

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

# **Hipertrigliceridemias de origem genética**

Mara Alves

**M**  
**2022**





**Orientador:**

Professora Doutora Georgina Correia da Silva

Prof. Auxiliar do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

**Coorientador:**

Dr. Francisco Eduardo da Rocha Laranjeira

Técnico Superior de Saúde Especialista de Genética - Assistente Principal do Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães

## **Agradecimentos**

Escrever a monografia de mestrado foi um desafio acadêmico e pessoal incomparável, um constante cair e reerguer. Quero dedicar umas breves palavras de gratidão às pessoas que me ampararam ao longo do percurso:

À minha orientadora, Professora Doutora Georgina Correia da Silva, quero expressar um profundo e sincero obrigada, pela imensa dedicação, compreensão, disponibilidade, exigência, pelos conselhos e palavras de motivação. Uma orientação cuidadosa e exemplar, sem a qual não teria realizado esta monografia.

Ao meu coorientador, Dr. Francisco Eduardo Laranjeira do Centro de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães, pela orientação e disponibilidade, pela clareza e simplicidade com que me transmitiu os seus conhecimentos em genética molecular, fundamentais para a execução desta monografia, e pela oportunidade de me receber no Centro de Genética Médica.

À diretora do Mestrado em Análises Clínicas, Professora Doutora Eugénia Pinto, pela dedicação, compreensão e disponibilidade ao longo deste percurso académico.

Ao meu pai, Carlos, pelo apoio incondicional e compreensão, pelas palavras de encorajamento, pelos conselhos, por me ensinar sobre resiliência e sobre encarar a vida de forma positiva.

À querida Nanda, não só pelas palavras de conforto e motivação, mas sobretudo pelo auxílio e total disponibilidade nos momentos mais exigentes.

Aos meus irmãos, Carlos, Ângelo e Simão, pelas brincadeiras e gargalhas, e por simplesmente me compreenderem nos momentos difíceis.

Aos meus amigos, Cecília, Daniela, Diana, Diogo, Filipe, Helena, Sara e Tiago, pelo apoio incondicional, pelos conselhos e palavras de encorajamento, e, sobretudo, por acreditarem em mim quando eu menos acreditei.

## Resumo

A hipertrigliceridemia é uma condição clínica caracterizada pela concentração elevada de triglicerídeos no plasma sanguíneo, acima do valor de referência definido. A hipertrigliceridemia de origem genética pode ser categorizada como monogénica ou poligénica. A hipertrigliceridemia monogénica, denominada como síndrome de quilomicronemia familiar, tem como origem a homozigotia ou heterozigotia composta para variantes genéticas patogénicas, raras nos genes canónicos envolvidos no metabolismo dos triglicerídeos. A hipertrigliceridemia poligénica, denominada síndrome de quilomicronémia multifatorial nos casos mais extremos de hipertrigliceridemia, é causada pela heterozigotia de variantes genéticas raras nos genes canónicos, e/ou elevada acumulação de polimorfismos comuns associados com triglicerídeos plasmáticos elevados. A expressão fenotípica é amplamente heterogénea e influenciada por fatores não genéticos, como obesidade, alcoolismo ou síndrome metabólica. Os genes canónicos do metabolismo dos triglicerídeos incluem *LPL*, *APOA5*, *APOC2*, *GPIHBP1* e *LMF1*. As variantes genéticas detetadas são do tipo *missense*, *nonsense*, *splicing*, *frameshift*, alterações nas regiões reguladoras, deleções, inserções, e rearranjos e introduzem alterações ao nível da transcrição e tradução genética de proteínas intervenientes no processamento das lipoproteínas. Face à ineficiência catabólica, a acumulação patológica dos triglicerídeos no compartimento plasmático contribui para a progressão de patologias, nomeadamente a doença aterosclerótica cardiovascular e a pancreatite aguda.

Palavras-chave: Hipertrigliceridemia; quilomicronemia; aterosclerose; pancreatite.

## Abstract

Hypertriglyceridemia is a common clinical condition characterized by an increase of plasma triglyceride concentration above a threshold value. The hypertriglyceridemia originating from genetic abnormalities can be categorized as monogenic or polygenic. Monogenic hypertriglyceridemia, currently known as familial chylomicronemia syndrome, is caused by homozygous or compound heterozygous genetic variants in canonical genes associated with triglyceride metabolism. Polygenic hypertriglyceridemia, also known as multifactorial chylomicronemia syndrome in extreme cases of hypertriglyceridemia, is caused by heterozygous genetic variants in canonical genes, or by a high score of common polymorphisms associated with elevated triglycerides. Phenotype expression is widely heterogeneous and influenced by non-genetic secondary factors, such as obesity, alcohol consumption, or metabolic syndrome. The canonical genes involved in triglyceride metabolism are *LPL*, *APOA5*, *APOC2*, *GPIHBP1* and *LMF1*. Genetic variants detected within these *loci* are missense, nonsense, splicing, frameshift, alterations at the regulatory region, deletion/insertion and rearrangements, and cause abnormal genetic transcription and translation of proteins participating in the lipoproteins processing. Due to inefficient lipolysis induced by the genetic variants, cumulating plasma triglycerides contribute to the development of pathologies, namely atherosclerotic cardiovascular disease and acute pancreatitis.

Keywords: Hypertriglyceridemia; chylomicronemia; atherosclerosis; pancreatitis.

## **Abreviaturas**

**ABCA1** – *ATP Binding Cassette A1*

**AGL** – Ácidos gordos livres

**ANGPTL** – Proteínas do tipo angiopoietina

**Apo** – Apolipoproteína

**ASCVD** – Doença aterosclerótica cardiovascular

**C** – Grupo carboxilo (-COOH)

**CAD** – Doença arterial coronária

**CETP** – *Cholesteryl ester transfer protein*

**c-HDL** – Colesterol HDL

**ChREBP** – *Carbohydrate response element binding protein*

**Cld** – *Combined lipase deficiency*

**c-LDL** – Colesterol LDL

**CT** – Colesterol total

**CVD** – Doença cardiovascular

**DGAT** – Diacilglicerol aciltransferase

**EWAS** – *Epigenome-wide association studies*

**FH** – Hipercolesterolemia familiar

**GGT** – Gamaglutamil transferase

**GLGC** – *Global Lipids Genetics Consortium*

**GOF** – Ganho de função (*gain of function*)

**GPIHBP1** – Proteína de ligação à lipoproteína de alta densidade ancorada ao glicosilfosfatidilinositol

**GWAS** – *Genome-wide association studies*

**HDL** – Lipoproteína de alta densidade (*high-density lipoprotein*)

**HL** – Lipase hepática

**HLP** – Hiperlipoproteinemia

**HSPG** – Proteoglicanos heparanosulfatos

**HTG** – Hipertrigliceridemia

**IDL** – Lipoproteína de densidade intermédia (*intermediate-density lipoprotein*)

**IMC** – Índice de massa corporal

**LCAT** – Lecitina colesterol aciltransferase

**LDL** – Lipoproteína de baixa densidade (*low-density lipoprotein*)

**LMF-1** – Fator de maturação da lipase 1

**LOF** – Perda de função (*loss of function*)

**LPL** – Lipoproteína lipase

**LR11/SorLA** – *Mosaic receptor*

**LRP1** – *LDL receptor related protein 1*

**LRT** – Lipoproteínas ricas em triglicerídeos

**LU** – Ly6/uPAR, *lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor*

**Lys6** – *Lymphocyte antigen 6*

**MAG** – Monoacilglicerol

**MGAT** – Monoacilglicerol aciltransferase

**MTP** – *Microsomal triglyceride transfer protein*

**N** – Grupo amino (-NH<sub>2</sub>)

**NCEP** – *National Cholesterol Education Program*

**oxLDL** - Lipoproteínas LDL oxidadas

**PLAT** – *Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin*

**PRS** – *Polygenic risk score*

**QM** – Quilomicra

**QMM** – Síndrome de quilomicronemia multifatorial

**RE** – Reticulo endoplasmático

**R-LDL** – Recetor LDL

**SNP** – Polimorfismo (*single-nucleotide polymorphism*)

**SQF** – Síndrome de quilomicronemia familiar

**SR-BI** - *Receptor class B type 1*

**TG** – Triglicerídeos

**USF** – *Upstream stimulatory factor*

**UTR** – Região não-codificante (*untranslated region*)

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

**VSMC** – Células do músculo liso vascular

Nos últimos anos tem sido recomendado a adoção de uma nova nomenclatura de classificação das alterações genéticas, substituindo as designações de mutação e polimorfismo. As primeiras correspondem agora às “variante genética patogénica” e “variante genética provavelmente patogénica”, enquanto as últimas correspondem agora às “variante genética benigna” e “variante genética provavelmente benigna”. Estas novas designações ainda não ganharam grande utilização na comunidade clínica, pelo que se optou neste trabalho pela utilização dos termos mais usuais por forma a facilitar a compreensibilidade por parte dos profissionais de saúde.

## Índice

|                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| Agradecimentos.....                                                   | iv  |
| Resumo.....                                                           | v   |
| Abstract.....                                                         | vi  |
| Abreviaturas.....                                                     | vii |
| 1. Introdução.....                                                    | 1   |
| 2. Classes de lipoproteínas.....                                      | 3   |
| 3. Apolipoproteínas.....                                              | 8   |
| 3.1. Apolipoproteínas A-I, A-II, A-IV e A-V.....                      | 8   |
| 3.2. Apolipoproteínas B-100 e B-48.....                               | 10  |
| 3.3. Apolipoproteínas C-I, C-II e C-III.....                          | 11  |
| 3.4. Apolipoproteína E.....                                           | 13  |
| 4. Lipoproteína lipase.....                                           | 14  |
| 5. Vias de metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos..... | 15  |
| 5.1. Metabolismo das lipoproteínas e hipertrigliceridemia.....        | 16  |
| 6. Hipertrigliceridemia.....                                          | 20  |
| 6.1. Síndrome de Quilomicronémia Familiar.....                        | 21  |
| 6.2. Síndrome de Quilomicronémia Multifatorial.....                   | 22  |
| 6.3. Hipertrigliceridemia leve-a-moderada.....                        | 25  |
| 6.4. Diagnóstico diferencial da hipertrigliceridemia.....             | 25  |
| 6.5. Genes.....                                                       | 27  |
| 6.5.1. <i>LPL</i> .....                                               | 27  |
| 6.5.2. <i>APOC2</i> .....                                             | 31  |
| 6.5.3. <i>APOC3</i> .....                                             | 34  |
| 6.5.4. <i>APOA5</i> .....                                             | 37  |
| 6.5.5. <i>LMF1</i> .....                                              | 44  |
| 6.5.6. <i>GPIHBP1</i> .....                                           | 45  |
| 6.6. Hipertrigliceridemia e risco de pancreatite.....                 | 47  |
| 6.7. Hipertrigliceridemia e risco cardiovascular.....                 | 49  |
| 7. Conclusão.....                                                     | 55  |
| Referências.....                                                      | 57  |

