêutica anticoagulante. Para a monitorização da dose terapêutica determina-se diariamente o PT e o INR (Razão Normalizada Internacional).

Os valores INR a manter nestes pacientes deverá ser entre 2 e 3. Valores fora desta faixa repetem-se e o Clínico responsável recalcula a nova dose para estes pacientes. Na Figura 13 encontram-se descritos alguns resultados para os Pacientes Sob terapêutica Anticoagulante, Pacientes Internados e Externos e também o valor obtido pelo controle interno alto (*Citrol 2*).



Status	Rack No. -Pos.	Sample No	PT sec sec	PT% I	PT INR	APTT sec	Fib ng/dL	F
	REA00	QCCitrol 548281*	35.2	18.8	3.40			F
	REA00	QCCitrol 548281*				48.4		F
	000001-01	PST14548900	22.3	34.0	2.05			F
	000002-01	PIN17945011	11.8	88.8	1.01			F
	000003-01	PST14550900	19.6	40.2	1.77			F
	000004-01	PST14550900*	19.8	40.2	1.77			F
	000005-01	PXT38185011	12.0	84.6	1.03	27.0		F
	000005-02	PXT38185011	11.2	113.0	0.95	26.5		F
	000005-03	PXT38188011	11.8	103.2	0.99			F
	000006-01	PIN17955011	13.5	71.2	1.17			F

Figura 13. Painel de resultados obtidos pelo equipamento Sysmex CS 2100i. QCCitrol – Controle interno Nível 2 (Dados obtidos do sistema no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)

Competências adquiridas

Durante a passagem pelo setor de hematologia e coagulação, o qual estive dois mês, foi possível adquirir diversas capacidades técnicas e profissionais. Diariamente realizava a manutenção diária e controle interno do equipamento dos hemogramas, Sysmex XT 2000i, alternando entre três níveis de controles. Após manutenção e passagem dos controles, processava a rotina entre as 11h e 12h. Quando algum parâmetro gerava alertas, uma folha era impressa automaticamente pela impressora ligada ao equipamento. Eram repetidas as análises, no caso de apresentar o alerta “turvação”, as amostras eram colocadas na estufa (presença de crioglobulinas) e voltava a ler passado 3 a 4h. Nas amostras com alertas, como alterações na contagem ou morfologia PLT, RBC, e WBC, realizava 2 esfregaços por paciente para posterior observação microscópica e contagem celular pelo patologista responsável. Em amostras de pacientes compatíveis com anemia ou alterações nas plaquetas, realizava a contagem de reticulócitos numa outra opção do

equipamento, pelo canal RET/PLT. No final do dia, era realizada a limpeza do equipamento.

Relativamente ao setor da coagulação, diariamente realizava os controlos dos parâmetros TP e APTT no equipamento *Sysmex CS-2100i*. De manhã colocava os reagentes necessários nos suportes do equipamento, colocava as cuvetes usadas no contentor e em caso de necessidade, trocava o recipiente da água destilada e dos resíduos. Relativamente aos controlos, hidratava o controlo liofilizado, deixava durante 15 minutos à temperatura ambiente, homogeneizava com o auxílio da pipeta e posteriormente realizava a leitura. Após validação dos controlos processava as amostras. Na primeira fase da manhã eram realizados os controlos dos pacientes sob terapêutica anticoagulante, os quais pretendia-se que estivessem com o INR entre 2-3, no caso de dar um valor fora deste intervalo, repetia-se a análise. Na segunda parte da manhã, eram processadas as amostras de rotina, no entanto as amostras diárias neste equipamento eram relativamente reduzidas. O equipamento da velocidade de sedimentação foi o menos utilizado durante a passagem por este setor. Todos os dias ligava o equipamento, este não precisava de qualquer tipo de controlo ou manutenção, e quando chegavam as amostras colocava os tubos por ordem numérica selecionando o tipo de análise que pretendia (rápida, VS 1h ou VS 2h). No final era impresso um ticket o qual era armazenado na base de dados do laboratório. Considero que fui autónoma neste setor, alcancei objetivos pessoais e profissionais, interpretei os resultados obtidos consoante o quadro clínico do doente e realizei os procedimentos corretos do laboratório e manuseei e trabalhei independentemente com estes equipamentos.

4. Imunologia e Endocrinologia

As amostras que assim exigirem, de acordo com as listas de trabalho dadas pelo sistema *Clinidata-MaxData*, são separadas e seguem para o setor de Imunologia. Neste setor são efetuados os doseamentos de marcadores tumorais, marcadores cardíacos, hormonas e algumas proteínas através de dois equipamentos automatizados, o *VIDAS* e o *IMMULITE 2000*.

Todas as técnicas usadas baseiam-se nas características de reconhecimento específico do imunocomplexo antígeno-anticorpo (Ag-Ac respetivamente), sendo a sua deteção possível através de marcadores como enzimas ou compostos fluorescentes, no entanto, estas técnicas de determinação dos parâmetros analíticos diferem no princípio analítico.

Os equipamentos automatizados neste setor utilizam tanto o princípio do imunoensaio competitivo como também o princípio do imunoensaio não-competitivo (também designado por *sandwich*) dependendo dos parâmetros em estudo.

Como a quantidade de testes diários é baixa, por norma, congelam-se estas amostras até ter um número significativo, de forma a reduzir custos uma vez que os calibradores e controlos são dispendiosos. Habitualmente realizam-se estes testes duas vezes por semana (terça-feira e quinta-feira). Neste capítulo, são apresentados os equipamentos automatizados utilizados no setor de imunologia/endocrinologia, as suas metodologias e os parâmetros (Tabelas 10 e 11) determinados e uma breve descrição em relação à sua utilização e diagnósticos prováveis.

4.1 VIDAS

O VIDAS (*Vitek Imuno Diagnostic Assay Sistem*) (Figura 14) é um sistema multiparamétrico de imunoensaio que permite a realização de diversos testes em simultâneo. É um analisador automático que efetua doseamentos pelo método imunoenzimático por sandwich em duas etapas com deteção final de fluorescência (*Enzyme Linked Fluorescent Assay – ELFA*), utilizam-se cones que constituem a fase sólida da reação, os quais estão sensibilizados com antigénios ou anticorpos de acordo com os parâmetros a ser estudados.



Figura 14. Equipamento VIDAS no setor de Imunologia. (Fotografia obtida no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)

Enzyme Linked Fluorescent Assay

O doseamento dos diferentes parâmetros é baseado no método *ELFA*. Os cones servem tanto de fase sólida como de suporte de pipetagem. Os outros reagentes da reação imunológica estão pré-repartidos na barrete. Todas as etapas do teste são realizadas automaticamente no equipamento. Os antigénios presentes na amostra, posteriormente vão fixar-se aos anticorpos/imunoglobulinas, marcados com fosfatase alcalina, formando o

conjugado. Sucodem-se lavagens com o objetivo de remover componentes não fixados. A mistura amostra/conjugado é aspirada e depois dispensada várias vezes pelo cone, permitindo a ligação tanto às imunoglobulinas fixadas no cone como também ao conjugado, formando assim uma “sandwich”.

Em alguns parâmetros como por exemplo D-dímeros, numa primeira etapa os antígenos presentes na amostra ligam-se às imunoglobulinas fixadas no cone. Sucodem-se lavagens com o objetivo de remover componentes não fixados. Numa segunda etapa, um anticorpo monoclonal marcado com fosfatase alcalina liga-se ao antígeno já fixado no cone, formando assim uma “sandwich”.

Na etapa final de revelação, a enzima do conjugado (fosfatase alcalina) catalisa a reação de hidrólise do substrato 4-metil-umbeliferilfosfato (4-MUP) em 4-metil-umbeliferona (4-MU), do qual resulta emissão de luz a 450nm após excitação a 370nm. A emissão de fluorescência é proporcional à quantidade de antígeno ou anticorpo presente na amostra. Os resultados são calculados automaticamente, a partir da curva de calibração introduzida no aparelho.

Tabela 10. Parâmetros analisados pelo equipamento VIDAS no laboratório de Patologia Clínica do HFAR-PP e respetivos valores de referência.

Designação		Valores de Referência
Serologia Infeciosa	Ac. Anti-Citomegalovírus IgM	<0,9 UA/mL
	Ac. Anti-Citomegalovírus IgG	<0,9 UA/mL
Vitaminas e Hormonas	Vitamina D Total (25OH)	>30 ng/mL
	T3 Livre	2,6 -5,4 pg/mL
	T4 Livre	0,89-1,76 ng/dL
Marcadores cardíacos	Beta-2-Microglobulina	0,8-2,2 mg/L
	D-Dímeros	<500 ng/mL
	NT-proBNP	<400pg/mL
	Troponina I	<0,04 ng/mL
	Mioglobina	10-46 µg

4.2 IMMULITE® 2000

O IMMULITE 2000 é um analisador automático que realiza imunoensaios de quimioluminescência. Este sistema utiliza amostras de soro/plasma para determinações *in vitro*. O sistema do IMMULITE 2000 utiliza esferas de poliestireno revestidas com uma camada de anticorpos (fase sólida). Uma esfera revestida é dispensada num tubo de reação especialmente concebido para o efeito, que serve tanto de recipiente para os processos de incubação, como também de lavagem e leitura do sinal analítico. A amostra é adicionada ao tubo de reação com a respetiva esfera (de acordo com o parâmetro em análise) e seguidamente é adicionado o reagente (Fosfatase alcalina conjugada ao respetivo Ac) (23). O tubo de reação é agitado intermitentemente durante a incubação para melhorar a cinética da reação. A maioria dos ensaios requer um único circuito de 30 minutos. Após incubação da amostra do doente com o reagente, esta é separada da esfera revestida pelo movimento de rotação do tubo de reação que atinge grandes velocidades sobre o seu eixo vertical (Figura 15) (23).

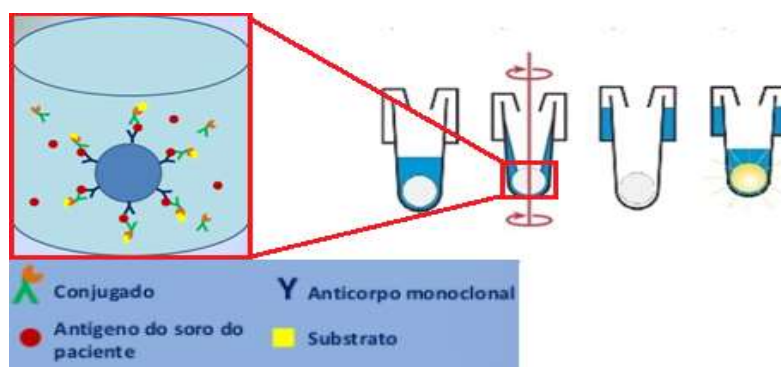


Figura 15. Mecanismo de lavagem pela rotação do tubo a grandes velocidades e posterior adição do substrato (último tubo) levando à emissão de luz. (Disponível em [Siemens - Immulite](#))

O fluido é transferido para uma câmara de lavagem, que constitui parte integrante da estação de lavagem das esferas revestidas. Num intervalo de segundos ocorrem quatro lavagens discretas que permitem o processamento sequencial dos tubos de reação em tempo uniforme.

Método de Quimioluminescência

A esfera revestida é desprovida de qualquer camada não ligada. A camada ligada é, então, quantificada utilizando um substrato de dioxetano para produzir luz. A luz é emitida quando o substrato de quimioluminescência reage com a camada de fosfatase alcalina ligada à esfera revestida (24). A quantidade de luz emitida é proporcional à quantidade de analito inicialmente contida na amostra. A emissão de luz é detetada pelo tubo fotomultiplicador

(PMT) e os resultados são calculados automaticamente pelo sistema para cada amostra. A quantidade de fosfatase alcalina capturada é diretamente proporcional (no caso de um ensaio tipo "sandwich"), ou inversamente proporcional (no caso de um ensaio competitivo) à concentração dos analitos na amostra do paciente.

Tabela 11. Parâmetros analíticos do IMMULITE 2000 e respectivos valores de referência.

	Designação	Valores alterados em:	VR
Marcadores tumorais	AFP	Cancro dos Testículos/Ovários, Fígado	<5,0 UI/mL
	CA 15-3	Cancro da Mama	Homem <31,3 U/mL Pré-menopausa <37 Pós-menopausa <47
	PSA	Cancro da Próstata	< 4,0
	CA 19-9	Cancro Colorretal, Pâncreas, Pulmão	<37 U/mL
	CA 125	Cancro Útero, Ovário Pulmão	<21 U/mL
	CEA	Cancro Colorectal/ Gástrico, Mama, Pulmão, Adenocarcinoma	N Fumadores <3 ng/mL Fumadores <5 ng/mL
	Tiroglobulina	Tumores da Tireoide	<55 ng/mL
Hormonas	Tiroxina	Disfunção Tireoide	T4 Total : 5 -12 µg/dL
	Beta-Estradiol	Fertilidade da mulher, Problemas menstruais Tumores	Homem< 56 ng/L Mulher: Fase Folicular <160 ng/L Periovulatorio 34-400 ng/L Fase luteínica 27-246 ng/L
	Hormona Estimulante Tireoide	Disfunção da tireoide / tumores	0,40-4,00 µUI/mL
	Hormona Folículo-Estimulante	Infertilidade Alterações do Ciclo menstrual	Fase Folicular 3,08 – 8,08 Meio Ciclo- 2,55 – 16,69 Fase Luteínica 1,38 – 5,47 µUI/mL

	Hormona Luteinizante	Disfunção da pituitária Infertilidade	Homem 0,8-7,6 mUI/mL Fase Folicular 1,1 -11,6 mUI/mL Ovulação 17,9- 77,0 mUI/mL Fase Luteínica <14,7 mUI/mL
	Testosterona Total	Tumores do ovário e glândulas adrenais, Hipogonadismo, Síndrome de Klinefelter, Hipopituitarismo e cirrose hepática.	Homem: 1,56 – 8,77 Mulher: 0,09-1,30 ng/mL
	Paratormona Intacta	Hiperparatiroidismo Hipercalcemia	15,0-68,3 pg/mL
	Prolactina	Amnorreia Galactorreia Desordens hipotálamo – pituitária Gravidez e stress	Homem: 2,5- 17,0 ng/mL Mulher ã grávida: 5,18-26,53 ng/mL
Anticorpos	Anti-TPO	Doenças autoimunes da Tireoide	<40,0 UI/mL
	Anti-TG	Tiroidite de Hashimoto e doença de Graves	<35,0 UI/mL

4.3 Avaliação Laboratorial

4.3.1 Serologia Infeciosa

No setor de imunologia, a pesquisa de agentes patogénicos realiza-se através da determinação sérica de Ag específicos ou Ac produzidos especificamente em resposta a essa infeção. Os Ac são divididos em quatro classes principais: IgM, IgG, IgA e IgE. Os Ac do tipo IgM, molécula de elevado peso molecular, são a primeira classe de anticorpos a ser produzida durante uma resposta imunitária. A pesquisa de Ac ou Ag específicos representa uma mais valia na deteção de infeções e também no seguimento de uma gravidez, uma vez que estas aumentam o risco de malformações fetais e de mortalidade neonatal. No Laboratório de Patologia Clínica o único teste realizado no equipamento VIDAS é a deteção

de Ac IgM e IgG Citomegalovírus (CMV), os restantes testes serológicos são determinados no equipamento ADVIA *Centaur* com o qual não foi possível trabalhar.

Ac IgM e IgG CMV

O CMV é um vírus pertencente à família *Herpesviridae*. Seres humanos de todas as idades são suscetíveis e a infeção propaga-se através de contacto sexual, exposição direta a fluidos corporais infetados, transfusões sanguíneas e transplante de órgãos (25-27). Embora a infeção por CMV seja, geralmente, assintomática, este vírus é um agente patogénico oportunista particularmente importante em pacientes imunocomprometidos (28). A suspeita clínica de infeção materna por CMV geralmente é confirmada pelo diagnóstico laboratorial, através da confirmação do título de anticorpos IgG e IgM.

IgG: Mantêm-se detetáveis após a infeção; usado como marcador de imunidade em resposta à infeção. Em conjunto com uma determinação IgM negativa é usado como marcador de infeção passada.

IgM: Produzido durante a fase aguda da infeção e nas reativações/reinfeções; pode persistir por meses ou anos. Quando positivo, é usado como marcador de infeção ativa. Sem soros anteriores comparativos, não corresponde a infeção primária ou reativação. Não prediz o risco de infeção fetal.

Interpretação dos resultados dados pelo VIDAS

Um resultado “**reativo**”, rácio (*Cut off*/Sinal da amostra) > 0,9 indica que os anticorpos IgG foram detetados na amostra.

Um resultado “**não reativo**”, rácio (*Cut off*/Sinal da amostra) < 0,7 indica que não foram detetados anticorpos IgG na amostra.

Quando o resultado varia entre 0,7 e 0,9, inconclusivo, repetem-se novamente as análises dentro de 2-3 semanas.

4.3.2 Marcadores Tumorais

Os marcadores tumorais são substâncias bioquímicas produzidas por células tumorais ou em resposta a tumores. Estes marcadores podem ser produtos endógenos que são produzidos a uma maior velocidade em células tumorais; ou o produto da expressão génica de substâncias, que em células normais permanece em repouso, como as substâncias produzidas, em situações normais, pelo tecido embrionário (29, 30).

A pesquisa contínua e adequada de marcadores tumorais no soro e outros fluidos corporais, durante o processo neoplásico, é de utilidade clínica no tratamento e acompanhamento de pacientes oncológicos (30, 31).

Alfa fetoproteína

A alfa fetoproteína (AFP) é uma glicoproteína, com massa molecular aproximadamente de 70 KDa. Esta é sintetizada pelo fígado fetal e saco vitelino durante o desenvolvimento embrionário. Após o nascimento, a síntese AFP diminui, e a sua concentração permanece baixa tanto em adultos como crianças saudáveis (32).

O doseamento desta proteína é importante no seguimento da terapia e monitorização do curso de determinadas patologias ou alterações fisiológicas.

Aumento: Gravidez, doenças benignas, doenças malignas, carcinomas hepatocelulares (33) e tumores de células germinativas (tumores dos testículos e ovários) (34-36). Patologias hepáticas não neoplásicas como cirrose hepática, hepatites agudas e crónicas, e também em neoplasias gastrointestinais.

O seu doseamento é realizado em amostras de soro pelo método de quimiluminescência no *Immulite 2000Xpi*.

Antigénio 15-3 do Cancro

O CA 15-3 é uma glicoproteína de 300-400 KDa produzida pelas células epiteliais glandulares. É um marcador tumoral, por excelência, do cancro da mama, pois é o mais sensível e específico deste órgão (37). A sua concentração varia de acordo com o estágio clínico e a massa tumoral, sendo que, o aumento de CA 15-3 correlaciona-se com a progressão da doença e a diminuição com a regressão da mesma (38).

Aumento: Doenças benignas, como hepatite crónica, tuberculose, sarcoidose e lúpus eritematoso sistémico.

Podem-se encontrar níveis elevados de CA 15-3 noutras neoplasias, como no cancro do ovário, do pulmão, do colo do útero, hepatocarcinoma e linfomas (39-41).

Antigénio específico da próstata

O antigénio específico da próstata (do inglês, *prostate specific antigen* - PSA) é uma glicoproteína monomérica com atividade proteolítica (42, 43). A sua função é transformar em líquido o sémen que coagula após a ejaculação, este encontra-se no citoplasma das células do epitélio do ducto prostático e em secreções de lúmen ductal (44).

Aumento: Tumor na próstata (Figura 16), hipertrofia benigna da próstata e condições inflamatórias de outros tecidos genitais adjacentes.

O doseamento de PSA por si só não é suficiente para o rastreio de cancro na próstata, uma vez que também se encontram concentrações elevadas de PSA em doentes com hipertrofia benigna da próstata. A combinação do doseamento de PSA com o exame rectal

por ecografia (endorectal), no caso de se encontrarem situações anormais, pode fornecer um melhor método na deteção de tumor na próstata do que só o exame rectal.

IMUNOLOGIA					26-12-2019	09-12-2019
ANTIGÉNIO ESPECÍFICO PROSTÁTICO (PSA)						
PSA Total	11,56	ng/mL	<4,00	14,29	13,99	
Determinação PSA Livre só efectuada se PSA Total entre 4,00 e 10,0 ng/mL						
- Segundo Norma DGS 060/2011 e sua actualização						
ENDOCRINOLOGIA						
				26-12-2019	09-12-2019	
Testosterona Total	5,06	ng/mL	1,56-8,77			

Figura 16. Boletim analítico de um homem de 80 anos diagnosticado com cancro da próstata. (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)

Antigénio 19-9 do Cancro

O antigénio 19-9 do Cancro (CA 19-9), também conhecido como antigénio de Lewis é uma glicoproteína produzida pelos canalículos biliares e pancreáticos humanos, bem como por células epiteliais do estômago, do cólon, endométrio e glândulas salivares. O CA 19-9 apresenta um peso molecular de 219 KDa e é utilizado como marcador de primeira escolha para suspeita de situações malignas do pâncreas e da vesícula biliar (45).

Aumento: Adenocarcinoma do pâncreas, pancreatite aguda e crónica (39, 46).

Antigénio 125 do Cancro

O antígeno 125 do cancro (CA 125) é uma glicoproteína do tipo mucina, produzida pelo gene MUC16 e está associada à membrana celular (47). O CA 125 é um marcador usado principalmente no carcinoma epitelial do ovário sendo também útil no diagnóstico de cancro do endométrio (48). A principal função do CA-125 é a monitorização da resposta terapêutica e deteção precoce de recidivas no caso de cancro epitelial do ovário, variando de acordo com o tamanho e o estágio (47).

Aumento: Cancro do ovário, endométrio, situações benignas como cirrose, quistos no ovário, endometriose, gravidez, hepatite e pancreatite (49).

Antigénio Carcinoembrionário

O antígeno carcinoembrionário (CEA) compreende uma família heterogénea de glicoproteínas com peso molecular que varia de 175 a 200 KDa. A sua função biológica não está totalmente definida, mas é conhecido por desempenhar um papel no

reconhecimento intercelular, regulação da resposta imunológica e metástase do cancro colorretal (50).

Os valores séricos em adultos saudáveis geralmente são inferiores a 5 ng/mL (51). Embora os valores séricos acima de cinco vezes a faixa normal usualmente indiquem malignidade, os valores observados em condições malignas e benignas podem se sobrepor consideravelmente, descartando o uso de CEA como um marcador para malignidade (52).

Aumento: Carcinoma colorectal, carcinoma pulmonar, gástrico, mama, pancreático, uterino, e ainda em situações benignas, tais como hepatites, cirrose hepática, enfisema pulmonar, colite ulcerativa, doença benigna da mama e em fumadores.

Microglobulina β_2

A β_2 microglobulina é um polipéptido de baixo peso molecular 11,8 KDa a qual é sintetizada pela maior parte das células nucleadas. O seu turnover corresponde a uma produção de aproximadamente, 150 mg/dia (53, 54). Cerca de metade da β_2 microglobulina plasmática renovada diariamente é de origem linfocítica.

A β_2 microglobulina circulante é filtrada ao nível do glomérulo renal para ser reabsorvida pelo tubo contornado proximal que assegura a sua degradação (55). Este é o parâmetro mais eficaz para a deteção das disfunções tubulares proximais (53).

Aumento: Doentes renais, doentes não renais e doentes imunocomprometidos ou com doenças autoimunes (53, 54), como em doenças como o lúpus eritematoso, a artrite reumatóide, o síndrome de *Sjögren*, as doenças malignas (mieloma múltiplo, linfoma de células B), em algumas doenças virais (hepatite ou HIV) (53,54).

4.3.3 Marcadores Doenças Autoimunes da Tireoide

Autoanticorpo Anti-Tiroperoxidase

Os autoanticorpos anti-tiroperoxidase (Anti-TPO) são autoanticorpos direcionados contra a enzima peroxidase da tireoide. Esta enzima catalisa a iodação da tirosina em tiroglobulina durante a biossíntese de T3 e T4 (56).

A doença autoimune da tireoide é o principal fator subjacente ao hipotireoidismo e hipertireoidismo e tende a ocorrer em indivíduos geneticamente predispostos (57).

Aumento: Tiroidite de Hashimoto e na maioria dos casos de doença de Graves (57). Níveis elevados de Anti - TPO, no contexto clínico de hipotireoidismo, confirma o diagnóstico da Tiroidite de Hashimoto.

Autoanticorpo Anti-Tiroglobulina

A tiroglobulina é produzida apenas pela glândula tiroide e é um componente importante do colóide folicular da tiroide (58). As hormonas tiroideias T4 e T3 são sintetizados a partir da tiroglobulina (59). Autoanticorpos contra tiroglobulina (Anti-TG) estão frequentemente presentes nos pacientes com doença autoimune da tiroide.

Os doseamentos de Anti-TPO têm maior sensibilidade e igual especificidade às determinações dos Anti-TG no diagnóstico da doença autoimune da tiroide (60).

Os níveis de Anti-TG devem, portanto, ser medidos apenas se as determinações de Anti-TPO forem negativas, mas se a suspeita clínica de doença autoimune da tiroide for alta.

A deteção de títulos significativos de autoanticorpos Anti-TG ou Anti-TPO é uma evidência de suporte para o diagnóstico da doença de Graves (61).

As determinações de Anti-TG têm maior utilidade na avaliação de doseamentos de tiroglobulina uma vez que os Anti-TG podem interferir nos imunoensaios competitivos e nos testes imunométricos de tiroglobulina (para monitorização de cancro da tiroide) (62).

4.3.4 Marcadores Cardíacos

Os marcadores cardíacos são substâncias secretadas no sangue quando ocorre uma lesão cardíaca. O doseamento destes marcadores é utilizado para diagnosticar, avaliar e monitorizar pacientes com suspeita de Síndrome Coronária Aguda (SCA), Enfarte Agudo do Miocárdio (EAM) e Insuficiência Cardíaca (IC).

D-Dímero

Os D-Dímeros são os produtos resultantes da degradação da fibrina, são fragmentos solúveis de composição muito heterogénea, que resultam da coagulação do fibrinogénio em fibrina estabilizada após ação da trombina e do fator XIIIa, e para além do processo de coagulação, resultam também do processo de fibrinólise, no qual a fibrina é degradada pela plasmina em fragmentos solúveis que são libertados na circulação sanguínea (63). O tamanho dos D-dímeros é variável, mas todos são caracterizados pela presença de um ou vários epítomos (63, 64). Apresenta uma elevada sensibilidade para a deteção de trombos oclusivos (65) e, portanto, os doseamentos quantitativos dos D-dímeros têm particular interesse no diagnóstico de exclusão da doença tromboembólica venosa (66).

Aumento: Multiplicidade de condições onde ocorre a ativação da coagulação e da fibrinólise (cirurgias, traumatismo, infeção, inflamação, gravidez, cancros) (65).

O doseamento dos D-Dímeros é realizado em amostras de soro pelo método ELFA no equipamento VIDAS.

Troponina

O complexo de troponina, composto pelas sub-unidades I, T e C, está ligado a finos filamentos miofibrilares do músculo estriado nos quais desempenha um papel na regulação da contração muscular mediada pelo cálcio (67). Existem isoformas distintas de troponina I e T nos miócitos cardíacos e podem ser especificamente determinadas por imunoensaios quando são libertadas na corrente sanguínea (68). Devido à sua elevada especificidade para o tecido miocárdico, a troponina cardíaca (I ou T) é o marcador preferencial para a deteção de lesão miocárdica e tornou-se no padrão para o auxílio ao diagnóstico de EAM no contexto clínico de isquemia cardíaca (69).

Os níveis de troponina I cardíaca (cTnI) aumentam rapidamente após o aparecimento de lesão miocárdica e descem para níveis normais no espaço de 7 dias (70). Face a este padrão de aumento e de diminuição dos valores, recomenda-se que se efetuem medições em série de cTnI com amostras de sangue colhidas aquando da apresentação e após 6–9 horas. O seu doseamento é realizado em amostras de soro pelo método *ELFA* no equipamento *VIDAS*.

Mioglobina

A mioglobina é uma proteína hémica, capaz de fixar o oxigénio de forma reversível e assim favorecer a sua difusão nas células musculares. Apresenta peso molecular de 17,8 KDa e armazena-se no citoplasma, o que explica o facto da sua libertação ser rápida ao nível das células musculares danificadas. Este aumento rápido da concentração da mioglobina no sangue, faz desta uma molécula útil para o diagnóstico precoce do EAM (71, 72).

Aumento: Patologias de origem cardíaca (enfarto, cirurgia cardíaca), patologias de origem muscular (exercício intenso, distrofia muscular, rabdomiólise) ou renal. Portanto, o aumento da concentração de mioglobina no sangue deve ser associado a outros critérios para confirmar a hipótese de um enfarte do miocárdio (73-75). O seu doseamento é realizado em amostras de soro pelo método *ELFA* no equipamento *VIDAS*.

Fragmento N-terminal do péptido natriurético tipo B

Os péptidos natriuréticos, ANP (*atrial natriuretic peptide*), BNP (B de *brain*) e CNP (C-tipo natriurético péptido) constituem uma família de polipéptidos de origem essencialmente cardíaca, tendo um efeito natriurético (aumento da eliminação urinária do sódio), diurético e vasodilatador (antagonismo do sistema renina angiotensina).

O NT-proBNP (fragmento N-terminal) é clivado a partir do péptido precursor proBNP em quantidades proporcionais ao seu homólogo biologicamente ativo, o BNP e em estreita correlação com a gravidade da insuficiência cardíaca (76). O BNP é secretado

principalmente pelos miócitos do ventrículo esquerdo em resposta a uma dilatação ventricular excessiva. Na presença de uma anomalia ventricular esquerda, observa-se um aumento da concentração sanguínea de BNP mas também do NT-proBNP.

Aumento: Insuficiência renal (77), insuficiência cardíaca ventricular esquerda (permite, nomeadamente, diferenciar a origem de uma dispneia, entre cardíaca e pulmonar (78).

O doseamento é realizado em amostras de soro pelo método ELFA no equipamento VIDAS.

4.3.5 Estudo da fertilidade e gónadas

Os testes da função gonadal são úteis para a avaliação de patologias como o hipogonadismo no homem, distúrbios menstruais, problemas de fertilidade e hirsutismo na mulher. Os principais parâmetros determinados são a hormona luteinizante (LH), a hormona foliculoestimulante (FSH), a progesterona, a testosterona, o estradiol e a prolactina. No laboratório de Patologia Clínica, estes doseamentos são efetuados por imunoensaio enzimático com leitura por quimioluminescência no *Immulite 2000*.

Estradiol

Os estrógenos estão envolvidos no desenvolvimento e conservação do fenótipo feminino, maturação das células germinativas e na gravidez (79). Eles são também importantes para muitos outros processos não-específicos, incluindo crescimento, maturação do sistema nervoso, metabolismo ósseo e capacidade de resposta endotelial.

O estradiol (E2) é uma hormona esteroide produzida maioritariamente pelos ovários, mas também em pequenas quantidades nos testículos (80) (responsável pela aromatização da testosterona) e nas glândulas suprarrenais (81). O doseamento do E2 sérico é parte integrante da avaliação da função reprodutiva em mulheres, incluindo avaliação da infertilidade, amenorreia e status da menopausa. Além disso, é amplamente utilizado para monitorar a indução da ovulação, bem como durante a preparação para fertilização *in vitro*.

Aumento: Gravidez e no caso de tumores produtores de estrogénios (tumores de ovários/ ou testículos ou hiperplasia do córtex suprarrenal).

Diminuição: Menopausa, insuficiência ovárica e hirsutismo.

Hormona Folículo-Estimulante e Hormona Luteinizante

A LH e a FSH são glicoproteínas, ambas hormonas gonadotróficas, que regulam dinamicamente o crescimento e o funcionamento das gónadas. O LH tem várias funções que diferem entre homens e mulheres. Em ambos os sexos, o LH contribui para a

maturação das células germinativas primordiais. No entanto a LH, nos homens, faz com que as células de Leydig dos testículos produzam testosterona (82) e a FSH induz a espermatogénese (83). Nas mulheres, o LH desencadeia a síntese de hormonas esteroides. Além disso, ajuda a regular a duração do ciclo menstrual, desempenhando papéis tanto na ovulação quanto na implantação de um óvulo no útero. Na mulher, o LH e o FSH estimulam o crescimento e amadurecimento do folículo, atingindo um pico de LH no momento de ovulação (84).

A determinação em conjunto de LH e FSH está indicada em doenças congénitas com anomalias cromossómicas (síndrome de Turner), ovários poliquísticos, determinação das causas de amenorreia, menopausa e infertilidade (85).

Testosterona Total

A testosterona é a principal hormona androgénica. No homem é responsável pelo desenvolvimento dos genitais e características sexuais secundárias, como a próstata, as vesículas seminais e o crescimento de barba, pelos púbicos e axilares, enquanto na mulher é o principal precursor do estrogénio, hormona essa responsável pela ovulação e pelas características femininas. Nos homens, a testosterona é sintetizada maioritariamente pelas células de Leydig e nas mulheres pelos ovários e glândulas adrenais. A produção de testosterona nos testículos e ovários é regulada pelo eixo Hipotálamo-Pituitária, envolvendo a LH.

Aumento: Nos homens, resistência completa aos andrógenos (feminização testicular) (86). As causas comuns do aumento dos níveis séricos de testosterona nas mulheres incluem ovários policísticos, tumores ovarianos, tumores adrenais e hiperplasia adrenal. A virilização em mulheres está associada à administração de andrógenos e à superprodução endógena de testosterona.

Diminuição: Hipogonadismo, orquiectomia, tratamento com estrogénios, síndrome de *Klinefelter* e cirrose hepática. Nas mulheres, os níveis de testosterona são normalmente muito mais baixos do que os encontrados no homem saudável.

Prolactina

A prolactina (PRL) é uma hormona polipeptídica da pituitária anterior com um peso molecular de aproximadamente 22,8 KDa. Desempenha um papel principal na secreção do leite materno e tem a capacidade de inibir a função gonadal.

A determinação da prolactina é uma ferramenta importante na investigação da amnorreia, galactorreia e desordens hipotálamo – pituitária. Durante a gravidez, os valores da

prolactina aumentam 10 a 20 vezes, voltando ao normal após o parto – num prazo de 3 semanas para as mães que não amamentam.

Aumento: Mulheres sob terapia com estrogénios ou uso contraceptivos orais, stress e durante o sono.

4.3.6 Estudo da função da Glândula Tiróide e Paratiroide

Hormona Estimulante Tiroide

A hormona estimulante da tiroide ou tirotrofina (do inglês, *thyroid stimulating hormone* — TSH) é uma hormona pituitária que, através da sua ação sobre a glândula tiróide, assume um papel primordial na manutenção de níveis séricos normais das iodotironinas tiroxina (T4) e triiodotironina (T3). TSH apresenta um pequeno ritmo circadiano, e por este motivo a hora da colheita deve ser levada em conta. Os níveis mais altos prevalecem entre as duas e as quatro horas da manhã e os mais baixos entre as cinco e as seis horas da tarde (30). O doseamento da TSH é o teste mais indicado no diagnóstico das anomalias das hormonas da tiroide, sendo usado como teste inicial no estudo da função tiroideia, é também útil na monitorização terapêutica de substituição das hormonas da Tiroide (Figura 17).

Aumento: Hipotiroidismo primário

Diminuição: Hipotiroidismo secundário e terciário (doenças hipofisárias e hipotalâmicas respetivamente), os níveis de TSH no soro são baixos em todas as formas de hipertiroidismo exceto em casos raros como num tumor hipofisário secretor de TSH.

Tiroxina - T4

A principal hormona da tiroide, T4, circula maioritariamente ligada às proteínas de transporte, sendo a mais importante a TBG. Concentrações alteradas das proteínas de transporte induzem alterações nos níveis circulantes de T4. Por esta razão, os doseamentos do T4 total nem sempre refletem o verdadeiro estado da tiroide.

Os níveis de T4 total podem ultrapassar os valores normais enquanto o T4 livre permanece normal. Por outro lado, os doentes com disfunção da tiroide e níveis alterados de TBG podem ter valores normais de T4 total erróneos. Uma vez que níveis alterados de T4 total podem indicar uma alteração da função tiroideia ou uma variação fisiológica ou patológica das proteínas de transporte, os doseamentos de T4 livre correlacionam-se melhor com a função tiroideia do que os doseamentos de T4 total.

Aumento: Hipertiroidismo e disfunções da tiroide.

Triiodotironina - T3

Embora esteja presente em menor concentração do que a T4, a T3 apresenta uma maior atividade metabólica, maior atividade metabólica intrínseca, rápida taxa de síntese e degradação e maior volume de distribuição (87). A maioria da T3 é produzida a partir da conversão extratiroidal da T4. A T3 circula praticamente na totalidade ligada às proteínas transportadoras: TBG, pré-albumina e albumina. Na presença de valores elevados de T4 total ou livre, o doseamento de T3 total ajuda a confirmar o diagnóstico de hipertireoidismo.

Aumento T3 total: Tirotoxicose, gravidez, uso de contraceptivos orais, da terapia com estrogénios.

Aumento T3 Livre: Reflete o estado da tireoide de forma mais fidedigna do que a T3 total. Valores de T3 não devem ser usados por si só na avaliação da função tireoideia de um indivíduo, mas devem ser considerados valores do T4, TBG e do TSH bem como outros dados clínicos.

Paratormona Intacta

A paratormona intacta (PTH) é um polipéptido de uma única cadeia sintetizada e secretada pelas glândulas paratiroides com uma função crucial na manutenção da concentração do cálcio, como também responsável pela regulação da concentração de fósforo na corrente sanguínea. No osso, a PTH é responsável pela libertação de cálcio, através de um aumento da reabsorção óssea. No rim provoca um aumento da reabsorção de cálcio e diminuição da reabsorção de fosfato. A nível intestinal promove a formação da vitamina D ativa (1,25-dihidroxitamina D), que por sua vez estimula a absorção intestinal de cálcio e fosfato. O seu doseamento é indicado para monitorizar os pacientes que têm doenças que causam desequilíbrios crónicos de cálcio, tumores da paratiroide, para distinguir doentes com hiperparatireoidismo, hipoparatiroidismo ou hipercalcemia maligna.

Aumento: Hiperparatireoidismo, insuficiência renal crónica, deficiência de vitamina D e na hipercalcúria.

Diminuição: Hipercalcemia maligna, hipoparatiroidismo, doença autoimune.

TIROTROFINA (hTSH)	0,398	µUI/mL	0.40-4.00
TRIIODOTIRONINA LIVRE (T3 Livre)	1,8	pg/mL	2.6-5.4
TIROXINA LIVRE (T4 Livre)	1,15	ng/dL	0.89-1.76
Paratormona intacta (PTHi)	52,0	pg/mL	15 - 68.3

Figura 17. Boletim analítico referente a uma paciente do sexo feminino, 91anos, Doente Renal Crónica. (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)

Competências Adquiridas

O setor de imunologia/endocrinologia foi o setor que permaneci menos tempo, devido ao facto de a quantidade de amostras ser reduzida. De forma geral, aprendi a trabalhar com ambos os equipamentos, observei o orientador a realizar diferentes análises, no entanto trabalhei pouco tempo de forma autónoma. Realizei a manutenção mensal e semanal no equipamento *Immulite 2000*, realizei os controlos dos parâmetros solicitados pelo equipamento e processei a rotina com o orientador. Adquiriti competências relativamente aos imunoensaios realizados, interpretei boletins e valores obtidos pelo equipamento, aprendi sobre o funcionamento destes equipamentos e desenvolvi espírito crítico. Como foi o setor com menor permanência, pesquisei bastante na bibliografia para compreender melhor todo o processo analítico e o significado clínico.

Os parâmetros mais requisitados foram as hormonas da tiroide e os marcadores cardíacos, os menos solicitados foram os parâmetros referentes à fertilidade. Portanto considero que se permanecesse mais tempo neste setor seria mais enriquecedor, no entanto, atingi as competências básicas para manusear as amostras e trabalhar com os respetivos equipamentos.

5. Química Clínica

A Química Clínica é uma área multidisciplinar que tem como objetivo a determinação de parâmetros bioquímicos para auxiliar no diagnóstico, tratamento, monitorização ou prevenção de determinadas patologias. A este setor do laboratório chegam tubos de soro e frascos de urina para análise.

Na triagem das amostras, os tubos são centrifugados a 3500 RPM durante 10 minutos e posteriormente distribuídos, de acordo com os parâmetros em estudo, pelos vários equipamentos automáticos. Para determinações no equipamento automático *Olympus AU680* chegam os tubos sem anticoagulante. As eletroforeses de proteínas também se realizam neste setor, as quais são efetuadas no equipamento automático concebido para este fim, o *MiniCap*.

Neste setor realiza-se também o exame de urina de 24 horas, que se destina a avaliar a função renal, ou seja, detetar possíveis alterações renais através da determinação da concentração de algumas substâncias na urina como: Clearance de Creatinina que avalia a taxa de filtração dos rins, proteínas como a albumina/microalbumina, e também determinações do Sódio, Cálcio, Ácido Úrico e Potássio.

As urinas 24h que chegam a esta seção são medidas e colocadas em tubos próprios para a análise dos metabolitos e proteínas no equipamento *Olympus AU680*.