## Índice de figuras

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Representação esquemática das diferentes densidades das frações lipoprotéicas no plasma, obtidas por ultracentrifugação.....                                          | 3  |
| <b>Figura 2.</b> Formação das quilomicra no reticulo endoplasmático e complexo de golgi, no enterócito.....                                                                            | 5  |
| <b>Figura 3.</b> Representação gráfica das lipoproteínas <i>very low-density lipoprotein</i> (VLDL), <i>low-density lipoprotein</i> (LDL) e <i>high-density lipoprotein</i> (HDL)..... | 7  |
| <b>Figura 4.</b> Biogénese e metabolismo da HDL.....                                                                                                                                   | 7  |
| <b>Figura 5.</b> Síntese das apoproteínas B100 e B48 pelo mecanismo de edição RNA pós-transcricional.....                                                                              | 10 |
| <b>Figura 6.</b> Estrutura do complexo lipolítico.....                                                                                                                                 | 12 |
| <b>Figura 7.</b> Representação gráfica da enzima lipoproteína lipase ligada à GPIHBP1.....                                                                                             | 14 |
| <b>Figura 8.</b> Metabolismo dos triglicerídeos pela via endógena e via exógena.....                                                                                                   | 15 |
| <b>Figura 9.</b> Representação gráfica da cascata metabólica da apoproteína B-100 na hipertrigliceridemia.....                                                                         | 17 |
| <b>Figura 10.</b> Sistema <i>score</i> para diagnóstico da síndrome de quilomicronemia familiar.....                                                                                   | 24 |
| <b>Figura 11.</b> Diagrama esquemático dos domínios funcionais, modificações pós-traducionais e variantes no gene <i>LPL</i> .....                                                     | 26 |
| <b>Figura 12.</b> Sequência primária, estrutura helicoidal da apoproteína C-II, e variantes no gene <i>APOC2</i> .....                                                                 | 29 |
| <b>Figura 13.</b> Representação esquemática da apoproteína C-II <i>wild type</i> e variante p.Ser45GlnfsTer24.....                                                                     | 31 |
| <b>Figura 14.</b> Representação gráfica da estrutura helicoidal da apoproteína C-III.....                                                                                              | 32 |
| <b>Figura 15.</b> Diagrama do gene <i>APOA5</i> e da organização estrutural da apoproteína A-V.....                                                                                    | 35 |
| <b>Figura 16.</b> Modelo molecular da apoproteína A-V e as versões truncadas, resultantes das variantes Q148X, Q139X e c.161+3G>C.....                                                 | 40 |
| <b>Figura 17.</b> Representação gráfica da estrutura e função da LMF1.....                                                                                                             | 41 |
| <b>Figura 18.</b> Diagrama esquemático dos domínios funcionais, modificações pós-traducionais e variantes no gene <i>GPIHBP1</i> .....                                                 | 43 |

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 19.</b> Mecanismo proposto para a pancreatite aguda induzida pela hipertrigliceridemia..... | 46 |
| <b>Figura 20.</b> Efeito aterogénico das lipoproteínas ricas em triglicerídeos e remanescentes..      | 49 |

## **Índice de tabelas**

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas das principais classes de lipoproteínas.....4

**Tabela 2.** Classificação de Fredrickson dos fenótipos de hiperlipoproteinemia.....18

## 1. Introdução

Os lípidos são biomoléculas com características hidrofóbicas que atuam como reservatórios de energia, como moléculas estruturais na biogênese das membranas e das bainhas de mielina, mediadoras da sinalização celular e reguladoras do tráfego intracelular, entre outras funções (1). Existe um sistema de transporte envolvendo complexos moleculares especializados, denominados lipoproteínas, que viabilizam a circulação de triglicerídeos (TG), colesterol e fosfolípidos, assim como vitaminas lipossolúveis (A, D, E, e K) no compartimento plasmático aquoso (2). Para além disso na circulação sanguínea ocorrem várias interações entre as proteínas superficiais que constituem o complexo lipoprotéico, denominadas apolipoproteínas, com enzimas lipolíticas fundamentais no metabolismo lipídico e com recetores celulares (1, 3, 4).

A concentração plasmática dos lípidos, nomeadamente de TG e colesterol, de grande parte da população dos países desenvolvidos, excede significativamente o valor de referência predefinido, em conformidade com as necessidades fisiológicas, contribuindo para o desenvolvimento de patologias, como a doença cardiovascular aterosclerótica (ASCVD) e a pancreatite aguda (4, 5). A associação entre elevados níveis de colesterol sanguíneo e o desenvolvimento de ASCVD está exaustivamente descrita na literatura, pelo contrário o contributo dos TG na progressão da ASCVD é ainda pouco conhecido, ainda que vários estudos epidemiológicos tenham vindo a demonstrar uma forte correlação positiva entre a concentração plasmática de TG e o risco ASCVD (4-9). Os níveis plasmáticos muito elevados de TG são um inegável fator de causalidade de pancreatite aguda, representando a terceira causa mais comum na origem dos episódios pancreáticos agudos (5, 10-12).

A concentração dos TG no plasma resulta de uma interação entre fatores genéticos e fatores não-genéticos. Os fatores genéticos compreendem a presença de variantes genéticas em múltiplos *loci* genómicos, positivamente correlacionados com a concentração de TG plasmáticos (13, 14). Cumulativamente, estas variantes explicam parte da variabilidade interindividual na concentração de TG observada a nível populacional (13). Duas importantes sociedades científicas, a *European Society of Cardiology* e a *European Atherosclerosis Society* consideram valores de TG plasmáticos, em jejum, inferiores a 1,7 mmol/L ou 150 mg/dL, como normotrigliceridemia. Quando a concentração excede o valor de referência (percentil 90 a 95 para a idade e sexo na população) é qualificada como hipertrigliceridemia (5).

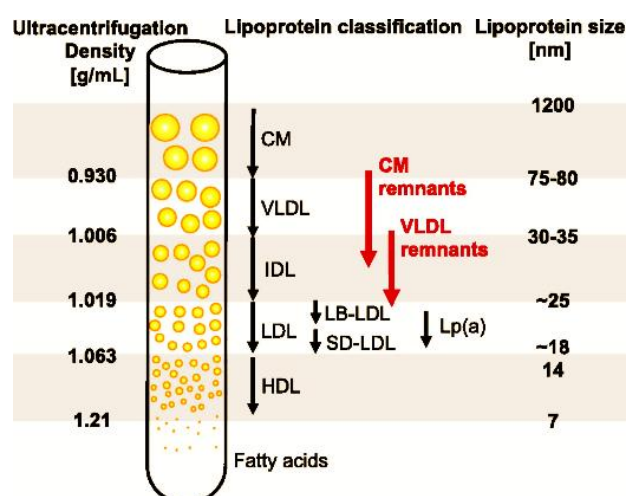
A hipertrigliceridemia é um problema frequentemente reportado na prática clínica, apresentando uma prevalência de, aproximadamente 10% na população adulta, com

considerável variabilidade inter-regional (12, 15). A hipertrigliceridemia pode ser classificada quanto ao fenótipo (concentração de TG), como hipertrigliceridemia leve-a-moderada e hipertrigliceridemia grave, e quanto ao genótipo, como hipertrigliceridemia monogénica ou hipertrigliceridemia poligénica (16, 17). A hipertrigliceridemia monogénica, atualmente denominada síndrome de quilomicronemia familiar (SQF), tem na sua origem a homozigotia ou heterozigotia composta para variantes genéticas raras, de grande impacto, nos genes canónicos envolvidos no metabolismo dos TG. A expressão do fenótipo monogénico induz o desenvolvimento de hipertrigliceridemia grave, independentemente da presença de fatores não genéticos (17-19). Em contrapartida, a hipertrigliceridemia poligénica apresenta uma base genética particularmente ambígua, caracterizada pela heterozigotia para variantes, de grande impacto, nos genes canónicos, e elevada acumulação de polimorfismos comuns, de pequeno impacto, em genes candidatos, associados com TG elevados. O fenótipo poligénico é amplamente heterogéneo, variando desde normolipidemia a hipertrigliceridemia grave, esta denominada síndrome de quilomicronemia multifatorial (QMM). A expressão fenotípica da hipertrigliceridemia poligénica é influenciada pela presença de fatores não genéticos, sendo o fenótipo tanto mais grave quanto maior o número e relevância dos fatores não genéticos presentes (17, 20, 21).

Os fatores não genéticos, ou secundários, predisponentes ao desenvolvimento da hipertrigliceridemia, incluem aspetos biológicos (idade, sexo, etnia), hábitos de vida (tabagismo, consumo excessivo de álcool, dieta hipercalórica com elevado índice glicémico, sedentarismo, *stress*), e condições de saúde (diabetes *mellitus*, insulinoresistência, obesidade, doença crónica renal, hipotireoidismo, gravidez), entre outros fatores, nomeadamente medicação (4, 5, 16). Num estudo populacional com uma amostra representativa da população Norte-Americana, 22,5% dos indivíduos diabéticos apresentavam valores de TG >200 mg/dL (22). Estudos em doentes com hipertrigliceridemia grave reportaram que até 50% dos participantes apresentavam um índice de massa corporal (IMC) na categoria da obesidade (23). Outros estudos populacionais demonstraram que o consumo excessivo de álcool estava presente em 9% a 50% dos indivíduos com hipertrigliceridemia grave, em coexistência com obesidade e diabetes (23). A administração de fármacos, como diuréticos, estrogénios, corticosteroides, antidepressivos e retinoides também contribuem consideravelmente para o desenvolvimento da hipertrigliceridemia (10). Por norma, os indivíduos geneticamente suscetíveis ao desenvolvimento desta condição apresentam também elementos não genéticos, pelo que a expressão fenotípica dever-se-á à carga cumulativa da genética com fatores não genéticos (5, 10, 24).

## 2. Classes de lipoproteínas

Os principais lípidos, TG e ésteres de colesterol, são apolares e insolúveis em solução aquosa. As lipoproteínas são complexos macromoleculares esféricos tipo micelas, que transportam os lípidos e vitaminas lipossolúveis no compartimento plasmático. Os TG e o colesterol esterificado constituem o *core* lipoproteico, circundado por uma monocamada fosfolipídica anfipática, composta por fosfolípidos, colesterol livre e proteínas especializadas. A componente proteica corresponde às apolipoproteínas ou apoproteínas, reguladoras das interações com enzimas metabólicas e recetores celulares (1, 2, 25, 26). As lipoproteínas podem ser categorizadas em classes de acordo com o tamanho, densidade e composição. As principais classes de lipoproteínas foram definidas de acordo com a respetiva densidade, determinada por ultracentrifugação: quilomicra (QM), lipoproteínas de muito baixa densidade (*very-low-density lipoprotein*, VLDL), lipoproteínas de densidade intermédia (*intermediate-density lipoprotein*, IDL), lipoproteínas de baixa densidade (*low-density lipoprotein*, LDL) e lipoproteínas de alta densidade (*high-density lipoprotein*, HDL). (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática das diferentes densidades das frações lipoprotéicas no plasma, obtidas por ultracentrifugação. [Adaptado de Chait A *et al.* 2020 (27)]

As propriedades físico-químicas de cada lipoproteína encontram-se descritas na tabela 1.