Neste capítulo, são apresentados os equipamentos automáticos com os quais tive oportunidade de trabalhar e as suas metodologias e os parâmetros que determinam.

5.1 Olympus AU680

O *Olympus AU680* é um autoanalisador de diagnósticos *in vitro* o qual realiza determinações analíticas em amostras de soro e urina. Neste equipamento (Figura 18) são realizadas determinações em grande fluxo, como a atividade de enzimas, proteínas, metabolitos, entre outros (Tabela 12).



Figura 18. Equipamento automático, Olympus AU680, presente no setor de Química Clínica. (Fotografia obtida no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)

As técnicas realizadas pelo autoanalisador dividem-se segundo o seu princípio analítico: espectrofotometria e potenciometria. Relativamente aos métodos analíticos eles dividem-se em colorimétrico, turbidimétrico, enzimático/cinético-colorimétrico/UV e ISE indireto (Eléctrodo Seletivo de Ião).

Espectrofotometria É a medição da cor numa solução, determinando a quantidade de luz absorvida no espectro ultravioleta, infravermelho ou visível (88). Mede a absorção de um comprimento de onda dentro do espectro UV – IV. A Lei de *Beer-Lambert* (89) afirma que a quantidade de luz de um determinado comprimento de onda absorvida por uma substância ao longo de uma distância constante (caminho da luz) é proporcional à concentração dessa substância.

Potenciometria A potenciometria é um princípio amplo, sendo os ISEs, apenas uma pequena parte deste campo da eletroanalítica (90). O potencial é medido sob condições de ausência de corrente. Desenvolve-se um potencial eléctrico para cada ião, e quando comparado com o potencial do eléctrodo de referência, gera-se um sinal que resulta num valor que é proporcional à concentração do analito em estudo. O modulo ISE do equipamento *Olympus AU680* (91) opera por potenciometria e integra dois eléctrodos de membrana éter-coroa para sódio e potássio, um eléctrodo de membrana de policloreto de vinil (PVC) orientada a nível molecular para o cloreto e um de referência. Quando comparado com uma referência interna, este potencial eléctrico é convertido em voltagem e seguidamente na concentração de iões da amostra.

Tabela 12. Parâmetros determinados pelo equipamento Olympus AU680 e o respetivo método.

Parâmetro	Método Analítico	Descrição
Ácido Úrico Colesterol HDL LDL Triglicérideos Lactato	Enzimático colorimétrico	Através de uma reacção catalisada por uma ou mais enzimas e um sistema cromogénio, forma-se um complexo colorido cuja absorbância medida é directamente proporcional à concentração do analito na amostra.
Albumina Bilirrubina Direta Bilirrubina Total Ferro GGT Magnésio Proteínas Totais Proteínas Urinárias UIBC	Colorimétrico	Nas reacções colorimétricas, o produto formado tem uma cor e a intensidade dessa cor é medida através da absorbância. O valor do sinal ótico é proporcional à concentração do analito na amostra.

Amilase ALP		
ALT AST LDH Creatinoquinase Ureia	Cinético UV	Após reação forma-se um composto que absorve na zona da radiação UV. A velocidade da formação desse composto é medida por intervalo de tempo.
Bicarbonatos	Enzimático UV	Através de uma reação catalisada por uma ou mais enzimas, forma-se um composto cuja absorbância (na zona da radiação UV) medida é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra.
Cálcio	Colorimétrico	Método Arsezano III
Proteínas do complemento C3 e C4; Microalbumina; PCR Ferritina IgA; IgG; IgM; Fator Reumatóide ASO	Imunoturbidimétrico	Este método utiliza a ligação de antígeno e anticorpo para determinar a concentração do analito de interesse. Os complexos imunes formados na solução difundem a luz em proporção à sua dimensão, forma e concentração. Em condições de excesso de anticorpos, quantidades crescentes de antigénio resultam numa maior difusão. Os turbidímetros medem a redução da luz incidente devido a reflexão, absorção ou difusão
Creatinina	Cinético colorimétrico. Método de Jaffé	Após reação forma-se um composto colorido que absorve na zona do visível. A velocidade da formação desse composto é medida em diferentes intervalos de tempo.
Fósforo Inorgânico	Fotométrico por U.V.	Após adição de um reagente forma-se um composto que absorve radiação na zona da radiação UV
Glicose	Enzimático por U.V.	Método da hexoquinase
CK-MB	Imunoibição enzimática	

Fonte: Bulas do equipamento Olympus AU680.

5.1.1 Avaliação Laboratorial

Metabolismo da Glicose

Glicose

A glicose provém do metabolismo dos carboidratos e constitui a principal fonte de energia utilizada pelo corpo. Os níveis de glicose no sangue são regulados pela insulina e pelo glucagon (88, 92).

Aumento: Insuficiência na quantidade ou eficácia da insulina, diabetes *Mellitus*, diabetes gestacional, hepatite aguda, pancreatite aguda, hemacromatose, síndrome de Cushing, fármacos como estrogênios e corticosteroides.

Diminuição: Defeitos congênitos enzimáticos, doença hepática, alcoolismo, tumores pancreáticos produtores de insulina (insulinomas), anticorpos insulina, neoplasmas não pancreáticos, deficiência de glucagon, desnutrição septicemia e insuficiência renal.

Lactato

O L-lactato é o produto final da glicólise anaeróbica. A concentração de lactato é uma medida do metabolismo anaeróbico, que ocorre quando as células não estão a ser oxigenadas o suficiente para suportar a produção de energia aeróbica (88, 92).

A determinação do lactato é utilizada para monitorização da acidose metabólica e láctica.

Aumento: Hipoperfusão, hipoxia, exercícios físicos intensos, insuficiência hepática ou renal.

Metabolismo dos Lipídios

Colesterol

O colesterol é um componente essencial das membranas das células e lipoproteínas e além disso, é um precursor para a síntese de hormonas esteroides e ácidos biliares. O colesterol total é útil na avaliação do risco de doença cardíaca ou aterosclerose. É solicitado em combinação do HDL (*High density lipoprotein*), LDL (*Low density lipoprotein*) e triglicerídeos (Figura 19) (88, 92).

Aumento: Diabetes *Mellitus*, gravidez, obesidade, álcool, tabagismo, cirrose biliar, insuficiência renal, hiperlipoproteinemia e neoplasias do pâncreas.

Diminuição: Desnutrição, doença hepática, doenças mieloproliferativas, anemias crónicas, stress e doença de *Tangier*.

HDL - O colesterol HDL corresponde ao colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidade. As HDL removem o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, para ser metabolizado ou excretado. No fígado é transformado em ácidos biliares que são excretados para os intestinos através das vias biliares.

LDL - As lipoproteínas de baixa densidade, transportam uma grande parte do colesterol do fígado até aos tecidos periféricos, onde irá ser utilizado. O LDL é responsável pelos depósitos do colesterol nas paredes das artérias, formando as placas da aterosclerose.

Triglicerídeos

Os triglicerídeos são uma fonte importante de energia para o corpo e são armazenados no tecido adiposo na forma de glicerol, monoglicerídeos e ácidos gordos. As determinações de triglicéridos são utilizadas para o diagnóstico e tratamento de doentes com pancreatite aguda e crónica, diabetes *mellitus*, obstrução biliar extrahepática e outras doenças que envolvem o metabolismo dos lípidos ou outras desordens endócrinas e na avaliação dos fatores de risco para a aterosclerose e doença da artéria coronária (88, 92).

Aumento: Diabetes, hipotireoidismo, pancreatite, gota, hiperlipoproteinemia, doença renal crónica.

Diminuição: Desnutrição, hipertireoidismo, abetalipoproteinemia.

QUÍMICA CLÍNICA				12-12-2019
GLICEMIA	81	mg/dL		
	4.5	mmol/L		
			Normal:	< 100 mg/dL
			Alterada:	100 - 125 mg/dL
			Diabetes:	> 125mg/dL (em 2
				doseamentos diferentes)
TRIGLICERÍDOS	190	mg/dL	40-160	
	2.15	mmol/L	0.45-1.81	
COLESTEROL HDL	60	mg/dL		
			Risco Aterogénico:	
			Baixo:	> 65
			Moderado:	45 - 65
			Elevado:	< 45
			Hiper-alfa-lipoproteinemia:	> 90
COLESTEROL TOTAL	183	mg/dL		
			Risco Aterogénico:	
			Baixo:	< 200
			Moderado:	200 - 240
			Elevado:	> 240
			Hipocolesterolemia:	< 90
COLESTEROL LDL	85	mg/dL	< 100	
			Risco Aterogénico:	
			Muito Baixo:	< 100
			Baixo:	100 - 130
			Moderado:	130 - 160
			Elevado:	> 160

Figura 19 Exemplo de um boletim analítico do Laboratório de Patologia Clínica com os respetivos valores de referência. (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).

Metabolismo Proteico

Proteína Total (Soro)

As proteínas totais consistem na soma da concentração das proteínas em circulação. A determinação de proteínas totais é utilizada no diagnóstico e no tratamento de diversas doenças que envolvem o fígado, os rins ou a medula óssea, bem como outras desordens metabólicas e nutricionais (88, 92).

Aumento: Desidratação, estados hipovolémicos e hipergamaglobulinemias.

Diminuição: Desnutrição, perda aumentada, doença hepática, síntese diminuída, catabolismo devido a febre/inflamação.

Proteína Total (Urina)

A medida de proteínas totais na urina é importante para o diagnóstico e tratamento de doenças associadas ao funcionamento dos rins, coração e tireoide (88, 92).

Aumento: Após exercício físico intenso ou na presença de gamopatias monoclonais, nefrite, nefropatia diabética ou infecções do trato urinário.

Proteína C reativa

A proteína C-Reactiva (PCR) é uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado em resposta à libertação de citocinas inflamatórias, como a interleucina-6 (88, 92).

Aumento: Inflamação aguda ou crónica, infeções por microrganismos, doenças autoimunes, neoplasias, enfarte agudo do miocárdio e doença renal crónica (Figura 20).

Albumina

A albumina é a proteína mais abundante no plasma humano, representando 55-65% do total de proteínas. As principais funções biológicas são o transporte e o armazenamento de vários compostos e manutenção da pressão oncótica (88, 92). A determinação de albumina é útil para avaliação do estado nutricional, doenças crónica e hepáticas (88, 92).

Aumento: Desidratação e estase venosa excessiva.

Diminuição: Síntese diminuída, má absorção, doenças hepáticas, desnutrição, síndrome nefrótico, enteropatia ou queimaduras, reação de fase aguda.

PROTEÍNA-C REACTIVA	35,5	mg/L	< 5.0
PROTEINÚRIA (Ocasional)	0,42	g/L	<0.12
PROTEÍNAS TOTAIS	68	g/L	66-87
ALBUMINA	39	g/L	35-52

Figura 20. Boletim analítico de um doente renal crónico com os respetivos valores de referência. (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).

IgA

A IgA é a imunoglobulina predominante em secreções: saliva, lágrima, leite, mucosas do trato gastrointestinal, trato respiratório e genitourinário. Também existe como forma sérica, contudo, o seu papel não é evidente. O seu principal papel é a ligação a microorganismos nas mucosas, protegendo assim o organismo (88, 92). A determinação de IgA é útil na detecção ou monitorização de gamopatias monoclonais de IgA e deficiências imunológicas relacionadas a IgA.

Aumento: Doenças hepáticas, tecido conjuntivo, infeções agudas e crónicas, doença renal (Figura 21) e também em gamopatias monoclonais, como mieloma múltiplo, amiloidose sistémica primária.

Diminuição: Pacientes com deficiências imunológicas primárias ou secundárias (Figura 23).

IgM

A IgM é a primeira imunoglobulina a responder à presença de antígenos. As suas funções na resposta imunitária são a aglutinação de patógenos e a ativação da via clássica do complemento (88, 92).

Aumento: Gamopatias monoclonais como no caso de macroglobulinemia de Waldenström e linfoma maligno, e em gamopatias policlonais como no caso de cirrose biliar primária.

IgG

A IgG é constituída por 4 subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e é a imunoglobulina mais abundante no sangue e a única imunoglobulina que atravessa a placenta. Está presente em todo o corpo e participa na defesa contra a invasão bacteriana e outros antígenos (88, 92).

Aumento: Gamopatias monoclonais como no mieloma múltiplo do tipo IgG, em linfomas, leucemias, em gamopatias policlonais, nas doenças imunes (lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatoide, síndrome de *Sjögren*), sarcoidose, doença hepática crónica, algumas doenças parasitárias e infeções crónicas ou recorrentes.

Diminuição: Agamaglobulinemia, Síndrome nefrótico, enteropatias com perda de proteínas e mielomas não-IgG.

Proteínas do complemento C3 e C4

O Sistema Complemento é composto por proteínas de membrana plasmática e solúveis no sangue que participam das defesas inatas (natural) e adquiridas (memória). Essas proteínas reagem entre si para opsonizar os patógenos e induzir uma série de respostas inflamatórias que auxiliam no combate à infeção.(93) O sistema de complemento pode ser

ativado por complexos imunes (via clássica), polissacarídeos bacterianos (via alternativa), ou pela via da Lectina. A via clássica do complemento consiste em mecanismos de reconhecimento (C1q, C1r, C1s), ativação (C2, C3, C4) e ataque (C5, C6, C7, C8, C9) (93).

Fator Reumatoide

O Fator Reumatoide (FR) é uma imunoglobulina da classe IgM dirigida contra determinantes antigénicos no fragmento Fc da IgG (88, 92). O FR é um autoanticorpo, que é sintetizado pelo sistema imunológico do organismo. Os autoanticorpos atacam os próprios tecidos do indivíduo, por lapso, identificando o tecido como "estranho". Embora o papel biológico do FR não seja bem compreendido, sua presença é útil como indicador da atividade inflamatória e autoimune. A determinação é útil no auxílio do diagnóstico de artrite reumatoide.

Aumento: Hepatite crónica, infeções virais crónicas, mononucleose infecciosa, artrite reumatoide, síndrome de *Sjögren*, doenças pulmonares crónicas e ativas.

IMUNOGLOBULINAS			
IgG	839	mg/dL	700-1600
IgA	534	mg/dL	70-400
IgM	126	mg/dL	40-230
FACTOR REUMATOIDE	<5	UI/mL	=< 14
C3	123	mg/dL	90-180
C4	27	mg/dL	10-40

Figura 21. Exemplo de um boletim analítico com os respetivos valores de referência. (Doente Renal Crónico 71Anos, Homem) (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).

Metabolismo do Ferro

Ferro

É um elemento presente no organismo constituinte da hemoglobina e mioglobina, bem como de várias enzimas, nomeadamente citocromo oxidase e peroxidases. O restante ferro no organismo encontra-se ligado à transferrina e armazenado na forma de ferritina. O nível de ferro no soro reflete o Fe³⁺ ligado à transferrina e não inclui o ferro presente no soro como hemoglobina livre (88, 92).

Aumento: Hemocromatose, hemossiderose, envenenamento agudo por ferro após administração de ferro por via oral ou parenteral, hepatite aguda, leucemia aguda, talassemia, contraceção oral e transfusões.

Diminuição: Anemia ferropénica, anemias de doenças inflamatórias crónicas, enfarte do miocárdio, hemorragia aguda ou recente, doença maligna e infeções agudas ou crónicas.

Capacidade de fixação de ferro insaturado

A determinação da capacidade de ligação do ferro insaturado (UIBC) em combinação com a de ferro é uma ferramenta de diagnóstico eficaz para deteção das várias doenças envolvendo ferro. A soma do UIBC e do ferro sérico fornecem o valor da capacidade de fixação do ferro total (TIBC). TIBC representa a concentração máxima de ferro que as proteínas séricas são capazes de ligar.

Aumento: Deficiência de ferro.

Diminuição: Doenças inflamatórias crónicas ou malignas.

Transferrina

A transferrina é a principal proteína do plasma para o transporte de ferro. A medição dos níveis de transferrina no plasma é útil no diagnóstico diferencial da anemia, e aumentarão com a anemia por deficiência de ferro. A transferrina é utilizada frequentemente em conjunto com o ferro para calcular a saturação de transferrina (88, 92).

Aumento: Gravidez, administração de estrogénio e anemia ferropénica.

Diminuição: Perda de proteínas, reação de fase aguda, inflamação aguda.

Ferritina

A ferritina é uma proteína de armazenamento celular de ferro. A determinação da ferritina no soro é útil na monitorização de pacientes com défice de ferro, resposta a terapia, diagnóstico diferencial de anemia ferropénica e anemia de doenças crónicas (88, 92).

Aumento: Doença hepática, alcoolismo, inflamação crónica (Figura 22), neoplasias, especialmente linfomas, leucemias, cancro da mama e neuroblastoma, sobrecarga de ferro, anemia sideroblástica, hemolítica.

Diminuição: Deficiência em ferro e pacientes em tratamentos de hemodiálise.

FERRO	14	µg/dL	60-180
TRANSFERRINA (TRF)	160	mg/dL	200-360
FERRITINA	813	ng/mL	10-120
CAPACIDADE TOTAL FIXAÇÃO FERRO	218	µg/dL	254-457
COEFICIENTE SATURAÇÃO TRANSFERRINA (Tsat)	6	%	15-50

Figura 22. Exemplo de um boletim analítico com os respetivos valores de referência. (Doente Renal Crónico, 91Anos, Mulher) (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).

Função Renal

Ureia

A ureia é sintetizada no fígado como o produto final do metabolismo das proteínas e dos aminoácidos. A maior parte da ureia produzida durante estes processos metabólicos é eliminada por filtração glomerular, sendo que 40-60% volta para a corrente sanguínea. A determinação da concentração de ureia é útil para avaliar a função renal e para monitorização de doentes renais crónicos (88, 92).

Aumento: Aumento do catabolismo proteico, glomerulonefrite aguda, nefrite crónica, rim policístico, necrose tubular, insuficiência renal aguda e insuficiência renal crónica.

Diminuição: Hidratação excessiva e lesão hepática grave.

Creatinina

A creatinina é formada devido à hidrólise da creatina e fosfocreatina no músculo, bem como pelo catabolismo proteico (ingestão de proteínas). Esta é livremente filtrada no glomérulo e secretada do túbulo proximal. A determinação da creatinina é útil para estabelecer um diagnóstico de insuficiência renal, determinação da taxa de filtração glomerular e avaliação da função renal (88, 92).

Aumento: Dieta (carne assada), doença muscular, azotemia, patologias renais (é necessária uma perda de mais de 50% da função renal para aumentar o nível sérico da creatinina)

Diminuição: Gravidez, fármacos e perda de massa muscular.

Ácido Úrico

O ácido úrico é um produto final do catabolismo das purinas, este é formado quando o DNA e RNA são degradados. A maior parte do ácido úrico é sintetizada no fígado e na mucosa intestinal. Dois terços são excretados pelos rins e um terço, pelo trato gastrointestinal (88, 92). O seu valor é utilizado para monitorização do tratamento da gota e quimioterapia de neoplasias.

Aumento: Insuficiência renal, gota, hiperuricemia, destruição aumentada de nucleoproteínas (Figura 23) .

Diminuição: Fármacos, Doença de *Wilson*, Síndrome de *Fanconi*, entre outros.

Microalbuminúria (Urina)

A microalbuminúria é definida como uma taxa de excreção de albumina entre 30-300 mg/24h. A microalbuminúria é considerada um indicador clinicamente importante de deterioração das funções renais em indivíduos diabéticos (88, 92).

Aumento: Nefropatia diabética, doenças cardiovasculares e disfunção renal.

URÊMIA	84	mg/dL	10-50
	13.9	mmol/L	1.7-8.3
CREATININA	1,58	mg/dL	0.66-1.09
ÁCIDO ÚRICO	8,5	mg/dL	2.4-6.8
	0.50	mmol/L	0.14-0.40
CREATININA (Urina ocasional)	0,76	g/L	0.28 -2.17

Figura 23. Exemplo de um boletim analítico com os respectivos valores de referência. (Doente Renal Crônico, 91Anos, Mulher) (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).

Função Hepática

Aspartato Aminotransferase

A aspartato aminotransferase (AST) está presente numa diversidade de tecidos, entre os quais se incluem o fígado, músculo cardíaco, sistema músculoesquelético, cérebro, rins, pulmões, eritrócitos e leucócitos, em concentrações mais elevadas no fígado e no sistema músculoesquelético.

A determinação de AST (Figura 24) é indicada no diagnóstico, diferenciação e monitorização de doença hepatobiliar, enfarte do miocárdio e lesão músculoesquelética (88, 92).

Aumento: Doença hepática, hepatite vírica, cirrose, colestase extra-hepática, distrofia muscular progressiva, pancreatite aguda.

Diminuição: Azotemia, deficiência de fosfatos e diálise.

Alanina Aminotransferase

A alanina aminotransferase (ALT) é uma aminotransferase que consiste num grupo de enzimas que catalisam a transformação reversível de ácidos α -keto em aminoácidos pela transferência de grupos amino. Visto que a atividade específica do ALT no fígado ser aproximadamente 10 vezes a do coração e do sistema músculo-esquelético, a atividade elevada de ALT no soro é considerada um indicador da doença parenquimal do fígado (88,

92). O ALT encontra-se no citosol de hepatócitos e níveis aumentados no soro indicam deterioração na integridade da membrana plasmática do hepatócito.

Aumento: Doenças hepáticas, incluindo hepatite vírica ou tóxica, cirrose e colestase extrahepática e mononucleose.

Diminuição: Azotemia, deficiência de fosfatos e diálise.

Gama Glutamil Transferase

A gama-glutamil transferase (GGT) pertence a um grupo de peptidases que catalisam a transferência de aminoácidos de um péptido para outro e atuam assim como transferases de aminoácidos. O GGT existe em todas as células do organismo, excepto nas dos músculos, contudo, a enzima existente no soro provem essencialmente do sistema hepatobiliar (88, 92).

Aumento: Obstrução biliar intrahepática ou extrahepática, hepatite infecciosa, fígado gordo, pancreatite aguda e crónica e fármacos.

Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (FA) encontra-se em quase todos os tecidos do organismo, mais concretamente nas membranas celulares. Apresenta-se sobretudo em elevados níveis no epitélio intersticial, túbulos renais, ossos (osteoblastos), fígado e placenta. A FA deriva do fígado e do sistema esquelético em proporções aproximadamente iguais (88, 92).

Aumento: Causas fisiológicas (gravidez), doença do fígado ou do trato biliar, doenças primárias dos ossos, nomeadamente osteomalacia, osteogénese imperfeita, intoxicação por vitamina D e tumores ósseos primários.

Diminuição: Hipoparatiroidismo, acondroplasia, doença óssea adinâmica em doentes em diálise, nanismo pituitário, doença crónica por radiação e má nutrição.

Bilirrubina

A maioria da bilirrubina produzida (85%) é derivada da fração heme da hemoglobina libertada pela decomposição dos eritrócitos senescentes, destruídos nas células do sistema retículo-endotelial do fígado, baço e medula óssea. Os restantes 15% resultam dos precursores dos eritrócitos, destruídos na medula óssea e do catabolismo de outras proteínas contendo o grupo heme como a mioglobina e os citocromos (94).

Direta/Conjugada: Como a bilirrubina é insolúvel no plasma, esta é transportada ligada à albumina até ao fígado onde vai ser conjugada com o ácido glicurónico tornando-a hidrossolúvel (Bilirrubina directa), sendo depois eliminada pela bília.

Indireta/não conjugada: é a substância que se forma no momento da destruição dos eritrócitos que depois é transportada para o fígado. Por isso, a sua concentração é maior e pode estar alterada quando existe alguma condição hemolítica.

BILIRRUBINAS			
Bilirrubina Total	0,63	mg/dL	0.2-1.2
	11	$\mu\text{mol/L}$	3-21
Bilirrubina Directa	0,10	mg/dL	0.02-0.25
Bilirrubina Indirecta	0,53	mg/dL	<0.75
ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)	22	U/L	<50
GAMA-GLUTAMILTRANSFERASE (GGT)	18	U/L	<55

Figura 24. Exemplo de um boletim analítico com os respetivos valores de referência (Doente Renal Crónico, 71Anos, Homem) (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP).

Função Pancreática

Alfa-Amilase

As amilases são um grupo de hidrolases que fracionam os hidratos de carbono complexos compostos por unidades de α -D-glicose. A concentração mais elevada está presente no pâncreas, onde esta é sintetizada (88, 92).

Aumento: Pancreatite aguda, parotidite, alcoolismo, insuficiência renal e doenças como a hepatite vírica, HIV, febre tifoide, sarcoidose e traumatismo no abdómen superior.

Diminuição: fibrose cística avançada e doença hepática.

Lipase

A lipase é produzida no pâncreas e é responsável pela hidrólise de ésteres de glicerol de ácidos gordos de cadeia longa insolúveis na água. A determinação da lipase no soro é utilizada exclusivamente para a investigação de anomalias do pâncreas (88, 92).

Aumento: Pancreatite aguda, episódios agudos de pancreatite crónica e pancreatite obstrutiva, insuficiência renal.

Função Cardíaca/Lesão Muscular

Creatina Quinase

A creatina quinase (CK), um dímero composto por subunidades M e/ou B que se associam para formar as isoenzimas CK-MM, CK-MB e CK-BB. Esta catalisa a fosforilação reversível da creatina por ATP. As medidas de CK são sobretudo utilizadas no diagnóstico e tratamento do enfarte do miocárdio, revelando-se também o indicador mais sensível de lesões musculares (88, 92).

Aumento: Necrose ou regeneração muscular, miopatias e rabdomiólise. A CK total também pode aumentar em doenças do sistema nervoso central.

LDH

A lactato desidrogenase, uma NAD⁺ oxidoredutase, catalisa a oxidação reversível do L-lactato em piruvato utilizando NAD⁺ como um aceitador de hidrogénio. Encontra-se em todas as células do organismo, mais concretamente no citoplasma (Figura 25) (88, 92).

O principal papel da LDH total reside na deteção de pequenas lesões nos tecidos.

Aumento: Enfarte do miocárdio, miocardite, arritmias cardíacas e lesões do fígado como hepatites.

CREATINA QUINASE (CK)	99	UI/L	<167
LACTATO DESIDROGENASE (LDH)	238	U/L	<247

Figura 25. Exemplo de um boletim analítico com os respetivos valores de referência. (Doente Renal Crónico, 91Anos, Mulher) (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)

Metabolismo Mineral e Ósseo

Fósforo inorgânico

As concentrações dos fosfatos no soro dependem da dieta e da variação na secreção de hormonas tais como a PTH. O fosfato intracelular ocorre sobretudo sob a forma de fosfato orgânico, contudo, existe uma pequena, mas extremamente importante fração sob a forma de fosfato inorgânico que, por se tratar de um substrato para fosforilação oxidativa, participa em reações relacionadas com a produção de energia metabólica (88, 92).

Aumento: Ingestão aumentada, como por exemplo no caso de terapia intravenosa e enemas de fosfato; excreção reduzida como no caso de insuficiência renal aguda ou

crônica, PTH baixo ou resistência a PTH, intoxicação por vitamina D, redistribuição de fosfato que ocorre na destruição celular neoplásica e rabdomiolise.

Diminuição: ingestão ou absorção reduzida de fosfato, deficiência de Vitamina D, uso de aglutinadores de fosfato orais, excesso de PTH primário.

Magnésio

O magnésio é um ião intracelular, é um fator essencial em diversas reações enzimáticas. O magnésio é regulado sobretudo pela velocidade da excreção renal de magnésio a qual, juntamente com o cálcio, está sujeita aos efeitos da hormona paratiroide (88, 92). O doseamento do magnésio é útil para o diagnóstico e monitorização de hipo- e hipermagnesemia particularmente na insuficiência renal

Aumento: Insuficiência renal, desidratação, acidose diabética grave e doença de *Addison*.

Diminuição: Distúrbios gastrointestinais, doença renal, diurese, diabetes, alcoolismo crónico, agentes diuréticos, hipertiroidismo, hipoparatiroidismo, hipercalcemia.

Cálcio

Os iões de cálcio são importantes na transmissão dos impulsos nervosos, são um cofactor em várias reações enzimáticas, são importantes na manutenção da contractilidade normal do músculo e no processo de coagulação.

A determinação do cálcio (Figura 26) é utilizada no diagnóstico e tratamento da doença da paratiroide, doenças ósseas, doença renal, doenças gastrointestinais. O cálcio total existente no soro é constituído pelo cálcio livre ou ionizado, cálcio ligado a proteínas, e cálcio ligado a um complexo, sobretudo a fosfato, citrato e bicarbonato (88, 92).

Aumento: Hiperparatiroidismo, insuficiência renal aguda/crónica, osteomalacia, tumor maligno e osteoporose aguda.

Diminuição: Hipoparatiroidismo, hiperfosfatemia, rabdomiólise, síndrome do choque toxico, alcalose respiratória.

CÁLCIO TOTAL	9,4	mg/dL	8.1-10.4
	2.4	mmol/L	2.0-2.6
FÓSFORO INORGÂNICO	3,60	mg/dL	2.7-4.5
	1.16	mmol/L	0.87-1.45

Figura 26. Exemplo de um boletim analítico com os respetivos valores de referência. (Doente Renal Crónico, 91Anos, Mulher) (Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)

Doenças Infeciosas

Anti-Streptolisina O

O *Streptococcus* do grupo A é uma das causas mais comuns de infecções bacterianas humanas, provocando doenças tais como febre reumática aguda e glomerulonefrite aguda (88, 95). Num indivíduo infetado, a hemolisina sintetizada por este grupo de microrganismos, a streptolisina O, age como um antigénio proteico ao qual o doente cria uma resposta de anticorpos. Os níveis de anticorpos anti-streptolisina O (ASO) aumentam numa semana e têm o seu pico 3 – 6 semanas após infeção.

Aumento: Febre reumática aguda, glomerulonefrite aguda, faringite aguda, sinusite, pneumonia, escarlatina séptica e gangrena.

Eletrólitos

Os eletrólitos afetam a maioria dos processos metabólicos. São essenciais na manutenção da pressão osmótica e a hidratação de vários compartimentos de fluidos corporais, pH adequado do organismo e regulação das funções cardíaca e muscular apropriadas. Os eletrólitos também se encontram envolvidos nas reações oxidação-redução e participam como partes essenciais ou, cofatores, nas reações enzimáticas (88, 95).

Sódio (Na^+) - O sódio é o principal catião do líquido extracelular. Desempenha um papel central na manutenção do equilíbrio osmótico e da eletroneutralidade.

Potássio (K^+) - O potássio é o principal catião intracelular. O potássio participa em inúmeros processos bioquímicos e desempenha um papel indispensável na manutenção da pressão osmótica celular. Cerca de 90% do potássio ingerido é absorvido pelo trato gastrointestinal, sendo 80% excretados pelos rins, e o restante, pelas fezes.

Cloretos (Cl^-) - O cloro é o principal anião extracelular. É importante na manutenção da neutralidade eletroquímica do líquido extracelular, incluindo o plasma. A maior parte do cloro ingerido é absorvido, e o excesso é eliminado pelos rins. A causa mais comum de distúrbio eletrolítico é a insuficiência renal, pressão arterial elevada (hipertensão), insuficiência cardíaca e doença hepática.

Aumento: Ingestão excessiva ou redução na eliminação de um eletrólito, ou redução diminuída.

Bicarbonato

As medições do bicarbonato (Figura 27) são utilizadas no diagnóstico e tratamento de várias patologias graves associadas a alterações do equilíbrio ácido-base no organismo.

A determinação do bicarbonato (HCO_3^-) é utilizada em conjunto com outras informações clínicas e laboratoriais para a avaliação do equilíbrio ácido base (88, 95).

Aumento: Acidose respiratória e alcalose metabólica.

IONOGRAMA			
Sódio	139	mmol/L	136-145
Potássio	4,5	mmol/L	3.5-5.5
Cloretos	102	mmol/L	98-109
BICARBONATOS			
	29	mmol/L	21-31

Figura 27. Exemplo de um boletim analítico com os respectivos valores de referência. (DRC, 91Anos, Mulher)
(Dados obtidos a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)

5.2 MiniCap

O *MiniCap* (Figura 28) é um sistema de eletroforese capilar automatizado usado para a separação das proteínas séricas e detecção de padrões de proteínas. O sistema utiliza dois tubos capilares em paralelo para fazer múltiplas separações eletroforéticas em simultâneo e com boa resolução. A separação ocorre em capilares de sílica, em função da sua mobilidade eletroforética e fluxo eletroosmótico a alta tensão num tampão alcalino. As proteínas são detetadas diretamente durante a migração, no final é lida a absorvância no espectro UV de cada fração que contém uma ou mais proteínas.



Figura 28. Equipamento destinado à realização de eletroforeses, Minicap da Sebia, presente no setor de Química Clínica. (Fotografia obtida no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)

5.2.1 Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar baseia-se na separação das proteínas pelo seu tamanho e outras propriedades físico-químicas, através do fluxo num tubo capilar (96, 97). As proteínas percorrem distâncias diferentes, formando bandas denominadas: albumina, alfa-1-globulina, alfa-2-globulina, betaglobulina-1, betaglobulina-2 e gamaglobulina. Essas bandas são, em seguida, quantificadas. Devido à sua alta resolução, a eletroforese capilar permite a separação de bandas pouco visíveis no método convencional, como os picos de *Beta-1* (transferrina e hemopexina) e *Beta-2* (complemento C3), resultando num padrão de seis bandas. O perfil eletroforético pode ser normal observando-se a presença das 6 bandas (Figura 29) ou alterado por situações fisiológicas e/ou patológicas, onde poderá apresentar bandas diminuídas ou ausentes, bandas com intensidade aumentada e bandas com mobilidade anormal.

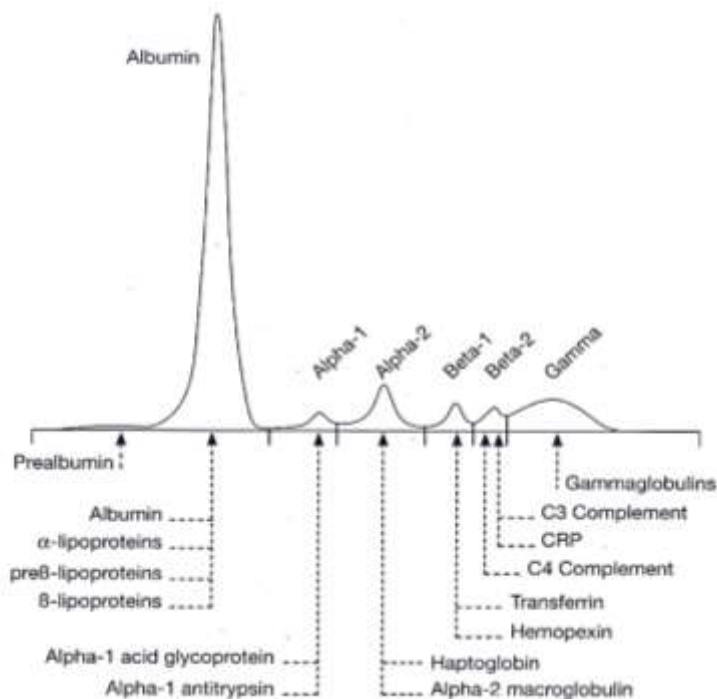


Figura 29. Padrão eletroforético normal e as respectivas proteínas presentes nas diferentes bandas. (Disponível em [Sebia - MiniCap](#))

A eletroforese das proteínas séricas é útil na monitorização de pacientes com gamopatias monoclonais, mieloma múltiplo, em estudos complementares de diagnóstico de doença hepática, hipo- e hipergamaglobulinemias, estados inflamatórios, neoplasias, distúrbios gastrointestinais, insuficiência renal, anemia entre muitas outras (92). O conhecimento dos principais componentes de cada banda eletroforética (Tabela 13) facilita o raciocínio clínico e auxilia na identificação de padrões eletroforéticos, característicos de algumas doenças.

Tabela 13. Valores de referência das frações das proteínas séricas.

Proteína	Valor de Referência g/L	Porcentagem %
Albumina	66-87	55,8 – 66,1%
Alfa-1 (α1- Antitripsina; α1- Glicoproteína ácida)	1,9-4,3	2,9– 4,9 %
Alfa-2 (α2- Macroglobulina; Ceruloplasmina; Haptoglobina; α- Lipoproteínas)	4,7-10,3	7,1 – 11,8 %
Beta 1 (Hemopexina; Transferrina; Plasminogénio; C3; β- Lipoproteínas)	3,1-6,3	4,7 – 7,2 %
Beta 2	2,1-5,7	3,2-6,5
Gama (Fibrinogénio; Imunoglobulinas; Proteína-C Reativa)	7,3-16,4	11,1 – 18,8 %
Relação Albumina/Globulinas		1,2-2,2

5.2.2 Avaliação Laboratorial

Albumina

A albumina corresponde ao maior pico no gráfico da eletroforese de proteínas. Esta é o principal componente proteico do soro e é produzida pelo fígado em condições fisiológicas normais (92, 98).

Aumento: Desidratação aguda.

Diminuição: Gravidez, analbuminemia, inflamações, doença hepática, glomerulopatias, lesão tubular, doença inflamatória intestinal, desnutrição proteica, linfomas, leucemias, hipertireoidismo e uso de corticóides. O aumento da intensidade da interzona albumina/alfa-1 globulina pode acontecer em casos de alcoolismo crônico e gravidez. A diminuição está associada à cirrose, hepatites e inflamações.

Alfa 1 globulina

Esta banda é composta principalmente pela alfa- 1-antitripsina. O restante (10%) deve-se à alfa- 1-glicoproteína ácida, AFP e certas proteínas carregadoras (92, 98).

Aumento: Reação de fase aguda, cirrose, disproteinemia familiar idiopática, Linfoma de *Hodgkin*, carcinomatose metastática, úlcera péptica, gravidez, enteropatia perdedora de proteína, stresse, colite ulcerosa, uso de estrogénios, corticoides e anti-inflamatórios.

Diminuição: Hepatites virais agudas, má-absorção, enfisema pulmonar, síndrome nefrótica e ao jejum prolongado.

Alfa 2 globulina

Composta maioritariamente pela haptoglobina, alfa-2 macroglobulina e ceruloplasmina (92, 98).

Aumento: Febre reumática, analbuminemia, senilidade, hipoalbuminemia, glomerulonefrite, cirrose, diabetes, disproteinemia familiar idiopática, Linfoma de *Hodgkin*, doença aguda, carcinomatose metastática, cirrose hepática, enfarto agudo do miocárdio, síndrome nefrótica, osteomielite, úlcera péptica, pneumonia, poliartrite nodosa, enteropatia perdedora de proteína, artrite reumatoide.

Diminuição: Doença de Wilson, desnutrição, síndrome nefrótica, e enteropatia de perda de proteínas.

Betaglobulina

A fração Beta 1 corresponde a transferrina e hemopexina e a fração Beta 2 corresponde ao complemento C3 (98).

Aumento: Reação de fase aguda, neoplasias, desnutrição proteico-calórica e na perda de proteínas (síndrome nefrótica, enteropatia perdedora de proteína) e obstrução biliar.

Diminuição: Má nutrição e alimentação pobre em proteínas.

Gamaglobulina

A fração gama corresponde à zona de migração das imunoglobulinas (G, A, M, D, E) (92, 98). A PCR está localizada na área entre os componentes beta e gama. A interpretação de variações nesta zona depende da faixa etária e também de um mínimo de informações clínicas.

Aumento: Doenças autoimunes como artrite reumatoide, síndrome de *Sjögren*, Lúpus eritematoso, esclerose sistêmica progressiva. Anticorpos contra proteínas virais: HIV, hepatite viral, meningite, infecção por citomegalovírus, Mieloma Múltiplo.

Diminuição Imunodeficiência, utilização de corticoides, terapia imunossupressora, quimioterapia ou radioterapia. Hipogamaglobulinemia do mieloma de cadeias leves.

5.3 CLINITEK Novus™

O analisador químico automático de urina *CLINITEK Novus™* (Figura 30) é um instrumento de análises à urina completamente automático. Destina-se a ser utilizado em diagnósticos *in vitro* (99). Este analisador destina-se à determinação dos seguintes componentes na urina: albumina, bilirrubina, sangue, creatinina, glicose, corpos cetônicos (ácido acetoacético), leucócitos, nitritos, pH, proteína, urobilinogénio, densidade, relação albumina-creatinina e relação proteína-creatinina. Estas medições são utilizadas para ajudar no diagnóstico de patologias relacionadas com o metabolismo dos hidratos de carbono (como a *diabetes mellitus*), função renal, função hepática, infecção do trato urinário, entre outras. O analisador indica a cor e a transparência da amostra. Este analisador lê a cor e a intensidade das placas de teste (tiras) e converte os resultados em unidades clinicamente significativas. Para testar as amostras, o sistema ótico inclui uma câmara digital a cores que grava uma imagem de um conjunto de placas de teste e, em seguida, analisa a cor e a intensidade da luz refletida por uma placa de teste que tenha apresentado reação. A concentração de cada analito é medida pela alteração da cor ocorrida quando uma amostra é depositada numa placa de teste. Pelo método de refratometria (índice de refração) é determinada a densidade, pelo método de turbidimetria (dispersão de luz) é determinada a turvação/transparência e pela fotometria de reflectância, é determinada a cor, pH, glucose, creatinina, corpos cetônicos, pigmentos biliares, urobilinogénio, nitritos, proteínas, hemoglobina e esterase leucocitária (99).