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas das principais classes de lipoproteínas. [Adaptado de (25)]

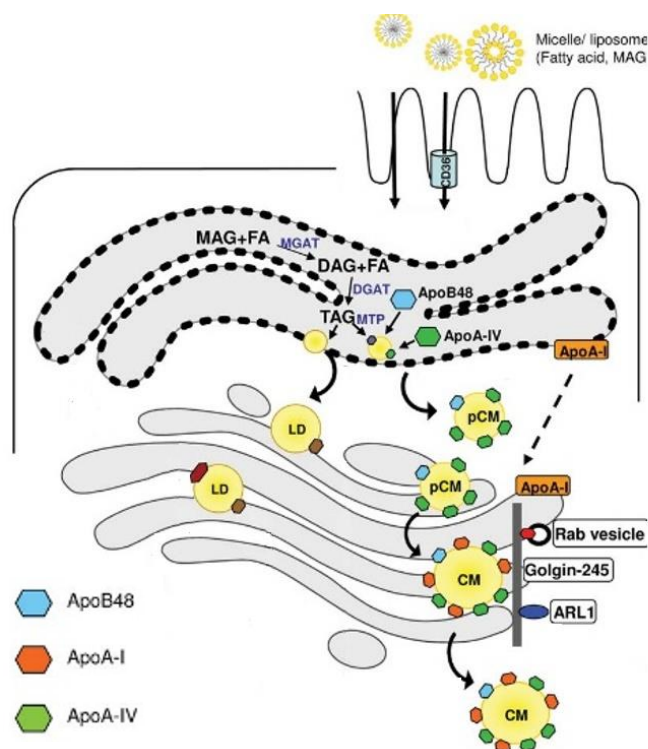
| Lipoproteína | Densidade<br>(g/dL) | Peso<br>molecular<br>(Daltons) | Diâmetro<br>(nm) | Lípidos* (%) |       |       |
|--------------|---------------------|--------------------------------|------------------|--------------|-------|-------|
|              |                     |                                |                  | TG           | CHOL  | PL    |
| Quilomicra   | 0.95                | 400×10 <sup>6</sup>            | 75-1200          | 80-95        | 2-7   | 3-9   |
| VLDL         | 0.95-1.006          | 10-80×10 <sup>6</sup>          | 30-80            | 55-80        | 5-15  | 10-20 |
| IDL          | 1.006-1.019         | 5-10×10 <sup>6</sup>           | 25-35            | 20-50        | 20-40 | 15-25 |
| LDL          | 1.019-1.063         | 2.3×10 <sup>6</sup>            | 18-25            | 5-15         | 40-50 | 20-25 |
| HDL          | 1.063-1.21          | 1.7-3.6×10 <sup>5</sup>        | 5-12             | 5-10         | 15-25 | 20-30 |

TG- Triglicerídeos; CHOL- Colesterol; PL- Fosfolípidos; VLDL- lipoproteína de muito baixa densidade; IDL- lipoproteína de densidade intermédia; LDL- lipoproteína de baixa densidade; HDL- lipoproteína de alta densidade; \*Composição percentual de lípidos; apolipoproteínas compõe a restante percentagem.

Os lípidos absorvidos da dieta são armazenados em gotículas lipídicas no citosol dos enterócitos e incorporados nas QM (28). As QM produzidas nos enterócitos são lançadas na circulação, onde transportam os lípidos e nutrientes lipossolúveis provenientes da dieta (25). Após as refeições estas partículas são rapidamente removidas da circulação e indetetáveis após um jejum de 12 horas (3). O interior das QM é predominantemente formado por TG, (perfazendo cerca de 90% do seu conteúdo lipídico) e colesterol esterificado (25). O core lipídico é circundado por uma monocamada fosfolipídica, com colesterol livre e apoproteínas B48, A-I, A-II e A-IV. Contrariamente às demais apoproteínas, a apoB48 existe exclusivamente nas quilomicra (2, 25, 28-30).

A síntese das QM no enterócito (Figura 2) começa com a edição pós-transcricional do mRNA apoB para mRNA apoB48 e translocação cotraducional do mRNA apoB48 para o lúmen do reticulo endoplasmático (RE), formando-se a apoproteína B48 (31, 32). Simultaneamente, ocorre a lipidação das apoB48 nascentes, mediada pela *triglyceride transfer protein microsomal* (MTP) (25, 29, 32). As apo A-IV são incorporadas na superfície das QM, estabilizando o processo de lipidação (28, 32). A indisponibilidade de material lipídico (TG, fosfolípidos, ou colesterol esterificado), ou da proteína MTP, determina a desintegração intracitosólica da cadeia apoB nascente, via sistema ubiquitina proteossoma (25, 28). As QM nascentes adquirem as apolipoproteínas C-I, C-III e E, por interação com a lipoproteína HDL após libertação para a circulação sistémica via ducto torácico, (2, 25, 28, 29).

As QM intestinais e as VLDL hepáticas representam as duas classes de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (LRT) que efetuam a distribuição dos lípidos e vitaminas lipossolúveis a todo o corpo. Enquanto as QM executam o transporte dos lípidos provenientes da dieta, as VLDL facultam a transferência dos lípidos endógenos para os tecidos periféricos (29). As VLDL são sintetizadas no fígado e a sua composição compreende um interior rico em TG e colesterol esterificado, e uma superfície composta pelas apoproteínas B-100, C e E (Figura 3). Das apoproteínas constitutivas, a apoB-100 é a mais importante, conferindo estabilidade estrutural à partícula VLDL nascente (26).



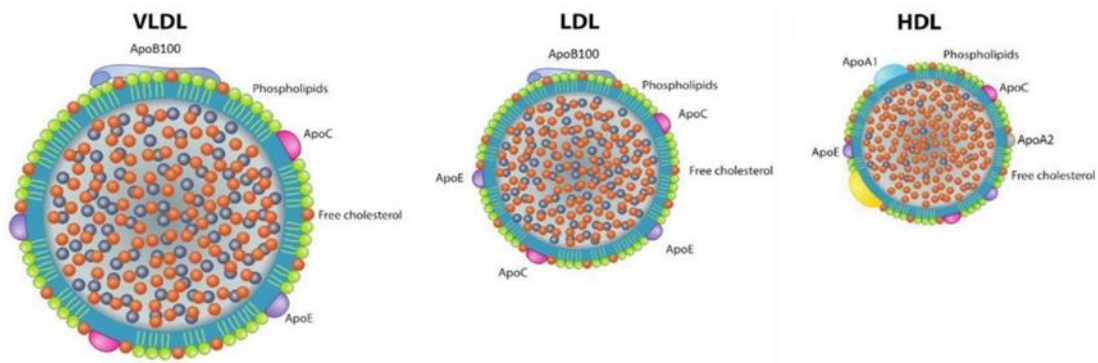
**Figura 2.** Formação das quilomicra no retículo endoplasmático e complexo de golgi, no enterócito. Os ácidos gordos livres (AGL) ou monoacilgliceróis (MAG) são absorvidos do lúmen intestinal (transportador CD36) e esterificados para formar TG. Estes são incorporados na apoB48 nascente via MTP. A ApoA-IV é associada às QM nascentes. As quilomicra são mobilizadas para o golgi, onde obtêm a apoA-I e por exocitose são libertadas para a linfa. [Adaptado de Hesse D *et al.* 2013 (32)]

A biogénese das VLDL começa com a translocação co-traducional da apoB-100 para o lúmen do RE. Mediante a ação da MTP, a apoB-100 nascente é lipidada com TG que se acumulam no espaço intramembranar do RE ou em gotículas citosólicas (33). Os TG são sintetizados pelo hepatócito a partir de ácidos gordos livres (AGL) provenientes 1) do intestino via veia porta, 2) da proteólise lisossomal hepática de lipoproteínas ricas em

TG, ou 3) da lipogénese *de novo* (5, 26). A insuficiência do conteúdo de TG incapacita a lipidação eficiente da apoB100 nascente e induz a sua degradação via interação com chaperonas citosólicas *heat shock protein* (hsp70 e hsp90) e degradação proteolítica (26). O fígado é capaz de sintetizar uma gama de partículas VLDL, que variam entre os 40 e os 70 nm (2). As VLDL são heterogéneas e moduladas consoante o estado nutricional, o que condiciona a composição lipídica e o diâmetro destas lipoproteínas, assim como a quantidade de partículas VLDL produzidas (25, 29). As VLDL são exocitadas para a corrente sanguínea, onde integram as apoproteínas C-I, C-II, C-III e E, por interação com as lipoproteínas HDL (26, 32).

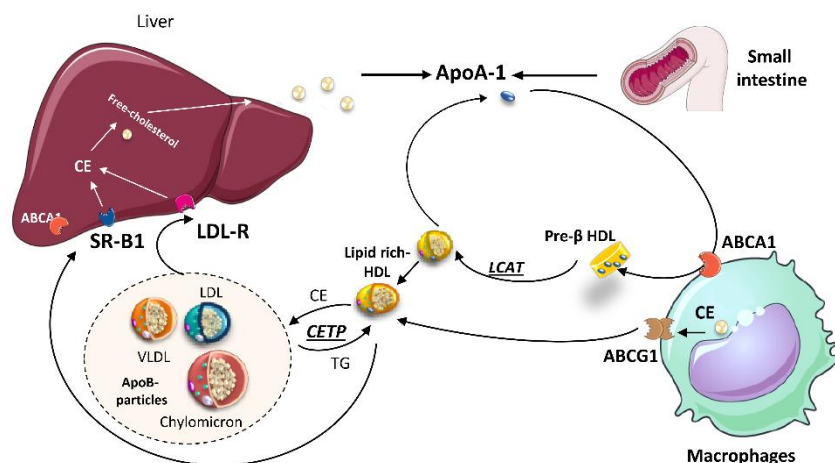
Na circulação, as VLDL interagem com as enzimas lípases, responsáveis pela hidrólise dos TG, e são convertidas nas partículas remanescentes IDL e LDL. A monocamada fosfolipídica das IDL contém as apoB-100 e apoE, revestindo um *core* lipídico constituído por frações de colesterol esterificado e TG. A lipólise enzimática das IDL leva à formação das lipoproteínas LDL, compostas por apoproteína B-100 na monocamada fosfolipídica e um *core* lipídico quase exclusivamente constituído por colesterol esterificado (Figura 3), (3, 25, 29). As LDL são as principais lipoproteínas responsáveis pela deposição de colesterol nos tecidos periféricos. A taxa de secreção e as propriedades físico-químicas das IDL e LDL são influenciadas pela disponibilidade dos TG (25, 29).

As lipoproteínas HDL são representadas por uma mistura heterogénea de partículas com diferentes tamanhos, densidades e composição, desde pequenas partículas discoides até grandes esferas ricas em colesterol (34). Estas lipoproteínas são caracterizadas pela presença da apoproteína A (Figura 3) e podem ser classificadas em subclasses como HDL<sub>2</sub>, menos densas, e HDL<sub>3</sub>, mais densas (3). As HDL executam o transporte reverso do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado e de vitaminas, proteínas e microRNAs para os órgãos distais (35). As HDL são as lipoproteínas mais abundantes na circulação periférica. A pequena dimensão característica das HDL deve-se à composição do *core* central, rico em colesterol esterificado. O centro lipídico está incorporado numa monocamada fosfolipídica, contendo colesterol livre e apolipoproteínas, predominantemente as apoA-I e apoA-II.



**Figura 3.** Representação gráfica das lipoproteínas *very low-density lipoprotein* (VLDL), *low-density lipoprotein* (LDL) e *high-density lipoprotein* (HDL), e dos constituintes da monocamada fosfolipídica – fosfolípidos, colesterol livre e apolipoproteínas [Adaptado de Helkin A *et al.* 2016 (6)].

A biogénese das HDL (Figura 4) decorre no fígado e no intestino, através da síntese e secreção da apo A-I. Esta interage com o transportador transmembranar *ATP Binding Cassette A1* (ABCA1), expresso em diferentes células periféricas (hepatócitos, enterócitos, macrófagos), que promove o efluxo de colesterol e fosfolípidos para a partícula discoide HDL nascente (pré  $\beta$  HDL) (36). A enzima lecitina colesterol aciltransferase (*Lecithin: Cholesterol Acyltransferase* - LCAT) favorece a esterificação do colesterol livre, formando o *core* da partícula HDL madura. A enzima denominada proteína de transferência de colesterol esterificado (*cholesteryl ester transfer protein* - CETP) medeia a permuta do conteúdo lipídico entre as partículas HDL e as lipoproteínas contendo apoB, removendo o colesterol esterificado das HDL e, concomitantemente, adicionando TG provenientes das lipoproteínas contendo Apo B (25, 29, 35). A *clearance* do colesterol HDL ocorre via aporte seletivo, pelo recetor *scavenger receptor class B type 1* (SR-BI) expresso nos hepatócitos, sem haver internalização ou degradação da partícula HDL (37).