Figura 30 Equipamento destinado à realização da análise sumária da urina, CLINITEK Novus (à esquerda) e centrífuga destinada à obtenção do sedimento urinário (direita). (Fotografias obtidas a partir do sistema utilizado no Serviço de Patologia Clínica do HFAR-PP)

5.3.1 Urianálise

Após receção das urinas no laboratório, é efetuada na sala de triagem a separação dos frascos de urinas tipo II e urinas bacteriológicas. As urinas bacteriológicas seguem para o setor de Microbiologia e as urinas tipo II, seguem para o setor da Urianálise onde são analisadas no equipamento automático *CLINITEK Novus*. As urinas com parâmetros anormais, seguem para a centrífuga para posterior observação do sedimento urinário no setor de Microbiologia.

Urina Tipo II

A urina tipo II, também chamada de sumária é uma análise à urina onde são analisadas as características físicas e químicas e o exame microscópico do sedimento urinário. As amostras de urina devem ser analisadas o mais rápido possível nunca passando mais de duas horas entre o tempo de colheita e o tempo da análise para não falsear alguns resultados. A análise de urina fornece uma ampla variedade de informações clínicas úteis, no que respeita a patologias renais e do trato urinário inferior. A amostra utilizada é, preferencialmente, a primeira urina da manhã, fresca e homogeneizada. O exame físico e químico de urina é efetuado no equipamento *CLINITEK Novus* um sistema automatizado que permite a determinação semiquantitativa, de pH, leucócitos, nitritos, proteínas, glucose, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue, na urina, assim como a densidade, a cor e o aspeto.

5.3.2 Avaliação Laboratorial

Propriedades Físicas

Cor: Normalmente a cor da urina é amarela devido à produção e excreção constante do urocromo, no entanto esta pode estar alterada pela presença de sangue, hemoglobina, bilirrubina, corantes alimentares e alguns medicamentos (88, 92).

Amarelo – Normal

Verde- Infecção por *Pseudomonas sp.* ou corantes

Castanha- Pigmentos biliares ou contaminação por fezes

Preta- Melanoma, alcaptonúria, -metildopa

Vermelha- Hematúria ou rifampicina

Aspeto: Refere-se à transparência da amostra. Esta pode apresentar turvação em determinadas patologias. Pode ser devida à precipitação de fosfatos, quilúria, presença de leucócitos, bactérias ou hematúria (88, 92).

Exame químico semi-quantitativo

Densidade: O valor da densidade correlaciona-se com a osmolalidade urinária, ajudando a definir o estado de hidratação do doente. Reflete a capacidade do rim em concentrar a urina. Valores abaixo de 1,010 indicam hidratação relativa. Valores acima de 1,020 sugerem desidratação (88, 92).

pH: O pH pode variar entre 4,5 e 8. O pH normal é ligeiramente ácido – 5,5 a 6,5. As alterações do pH urinário geralmente são produzidas em resposta às variações do pH sérico. É útil na deteção de possíveis distúrbios eletrolíticos sistémicos de origem metabólica ou respiratória. A determinação do pH é também importante no diagnóstico e abordagem da litíase renal e infeções do trato urinário (ITU). A presença de uma urina alcalina num doente com ITU é sugestiva da presença de um organismo produtor de urease (como por exemplo – *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*) os quais se associam a cálculos de fosfato de amónia. Urina ácida e litíase é geralmente sinónimo de cálculos de ácido úrico (88, 92).

Hemoglobina: É avaliada através da reação colorimétrica que estima a presença do heme, permitindo inferir indiretamente sobre a presença de eritrócitos. A mioglobina é também identificada pela mesma reação. O valor de referência é ausência de hemoglobina ou

eritrócitos na urina (negativo) (88, 92). Um resultado positivo pode significar: hematúria, hemoglobinúria ou mioglobinúria. A hematúria pode ser consequente de traumatismos ou irritação do trato urinário, a hemoglobinúria pode ser consequência da lise dos eritrócitos nas vias urinárias ou hemólise intravascular. A mioglobinúria indica destruição muscular devido a esforços físicos.

Proteínas: A urina normalmente contém uma quantidade reduzida de proteína. Grande parte dessa proteína é do tipo albumina e mucoproteínas *Tamm-Horsfall* (88, 92). A presença de concentrações elevadas de proteínas na urina, >10 mg/dL é conhecida como proteinúria (100). Níveis baixos de proteína na urina são normais. Níveis transitoriamente altos de proteína na urina não são incomuns, particularmente em pessoas mais jovens após o exercício físico ou stress. Níveis persistentemente altos de proteína na urina podem ser um sinal de doença renal (permeabilidade glomerular alterada, albuminúria de origem renal, Glomerulonefrites, síndrome nefrótica, tuberculose renal, neoplasias renais).

Glicose: Em situações normais, a glicose é totalmente filtrada pelos glomérulos e é reabsorvida pelo túbulo proximal, ou seja, praticamente nenhuma glicose é excretada na urina, mas valores ≤ 15 mg/dL são considerados normais. No entanto, a capacidade do túbulo proximal de reabsorver glicose é limitada. Se a carga filtrada exceder a capacidade de reabsorção do túbulo proximal, uma parte da glicose será excretada na urina (88, 92). Assim, concentrações séricas elevadas de glicose (como observadas no diabetes *mellitus*) podem resultar em glicosúria. A glicosúria ocorre quando o limiar renal de absorção de glicose é excedido (normalmente > 180 mg/dL) (88, 92).

Corpos Cetónicos: Cetonas ou corpos cetónicos na urina são um sinal de que o corpo está a utilizar gordura para a obter energia em vez de utilizar a glicose. Isto pode ser devido ao baixo nível de insulina na corrente sanguínea, o qual não é suficiente para transportar glicose para o interior das células. A presença de corpos cetónicos na urina, cetonúria, pode ser devido a jejum prolongado, febre, cetoacidose diabética, vômitos, enterites, exercício extremo ou cetose alcoólica (88, 92).

Nitritos: A presença de nitritos na urina é um indicador de ITU, ou seja, presença de bactérias no trato urinário com a capacidade de reduzir os nitratos a nitritos (por exemplo: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp.) (88, 92). No entanto, a ausência de nitritos na urina não elimina a presença de uma possível infeção do trato urinário, uma vez que nem todas as bactérias produzem enzimas redutoras de nitratos a nitritos.

Leucócitos: Dada pela atividade da esterase dos granulócitos. A presença de leucócitos na urina normalmente é sugestivo de infecção, mas podem estar também presentes noutras situações, tais como traumas, uso de substâncias irritantes ou qualquer outra inflamação que não é causada por um agente infeccioso (88, 92).

Bilirrubina: A presença de bilirrubina na urina é observada em doenças hepáticas como a cirrose hepática, cálculos nos ductos do trato biliar, hepatites, obstrução biliar e hepatocarcinoma. A bilirrubinúria, em consequência da sua precocidade é, muitas vezes, a primeira indicação laboratorial da ocorrência de hepatopatia (88, 92).

Urobilinogénio: O urobilinogénio resulta da redução da bilirrubina no intestino por ação de enzimas de origem bacteriana. Uma parte do urobilinogénio formado é reabsorvido e outra é excretado na urina. A presença de urobilinogénio na urina ocorre sempre que há um aumento da destruição dos eritrócitos ou dos seus precursores como na anemia hemolítica e anemias megaloblásticas respetivamente (88, 92). A sua presença pode também estar associada com doenças e disfunções hepáticas como a hepatite infecciosa, hepatite tóxica, cirrose hepática e mononucleose infecciosa com comprometimento hepático.

Avaliação Microscópica - Sedimento Urinário

O sedimento prepara-se por centrifugação de 10 mL de urina a 1500 RPM durante 5 minutos. No final decantam-se 9 mL e ressuspende-se em 1mL final. Após obter este sedimento, este é observado ao microscópio ótico, pelo patologista clínico, onde é realizada a pesquisa de eritrócitos, leucócitos, bactérias, leveduras, células epiteliais de descamação e do epitélio, cilindros e cristais. A presença destes compostos em grande número pode estar associada a diferentes patologias.

Leucócitos: Característico de infecção.

Eritrócitos: Doença renal, alteração hematológica ou outra condição médica subjacente.

Bactérias ou leveduras: Sinal de infecção.

Cilindros: Proteínas em forma de tubo - podem formar-se como resultado de distúrbios renais.

Cristais: Formam-se a partir de produtos químicos na urina, podem ser um sinal litíase renal

Competências adquiridas

Durante a passagem por este setor, no qual permaneci durante 2 meses, foi possível adquirir conhecimentos aprofundados sobre a química clínica.

Contactei e operei com o equipamento automático *Olympus AU800*, compreendi o princípio das técnicas e métodos utilizados e estudei todos os parâmetros analíticos do âmbito da Química Clínica realizados neste laboratório. Além disso, compreendi a utilidade dos parâmetros no diagnóstico das diferentes patologias. Foi possível também interpretar e avaliar os resultados de acordo com o historial clínico dos pacientes.

Relativamente a manutenção e calibração deste equipamento, realizei todos os passos diariamente de acordo com o manual disponível no setor. Durante a permanência neste setor, realizei também a separação por alíquotas dos diferentes calibradores e controlos. Após esta divisão, estas alíquotas eram congeladas para uso individual, facilitando a realização das leituras de controlo. Adquiri também competências para utilizar o equipamento *MiniCap* autonomamente. Diariamente era realizada a leitura de um controlo interno juntamente com um tubo com água, pois este equipamento funciona com 2 colunas, e por isso só funciona com testes pares. Com este estágio foi possível também conhecer cada fração da eletroforese de proteínas, o seu significado clínico e possíveis patologias relacionadas com as diferentes alterações. Compreendi e identifiquei alterações no proteinograma de acordo com a literatura, comparei diferentes boletins de pacientes e desenvolvi capacidades do âmbito crítico.

O setor da urianálise foi o setor que estive mais confortável. Diariamente, às 11h da manhã, a auxiliar de saúde colocava todas as urinas na bancada e o respetivo código de barras de identificação. Cerca de 9mL de urina eram retirados do frasco original e colocados num outro tubo, adaptado para o sistema, *Clinitek Novus*, para efetuar a leitura. Nas urinas 24h, primeiro eram lidos os volumes e depois eram processadas. As urinas tipo II que estavam também destinadas a determinação de proteínas e outros parâmetros químicos eram separadas e colocadas num outro tubo e enviadas para o equipamento *Olympus*. Não tive oportunidade de observar os sedimentos nem de fazer contagem celular, pois esta função era destinada ao médico patologista. Nesta parte do estágio aprendi bastante sobre a utilidade dos parâmetros, a importância de homogenizar sempre as amostras, a manutenção do equipamento e os princípios utilizados pelo equipamento para obter os resultados e todos. De forma geral, adquiri competências para trabalhar autonomamente neste setor e avaliar as diversas situações recorrentes do laboratório.

6. Microbiologia

A valência de Microbiologia foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas de S. Lázaro, localizado em Braga, o qual é dirigido pelo Dr. Duarte Paiva. A orientação científica neste laboratório foi prestada pelo Dr. Jaime Peliteiro.

O principal papel do setor de Microbiologia é estabelecer o diagnóstico e o tratamento relacionado com doenças infecciosas de diferentes etiologias. Além da bacteriologia, o setor de microbiologia envolve também a área da micologia e parasitologia.

Neste setor é realizado o estudo bacteriológico, micológico e parasitológico das amostras, contemplando a observação microscópica, macroscópica e exame cultural dos diferentes produtos. Os produtos mais comuns que chegam ao setor são a urina, exsudados vaginais e uretrais, fezes e esperma. O processamento dos vários produtos biológicos compreende várias etapas, como a observação macroscópica e microscópica a fresco bem como após coloração, o exame cultural em diferentes meios de cultura, a execução de testes de rápidos e a identificação e antibiograma.

Neste setor está presente um aparelho que permite a identificação de estirpes microbiológicas e respetivo antibiograma, o *VITEK®2 Compact*, uma câmara de fluxo laminar, uma estufa, um microscópio Nikon Eclipse E4000 e um equipamento específico para avaliação qualitativa e quantitativa de esperma, denominado SQA-V Gold.

6.1 Exame Cultural

As tarefas que se realizam normalmente neste setor iniciam com a avaliação dos resultados do exame cultural incubados no dia anterior, a qual é realizada pelo Especialista responsável pelo setor. O responsável regista as amostras positivas e determina quais os testes que Técnico de Diagnóstico e Terapêutica responsável efetuará posteriormente.

O exame cultural é útil para isolar e identificar os microrganismos responsáveis pela infeção bem como as suas características, úteis para a escolha do tratamento. Além disso, a cultura permite uma melhor seletividade entre os diferentes grupos de microrganismos através das características macroscópica das colónias e das reações bioquímicas com o meio.

Durante o estágio, a técnica mais utilizada para o exame cultural foi a técnica de esgotamento a qual é efetuada com recurso a uma ansa de 1µL. Geralmente, após 24h de incubação as amostras são validadas e interpretadas pelo responsável pelo setor.

Para a validação dos resultados do exame cultural, o especialista tem em conta o historial clínico do paciente, os diferentes testes realizados, como urianálise e exame direto a fresco/coloração e respetiva observação macroscópica e microscópica.

Meios de Cultura

Um meio de cultura é uma preparação de nutrientes que permite o crescimento e desenvolvimentos de bactérias e fungos em laboratório. Existem diferentes meios de cultura, relativamente à consistência podem ser líquidos, sólidos ou semi-sólidos, quanto à composição podem ser sintéticos simples ou sintéticos complexos e quanto à finalidade podem ser seletivos, enriquecidos ou indicadores.

Tabela 14. Principais meios de cultura utilizados no setor de microbiologia

Meio	Características
CLED	Meio não seletivo e diferencial, utilizado para cultura de amostras de urina e espermocultura.
Gelose Sangue	Meio enriquecido e não seletivo que permite a observação da presença ou não de hemólise e o tipo de hemólise.
Gelose Chocolate	Meio enriquecido e não seletivo que favorece o crescimento de <i>Neisseria</i> spp. e <i>Haemophilus</i> spp.
MacConkey	Meio seletivo e diferencial para isolamento de bacilos Gram-negativo.
Sabouraud (Gentamicina + Cloranfenicol)	Meio seletivo para isolamento de fungos.
Granada	Meio seletivo para a deteção e a identificação direta de <i>Streptococos</i> do grupo B.
Manitol Salt Agar	Meio seletivo e diferencial para o isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp. e identificação presuntiva de <i>S. aureus</i> .
SS	Meio seletivo para isolamento de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> .
Hektoon	Meio seletivo diferencial para o isolamento de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp.
Selenito	Meio líquido de enriquecimento para <i>Salmonella</i> spp.

6.2 Colorações

Na rotina do LACSL são realizadas as colorações de Gram e Kinyoun após a preparação de esfregaços a partir dos produtos recebidos ou do exame cultural.

6.2.1 Coloração de Gram

A coloração de Gram (101) é utilizada para diferenciar as bactérias pelas características das paredes celulares. Esta coloração permite dividir as bactérias em dois grupos: gram-positivas e gram-negativas (102). As bactérias gram-positivas apresentam uma camada espessa de peptidoglicano na parede celular (102), a qual é responsável por reter a solução cristal violeta. As células gram-negativas apresentam uma membrana externa e uma fina camada de peptidoglicano, o que permite que o violeta cristal seja expulso com a adição de etanol. Portanto, as bactérias gram-positivas são coradas de violeta/roxo, enquanto que as bactérias gram-negativas são coradas rosa ou vermelho pela coloração contraste. Para a realização desta técnica são necessárias quatro etapas: Aplicação da solução de cristal violeta; Adição de Lugol (iodeto de potássio ou Iodo), o qual se liga ao cristal violeta e o retém na célula. Descoloração com um descorante, normalmente álcool-acetona e finalmente aplicação de contraste com solução de safranina.

6.2.2 Coloração de Kinyoun

A realização da coloração de Kinyoun é indicada para observar e identificar bactérias que contêm elevada concentração de ácido micólico na parede celular, como acontece com *Mycobacterium* spp.. A presença deste ácido nas micobactérias, torna-as resistentes à descoloração com soluções de ácido-álcool (103, 104) e, portanto, designadas por Bacilos Ácido-Álcool Resistentes.

Este método divide-se em 3 etapas. A primeira, aplicação do corante, utiliza uma solução de carbolfucsina a qual é constituída por fucsina básica e fenol.

Na etapa seguinte, descoloração, é utilizada uma solução de ácido sulfúrico e álcool etílico. Estas soluções permitem a remoção do corante de todas as estruturas, no entanto os Bacilos Ácido-Álcool Resistentes, retêm a fucsina básica permanecendo corados. Numa última etapa, é aplicado um contraste, o azul de metileno, o qual confere uma coloração azul aos restantes microrganismos e estruturas. Observando microscopicamente, os Bacilos Ácido-Álcool Resistentes aparecem corados de vermelho sobre um fundo azul (105, 106).

6.3 Processamento de produtos

6.3.1 Urina

Após análise sumária da urina, alguns frascos são enviados para o setor de microbiologia para estabelecer o exame bacteriológico/micológico/parasitológico.

De forma a obter resultados fidedignos, a urina deve ser semeada uma hora após a colheita, no entanto, se não for possível, deve ser refrigerada a 4.°C e processada até às 24 horas após a colheita (107).

A urocultura é realizada, sob condições assépticas, em meio Cistina- Lactose - Deficiente de Eletrólitos (CLED), através de uma ansa de 1 µL, a qual após incubação 24h a 37.°C permite isolar e quantificar os microrganismos presentes, através das Unidades Formadoras de Colónias (UFC).

Meio CLED

O meio CLED, não seletivo, diferencial, é utilizado para cultura de amostras de urina, permite o isolamento dos agentes mais frequentes de infeção urinária e quantificação de colónias. Este meio é deficiente em eletrólitos o que inibe o “swarming” de *Proteus* spp. (108). A lactose constitui a fonte de energia e o azul de bromotimol é o indicador de pH presente no meio. Este indicador serve para diferenciar os fermentadores da lactose dos não fermentadores da lactose. Os fermentadores de lactose reduzem o pH alterando a cor do meio de verde para amarelo (Figura 31).

Para amostras destinadas ao estudo micológico, a sementeira é realizada em meio Sabouraud (109).

As culturas provenientes de amostras de urina de jato médio, segundo os critérios de Kass consideram-se sob processo de infeção quando o crescimento é superior ou igual a 10^5 UFC/mL. Quando o crescimento é inferior a 10^4 UFC/mL considera-se contaminação, no entanto quando o valor de UFC varia entre 10^4 e 10^5 a interpretação depende do historial clínico, sintomatologia e dos resultados provenientes da análise do sedimento.

As amostras de urina colhidas através de punção supra púbica, uma vez que a bexiga é estéril, quaisquer UFC detetadas são valorizadas. Se existirem dúvidas relativamente à identificação dos microrganismos, procede-se a um teste de identificação através de testes bioquímicos, como galerias API e também através de cartas de identificação no equipamento VITEK® 2 Compact. Se positiva, a urocultura, após identificação microbiológica é realizado um teste de suscetibilidade a diferentes antibióticos. No caso de

coexistirem diferentes bactérias, denominada cultura mista, é realizada uma repicagem para o isolamento e identificação.



Figura 31. Urocultura, cada placa contém 2 amostras diferentes de urina. No quadrante superior verificou-se o crescimento de *Klebsiella* spp e no quadrante inferior o crescimento de *Escherichia coli*. (Fotografia obtida no Serviço de Microbiologia do LACSL)

Tabela 15. Aspeto macroscópico das colónias em Meio CLED

Microrganismo	Aspeto típico
<i>Escherichia coli</i>	Colónias amarelas, opacas – o meio muda de cor azul para amarelo
<i>Klebsiella, Enterobacter</i>	Colónias amarelas/azuis esbranquiçadas, aspeto mucóide – o meio fica amarelado
<i>Proteus</i>	Colónias azuis translúcidas – o meio fica azul ou verde
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colónias verdes com superfície mate – meio azul
<i>Enterococos</i>	Colónias pequenas, amarelas – meio amarelo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Colónias amarelas escuras – meio amarelo
<i>Estafilococos negativos para Coagulase</i>	Colónias amarelas pálidas

Durante a realização do presente estágio, a globalidade das amostras positivas provenientes da urocultura apresentavam fundamentalmente crescimento enterobactereáceas como *E.coli* e *Klebsiella* spp.. Numa pequena parte das amostras positivas, foram identificadas outras bactérias como *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Enterococos* spp..

6.3.2 Fezes

Cropocultura

A cultura bacteriológica das fezes é essencial para detetar infeções provocadas pela presença de bactérias intestinais patogénicas, principalmente *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter* spp. ou outras como *Yersinia* spp e *E. coli*. Este exame é útil para a pesquisa de bactérias responsáveis por gastroenterites e intoxicação alimentar.