**Figura 4.** Biogénese e metabolismo da HDL. A ApoA-I sintetizada pelo fígado ou intestino é libertada para o plasma, onde recolhe o colesterol dos tecidos periféricos e macrófagos via o transportador *ATP binding cassette transporter A1* (ABCA1). MicroRNAs, proteínas, hormonas e vitaminas são também incorporados na partícula HDL. A enzima *Lecithin: Cholesterol Acyltransferase* (LCAT) esterifica o colesterol livre e as HDL ricas em colesterol trocam TG com as lipoproteínas contendo apoB (QM, VLDL, LDL) pela ação da *cholesteryl ester transfer protein* (CETP). Recetores hepáticos *scavenger receptor* (SR)-B1 removem as partículas HDL. [Adaptado de Ben-Aicha S *et al.* 2020 (35)]

### 3. Apolipoproteínas

As apolipoproteínas, também denominadas apoproteínas, são glicoproteínas anfipáticas, incorporadas na camada fosfolipídica das lipoproteínas que conferem estabilidade estrutural e desempenham funções importantes na regulação do metabolismo das lipoproteínas, atuando como cofatores enzimáticos e ligandos de recetores celulares (3, 25, 37).

#### 3.1. Apolipoproteínas A-I, A-II, A-IV e A-V

As apoA-I são as apolipoproteínas mais abundantes na superfície das partículas HDL, representando cerca de 70% a 80% do seu conteúdo proteico. Como referido anteriormente, estas apoproteínas desempenham um papel anti-aterogénico, mediando o transporte reverso do colesterol HDL. A apo A-I é sintetizada e secretada pelo intestino e fígado, e constitui a denominada HDL pré- $\beta$ , ou HDL nascente, de estrutura discoide e ainda sem lípidos. A apoC-I ativa o transportador ABCA1, que promove o efluxo de colesterol e fosfolípidos para a partícula HDL nascente. Subsequentemente, a apoA-I ativa a enzima LCAT e desencadeia a esterificação do colesterol que vai sendo incorporado no *core*, formando a HDL<sub>3</sub> esférica. Atuando como ligando do recetor SR-BI, a apoC-I ativa a *clearance* do colesterol constitutivo das HDL<sub>2</sub> maduras em circulação (3, 25, 36, 37).

Para além das apoA-I, as apoA-II são também consideradas apoproteínas principais das partículas HDL, perfazendo 10% a 15% das proteínas desta lipoproteína (3, 25, 34). No entanto, a função da apo A-II no metabolismo e na estrutura lipoprotéica ainda não está completamente estabelecida (38). Polimorfismos na região promotora do gene *APOA2* diminuem a taxa de transcrição da apoA-II, sendo que os portadores apresentam baixas concentrações, às quais se associam o aumento da circunferência abdominal e do

metabolismo das VLDL pós-prandiais (25, 38). Sendo estas alterações observadas apenas com o consumo de gorduras saturadas, concluiu-se que a epigenética da região promotora do *APOC2* está associada ao consumo de uma dieta rica em gorduras saturadas e à existência do polimorfismo bialélico (38).

As apoA-IV são, fundamentalmente, sintetizadas nos enterócitos e circulam livremente no plasma ou associadas às QM e HDL. Após uma refeição rica em gorduras, é induzida a síntese intestinal da apoA-IV, assimilada pelas QM e partículas HDL, durante a absorção dos lípidos da dieta (3, 25, 37). Em modelos animais, a apoA-IV parece influenciar a formação e secreção das VLDL nascentes e, conseqüentemente, os níveis de triglicerídeos no plasma (39).

As apoA-V são, predominantemente, produzidas pelo fígado e circulam associadas às QM, VLDL e HDL. Comparativamente às outras apolipoproteínas, a apoA-V existe no plasma em concentrações muito baixas. Esta apoproteína é um importante modulador do catabolismo das LRT, atuando como ativadora da lipoproteína lipase (LPL), a enzima responsável pela hidrólise dos TG (3, 40, 41). Vários estudos demonstram que a apoA-V aumenta a afinidade das LRT pela LPL, por interação com os proteoglicanos heparanosulfatos (HSPG) e com a proteína de ligação à lipoproteína de alta densidade ancorada ao glicosilfosfatidilinositol (GPIHBP1), direcionando a lipoproteína para o centro alostérico da LPL. Os resíduos de aminoácidos positivamente carregados da apoA-V são complementares com os aminoácidos negativamente carregados da família de recetores LDL (R-LDL, *LDL receptor related protein 1* LRP1, *mosaic receptor* LR11/SorLA) e dos HSPG hepáticos, pelo que esta apoproteína poderá estar envolvida na *clearance* das LRT (40, 41). Foi ainda proposto o possível efeito inibitório da apoA-V na secreção hepática das VLDL, através de um mecanismo intracelular (40). Certas variantes homozigóticas no gene *APOA5* aumentam o risco de hipertrigliceridemia e pancreatite aguda (3).

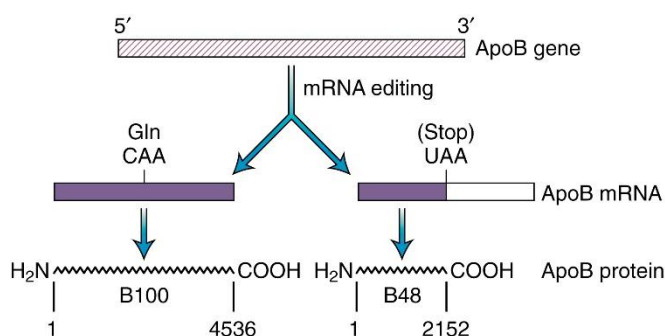
### 3.2. Apolipoproteínas B-100 e B-48

A apolipoproteína B é um componente estrutural das VLDL, IDL, LDL e QM. Estas lipoproteínas contendo uma apoproteína B são consideradas pró-aterogénicas e estão envolvidas no mecanismo fisiopatológico da aterogénese (6, 8, 9, 42-46). A ApoB existe sob as formas de apoB-100 e apoB-48. Tal como referido anteriormente, a apoB-100 é expressa no fígado e representa a apoproteína estrutural das VLDL, IDL e LDL, enquanto

que a apoB-48 é exclusivamente sintetizada no intestino e representa a apoproteína estrutural das QM (3, 25, 26).

A apoB-100 e a apoB-48 são codificadas pelo mesmo gene *APOB*. A cadeia polipeptídica apoB-100 integra 100% dos aminoácidos codificados pelo gene *APOB*, enquanto a ApoB-48 é composta por apenas 48% dos resíduos aminoacídicos codificados pelo mesmo gene (25, 26). A síntese da ApoB-48 resulta da edição pós-transcricional do mRNA – um processo molecular que modifica a sequência nucleotídica do transcrito RNA (Figura 5). Como resultado, os aminoácidos incorporados na cadeia polipeptídica da apo B-48 diferem dos codificados pelo gene *APOB* (31). O processo envolve a desaminação da base nucleotídica 6666 citosina (C) pelo uracilo (U) no mRNA apoB-100, convertendo o codão glutamina (CAA) num codão de terminação (UAA). Durante a tradução do mRNA apoB no enterócito, o codão UAA sinaliza a interrupção da tradução, formando-se uma versão mais curta da apolipoproteína B – a apoB-48 (26, 31).

A apoB-48, sintetizada no enterócito, inicia a formação das QM, proporcionando suporte estrutural às partículas. O terminal COOH- da apo B-100, responsável pela interação com o recetor LDL, não é incluído nas apo B-48, pelo que estas não estão envolvidas no mecanismo de *clearance* das QM. Por outro lado, a apoB-100, sintetizada no hepatócito, coordena a formação das partículas VLDL. Aquando da tradução de uma cópia mRNA apoB-100, a proteína MTP reorganiza as pontes de dissulfeto da apoproteína para acomodar os lípidos disponibilizados no lúmen do RE (3, 26, 32).



**Figura 5.** Síntese das apoproteínas B100 e B48 pelo mecanismo de edição pós-transcricional do RNA. A modificação citosina para uracilo determina a integração de um codão stop e a obtenção de uma proteína mais curta, constituída por 48% dos aminoácidos codificados pelo mRNA do gene *APOB* [Adaptado de Shlomo Melmed RK *et al.* 2019 (3)].

### 3.3. Apolipoproteínas C-I, C-II e C-III

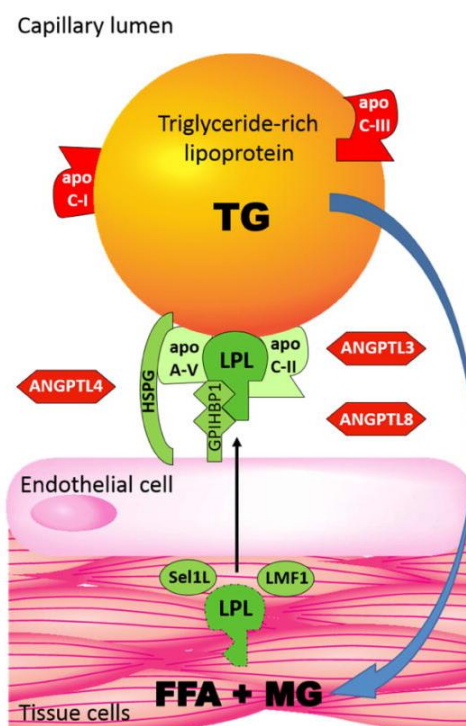
As apolipoproteínas C são representadas por três apoproteínas de baixo peso molecular, designadas apoC-I, apoC-II e apoC-III. As apoproteínas C são sintetizadas no fígado e, residualmente, no intestino (47). Apesar das diferentes funcionalidades, estão presentes nas várias classes nomeadamente nas lipoproteínas ricas em TG, LDL e HDL (3, 25, 47).

A apoC-I favorece a síntese e maturação das HDL (3, 25, 47, 48). Nas HDL nascentes, a apoC-I ativa a LCAT, enzima responsável pela esterificação do colesterol e maturação da lipoproteína HDL. Adicionalmente, a apoC-I inibe a CETP, que promove a troca de conteúdo lipídico entre a partícula HDL e as outras lipoproteínas. A apoC-I é também um importante interveniente no catabolismo das LRT, sendo reconhecida por inibir a ação lipolítica da LPL, assim como comprometer a *clearance* das LRT e respetivas remanescentes mediante os recetores celulares R-LDL e *LDL receptor-related protein* (LRP) (48).

A apoC-II é um cofator obrigatório da LPL (Figura 6). As lipoproteínas HDL são reconhecidas como reserva das apo C-II, subsequentemente transferidas para as QM e VLDL no estado pós-prandial (49). O mecanismo exato pelo qual a apoC-II agiliza a lipólise enzimática permanece indeterminado. Hipoteticamente, a oscilação da apoproteína na camada externa da lipoproteína promove a exteriorização dos TG no *core* hidrofóbico, onde são hidrolisados pela LPL (50). De facto, estudos de simulação molecular propõem que a camada fosfolipídica fica mais fina com um aumento da interdigitação entre TG e fosfolípidos, favorecendo a disponibilidade do substrato à LPL (50, 51). A interação proteína-proteína entre a apoC-II e a lipase poderá ainda induzir alterações conformacionais da LPL, como a exposição da fenda catalítica enzimática e subsequente acessibilidade dos TG (51). Variantes patogénicas na apoC-II causam hipertrigliceridemia grave, mimetizando uma deficiência de LPL, e pancreatite aguda (3, 25, 49). Por outro lado, níveis excessivos de apoC-II interferem com a capacidade das LRT se ligarem aos proteoglicanos na célula endotelial (25), por deslocação da apoE, dificultando a *clearance* via recetores celulares (3).

A apoC-III é um regulador fundamental da hemostasia dos TG. Esta apoproteína reduz a atividade lipolítica da LPL antagonizando a apoC-II, a apoproteína responsável pela ativação desta lipase. Adicionalmente, a apoC-III retarda a *clearance* das partículas remanescentes, interferindo com a ligação aos recetores hepáticos (3, 52). Foi ainda proposto que a apoC-III poderá estimular a secreção intra-hepática das VLDL, influenciando diretamente os níveis plasmáticos destas lipoproteínas (52). A apoC-III

influencia direta e drasticamente os níveis de TG plasmáticos. A sobreexpressão da apo CIII contribuí para o desenvolvimento do estado hipertrigliceridêmico, secundário à acumulação de TG na circulação sanguínea (3, 51, 52). Estudos genômicos demonstraram que variantes com perda de função (*loss of function*, LOF) do gene *APOC3*, codificante da apoproteína C-III, estão associadas a uma redução significativa do risco cardiovascular, concomitante à diminuição dos níveis de apoC-III circulantes (37, 52). Concentrações reduzidas da apoC-III são acompanhadas por níveis diminutos de TG e LDL circulantes, e aumentados da HDL (52, 53).



**Figura 6.** Estrutura do complexo lipolítico. A apoproteína C-II atua como ativador da LPL, enquanto o fator de maturação da lipase 1, *lipase maturation factor-1* LMF1, auxilia na síntese da LPL e regula a sua expressão. O GPIHBP1 medeia o transporte da LPL para as células do endotélio capilar, ancorando a enzima na superfície celular. ApoA-V promove a ligação da lipoproteína rica em triglicerídeos aos proteoglicanos heparanosulfatos (HSPG), promovendo a estabilização do complexo LPL-apoC-II. ApoC-III e *angiopoietin-like proteins* (ANGPTL) 3,4 e 8 inibem a atividade [Retirado de Wolska A *et al.* 2017 (51)].

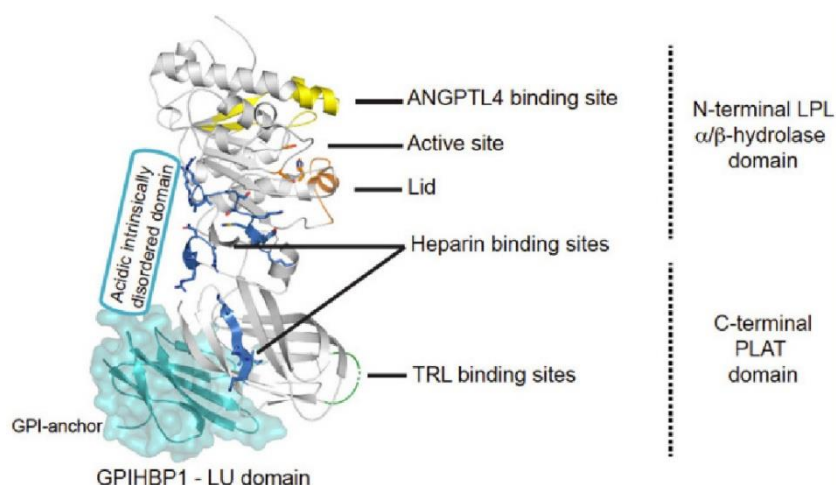
### 3.4. Apolipoproteína E

A apoproteína E é, predominantemente, sintetizada pelo fígado e, numa certa extensão, pelos macrófagos (47, 54, 55). Na circulação, a apoE existe associada ao revestimento fosfolipídico das lipoproteínas QM, VLDL, HDL e remanescentes. Após a lipólise das QM e VLDL, a apo E promove a *clearance* das partículas remanescentes que percorrem o compartimento plasmático, por interação com recetores hepáticos – R-LDL e LRP – e proteoglicanos heparanosulfatos (54, 55). As isoformas apoE2, apoE3 e apoE4 apresentam variações conformacionais e funcionais, que condicionam a afinidade das apoE aos recetores/HSPGs hepáticos. Assim, a eficácia da *clearance* mediada pela apo E depende da isoforma expressa pelo indivíduo (3, 54, 55). Para além disso, a apo E é um interveniente no transporte reverso do colesterol. Interagindo com a proteína transportadora de efluxo, ABCA1, expressa pelos macrófagos e células periféricas, atua como molécula aceitadora do colesterol e fosfolípidos e inicia a biogénese da HDL (54, 55).

## 4. Lipoproteína lipase

A lipoproteína lipase desempenha um papel determinante no metabolismo dos lípidos, sendo responsável pela hidrólise enzimática dos TG incorporados pelas lipoproteínas QM e VLDL, em ácidos gordos não-esterificados e monoacilglicerol (MAG) (56). Assim, o bom funcionamento da LPL é essencial para a homeostasia dos TG séricos (57). A lipase é, predominantemente, sintetizada por células de elevado metabolismo oxidativo, como miócitos e adipócitos (57, 58). É composta pelo domínio  $\alpha/\beta$ -hidrolase no N-terminal, correspondente ao centro ativo da LPL, e o domínio PLAT (*Polycystin-1*, *Lipoxygenase*, *Alpha-Toxin*) no C-terminal (Figura 7) (58). A LPL nascente passa por modificações pós-tradução mediadas pela proteína chaperona denominada fator de maturação da lipase -1 - *lipase maturation factor 1* (LMF1) (59). No RE, a LMF1 garante a funcionalidade catalítica e a correta secreção da LPL. Após a secreção, a enzima liga-se aos HSPG no espaço subendotelial e, pela ação da GPIHBP1, é translocada e ancorada na superfície do lúmen endotelial (56). O complexo LPL-GPIHBP1 marginaliza as QM e VLDL circulantes, iniciando o processo de hidrólise dos TG (57). A conformação dimérica dos monómeros LPL foi consensualmente aceite como sendo a forma cataliticamente ativa da LPL. No entanto, estudos recentes sugerem que o C-terminal da LPL é suficiente para

a ligação à GPIHBP1, pelo que a forma monomérica da LPL é considerada forma ativa (58, 60).



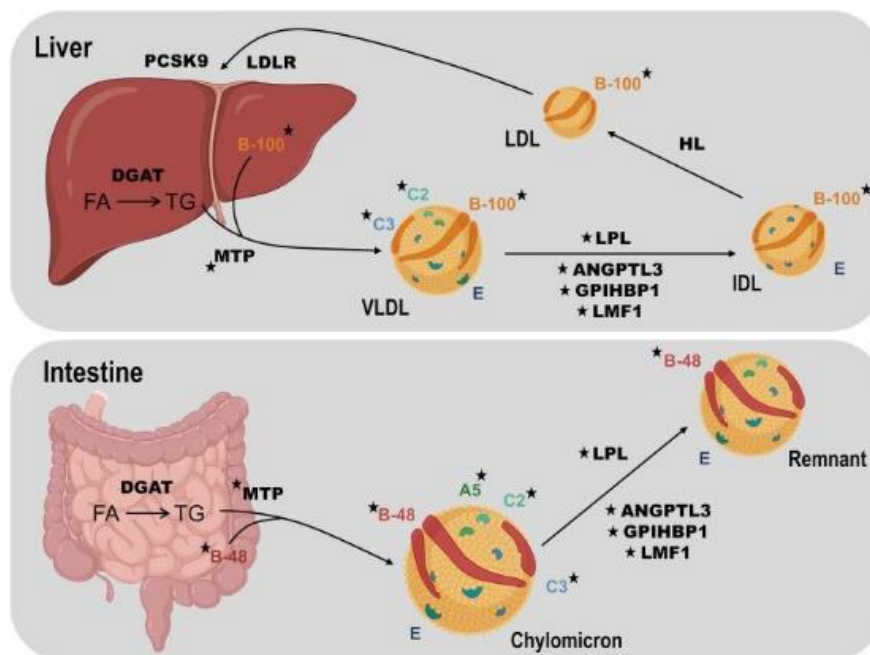
**Figura 7.** Representação gráfica da enzima lipoproteína lipase ligada à GPIHBP1. A GPIHBP1 liga ao PLAT no domínio C-terminal. A região ácida da GPIHBP1 estabiliza o domínio α/β-hidrolase. [Retirado de Kumari A *et al.* 2021 (57)]

Para garantir o fluxo de ácidos gordos consoante as necessidade energéticas, a lipólise intravascular é regulada pelas apoproteínas associadas às partículas LRT e pelos membros da família angiopoietina (ANGPTL) – ANGPTL3, ANGPTL4 e ANGPTL8 (58). As apoproteínas C-II e A-V regulam positivamente a atividade catalítica da LPL, enquanto que a apoC-I e a apoC-III atuam como inibidoras da LPL (59). A ANGPTL3 e a ANGPTL4 catalisam a desnaturação irreversível da α/β-hidrolase, por ligação direta ao N-terminal da LPL (58). A ANGPTL4 apresenta um potencial inibitório mais forte, enquanto que a ação inibitória da ANGPTL8 depende da formação de complexos com a ANGPTL3/4 (57).

## 5. Vias de metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos

O metabolismo das lipoproteínas QM e VLDL ocorre mediante duas vias distintas: a via exógena e via endógena. (Figura 8)

Na via exógena, os lípidos absorvidos da refeição são emulsificados pelos ácidos biliares e hidrolisados por lípases pancreáticas, no lúmen intestinal, formando ácidos gordos livres, monoglicerídeos e colesterol livre. Os produtos lipídicos são transportados para o interior do enterócito e mobilizados para o RE.



**Figura 8.** Metabolismo dos triglicerídeos pela via endógena e via exógena, [Retirado de Dron JS et al. 2020 (17)].

No espaço intramembranar do RE, as enzimas monoacilglicerol aciltransferase (MGAT) e diacilglicerol aciltransferase (DGAT) sintetizam novamente os TG. Os lípidos resintetizados no RE dos enterócitos podem ser armazenados em gotículas lipídicas no citosol ou excretados e incorporados nas QM, contendo a apoB-48 estrutural (28). As QM são excretadas para a linfa e entram na circulação, pelo ducto torácico, onde adquirem as apoC-II, apoC-III e apoE. Pela ação lipolítica da LPL, ancorada ao lúmen endotelial, são convertidas em QM remanescentes e o seu conteúdo lípido, hidrolisado em AGL e MAG, utilizado pelos tecidos periféricos (51).

Na via endógena, os TG sintetizados no hepatócito a partir de ácidos gordos livres, provenientes diretamente do plasma, da proteólise lisossomal hepática de LRT, ou da lipogénese *de novo*, são incorporados na apoB-100 nascente, formando-se a VLDL (5, 26). As VLDL são excretadas para a circulação sistémica, onde adquirem as apoproteínas apoC-II, apoC-III e apoE. No plasma, a LPL hidrolisa as VLDL em partículas mais condensadas, com menor carga de TG, denominadas remanescentes ou IDL. Uma fração das VLDL continua a ser deslipidada pela LPL, formando-se as LDL, posteriormente removidas da circulação pelo fígado via R-LDL. O colesterol da LDL em excesso pode ser depositado na parede arterial, onde pode causar aterosclerose (17).