A cropocultura, por rotina, é utilizada para despiste de infeção por *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter jejunii* / *coli*. Para a realização deste teste, as fezes devem ser colhidas para um recipiente limpo e seco. No laboratório deve ser escolhida a porção da amostra com pús, muco ou sangue. Para o despiste de *Campylobacter* spp. utiliza-se um teste imunocromatográfico, se positivo, a amostra é enviada para um laboratório externo, para exame cultural.

No LACSL a cropocultura, por norma, é realizada em gelose *Salmonella Shigella* (SS), meio Hektoen e caldo Selenito. A incubação dos meios é feita a 37.°C/18-24 horas. Após incubação, o caldo Selenito é semeado novamente em meio SS e Hektoen.

Meio Hektoen (110)

O meio Hektoen contém sais biliares que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas, permitindo o crescimento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. Este meio contém como fonte de carbono a sacarose, lactose e salicina e apresenta um sistema indicador de pH, o azul de bromotimol e a fucsina ácida. As estirpes de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. não são fermentadoras de compostos de carbono, portanto, não ocorre alteração do pH do meio, o que diferencia de outras bactérias Gram-negativas fermentadoras. A presença de citrato de amónio férrico e tiosulfato de sódio permite a deteção da produção de sulfureto de hidrogénio pela *Salmonella*. Do ponto de vista macroscópico, as colónias de *Salmonella* spp. são verdes/azuis com um centro negro e as colónias de *Shigella* spp. são verdes claras.

Meio SS (111)

O meio SS, contém na sua composição verde brilhante e sais biliares, os quais inibem o crescimento de coliformes fecais. A presença de sais de ferro, tal como no meio Hektoen, permitem a deteção das estirpes produtoras de sulfureto de hidrogénio. Neste meio, o indicador de pH é o vermelho neutro. A presença de lactose no meio permite diferenciar os organismos fermentadores dos não fermentadores, devido à mudança de cor do meio (acidificação do meio).

Caldo Selenito (112)

O caldo Selenito é utilizado no enriquecimento e isolamento de *Salmonellas* e *Shigellas*, o qual inibe a maioria das *Enterobacteriaceae*. Após o período de incubação a 37°C / 18-24h é realizada uma subcultura para os meios sólidos Hektoen e SS (Figura 32).

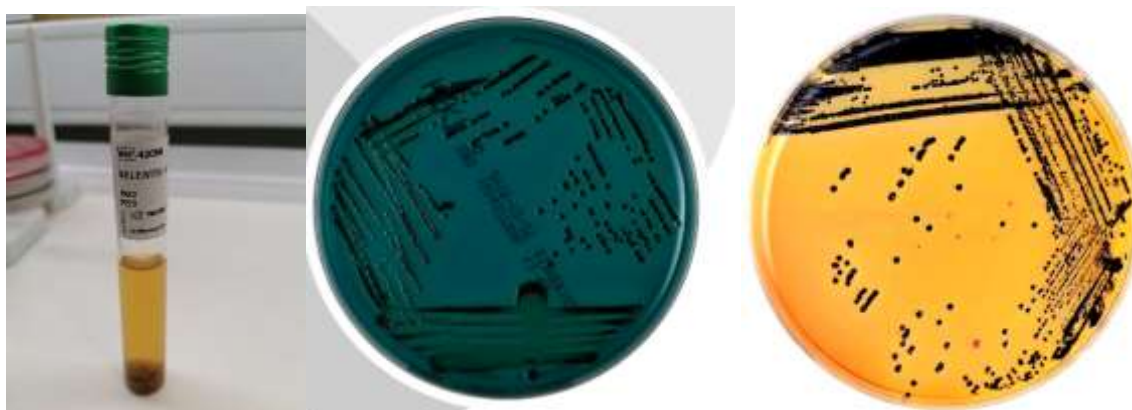


Figura 32. Caldo Selenito, Meio Hektoen (colônias de *Salmonella*), Meio SS (Colônias de *Salmonella* centro preto)
(Fotografia obtida no Serviço de Microbiologia do LACSL)

Após cultura e subcultura nos diferentes meios, as amostras positivas são sempre sujeitas a identificação e antibiograma no equipamento VITEK® 2 Compact conforme os procedimentos do laboratório.

Exame Parasitológico

As parasitoses intestinais são infecções de transmissão essencialmente fecal-oral. Estas infecções resultam da ingestão de quistos, ovos ou parasitas presentes fundamentalmente em animais ou plantas. Cada parasita apresenta um ciclo de vida específico e têm preferência pelo tubo digestivo humano (113).

No LACSL, as principais parasitoses diagnosticadas são devido a parasitas como *Giardia lamblia*, *Trichuris trichiura* e *Ascaris lumbricoides*

Para a realização do exame parasitológico devem ser colhidas 3 amostras em dias sucessivos e alternados (107). O exame parasitológico, neste laboratório, é realizado através de dois métodos, método de *Hoffman*, conhecido pelo método de sedimentação simples ou através do método de Ritchie (centrifugação e concentração). Posteriormente é observado o sedimento procurando-se características morfológicas e estruturas dos parasitas intestinais.

Durante a realização deste estágio não preparei nenhuma amostra, no entanto foi possível observar na base de dados diversas amostras que já foram previamente diagnosticadas com parasitoses, como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Enterobius vermicularis* e *Ascaris lumbricoides*. Na Tabela 16 estão descritos os principais parasitas que podem ser encontrados no exame parasitológico de fezes e na região perianal.

Tabela 16. Principais parasitas intestinais.

Protozoários	
<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Isospora belli</i>
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	<i>Blastocystis hominis</i>
Helmintas	
Nemátodes	
<i>Enterobius vermicularis</i>	Ancilostomas (<i>Ancylostoma duodenale</i> ,
<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Necator americanus</i>)
<i>Trichuris trichiura</i>	<i>Strongyloides stercoralis</i>
Céstodes	
Ténias (<i>T. saginata</i> , <i>T. solium</i> , <i>Diphyllobotrium latum</i> , <i>Hymenolepis nana</i>)	
Tremátodes	
Schistosomas (<i>S. intercalatum</i> , <i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i>)	
<i>Fasciolopsis buski</i> ,	
<i>Fasciola hepatica</i>	

6.3.3 Exsudado vaginal/endocervical/uretral

O exame do exsudado vaginal serve como auxílio no diagnóstico das infecções genitais na mulher. As infecções genitourinárias podem ser causadas por transmissão sexual de microrganismos patogênicos ou desequilíbrios na flora normal. Geralmente, a análise do exsudado vaginal implica a pesquisa dos microrganismos, como *Trichomonas vaginalis* (parasitas), *Candida* spp. (fungos), e *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*

Gardenerella vaginalis (bactérias), os quais são os principais responsáveis por cervicites, vulvovaginites e vaginoses.

Para o estudo de exsudados vaginal/ endocervical/ uretral, as amostras são semeadas em meio MSA, GS, GC, MacConkey e Sabouraud.

As geloses de sangue e chocolate são incubadas a 37.°C / 24-48 horas, numa atmosfera com 3-10% de CO₂. Os meios de MSA, MacConkey e Sabouraud são incubados durante 37.°C / 18-24 horas. As culturas negativas do meio Sabouraud são mantidas a 25-30.°C, durante cinco dias, antes de serem rejeitadas.

Pesquisa de *Streptococcus* do grupo B

A pesquisa de estreptococos β -hemolíticos do grupo B, *Streptococcus agalactiae*, é realizada em meio Granada, a partir do exsudado vaginal/perianal de grávidas e incubado em atmosfera de anaerobiose. Para obter condições de anaerobiose, a área semeada é coberta com uma lamela. A anaerobiose é importante porque estimula a produção de pigmentos por estas espécies. Após a incubação a 37.°C / 18-24 horas é efetuada a leitura da placa. Depois deste período, se pesquisa for negativa, a placa é novamente incubada até 72 horas. O diagnóstico é positivo quando se formam colônias cor-de-laranja, devido aos pigmentos carotenoides, característicos desta espécie (Figura 33).



Figura 33. Meio granada semeado com amostras de exsudado vaginal/perianal. No quadrante superior, com produção de pigmento, encontra-se o controle positivo e no quadrante inferior, uma amostra negativa. (Fotografia obtida no Serviço de Microbiologia do LACSL)

6.4 VITEK® 2 Compact

O equipamento automatizado *VITEK® 2 Compact* (Figura 36) destina-se a realizar testes de suscetibilidade antimicrobiana e de identificação com base nas suas características metabólicas e perfil bioquímico. Tem a capacidade de identificar e realizar testes para bacilos Gram-negativos aeróbios, bem como *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. e leveduras. Tem também a capacidade de identificar organismos anaeróbios clinicamente relevantes e das espécies *Corynebacterium*, bacilos Gram-negativos fermentadores e não fermentadores e organismos Gram-positivos. A utilização deste equipamento baseia-se no uso de cartas de teste de identificação (ID) exclusivos da VITEK® 2 e de suscetibilidade aos antimicrobianos (AST).



Figura 34. Equipamento VITEK® 2 Compact presente no setor de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas S. Lázaro. (Fotografia obtida no Serviço de Microbiologia do LACSL)

6.4.1 Identificação e antibiograma

Para efetuar a identificação/antibiograma são necessárias culturas puras. Após isolamento em meios de cultura específicos são obtidas as culturas puras, caso seja necessário, são realizadas repicagens para obter subculturas. O procedimento para a utilização das cartas ID e AST baseia-se no mesmo princípio. Obtêm-se suspensões em solução salina 0,50-0,63 *McFarland* para as bactérias e de 1,80-2,20 *McFarland* para as leveduras.

Com base na suspeita clínica, após exame a fresco e exame cultural, são selecionadas cartas para a realização do antibiograma no equipamento automático *VITEK® 2 Compact*. Se existirem dúvidas relativamente à identificação, realiza-se também um teste ID automatizado, selecionando as respetivas cartas para esse fim (Tabela 17).

Os testes de identificação têm por base provas bioquímicas convencionais, já as cartas de antibiograma, contêm diferentes concentrações de uma série de antibióticos.

Tabela 17. Cartas utilizadas pelo equipamento VITEK® 2 Compact realizados no laboratório

Descrição	Finalidade
AST-GN	Suscetibilidade de bactérias Gram-negativas
AST-GP	Suscetibilidade de bactérias Gram-positivas
AST-ST	Suscetibilidade da espécie <i>Streptococcus</i>
Carta GN	Identificação de bactérias Gram-negativas
Carta GP	Identificação de bactérias Gram-positivas
Carta YST	Identificação de leveduras

Para além da identificação com cartas no sistema VITEK 2, são também realizadas identificações para *Neisseria* spp *Haemophilus* spp através de galerias API.

API NH® - Identificação de *Neisseria* e *Haemophilus*.

6.5. Espermograma

O espermograma, realizado no setor de microbiologia, tem como objetivo avaliar os espermatozoides qualitativamente e quantitativamente. Esta é uma análise microscópica e macroscópica, que permite avaliar a concentração, mobilidade e morfologia dos espermatozoides.

Para a realização do espermograma, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o período de abstinência deve ser de 2 a 7 dias, se este não for cumprido, poderão ocorrer erros no diagnóstico. Numa primeira fase, quando a amostra chega ao laboratório, esta fica em standby até ter completo 60 minutos após recolha, para ocorrer uma correta liquefação. Após uma hora, são medidos o volume e o pH (tira bioquímica) e são avaliadas a cor, a viscosidade e a liquefação. A viscosidade é analisada aspirando a amostra para uma pipeta, se cair gota a gota, apresenta uma viscosidade normal. Posteriormente, a amostra é homogeneizada e colocada num suporte específico para o equipamento SQA - V GOLD, onde são efetuados os restantes testes.

A análise do esperma pode resultar nos seguintes diagnósticos:

Astenozoospermia - Diminuição significativa da mobilidade dos espermatozoides;

Teratozoospermia – 50 % ou mais dos espermatozoides têm anormalidades estruturais;

Oligozoospermia - Concentração muito baixa de espermatozoides.

6.5.1 SQA- V Gold

O SQA-V é um instrumento de análise de esperma de alto desempenho utilizado para estudar a fertilidade masculina (Figura 35). O SQA-V realiza uma avaliação dos parâmetros (Tabela 18) do esperma em menos de 2 minutos. Baseia-se na tecnologia eletroóptica, algoritmos de computador e microscopia de vídeo para fornecer uma análise rápida. O sistema vídeo permite observar as características morfológicas e gravar na base de dados. No entanto é também realizada a observação microscópica antes de efetuar a análise no equipamento.



Figura 35. Equipamento destinado ao espermograma, SQA-V Gold. (Fotografia obtida no Serviço de Microbiologia do LACSL)

Parâmetros testados	Valores de referência	Parâmetros testados	Valores de referência
Concentração total de espermatozoides	$\geq 15 \text{ M/mL}$	Concentração de espermatozóides funcionais	-
Mobilidade	$\geq 40\%$	Índice de motilidade espermática (SMI)	≥ 80
Mobilidade Progressiva	$\geq 32\%$	Velocidade média	$\geq 5 \text{ mic/sec}$
Mobilidade Não-Progressiva	-	Espermatozoides Totais	$\geq 39 \text{ M}$
Imóveis	-	Espermatozoides móveis totais	$\geq 16 \text{ M}$
Normal Morfologia	$\geq 4 \%$	Espermatozoides móveis progressivos totais	$\geq 12 \text{ M}$
Concentração de espermatozoides móveis	$\geq 6 \text{ M/mL}$	Espermatozóides móveis funcionais totais	-
Concentração de espermatozoides móveis progressivamente	$\geq 5 \text{ M/mL}$	Concentração total de espermatozoides morfolologicamente normais	$\geq 2 \text{ M}$

Tabela 18. Parâmetros testados no SQA- V Gold segundos critérios da 5ª Edição do manual da OMS

6.5.2 Espermocultura

A espermocultura é utilizada para auxiliar o diagnóstico de uma possível infecção causada por bactérias ou fungos no trato genital masculino no homem. Por rotina são pesquisados

microrganismos como *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *Enterobacteriaceae* e *Candida* spp..

No LACSL, quando a amostra chega ao setor de microbiologia, por norma é semeada em meio CLED, meio gelose chocolate (GC) e gelose sangue (GS). No entanto, apenas quando é solicitado exame micológico, é semeada também em meio Sabouraud. As culturas em GS e GC são incubadas a 37.°C/24-48h e numa atmosfera de 3-10% CO₂.

O exame microscópico é realizado, após coloração Gram, o que permite verificar na amostra a existência de células, leucócitos, eritrócitos, formas leveduriformes e microrganismo cocos ou diplococos.

6.6 Outros Produtos

Muitos outros produtos são processados no laboratório como expetoração, exsudados faríngeos/nasais, supurações e aspirados/raspados. Estes produtos são inoculados em meios Manitol Salt Agar para pesquisa de estafilococos, MacConkey para pesquisa de enterobactérias., GS para isolamento de *Streptococcus*, G C para pesquisa de *Neisseria*, *Haemophilus* e Sabouraud (Gentamicina + Cloranfenicol) para o isolamento de leveduras e de fungos filamentosos, este último apenas quando solicitado exame micológico. Alguns produtos como expetorações, podem ser inoculados em meio de *Lowenstein-Jensen* para pesquisa de micobactérias. Esta cultura é efetuada após procedimentos de descontaminação e fluidificação da amostra.

Muitos outros testes como, o teste da oxidase, catalase, filamentação, hemólise, *Slidex Staph* e produção de urease podem ser realizados para auxiliar na identificação de cada microrganismo.

Controlo de Qualidade Externo

O setor de microbiologia, participa anualmente nos programas de controlo de qualidade externo para as seguintes instituições: Sociedade Espanhola de Química Clínica, Instituto Nacional De Saúde Dr. Ricardo Jorge e National External Quality Assessment Service.

SEQC - Identificação e antibiogramas.

INSA - Microscopia - ensaios de micobacteriologia (Pesquisa de BK) e parasitologia.

NEQAS - Morfologia do esfregaço sanguíneo (ex. *Plasmodium* spp.).

Controlo de Qualidade Interno

O CQI compreende a utilização de estirpes ATCC (*American Type Culture Collection*), para o controlo dos meios de cultura e de testes de identificação e suscetibilidade. Estas estirpes são caracterizadas e conservadas de forma a garantir a reprodutibilidade dos resultados. São usadas estirpes ATCC 29213, ATCC 25922 e ATCC 29212.

Competências Adquiridas

O estágio no setor de microbiologia foi realizado diariamente durante 3 semanas das 9h da manhã até as 11h. Durante este período, acompanhava o Responsável pelo setor, observando toda a dinâmica. Por norma, eram efetuadas as validações das culturas e das respetivas análises do dia anterior. A validação consistia na identificação pelo aspeto macroscópico das colónias, pelo exame a fresco microscópico ou testes bioquímicos. Se não fosse possível obter identificação, era pedida a realização dos diferentes testes de identificação na lista de tarefas do Técnico. Sempre que necessário, eram também pedidos testes de suscetibilidade ou outros, como colorações.

Durante a minha passagem pelo setor, foram realizadas interpretação de antibiogramas, analisadas amostras e culturas estudando fundamentalmente as características microscópicas e microscópicas das colónias. Não realizei culturas nem trabalhei com os equipamentos, no entanto, tudo foi explicado exaustivamente.

De forma geral, a teoria foi bem compreendida, no entanto seria necessário mais tempo para consolidar toda a teoria com a prática. A microbiologia é uma área bem complexa e, portanto, há sempre muitos conhecimentos por adquirir.

7. Casos Clínicos

Caso Clínico 1

Um paciente do sexo masculino, 53 anos, dirigiu-se ao laboratório para análises de rotina. O hemograma realizou-se às 11:50h de um tubo que continha anticoagulante EDTA K3. O Sysmex-2000 apresentou distribuição anormal de plaquetas e contagem inferior a $150 \times 10^9/L$, de acordo com os seguintes resultados (Figura 36):

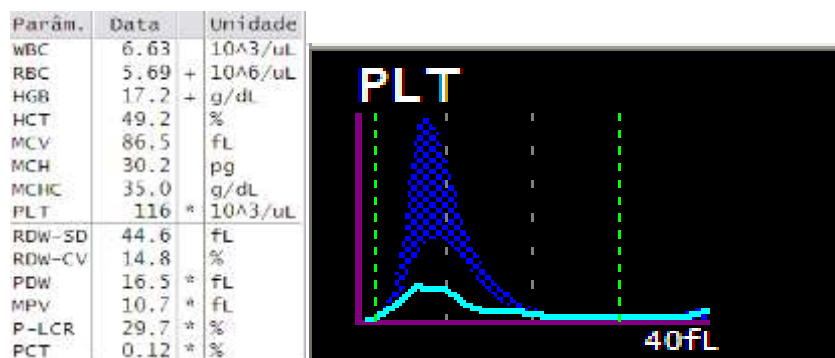


Figura 36. Resultados obtidos pelo equipamento Sysmex XT-2000i no HFAR-PP.

Suspeitou-se de pseudotrombocitopenia por possível agregação plaquetária. O hemograma repetiu-se num tubo com citrato (1:9) às 11:53h, obtendo os seguintes resultados (Figura 37):

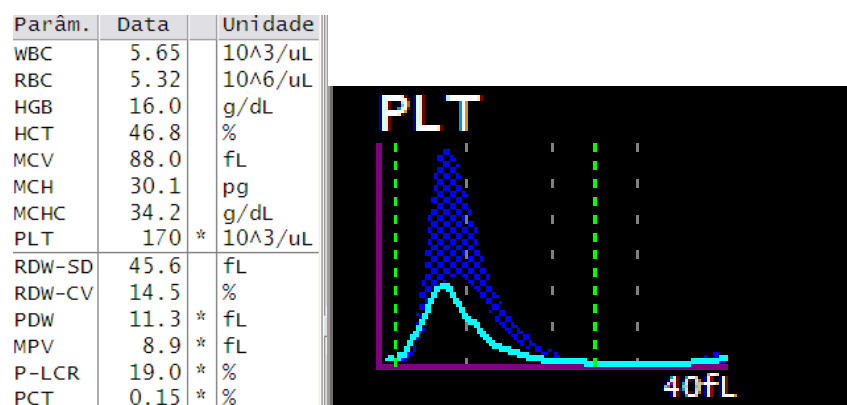


Figura 37. Resultados obtidos pelo equipamento Sysmex XT-2000i no HFAR-PP.

Após realizar o hemograma, procedeu-se ao cálculo do fator de diluição e verificou-se que as plaquetas se encontravam dentro dos valores de referência considerados “normais”. Concluindo, o paciente poderia ter anticorpos antiplaquetários dependentes de EDTA ou simplesmente agregação resultante do anticoagulante EDTA, esta última foi muito comum observar-se durante o estágio.