### 5.1. Metabolismo das lipoproteínas e hipertrigliceridemia

No estado de hipertrigliceridemia, a elevação dos níveis de TG plasmáticos faz-se acompanhar de alterações metabólicas ao longo da cascata de deslipidação sequencial VLDL<sub>1</sub>-VLDL<sub>2</sub>-IDL-LDL (Figura 9) (4, 61). Estudos populacionais demonstraram que a variação do nível de TG plasmáticos ocorre em função da subfração VLDL<sub>1</sub> (62). Para TG <1,2 mmol/L, circulam no compartimento plasmático quantidades equivalentes de ambas as subfrações VLDL<sub>1</sub> e VLDL<sub>2</sub>, observando-se uma reduzida taxa de secreção e uma rápida *clearance* da subfração VLDL<sub>1</sub> (4). Em contrapartida, na hipertrigliceridemia, ocorre a acumulação de partículas VLDL<sub>1</sub> volumosas no plasma, fenómeno este induzido pela combinação da sobreprodução e da deslipidação ineficiente das VLDL<sub>1</sub> (63). Perante a acumulação da subfração VLDL<sub>1</sub> no plasma, estudos cinéticos demonstraram a formação de espécies remanescentes de ambas VLDL<sub>1</sub> e VLDL<sub>2</sub> mais lentamente metabolizadas, que contribuem para o aumento da heterogeneidade metabólica das VLDL (4, 61).

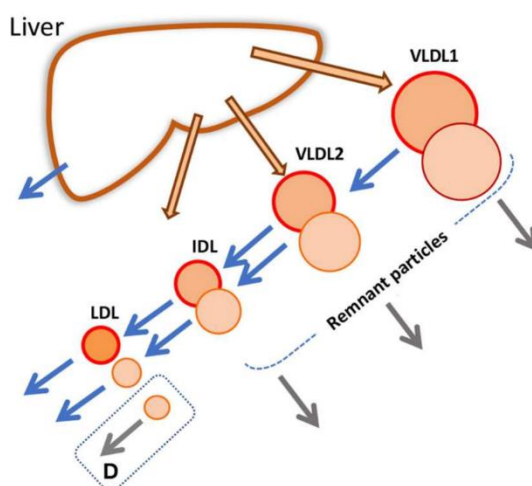
Na hipertrigliceridemia, a heterogeneidade metabólica da apoproteína B transcende o intervalo de densidades VLDL (4, 61, 64, 65). Foram realizados estudos metabólicos em grupos normolipidémicos e hipertrigliceridémicos, utilizando partículas VLDL<sub>1</sub> e VLDL<sub>2</sub> marcadas com isótopos de iodo (<sup>131</sup>I-VLDL<sub>1</sub> e <sup>125</sup>I-VLDL<sub>2</sub>) (64, 65). Os resultados demonstraram uma menor recuperação da apoB-100 proveniente das <sup>131</sup>I-VLDL<sub>1</sub> no intervalo de densidades LDL e uma lenta taxa catabólica das partículas LDL provenientes das <sup>131</sup>I-VLDL<sub>1</sub>, comparativamente às partículas <sup>125</sup>I-VLDL<sub>2</sub>.

A heterogeneidade metabólica das partículas LDL foi explorada em estudos adicionais. Estudos em grupos normolipidémicos terão reportado uma redução significativa da taxa do catabolismo LDL e aumento da concentração plasmática de LDL, para TG no intervalo 2 – 3 mmol/L. Paradoxalmente, para TG >3 mmol/L, reportaram um aumento da taxa do catabolismo LDL, com redução da concentração plasmática de LDL (4, 64, 66). Esta correlação positiva observada entre a taxa do catabolismo LDL e a severidade da hipertrigliceridemia tem sido consistentemente reportada na literatura (67). Uma possível explicação para esta heterogeneidade metabólica fundamenta-se na influência do tipo de partículas LDL na conformação tridimensional da apoB-100 (4, 63).

A apoproteína B-100 associada às VLDL e LDL é o principal ligando dos respetivos recetores celulares. A sua conformação é condicionada pelo tamanho e pelo conteúdo lipídico da lipoproteína (4, 63). Alguns estudos demonstraram que o processo lipolítico altera a estrutura tridimensional da apoB-100, de forma a expor incorretamente o respetivo domínio proteico compatível com o recetor celular (61). Outros modelos experimentais propõem que, em partículas LDL originadas do espectro de densidades VLDL<sub>2</sub> e IDL

diretamente excretadas pelo fígado, a apoB-100 é expressa numa conformação inicial que a capacita para a ligação eficiente aos recetores LDL, pelo que a lipoproteína é facilmente catabolizada. Em contrapartida, para partículas LDL derivadas da extensiva deslipidação da subfração VLDL<sub>1</sub>, propõe-se que a expressão da apoB-100 se encontra comprometida e, assim, a *clearance* via recetores celulares será ineficaz (4, 61, 64). Já o catabolismo acelerado das LDL observado em casos de hipertrigliceridemia grave poderá ser atribuído à *clearance* das partículas LDL mediante sistemas reticuloendoteliais, independentes da ação de recetores celulares (4, 61, 64, 66).

As partículas LDL lentamente metabolizadas originadas da lipólise das VLDL<sub>1</sub> permanecem mais tempo na circulação, o que facilita a permutação do seu conteúdo lipídico com outras lipoproteínas plasmáticas, mediante a ação enzimática da CETP (4). O colesterol esterificado que constitui o core lipídico das LDL é substituído por TG provenientes das partículas VLDL. A alteração da sua composição lipídica torna a partícula LDL mais suscetível à ação lipolítica da lipase hepática, ocorrendo a produção de partículas LDL pequenas e densas. Aliás, com base em metodologias de centrifugação foram identificadas três subfrações LDL em indivíduos saudáveis ou com hiperlipemia moderada – LDL-I (d=1.025 - 1.034 g/mL), LDL-II (d=1.034 - 1.044 g/mL), e LDL-III (d=1.044 g/ml - 1.060 g/mL) – enquanto em indivíduos com hipertrigliceridemia grave foram detetadas partículas LDL muito pequenas e densas, as LDL-IV (61, 68). Assim, as concentrações elevadas de TG plasmáticos favorecem a formação de partículas LDL lentamente metabolizadas, potencialmente convertidas em LDL pequenas e densas (4, 61).



**Figura 9.** Representação gráfica da cascata metabólica da apoproteína B-100 na hipertrigliceridemia. Os níveis de TG influenciam o metabolismo das partículas LDL. Em comparação com a subfração VLDL<sub>2</sub>, a subfração VLDL<sub>1</sub> apresenta uma menor taxa de conversão para LDL. LDL proveniente da subfração VLDL<sub>1</sub> apresenta uma taxa de catabolismo mais lenta. [Retirado de Packard CJ *et al.* 2020 (4)]

## 6. Hipertrigliceridemia

Previamente à era genómica, a heterogeneidade fenotípica observada entre indivíduos hipertrigliceridémicos era categorizada com base nas diferenças qualitativas e quantitativas das lipoproteínas plasmáticas (16). Através dos padrões eletroforéticos respetivos às frações de lipoproteínas, foi designada a classificação de Fredrickson dos fenótipos de hiperlipoproteinemia (HLP), incluídos na Classificação Internacional de Doenças da Organização Mundial da Saúde, descrita na tabela 2 (20, 69). Dentro dos fenótipos HLP, os que se caracterizam pela presença de hipertrigliceridemia são definidos de acordo com as classes de LRT que se acumulam na circulação, como sendo as QM, VLDL e remanescentes (16, 20, 21). Segundo Fredrickson, a singularidade das classificações HLP baseia-se na diferente origem genética de cada fenótipo; No entanto, estudos recentes propõe que os fenótipos HLP são geneticamente indistinguíveis (13, 14, 20). Assim, a contribuição da classificação de Fredrickson na prática clínica torna-se, essencialmente, obsoleta (59, 69, 70). Outras classificações para a hipertrigliceridemia foram propostas por diversas sociedades científicas. Estudos populacionais recentes categorizam a hipertrigliceridemia com base na concentração de TG plasmáticos em “leve-a-moderada” e “grave” para os intervalos 2.0 – 9,9 mmol/L (175 – 885 mg/dL) e  $\geq 10$  mmol/L ( $\geq 885$  mg/dL), respetivamente. Numa abordagem geral, considera-se que a hipertrigliceridemia leve-a-moderada reflete a acumulação das lipoproteínas VLDL e partículas remanescentes no compartimento plasmático, enquanto a hipertrigliceridemia grave resulta da acumulação de QM no plasma, em jejum (17, 69).

**Tabela 2.** Classificação de Fredrickson dos fenótipos de hiperlipoproteinemia. [Adaptado de (16)]

| Nome        | Principais lipoproteínas alteradas | Perfil lipídico | Prevalência populacional |
|-------------|------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| HLP tipo 1  | ↑QM                                | ↑↑↑TG<br>↑CT    | 1 por milhão             |
| HLP tipo 2B | ↑VLDL<br>↑LDL                      | ↑↑TG<br>↑↑CT    | 1 em 40                  |
| HLP tipo 3  | ↑IDL<br>↑Remanescentes QM          | ↑↑TG<br>↑↑CT    | 1 em 10 000              |
| HLP tipo 4  | ↑VLDL                              | ↑↑TG<br>↑CT     | 1 em 20                  |
| HLP tipo 5  | ↑QM<br>↑VLDL                       | ↑↑↑TG<br>↑↑↑CT  | 1 em 600                 |

HLP - hiperlipoproteinemia; CT - colesterol total; TG - triglicerídeos; QM - quilomicra; VLDL - lipoproteína de muito baixa densidade; IDL - lipoproteína de densidade intermédia; LDL - lipoproteína de baixa densidade; ↑ - Elevada concentração plasmática.

### 6.1. Síndrome de Quilomicronemia Familiar

A SQF, quilomicronemia monogénica, hipertrigliceridemia monogénica, ou tradicionalmente conhecida como hiperlipoproteinemia tipo 1 (OMIM# 238600), é uma doença predominantemente pediátrica com um padrão de hereditariedade autossômico recessivo, caracterizada pelo desenvolvimento de hipertrigliceridemia grave [TG >percentil 99 (>10 mmol/L ou 885 mg/dL)].(14, 16, 17, 69, 71). Globalmente, a prevalência populacional da hipertrigliceridemia monogénica afeta cerca de 1 a 10 em cada 1 000 000 pessoas (16, 72). Os portadores da SQF manifestam a doença sobretudo durante a infância e adolescência (69). O fenótipo monogénico é causado por variantes patogénicas bialélicas (em homozigotia ou heterozigotia composta) nos genes reguladores do catabolismo das LRT (59, 71, 73). Cerca de 90% dos indivíduos que manifestam fenotipicamente a patologia são portadores de variantes patogénicas bialélicas LOF no gene codificante da LPL, o gene *LPL* (5, 16). As restantes variantes bialélicas LOF associadas à SQF ocorrem, essencialmente, em genes codificantes de proteínas intervenientes no processo lipolítico, montagem e transporte da enzima LPL, nomeadamente a apolipoproteína C-II (gene *APOC2*), apolipoproteína A-V (gene *APOA5*), fator de maturação da lipase 1 (gene *LMF1*) e GPIHBP1 (gene *GPIHBP1*),(14, 59). As variantes patogénicas bialélicas nos cinco genes canónicos (*LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *LMF1* e *GPIHBP1*) perturbam profundamente a atividade lipolítica da LPL e a *clearance* das QM, que então persistem no compartimento plasmático para além da janela de jejum (12 a 14 horas), num fenómeno denominado quilomicronemia (observado a partir duma concentração de TG >900 mg/dL em jejum) (16-18). Um estudo de coorte com 52 doentes afetados pela condição reportou que ~80% (41 doentes) eram portadores de variantes patogénicas bialélicas no gene *LPL* (19). Dos restantes 20%, quase metade eram portadores de variantes patogénicas bialélicas no gene *GBPIHBP1* e, os restantes, portadores de variantes patogénicas em homozigotia/heterozigotia composta nos genes *APOC2*, *APOA5* e *LMF1*, ou dupla heterozigotia com 1 alelo *LPL* normal. Todos os doentes apresentavam níveis de TG e QM extremamente elevados, com níveis gravemente baixos das restantes lipoproteínas. O perfil bioquímico e clínico era significativamente semelhante entre as etiologias genéticas.

A persistência patológica das QM na circulação induz complicações que contribuem para o agravamento da morbidade e mortalidade dos doentes com SQF (18, 59, 71, 73). Episódios recorrentes de pancreatite aguda são a manifestação clínica mais preocupante entre os portadores, com risco acrescido de evolução para pancreatite crónica e necrose do tecido pancreático (18) e insuficiência exócrina do pâncreas como consequência direta

da pancreatite crônica(74). Outros sintomas incluem dor abdominal (>50% dos doentes), xantomas eruptivos do tronco e membros, lipemia *retinalis*, hepatoesplenomegalia, náuseas, vômitos, fadiga, artralgias, atraso no desenvolvimento e sintomas neurológicos, que afetam a qualidade de vida e a capacidade produtiva no trabalho (18, 71, 73).

## 6.2. Síndrome de Quilomicronemia Multifatorial

A QMM (OMIM#144650), também conhecida por hiperlipoproteinemia tipo 5, é uma condição complexa de natureza oligogénica ou poligénica, cuja expressão fenotípica é exacerbada pela presença de fatores não genéticos secundários (16, 72). Ao contrário da SQF, a QMM manifesta-se sobretudo durante a fase adulta, e é consideravelmente mais frequente, estimando-se uma prevalência de 1 em cada 600 pessoas (13, 75). Existem essencialmente dois subtipos de fatores genéticos predisponentes: variantes, em heterozigotia num dos cinco genes canónicos, e carga elevada de polimorfismos comuns, correlacionados com a elevação dos TG plasmáticos, reportados por *genome-wide association studies* (GWAS) (14, 16). Cumulativamente, os polimorfismos induzem um estado de suscetibilidade para o desenvolvimento da hipertrigliceridemia, que pode interagir sinergicamente com variantes heterozigóticas nos genes canónicos e/ou fatores não genéticos secundários, forçando a expressão de um fenótipo extremo (hipertrigliceridemia grave [TG >10 mmol/L]) (17, 59). Indivíduos normolipidémicos podem ser portadores de determinantes genéticas sobrerrepresentadas em doentes hipertrigliceridémicos, pelo que a componente genética não garante a manifestação do fenótipo (14, 59).

Na era pré genómica, Babirak *et al.* estudaram seis famílias com QMM (76). Os probandos homozigotos ou heterozigotos compostos para variantes patogénicas no gene *LPL* apresentavam uma deficiência completa da enzima LPL. Foi observada heterogeneidade fenotípica entre 13 pais obrigatoriamente heterozigóticos, sendo que mais de metade tinham normolipidemia, alguns tinham hipertrigliceridemia leve e dois tinham TG >7 mmol/L; A atividade enzimática e massa da LPL foram variáveis entre os mesmos portadores heterozigotos. Concluíram que o estado de heterozigotia para variantes *LPL* se associava a uma manifestação heterogénea da hiperlipidemia, com vários portadores fenotipicamente normais. Julien *et al.* verificou que o nível de TG variava desde normal a gravemente elevado entre portadores heterozigotos de variantes *LPL*,

destacando a obesidade abdominal e hiperinsulinemia de jejum como fatores positivamente associados aos TG plasmáticos mais elevados (77).

Vários estudos de sequenciação genómica demonstraram a correlação entre a presença de variantes heterozigóticas e o desenvolvimento de hipertrigliceridemia. Em 2010, foi reportado que variantes heterozigóticas em quatro genes candidatos, incluindo *LPL* e *APOA5*, estão cerca de 2,2 vezes mais representados em indivíduos com hipertrigliceridemia (153 variantes identificadas em 439 hipertrigliceridémicos *versus* 53 variantes em 327 controlos normolipidémicos); A maioria era apenas portadora de uma variante, mas indivíduos com múltiplas variantes estavam significativamente sobre-representados no grupo hipertrigliceridémico (6,6% dos indivíduos com HTG *versus* 0,9% dos controlos) (78). Em 2012, confirmou-se que doentes com hipertrigliceridemia grave apresentavam uma prevalência excessiva de variantes heterozigóticas nos genes *LPL*, *APOC2*, *GPIHBP1*, *APOA5* e *LMF1*, mais uma vez indicando que a heterozigotia é um fator predisponente para o desenvolvimento da QMM (79). Mais recentemente, num estudo que envolveu a caracterização genética de 563 doentes com hipertrigliceridemia grave, 14,(4%) eram portadores heterozigóticos de variantes nos genes *LPL*, *APOC2*, *GPIHBP1*, *APOA5* e *LMF1*, em comparação com apenas 3,8% dos controlos normolipidémicos (80). A identificação de portadores heterozigóticos no grupo fenotipicamente normal sugere que estas variantes apresentam uma penetrância parcial ou incompleta. O fenótipo entre os portadores heterozigóticos variou desde normal a hipertrigliceridemia grave. Ainda que os portadores heterozigóticos tenham apresentado um risco 4 vezes superior de desenvolver hipertrigliceridemia grave, não se trata de um risco absoluto para o indivíduo. Assim, propõe-se que as variantes heterozigóticas raras nos genes associados com o catabolismo das lipoproteínas ricas em TG apresentam penetrância variável, ainda que significativamente associadas com o fenótipo (17).

Estudos GWAS proporcionaram um contributo revolucionário na identificação de *loci* genéticos compostos por variantes com frequência alélica >1% (polimorfismos de nucleótido único [SNP]) significativamente associadas a uma multitude de traços fenotípicos complexos, incluindo concentração de lípidos plasmáticos (13, 14). Numa metanálise GWAS que envolveu mais de 100,000 indivíduos normolipidémicos, *Global Lipids Genetics Consortium* (GLGC) identificou 95 *loci* significativamente associados ao perfil lipídico ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ), dos quais 32 integravam variantes que contribuem para a variabilidade interindividual dos TG plasmáticos (81). Cumulativamente, as 32 variantes descrevem ~25 a 30% do arquétipo genético dos TG, que corresponde a ~10% da variabilidade total do fenótipo. Os polimorfismos comuns associados à variabilidade de TG

em indivíduos normolipidémicos contribuem, cumulativamente, para a expressão de fenótipos lipídicos extremos, como hipertrigliceridemia grave (13, 14, 17, 21). Estudos GWAS com participação de 132 doentes com hipertrigliceridemia grave (sem variantes nos genes candidatos) e 351 controlos normolipidémicos demonstraram que genótipos com variantes nos *loci* *APOA5*, *APOE*, *GCKR*, *TRIB1* e *MLXIPL* estavam significativamente associados com hipertrigliceridemia grave (82). Dos 32 *loci* associados aos TG descritos na metanálise GLGC, 29 alelos associados com TG elevados estavam sobrerrepresentados em indivíduos hipertrigliceridémicos comparativamente ao grupo controlo, contribuindo para o aumento da carga genética de risco (81). Estudos com 504 doentes hipertrigliceridémicos e 1213 controlos normotrigliceridémicos demonstraram que os indivíduos com elevado *polygenic risk score* (PRS) são 4,2 vezes mais propensos a desenvolver hipertrigliceridemia, em relação aos indivíduos com PRS intermédio, e 23 vezes mais relativamente aos indivíduos com PRS baixo (83).

Atualmente, o risco poligénico para o desenvolvimento de hipertrigliceridemia é quantificado mediante o PRS (17). Num estudo coorte com 563 doentes com hipertrigliceridemia grave, 32% apresentavam PRS elevado em 16 *loci*, associados com TG aumentados, em comparação com apenas 9,5% dos controlos normolipidémicos (15). Uma vez que ~10% dos controlos também apresentam um PRS elevado, conclui-se que o PRS elevado não justifica completamente a expressão do fenótipo hipertrigliceridémico. Assim, à semelhança das variantes heterozigóticas na QMM, a relação genótipo-fenótipo é meramente probabilística, não determinística. Estudos adicionais serão necessários para quantificar o efeito interativo entre variantes heterozigóticas raras e a acumulação excessiva de polimorfismos comuns (17).

### 6.3. Hipertrigliceridemia leve-a-moderada

A hipertrigliceridemia leve-a-moderada, fenotipicamente semelhante à hiperlipoproteinemia de Fredrickson tipo 4, é uma condição de natureza oligo/poligénica caracterizada pela relação genótipo-fenótipo probabilística (à semelhança da QMM) (17). Estudos GWAS com 134 doentes com hipertrigliceridemia leve-a-moderada reportaram um enriquecimento de variantes heterozigóticas em 9,0% dos doentes, com razão de probabilidade de 2,3 relativamente ao grupo controlo normolipidémico, e *score* elevado de polimorfismos comuns (percentil 90) em 24,6% dos doentes, com razão de probabilidade de 3,26 em relação ao controlo (21).

#### 6.4. Diagnóstico diferencial da hipertrigliceridemia

A SQF é uma doença excecionalmente rara e fenotipicamente semelhante à QMM. (18, 72, 73). Em 1:600 adultos potencialmente afetados com quilomicronemia, apenas 5% representam doentes com quilomicronemia monogénica (84). Dada a ínfima prevalência, a SQF é comumente subdiagnosticada nos cuidados de saúde primários (18, 72, 73). Muitos dos doentes com SQF têm seguimentos inadequados, e muitos sofrem de episódios pancreáticos recorrentes e transtorno psicossocial até obterem um diagnóstico definitivo (18, 72). Paquette *et al.* reportou que doentes com SQF apresentam uma frequência significativamente maior de pancreatite aguda (60% vs. 6%), pancreatite recorrente (48% vs. 3%) e dor abdominal (63% vs. 19%) relativamente aos doentes com QMM, ainda que os valores de TG sejam comparavelmente elevados (72).