Caso Clínico 2

Homem com 77 anos, recorre à urgência com queixas de retenção urinária e diarreia. Relata ingestão de enchidos. Foram realizadas hemoculturas e identificou-se *Clostridium Botulinum*. Foi realizado um hemograma apresentando os seguintes resultados (Figura 38):

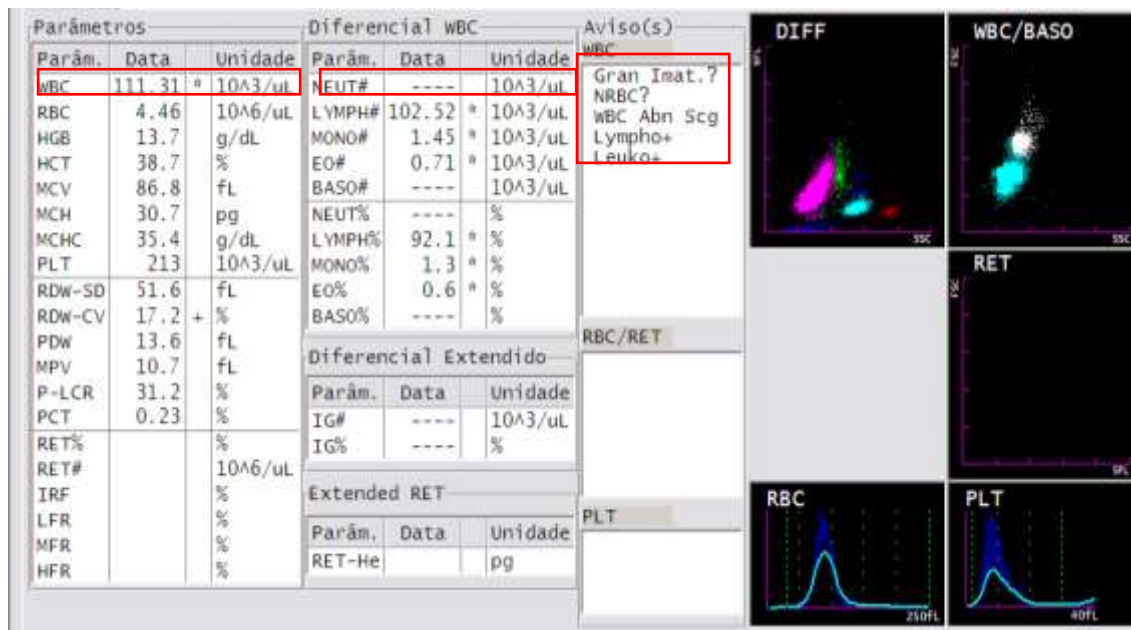


Figura 38. Resultados obtidos pelo equipamento Sysmex XT-2000i no HFAR-PP

O hemograma deste paciente mostrou leucocitose linfocítica. O equipamento não conseguiu fazer a análise diferencial correta e procedeu-se à execução do esfregaço sanguíneo. A observação do esfregaço sanguíneo mostrou presença de linfócitos grandes, com nucléolos muito evidentes.

O patologista sugeriu Linfoma ou Leucemia Prolinfocítica, no entanto não foi conclusivo. Neste caso, aconselhou-se o estudo fenotípico dos linfócitos e posteriormente foi diagnosticado com Linfoma.

Caso Clínico 3

Um paciente, sexo masculino, de 78 anos, sem sintomatologia dirigiu-se ao laboratório para realizar exames de rotina, entre os quais eletroforese de proteínas, a qual esta representada na Figura 39.

ELECTROFORESE DAS PROTEINAS SERICAS

Proteínas Totais	80	g/L	66-87
Albumina	46,8	%	55.8-66.1
Globulina Alfa-1	3,9	%	2.9-4.9
Globulina Alfa-2	9,2	%	7.1-11.8
Globulina Beta-1	3,40	%	4.7-7.2
Globulina Beta-2	26,7	%	3.2-6.5
Globulina Gama	10,0	%	11.1-18.8

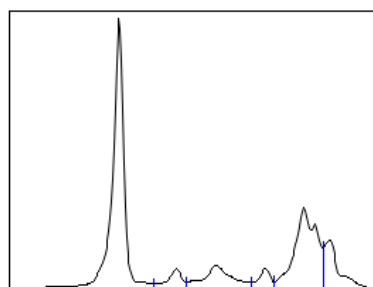


Figura 39. Resultados obtidos na eletroforese de proteínas de um paciente do sexo masculino com 78anos no HFAR-PP.

Foi solicitada a Imunoeletroforese das proteínas a um laboratório externo para saber qual a imunoglobulina em excesso (monoclonal), a qual revelou ser Mieloma Múltiplo de IgA cadeias leves (Lambda).

O Mieloma Múltiplo é uma doença maligna de um tipo de células que existem na medula óssea, os plasmócitos. Os plasmócitos correspondem à fase final de diferenciação dos linfócitos B e são as células que produzem os anticorpos (imunoglobulinas), que nos defendem das infecções; cada plasmócito produz apenas um tipo de imunoglobulina, uma proteína constituída por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves de aminoácidos.

Caso Clínico 4

Homem, 39 anos, presente a uma consulta de urgência relata dores abdominais e disúria. O Clínico solicitou a realização de um exame sumário de urina (Figura 40). Como esperado, foram encontrados nitritos (metabolismo de algumas bactérias), hemoglobina (lesão) e aspeto muito turvo. Como indicador de inflamação, estavam presentes leucócitos e eritrócitos.

Características Físico-Químicas	
Cor (Escala de Vogel)	Amarela
Aspecto:	Muito turvo
Reacção (pH):	6,0
Densidade:	1010
Proteínas:	Contém
Glicose:	Não contém
Corpos Cetónicos:	Não contém
Bilirrubina:	Não contém
Urobilinogénio:	Não contém
Hemoglobina	Contém
Nitritos	Positivo
Estudo do Sedimento:	
Leucócitos:	Contém
Eritrócitos:	Contém

Figura 40. Resultados obtidos pelo equipamento Clinitek Novus no HFAR-PP.

8. Conclusão

A realização do presente estágio foi muito enriquecedora e proveitosa para a minha vida profissional e pessoal. A nível profissional permitiu a consolidação e aprofundamento dos conhecimentos teóricos e práticos adquiridos durante as unidades curriculares, para além disso, permitiu conhecer o mercado de trabalho, as adversidades encaradas num laboratório, e toda a mecânica de trabalho tanto num laboratório de hospital como de clínica. A nível pessoal, foi importante pois permitiu crescer e evoluir individualmente, alcançar objetivos traçados, sonhos, e tornei-me uma pessoa mais realizada.

Com este estágio foi possível adquirir competências para executar as diferentes funções num laboratório de análises clínicas, como realizar os diferentes procedimentos e técnicas adotadas em laboratório, realizar as manutenções de cada equipamento com base no manual do fabricante, realizar testes de CQI, verificar a precisão e exatidão dos controlos e identificar possíveis erros ou falhas. Também foi possível ler e interpretar os boletins analíticos e identificar possíveis diagnósticos.

Durante a passagem pelo HFAR-PP tive oportunidade de realizar as seguintes ações de formação: Precauções Básicas do Controlo da Infecção e Gestão Integrada de Resíduos Hospitalares. Estas formações foram bastante enriquecedoras para o desenvolvimento do meu trabalho.

Esta experiência foi extremamente proveitosa e gratificante, apesar das adversidades ocorridas, considero que os meus objetivos foram alcançados e sinto que tive a preparação necessária para encarar a vida profissional na área da saúde. Apesar de cada laboratório ter métodos de trabalho diferentes, fui capaz de me adaptar a cada situação, evoluir e aprender sempre mais.

9.Referências bibliográficas

1. Diniz S. Monumentos: Direção-Geral do Património Cultural; 2007 [Available from: http://www.monumentos.gov.pt/Site/APP_PagesUser/SIPA.aspx?id=20497
2. Chadban SJ, Briganti EM, Kerr PG, Dunstan DW, Welborn TA, Zimmet PZ, et al. Prevalence of kidney damage in Australian adults: The AusDiab kidney study. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(7 Suppl 2):S131-8.
3. Westgard JO, Westgard SA. Quality control review: implementing a scientifically based quality control system. *Ann Clin Biochem*. 2016;53(Pt 1):32-50.
4. Saúde GdSdEAed. Despacho n.º 10009/ 2019 Manual de Boas Práticas Laboratoriais de Patologia Clínica ou Análises Clínicas. *Diario da Republica*, 2º Série Parte C 2019:66.
5. Lewis SM, Bain BJ, Bates I, Dacie JV, Dacie JV. Dacie and Lewis practical haematology. Philadelphia, Penns.: Churchill Livingstone; 2006.
6. Voigt GL. Hematology Techniques and Concepts for Veterinary Technicians: Ames Iowa: Iowa State University Press; 2000.
7. CORPORATION S. Princípios de funcionamento do equipamento Sysmex XT-2000i™. SYSMEX EUROPE GmbH 2003 [Available from: <https://www.sysmex.com/LA/pt/Products/Hematology/XTSeries/Pages/XT-2000-Hematology-Analyzer.aspx>.
8. Lee RE, Young RH, Castleman B. James Homer Wright: a biography of the enigmatic creator of the Wright stain on the occasion of its centennial. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(1):88-96.
9. Sox HC, Jr., Liang MH. The erythrocyte sedimentation rate. Guidelines for rational use. *Ann Intern Med*. 1986;104(4):515-23.
10. Fabry TL. Mechanism of erythrocyte aggregation and sedimentation. *Blood*. 1987;70(5):1572-6.
11. Ramsay ES, Lerman MA. How to use the erythrocyte sedimentation rate in paediatrics. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2015;100(1):30-6.
12. Vanessa A-C, Manuela A-S, Nuria V-T, Carmen T, Daniel R, Carmen G-I, et al. Factors influencing erythrocyte sedimentation rate in adults: New evidence for an old test. *Medicine*. 2019;98(34):e16816.
13. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*. 2016;388(10053):1459-544.
14. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth*. 2014;58(5):515-23.
15. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*. 2002;88(2):186-93.
16. JE H. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology:. 11th ed: Enhanced E-Book Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2010 2010. 457-9 p.
17. Pisciotta AV. Concepts of haemostasis and thrombosis: A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice (Quick, Stanley-Brown and Bancroft 1935). Armand J. Quick (1894-1978)--a short biography. *Thromb Haemost*. 1980;44(1):1-5.
18. Hirsh J, Dalen J, Anderson DR, Poller L, Bussey H, Ansell J, et al. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest*. 2001;119(1 Suppl):8s-21s.
19. Poller L, World Health Organization. Health Laboratory Technology U. The prothrombin time / by L. Poller. Geneva: World Health Organization; 1998.
20. Levy JH, Szlam F, Wolberg AS, Winkler A. Clinical use of the activated partial thromboplastin time and prothrombin time for screening: a review of the literature and current guidelines for testing. *Clin Lab Med*. 2014;34(3):453-77.

21. Kamal AH, Tefferi A, Pruthi RK. How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. *Mayo Clin Proc.* 2007;82(7):864-73.
22. Bates SM, Weitz JI, Johnston M, Hirsh J, Ginsberg JS. Use of a fixed activated partial thromboplastin time ratio to establish a therapeutic range for unfractionated heparin. *Arch Intern Med.* 2001;161(3):385-91.
23. Babson AL, Olson DR, Palmieri T, Ross AF, Becker DM, Mulqueen PJ. The IMMULITE assay tube: a new approach to heterogeneous ligand assay. *Clin Chem.* 1991;37(9):1521.
24. Schaap AP, Akhavan H, Romano LJ. Chemiluminescent substrates for alkaline phosphatase: application to ultrasensitive enzyme-linked immunoassays and DNA probes. *Clin Chem.* 1989;35(9):1863-4.
25. Ross SA, Novak Z, Pati S, Boppana SB. Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infect Disord Drug Targets.* 2011;11(5):466-74.
26. Singh N, Dummer JS, Kusne S, Breinig MK, Armstrong JA, Makowka L, et al. Infections with cytomegalovirus and other herpesviruses in 121 liver transplant recipients: transmission by donated organ and the effect of OKT3 antibodies. *J Infect Dis.* 1988;158(1):124-31.
27. van der Bij W, van Dijk RB, van Son WJ, Torensma R, Prenger KB, Prop J, et al. Antigen test for early diagnosis of active cytomegalovirus infection in heart transplant recipients. *J Heart Transplant.* 1988;7(2):106-9.
28. Ho M. Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis.* 1990;12 Suppl 7:S701-10.
29. Malati T. Tumour markers: An overview. *Indian J Clin Biochem.* 2007;22(2):17-31.
30. Carl A. Burtis DEB. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* 6. ed. ed: Saunders Elsevier; 2014. 1444 p.
31. Bates SE, Longo DL. Use of serum tumor markers in cancer diagnosis and management. *Semin Oncol.* 1987;14(2):102-38.
32. Perkins GL, Slater ED, Sanders GK, Prichard JG. Serum tumor markers. *Am Fam Physician.* 2003;68(6):1075-82.
33. Johnson PJ. The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis.* 2001;5(1):145-59.
34. Kohn J, Orr AH, McElwain TJ, Bentall M, Peckham MJ. Serum-alpha1-fetoprotein in patients with testicular tumours. *Lancet.* 1976;2(7983):433-6.
35. Abelev GI. Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv Cancer Res.* 1971;14:295-358.
36. Kawai M, Furuhashi Y, Kano T, Misawa T, Nakashima N, Hattori S, et al. Alpha-fetoprotein in malignant germ cell tumors of the ovary. *Gynecol Oncol.* 1990;39(2):160-6.
37. Duffy MJ. Serum Tumor Markers in Breast Cancer: Are They of Clinical Value?. *Clin Chem.* 2006;52(3):345.
38. Kurebayashi J, Nishimura R, Tanaka K, Kohno N, Kurosumi M, Moriya T, et al. Significance of serum tumor markers in monitoring advanced breast cancer patients treated with systemic therapy: a prospective study. *Breast Cancer.* 2004;11(4):389-95.
39. Shukla VK, Gurubachan, Sharma D, Dixit VK, Usha. Diagnostic value of serum CA242, CA 19-9, CA 15-3 and CA 125 in patients with carcinoma of the gallbladder. *Trop Gastroenterol.* 2006;27(4):160-5.
40. Thriveni K, Krishnamoorthy L, Ramaswamy G. Correlation study of Carcino Embryonic Antigen & Cancer Antigen 15.3 in pretreated female breast cancer patients. *Indian J Clin Biochem.* 2007;22(1):57-60.
41. Duffy MJ, Evoy D, McDermott EW. CA 15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clin Chim Acta.* 2010;411(23-24):1869-74.
42. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol.* 1979;17(2):159-63.
43. Kuriyama M, Loo R, Wang MC, Lee C, Killian CS, Papsidero LD, et al. Prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen in prostate cancer. *Int Adv Surg Oncol.* 1982;5:29-49.

44. Nadji M, Tabei SZ, Castro A, Chu TM, Murphy GP, Wang MC, et al. Prostatic-specific antigen: an immunohistologic marker for prostatic neoplasms. *Cancer*. 1981;48(5):1229-32.
45. Magnani JL, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V. Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin. *Cancer Res*. 1983;43(11):5489-92.
46. Frebourg T, Bercoff E, Manchon N, Senant J, Basuyau JP, Breton P, et al. The evaluation of CA 19-9 antigen level in the early detection of pancreatic cancer. A prospective study of 866 patients. *Cancer*. 1988;62(11):2287-90.
47. Dochez V, Caillon H, Vaucel E, Dimet J, Winer N, Ducarme G. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *J Ovarian Res*. 2019;12(1):28
48. Chan D. BR, Diamandis E. Tumor Markers. In: In Burtis A, E.R., Bruns, D.E. (Eds.) editor. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*,. 6th Ed. ed: Saunders Elsevier, St Louis, Missouri; 2008. p. pp 337-62.
49. Buamah P. Benign conditions associated with raised serum CA-125 concentration. *J Surg Oncol*. 2000;75(4):264-5.
50. Jessup M, Thomas P. Carcinoembryonic antigen: Function in metastasis by human colorectal carcinoma. *Cancer and Metast Rev*. 1989;8(3):263-80.
51. Fleisher M, Nisselbaum JS, Loftin L, Smith C, Schwartz MK. Roche RIA and Abbott EIA carcinoembryonic antigen assays compared. *Clin Chem*. 1984;30(2):200-5.
52. Begent RH. The value of carcinoembryonic antigen measurement in clinical practice. *Ann Clin Biochem*. 1984;21 (Pt 4):231-8.
53. Vincent C, Esteve J, Cooper EH, Deconninck I, Forbes M, Poulik MD, et al. A collaborative study of a preparation of normal human serum for use as a reference in the assay of beta 2 microglobulin. *J Biol Stand*. 1985;13(3):185-97.
54. Bernier GM. beta 2-Microglobulin: structure, function and significance. *Vox Sang*. 1980;38(6):323-7.
55. Karlsson FA, Wibell L, Evrin PE. beta 2-Microglobulin in clinical medicine. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1980;154:27-37.
56. Czarnocka B, Ruf J, Ferrand M, Carayon P, Lissitzky S. Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. *FEBS Lett*. 1985;190(1):147-52.
57. Feldt-Rasmussen U. Analytical and clinical performance goals for testing autoantibodies to thyroperoxidase, thyroglobulin, and thyrotropin receptor. *Clin Chem*. 1996;42(1):160-3.
58. Mullur R, Liu Y-Y, Brent GA. Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiol Rev*. 2014;94(2):355-82.
59. Citterio CE, Targovnik HM, Arvan P. The role of thyroglobulin in thyroid hormonogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(6):323-38.
60. Sapin R, d'Herbomez M, Gasser F, Meyer L, Schlienger JL. Increased sensitivity of a new assay for anti-thyroglobulin antibody detection in patients with autoimmune thyroid disease. *Clin Biochem*. 2003;36(8):611-6.
61. Feldt-Rasmussen U. Serum Thyroglobulin and Thyroglobulin Autoantibodies in Thyroid Diseases. *Allergy*. 1983;38(6):369-87.
62. Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M. Current status and performance goals for serum thyroglobulin assays. *Clin Chem*. 1996;42(1):164-73.
63. Mosesson MW. Terminology for macromolecular derivatives of crosslinked fibrin. On behalf of the Subcommittee on Fibrinogen of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost*. 1995;73(4):725-6.
64. Dempfle CE. Validation, calibration, and specificity of quantitative D-dimer assays. *Semin Vasc Med*. 2005;5(4):315-20.
65. Bockenstedt P. D-dimer in venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2003;349(13):1203-4.

- 66.Di Nisio M, Squizzato A, Rutjes AW, Buller HR, Zwinderman AH, Bossuyt PM. Diagnostic accuracy of D-dimer test for exclusion of venous thromboembolism: a systematic review. *J Thromb Haemost.* 2007;5(2):296-304.
- 67.Parmacek MS, Solaro RJ. Biology of the troponin complex in cardiac myocytes. *Prog Cardiovasc Dis.* 2004;47(3):159-76.
- 68.Apple FS, Jesse RL, Newby LK, Wu AH, Christenson RH, Cannon CP, et al. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. *Clin Chem.* 2007;53(4):547-51.
- 69.Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2012;33(20):2551-67.
- 70.Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Clin Chem.* 2007;53(4):552-74.
- 71.Plebani M, Zaninotto M. Diagnostic strategies using myoglobin measurement in myocardial infarction. *Clin Chim Acta.* 1998;272(1):69-77.
- 72.Stork TV, Wu AH, Muller-Bardorff M, Gareis R, Muller R, Hombach V, et al. Diagnostic and prognostic role of myoglobin in patients with suspected acute coronary syndrome. North-Wurttemberg Infarction Study (NOWIS) Group. *Am J Cardiol.* 2000;86(12):1371-4, a5.
- 73.Christenson RH, Azzazy HM. Biochemical markers of the acute coronary syndromes. *Clin Chem.* 1998;44(8 Pt 2):1855-64.
- 74.Mockel M, Gerhardt W, Heller G, Jr., Klefisch F, Danne O, Maske J, et al. Validation of NACB and IFCC guidelines for the use of cardiac markers for early diagnosis and risk assessment in patients with acute coronary syndromes. *Clin Chim Acta.* 2001;303(1-2):167-79.
- 75.Panteghini M, Pagani F, Bonetti G. The sensitivity of cardiac markers: an evidence-based approach. *Clin Chem Lab Med.* 1999;37(11-12):1097-106.
- 76.Valli N, Gobinet A, Bordenave L. Review of 10 years of the clinical use of brain natriuretic peptide in cardiology. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 1999;134(5):437-44.
- 77.Luchner A, Hengstenberg C, Lowel H, Riegger GA, Schunkert H, Holmer S. Effect of compensated renal dysfunction on approved heart failure markers: direct comparison of brain natriuretic peptide (BNP) and N-terminal pro-BNP. *Hypertension.* 2005;46(1):118-23.
- 78.Hunt PJ, Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Doughty RN, Espiner EA. Immunoreactive amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-PROBNP): a new marker of cardiac impairment. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997;47(3):287-96.
- 79.Klein KO, Baron J, Colli MJ, McDonnell DP, Cutler GB, Jr. Estrogen levels in childhood determined by an ultrasensitive recombinant cell bioassay. *J Clin Invest.* 1994;94(6):2475-80.
- 80.Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reprod Biol Endocrin.* 2003;1(1):35.
- 81.Mason HD, Willis DS, Beard RW, Winston RM, Margara R, Franks S. Estradiol production by granulosa cells of normal and polycystic ovaries: relationship to menstrual cycle history and concentrations of gonadotropins and sex steroids in follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79(5):1355-60.
- 82.Zirkin BR, Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol Reprod.* 2018;99(1):101-11.
- 83.Simoni M, Weinbauer GF, Gromoll J, Nieschlag E. Role of FSH in male gonadal function. *Ann Endocrinol (Paris).* 1999;60(2):102-6.
- 84.Kumar P, Sait SF. Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction. *J Hum Reprod Sci.* 2011;4(1):2-7.
- 85.Howles CM. Role of LH and FSH in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;161(1-2):25-30.
- 86.Ismail AA, Astley P, Burr WA, Cawood M, Short F, Wakelin K, et al. The role of testosterone measurement in the investigation of androgen disorders. *Ann Clin Biochem.* 1986;23 (Pt 2):113 34.

87. Hollander CS SL. Radioimmunoassays for triiodothyronine and thyroxine. Rothfeld B, editor. Nuclear medicine in vitro: Philadelphia: Lippincott :136-49. 2; 1974.
88. Ashwood ER, Tietz NW, Burtis CA. Tietz textbook of clinical chemistry. Philadelphia [etc.]: Saunders; 1999.
89. Lambert J-H, Klett VdE, Detleffsen CP, Verdet É, Arago F, École normale s, et al. J. H. Lambert,... Photometria sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae 1760.
90. Wu AHB, Tietz NW. Tietz clinical guide to laboratory tests. Edinburgh: Elsevier Saunders; 2006.
91. Coulter B. Guia do Utilizador, Analisador de química clínica AU680®. 1 ed 2011.
92. Wallach J, Kanaan S. Interpretação de exames laboratoriais. Rio de Janeiro: MEDSI; 2003.
93. Janeway C. Immunobiology : the immune system in health and disease. London: Harcourt Brace & Company; 1999.
94. Sticova E, Jirsa M. New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. World J Gastroenterol. 2013;19(38):6398-407.
95. Thomas L. Clinical laboratory diagnostics : use and assessment of clinical laboratory results. Frankfurt, Germany: TH-Books; 1998.
96. Kemp G. Capillary Electrophoresis. Biotechnol Appl Biochem. 1998;27(1):9-17.
97. Srinivas SRaCN. Serum Protein Electrophoresis and Its Clinical Applications. IntechOpen. 2019.
98. O Connell TX, Horita TJ, Kasravi B. Understanding and Interpreting Serum Protein Electrophoresis. Am Fam Physician. 2005;71(1):105-12.
99. Guia do Operador Clinitek Novus - Automated Urine Chemistry Analyzer. In: Diagnostics SH, editor. 2013.
100. Carroll MF, Temte JL. Proteinuria in adults: a diagnostic approach. Am Fam Physician. 2000;62(6):1333-40.
101. Coico R. Gram staining. Curr Protoc Microbiol. 2005;Appendix 3:Appendix 3C.
102. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(5):a000414-a.
103. Chiaradia L, Lefebvre C, Parra J, Marcoux J, Burlet-Schiltz O, Etienne G, et al. Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. Sci Rep. 2017;7(1):12807.
104. Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A. Chapter 5 - Biochemical Tests and Staining Techniques for Microbial Identification. In: Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A, editors. Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology: Elsevier; 2017. p. 61-73.
105. Vasanthakumari R, Jagannath K, Rajasekaran S. A cold staining method for acid-fast bacilli. Bull World Health Organ. 1986;64(5):741-3.
106. Ellis RC, Zabrowarny LA. Safer staining method for acid fast bacilli. J Clin Pathol. 1993;46(6):559-60.
107. Fonseca A. SC, Martins F. et al Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. Programa Nacional de Controlo da Infecção 2004.
108. Sandys GH. A new method of preventing swarming of Proteus sp. with a description of a new medium suitable for use in routine laboratory practice. J Med Lab Technol. 1960;17:224-33.
109. Odds FC. Sabouraud('s) agar. J Med Vet Mycol. 1991;29(6):355-9.
110. King S, Metzger WI. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. I. hektoen enteric agar. Appl Microbiol. 1968;16(4):577-8.
111. Isenberg HD, Kominos S, Siegel M. Isolation of Salmonellae and Shigellae from an artificial mixture of fecal bacteria. Appl Microbiol. 1969;18(4):656-9.
112. Zimbro MJ, Power DA. Difco & BBL manual : manual of microbiological culture media. Sparks, MD: Becton Dickinson and Co.; 2009.
113. Weatherhead JE, Hotez PJ. Worm Infections in Children. Pediatr Rev. 2015;36(8):341-52; quiz 53-4.

10. Anexos

Anexo I – Quadro de Inscrições no Programa Nacional de Avaliação Externa de Qualidade

 REPÚBLICA PORTUGUESA SAÚDE		 SNS SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE		 Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge	
Quadro de Inscrições PNAEQ 2020					
Assinale o(s) programa(s) pretendido(s) com uma cruz e preencha o nome do responsável de cada programa com letra legível.				Indique o número do seu laboratório	37
Endocrinologia				Nome do Responsável do Programa	
1E	Endocrinologia	☒	☐		
Hematologia					
2B	Contagem Celular em Sangue Total	☐	☐		
3B	Hemoglobinopatias	☒	☐		
4B	Morfologia do Sangue Periférico e Contagem Diferencial Leucocitária	☒	☒	Dra. Fátima Sousa	
5B	Reticulócitos, contagem automática e manual	☐	☐		
6B	Velocidade de Sedimentação	☐	☐		
Coagulação					
1B	Coagulação	☒	☒	Dra. Cristina Gouveia	
Imunologia					
1I	Alergias	☒	☐		
2I	Imunologia	☐	☐		
Microbiologia: Bacteriologia					
1M	Micobacteriologia, deteção molecular de multiresistências	☒	☐		
2M	Micobacteriologia, exame microscópico	☒	☐		
3M	Micobacteriologia, TSA	☒	☐		
Microbiologia: Parasitologia					
5M	Morfologia Parasitária	☒	☒	Dra. Cristina Gouveia	
Microbiologia: Serologia					
8M	Brucella, Ac	☒	☐		
9M	Hidatidose, Ac	☒	☐		
7M	Rubéola, Ac	☒	☐		
4M	Sífilis, Ac	☒	☒	Dra. Cristina Gouveia	
6M	Toxoplasmose, Ac	☒	☐		
Microbiologia: Biologia Molecular					
10M	Influenza A e B, PCR	☒	☐		
Química Clínica					
3Q	Análise Físico-Química e Microscópica da urina	☐	☐		
1Q	Hemoglobina Glicada (A1c)	☒	☒	Dra. Fátima Sousa	
2Q	Química Clínica	☒	☒	Dra. Fátima Sousa	

Continuação do Anexo I



REPÚBLICA PORTUGUESA
SAÚDE



SNS SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE


Instituto Nacional de Saúde
Dr. Ricardo Jorge

Por favor coloque um círculo à volta do(s) mês(es) pretendido(s) em cada programa.
 Nos programas Multiplex (5191, 5300, 5302, 5303, 5304, 5472) a inscrição é anual.
 Indique o nome do responsável pelo programa em letra legível.

Leia e preencha por favor o formulário AEQ-IM59_06.

Quadro de inscrições PNAEQ/Labquality 2020

Indique o número do seu laboratório

37

Endocrinologia

		Fev	Mai	Ago	Nov	Nome do Responsável do Programa
2703	Hormona anti-Mülleriana NEW					
2250	PTH (Hormona Paratiroide)	Mar	Out			Dra. Cristina Gouveia
5913	Recetor da hormona estimuladora da tiroide, Ac	Mar	Set			

Hematologia

		Mai	Out			Nome do Responsável do Programa
4180	Contagem Diferencial Leucocitária e avaliação da morfologia do sangue periférico, microscopia virtual NEW					
4238	Contagem diferencial leucocitária automática, 5-part Abacus NEW	Mar	Jun	Set	Dez	
4234	Contagem diferencial leucocitária automática, 5-part ABX Pentra NEW	Mar	Jun	Set	Dez	
4231	Contagem diferencial leucocitária automática, 5-part Cell-Dyn NEW	Mar	Jun	Set	Dez	
4232	Contagem diferencial leucocitária automática, 5-part Coulter NEW	Mar	Jun	Set	Dez	
4235	Contagem diferencial leucocitária automática, 5-part Coulter ACT5-diff NEW	Mar	Jun	Set	Dez	
4236	Contagem diferencial leucocitária automática, 5-part Mindray NEW	Mar	Jun	Set	Dez	
4237	Contagem diferencial leucocitária automática, 5-part Nihon Kohden Celltac MEK NEW	Mar	Jun	Set	Dez	
4230	Contagem diferencial leucocitária automática, 5-part Siemens Advia NEW	Mar	Jun	Set	Dez	
4233	Contagem diferencial leucocitária automática, 5-part Sysmex XE, XS, XT, XN NEW	Mar	Jun	Set	Dez	
2731	Velocidade de Sedimentação (Alifax): Tubos Greiner NEW	Mar	Mai	Set	Nov	
2732	Velocidade de Sedimentação (Alifax): Tubos Sarstedt NEW	Mar	Mai	Set	Nov	

Coagulação

		Fev	Mai	Ago	Nov	Nome do Responsável do Programa
4386	Coagulação (Fatores) NEW					

Imunologia

		Fev	Ago			Nome do Responsável do Programa	
5935	ANCA e GbmAc NEW						
5920	Ac Anti-Tiroideus NEW	Mar	Jun	Out			
5937	Ac Fosfolipídicos						
2226	Antígeno Específico da Próstata (PSA) NEW	Fev	Abr	Jul	Out		
5900	Autoimunidade NEW						
5938	Diagnóstico de autoimunidade, interpretação IFA						
5940	Doença Celíaca, Ac NEW	Fev	Jun	Out			
5930	Doença Hepática autoimune e Ac para células parietais gástricas						
5820	Fator Reumatoide e Ac Anti-Péptidos Citrulinados NEW	Jan	Abr	Jul	Out		
4420	Grupo de Sangue AB0, Rh NEW	Fev	Mai	Ago	Nov		
4480	Métodos de aglutinação em coluna: Classificação de intensidade de reação e casos clínicos NEW						
2540	Marcadores Cardíacos NEW	Fev	Abr	Jun	Set	Nov	Dra. Fátima Sousa
2541	Marcadores Cardíacos e PCR de baixa concentração NEW	Fev	Abr	Jun	Set	Nov	
2700	Marcadores Tumorais NEW	Fev	Mai	Ago	Nov		Dra. Fátima Sousa
4460	Screening de Ac e Testes de Compatibilidade NEW	Fev	Mai	Ago	Nov		
4440	Teste Antiglobulina, direto NEW	Fev	Mai	Ago	Nov		

DEP AEQ-IM04_10

 Programa Nacional de Avaliação da Qualidade em Laboratório

Continuação do Anexo I

Indique o número do seu laboratório

37

Microbiologia: Bacteriologia

Nome do Responsável do Programa

5080	Bacteriologia Geral 1 (aeróbios e anaeróbios)	EQA ¹	Mar	Mai	Set	Dez	
5081	Bacteriologia Geral 2 (só aeróbios)	EQA ¹	Mar	Mai	Set	Dez	Dra. Cristina Gouveia
5200	<i>Clostridium difficile</i> , cultura e deteção de toxinas		Fev	Mai	Ago	Nov	
5050	Coloração Bacteriológica, exame direto		Abr	Out			
5041	Coloração gram, hemocultura		Jan	Abr	Jul	Out	
5040	Coloração gram, identificação de colónias		Jan	Abr	Jul	Out	
5190	Coprocultura		Abr	Jun	Out	Dez	
5596	<i>Helicobacter pylori</i> , deteção de Ag nas fezes		Mar	Jun	Set	Dez	
5100	Hemocultura: cultura, identificação e suscetibilidade		Mar	Mai	Out	Dez	
5101	Hemocultura: screening		Mar	Mai	Out	Dez	
5597	Legionella, deteção de Ag na urina		Mar	Mai	Set	Dez	
5150	Líquido Cefalorraquidiano, cultura, screening		Fev	Mai	Set	Dez	
5220	Micobacteriologia, cultura e coloração		Mar	Jun	Set	Dez	
5120	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , cultura e suscetibilidade		Mar	Mai	Ago	Nov	
5180	<i>Salmonella</i> , cultura		Abr	Jun	Out	Dez	
5140	<i>Streptococcus</i> faríngeos, cultura		Mar	Mai	Ago	Nov	
5595	<i>Streptococcus pyogenes</i> (grupo A), deteção Ag em amostra faríngea		Mar	Mai	Set	Dez	
5594	<i>Streptococcus</i> grupo B, deteção		Abr	Jun	Set	Nov	
5598	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , deteção de Ag na urina		Mar	Mai	Set	Dez	
5060	Urocultura, screening quantitativo		Mar	Jun	Set	Dez	
5065	Urocultura, screening, identificação e suscetibilidade		Mar	Jun	Set	Dez	Dra. Cristina Gouveia
5073	Vigilância de culturas de bactérias multiresistentes, bacilos gram negativos		Fev	Jun	Set	Nov	Dra. Cristina Gouveia
5071	Vigilância de culturas de bactérias multiresistentes, MRSA		Fev	Jun	Set	Nov	
5072	Vigilância de culturas de bactérias multiresistentes, VRE		Fev	Jun	Set	Nov	

Microbiologia: Micologia

Nome do Responsável do Programa

5260	Micologia		Mar	Mai	Set	Nov	Dra. Fátima Sousa
------	-----------	--	-----	-----	-----	-----	-------------------

Microbiologia: Parasitologia

Nome do Responsável do Programa

5450	Parasitas nas fezes, microscopia virtual		Abr	Out			
5470	Parasitas no Sangue, coloração Giemsa, microscopia virtual		Out				
5471	Parasitas no Sangue, coloração MGG, microscopia virtual		Out				

Microbiologia: Serologia Bacteriana e Parasitária

Nome do Responsável do Programa

5840	Anti-streptolisina		Fev	Mai	Ago	Nov	
5950	<i>Bordetella pertussis</i> , Ac		Jan	Abr	Ago	Nov	
5960	<i>Borrelia burgdorferi</i> , Ac		Jan	Abr	Ago	Nov	
5620	<i>Chlamydia pneumoniae</i> , Ac		Fev	Mai	Ago	Nov	
5860	<i>Helicobacter pylori</i> , Ac		Mar	Jun	Set	Dez	
5430	Malária, deteção de Ag e de ácido nucleico		Fev	Mai	Ago	Nov	
5980	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , Ac		Fev	Mai	Set	Nov	
5420	Toxoplasmose, Ac		Fev	Mai	Ago	Nov	
5473	<i>Trichomonas vaginalis</i> , deteção		Abr	Nov			

Anexo II -Regras de consenso de Hematologia, Protocolo/Esfregaço de Sangue Periférico.

Parâmetro	1ª vez	2ª / + vezes	Ação
WBC	<2,5 ou >30,0	1ª vez	Ver lâmina
WBC	<4,0 ou >30,0	Delta Chek +	Ver lâmina
PLT	<100 ou >1000	1ª vez	Ver lâmina
PLT	Qualquer valor	Delta Chek +	Ver lâmina
HGB	<7 g/dl ou >2 g/dl acima do VR.	1ª vez	Ver lâmina; verificar integridade da amostra.
MCV	<70 fl ou >110 fl	1ª vez	Ver lâmina; ver alterações macrocíticas?
MCHC	>36,5 ou >2 g/dl acima do VR.		Colocar na estufa (~3h) e repetir. Verificar se lipemia, hemólise, aglutinação de RBC, esferócitos.
MCHC	<30 g/dl	Se MCV normal/alto	Possível contaminação IV?
RDW	>22%	1ª vez	Ver lâmina
DIFERENCIAL			
WBC	Sem diferencial ou incompleto		Ver lâmina e diferencial manual: ou apagar a fórmula e >>> Resultado provisório
Neut #	<1,0 ou >25,0	1ª vez	Ver lâmina
Linf #	>5,0 (adulto) ou >7,0 (<12 anos)	1ª vez	Ver lâmina
Monoc #	>1,5 (adulto) ou >3,0 (<12 anos)	1ª vez	Ver lâmina
Eosin #	>2,0	1ª vez	Ver lâmina
Basof #	>0,5		Ver lâmina
NRBC #	Qualquer valor	1ª vez	Ver lâmina
IG%	>3%		Ver lâmina (marcador de sépsis)
ALARMES			
HGB	Turbidez/ Interf. HGB		Colocar na estufa (~3h) e repetir. Verificar se lipemia, hemólise, aglutinação de RBC, esferócitos.
HGB	Defeito HGB		Ver lâmina
RBC	Pop.Dimórfica	1ª vez	Ver lâmina
RBC	Fragmentos	Sempre	Ver lâmina
RBC	Resistência lise	Sempre	Rever Histograma WBC; ver lâmina para morfologia eritrocitária
PLT	Agregados PLT	Ver em citrato?	Verificar coágulo da amostra. Ver lâmina se PLT <130.
PLT	Distrib.anormal PLT	1ª vez	Ver lâmina se PLT <130.
Linf. atípicos/variantes		1ª vez	Ver lâmina
Blastos		1ª vez	Ver lâmina
NRBC		1ª vez	Ver lâmina; Contar e corrigir WBC

Fonte:(International Society for Laboratory Hematology - Guidelines 2009)

Data: Dezembro 2010

Anexo III - Estabilidade de parâmetros em amostra (Immulite e VIDAS)

<i>Pârametro</i>	<i>Amostra</i>	<i>Estabilidade</i>
B ₂ Microglobulina	100 µL Soro	2 dia a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
FT3 (T3 Livre)	100 µL Soro	2 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
T3 (T3 Total)	100 µL Soro	2 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
Atc anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (IgM)	100 µL Soro	7 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
Atc anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (IgG)	100 µL Soro	7 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
Atc anti-CMV (IgM)	100 µL Soro	5 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
Atc anti-CMV (IgG)	100 µL Soro	5 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
Atc anti-Rubéola (IgM)	100 µL Soro	7 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
Atc anti-Rubéola (IgG)	100 µL Soro	7 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
iPT (Paratormona Intacta)	50 µL Soro	2-8°C até 8 horas após a colheita. Para períodos mais longos, aliquotar e congelar até 2 meses a -20°C
Atc IgE	5 µL Soro	3 dias a 2-8°C, ou 6 meses a -20°C
OV (CA 125)	50 µL Soro	1 dia a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
GIM (CA 19.9)	50 µL Soro	1 dia a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
F4 (T4 livre)	50 µL Soro	2 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
E2 (Estradiol)	50 µL Soro	2 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
ATA (Ac. Anti-TPO)	50 µL Soro	2 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
AF (Alfafetoproteína)	10 µL Soro	3 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
TG (Tiroglobulina)	50 µL Soro	3 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
BRM (CA 15.3)	5 µL Soro	5 dias a 2-8°C ou 2 meses a -20°C
TSH (Hormona Estimulante Tiróide)	50 µL Soro	5 dias a 2-8°C, ou 1 mês a -20°C
CEA (Antigénio Carcinoembrionário)	15 µL Soro	7 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
TT4 (T4 Total)	50 µL Soro	7 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
FSH (Hormona folículo-estimulante)	50 µL Soro	7 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
PRL (Prolactina)	50 µL Soro	7 dias a 2-8°C, ou 3 meses a -20°C
ATG (Ac. Anti-TG)	50 µL Soro	7 dias a 2-8°C, ou 6 meses a -20°C
LH (Hormona Luteínica)	50 µL Soro	2 semanas a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C
Testosterona	50 µL Soro	7 dias a 2-8°C, ou 2 meses a -20°C

Chronic Kidney Disease
Molecular Mechanisms of Hypoxia and
Inflammation in the Development of Anaemia in
Kidney Disease

Ana Sofia Gonçalves Abreu

FACULDADE DE FARMÁCIA