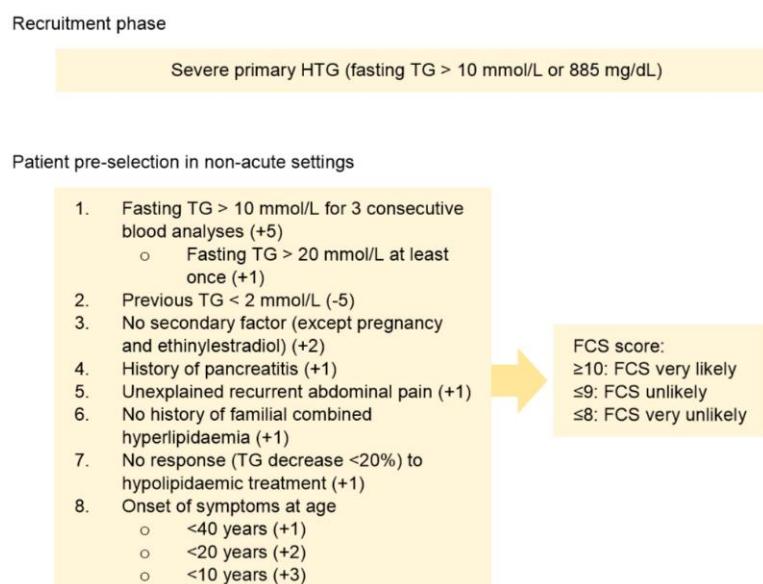
Numa primeira abordagem no diagnóstico da SQF, a quilomicronemia deve ser confirmada perante o doseamento da concentração de TG >10 mmol/L (885 mg/dL) em 3 amostras de sangue consecutivas, ou >20 mmol/L em uma única ocasião (18, 73). Níveis de TG consistentemente elevados (> 10 mmol/L) ao longo de semanas ou meses é um forte indicador a favor do diagnóstico de SQF. Em contrapartida a QMM apresenta maior variabilidade dos níveis de TG e é significativamente responsiva à dieta ou tratamentos farmacológicos, ao contrário da SQF (73). Tipicamente, após a centrifugação da amostra de sangue, é possível detetar um sobrenadante de aspeto cremoso, composto por partículas QM, e um plasma opalescente de aspeto leitoso. A deteção das QM pelo método de eletroforese em gel de agarose (lipidograma) não é confiável, uma vez que as de maior dimensão frequentemente não penetram no gel de agarose, pelo que não são consistentemente detetadas. Para TG >10 mmol/dL, um rácio de triglicerídeos/colesterol total superior a 5 mg/mg (2,2 mmol/mmol) e uma concentração de apolipoproteína B inferior a 100 mg/dL são compatíveis com a presença de QM, VLDL e remanescentes de grandes dimensões (73).

Laboratorialmente, existe um ensaio que permite determinar a atividade da enzima LPL, o teste de heparina. A injeção intravenosa de 50 IU/Kg de heparina induz a libertação da LPL, ligada aos proteoglicanos e GPIHBP1 na parede endotelial, para o compartimento plasmático (85). A atividade da LPL 10 minutos após a injeção em indivíduos com SQF encontra-se muito reduzida nos portadores homozigóticos/ heterozigóticos compostos de variantes no gene *LPL*, e diminuída nos portadores homozigóticos/ heterozigóticos compostos de variantes nos genes *APOC2*, *APOA5*, *GPIHBP1* e *LMF1*. Em contrapartida, a atividade da LPL após 10 minutos da injeção é normal em indivíduos com QMM (73).

Outros parâmetros clínicos devem ser ponderados no diagnóstico diferencial entre SQF e QMM, como a idade da primeira manifestação clínica, o IMC e a atividade da gamaglutamil transferase (GGT) (72, 73). Os doentes com SQF apresentam manifestações mais precoces, IMC mais baixos e níveis GGT inferiores, comparativamente aos doentes com QMM. Sabendo que os níveis elevados de GGT estão positivamente associados a um risco aumentado de doenças cardiometabólicas, o aumento da atividade de GGT nos doentes com QMM pode resultar da incidência de fatores não genéticos, como diabetes, obesidade ou síndrome metabólica (72).

O acesso a testes genéticos como Sequenciamento de Nova Geração permite identificar variantes em genes candidatos e a obtenção do diagnóstico definitivo de SQF (73). No entanto, não é recomendada a execução de testes genéticos rotineiramente em indivíduos adultos com uma concentração de TG de 2 a 10 mmol/L, apenas para doentes pediátricos ou adolescentes com hipertrigliceridemia grave (69).

Moulin *et al.* (73) propuseram um score diagnóstico para SQF (Figura 10) como uma ferramenta de avaliação fenotípica, baseando-se nos dados clínicos e idade do doente. Este score foi desenvolvido e validado externamente em duas coortes independentes, que reportaram uma sensibilidade de 88% (IC 95%: 0,97, 0,76) e especificidade de 85% (IC 95%: 0,94, 0,75).



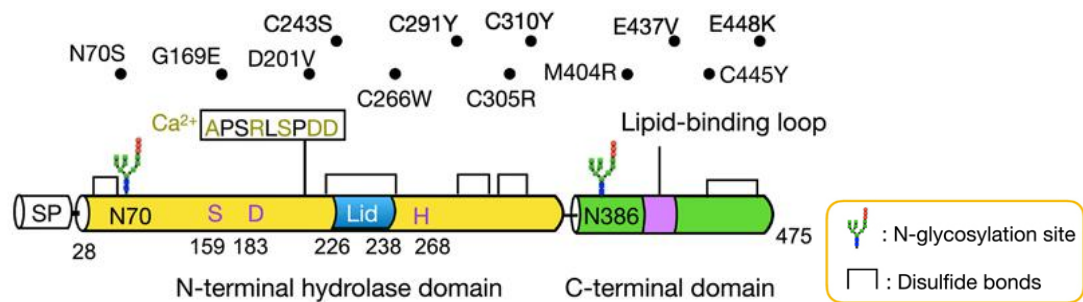
**Figura 10.** Sistema score para diagnóstico da síndrome de quilomicronemia familiar. [Adaptado de Carr RA *et al.* 2016 (24)]

## 6.5. Genes

### 6.5.1. *LPL*

A enzima LPL é predominantemente expressa por tecidos que utilizam os ácidos gordos como fonte de energia, nomeadamente as células do parênquima cardíaco, músculo liso e tecido adiposo, onde a enzima está presente ao longo da rede vascular (86, 87). O gene LPL, composto por dez exões e nove intrões, localiza-se no cromossoma 8q22 (87). O mRNA codifica para os 27 aminoácidos do péptido sinalizador e os 448 aminoácidos que constituem a cadeia polipeptídica da lipoproteína lipase (88).

A organização estrutural da enzima LPL é definida pelas regiões amino (N) terminal e carboxilo (C) terminal, conectadas por um péptido flexível (Figura 11). A região N-terminal (resíduos 1-312) serve de plataforma para a atividade hidrolítica pela tríade catalítica, constituída pelos aminoácidos Ser159, Asp183 e His268, e codifica para a “*lid*” (89). A “*lid*” (resíduos 245 a 265) representa uma superfície helicoidal móvel na estrutura tridimensional da LPL que oculta a fenda catalítica e pode adotar uma conformação aberta ou fechada para regular a acessibilidade do substrato lipídico ao centro catalítico (87, 89). A sequência da “*lid*” está contida entre duas cisteínas conservadas (Cys243 e Cys266), que formam uma das quatro pontes dissulfeto, possivelmente para a estabilização da proteína durante a ação catalítica (88). Na região N-terminal estão presentes vários resíduos de aminoácidos no envolvidos na modulação do cofator cálcio (Ala221, Arg224, Ser226, Asp228, Asp229) (60). A região C-terminal é rica em triptofano, importante para o reconhecimento do substrato lipídico e ligação às lipoproteínas (87). A interação entre a enzima e a lipoproteína desencadeia uma alteração conformacional na estrutura tridimensional da lipase. Subsequentemente, ocorre a exposição do centro catalítico enzimático, que se torna disponível para dar início ao processo hidrolítico dos TG. Um segmento de resíduos básicos, que expandem desde o N-terminal ao C-terminal, interage com os proteoglicanos heparanosulfatos negativamente carregados e com a região acídica da proteína glicosilfosfatidilinositol (90). O *folding* da proteína LPL nascente depende de modificações pós-tradução, como a N-glicosilação dos resíduos de Asp70 e Asp386 (N70 e N386) e a formação de pontes dissulfeto entre os aminoácidos de Cisteína (Cys54 - Cys67, Cys243 - Cys266, Cys291-Cys302, Cys305 - Cys310, Cys445 - Cys465), essenciais para a sua atividade catalítica (87). As unidades monoméricas LPL associam-se numa orientação cabeça-cauda, formando um homodímero ativo não-covalente. A dissociação em monómeros implica a inativação catalítica da enzima (86).



**Figura 11.** Diagrama esquemático dos domínios funcionais, modificações pós-tradução e variantes no gene LPL [Adaptado de Wu SA et al. 2021 (87)].

Estudos genéticos reportam mais de 100 variantes (HGMD: <https://www.hgmd.cf.ac.uk>) com perda de função e funcionalmente heterogêneas no gene LPL, associadas ao desenvolvimento da deficiência em LPL (OMIM#609708) em doentes com SQF.(60).

As variantes *missense* c.106G>A (p.Asp36Asn), c.644G>A (p.Gly215Glu), c.701C>T (p.Pro234Leu), c.829G>A (p.Asp277Asn), c.953A>G (p.Asn318Ser), e c.1421C>A (p.Ser474Ter) são as mais comuns no gene LPL, com frequência alélica superior a 1% em certas comunidades Caucasianas (91, 92). Estas variantes estão associadas a níveis de TG elevados e risco CVD aumentado.

A variante p.Asp36Asn encontra-se em *linkage disequilibrium* com a variante c.-188-93T>G; c.-188-93T>G demonstrou uma taxa significativamente reduzida da expressão genética do gene LPL, enquanto p.Asp36Asn associava a uma taxa de secreção celular de 85%, comparativamente ao alelo *wild type* (-188-93T, 106G) (91). A frequência de portadores da variante p.Asp36Asn em doentes hipertrigliceridémicos é superior à observada no grupo controlo normolipidémico (aproximadamente 5,9% vs. 2,5%). No entanto, esta variante não desencadeou SQF em portadores homozigóticos ou portadores heterozigóticos compostos com outras variantes no gene LPL (91). Num estudo coorte com 2091 doentes com hipercolesterolemia familiar (FH), 87 portadores da variante p.Asp36Asn demonstravam TG elevados e um risco CVD significativamente maior, em relação aos doentes com FH não portadores do alelo c.106G>A (93).

As variantes c.644G>A (p.Gly215Glu), c.701C>T (p.Pro234Leu), e c.829G>A (p.Asp277Asn), detetadas em probandos Franco-Canadianos com deficiência em LPL (73%, 24% e 2%, respetivamente), comprometem a secreção celular da LPL e a dimerização de uma enzima LPL cataliticamente inativa. Os portadores destas variantes

desenvolvem hipertrigliceridemia moderada antes de completarem os 20 anos de idade, com tendência a piorar ao longo da vida (91, 92).

A variante c.953A>G (p.Asn318Ser) compromete parcialmente a funcionalidade catalítica e reduz a taxa de secreção celular da LPL. No entanto, esta variante não causa a SQF em portadores homozigóticos ou heterozigóticos compostos (93). A frequência alélica da variante p.Asn318Ser é superior em indivíduos hipertrigliceridêmicos, comparativamente a controles normolipidêmicos (aproximadamente 6,9% vs. 3,8%) (94). Num estudo populacional com 1393 participantes, apenas 1,7% dos controles normolipidêmicos com mais idade eram portadores heterozigóticos da variante p.Asn318Ser. Em contrapartida, 10,5% e 12% dos doentes com hiperlipidemia moderada (TG 5,6 – 12,0 mmol/L) e hiperlipidemia excessiva (TG >12,0 mmol/L) eram portadores heterozigóticos desta variante, respetivamente. Observou-se uma predominância de homens de meia-idade que expressam fenotipicamente a hipertrigliceridemia, nos portadores da variante (91).

O polimorfismo c.1421C>A (p.Ser474Ter), com uma frequência alélica entre 12% a 16%, forma uma proteína LPL truncada sem os dois últimos aminoácidos (Ser-Gly). Esta variante apresenta um fenótipo com ganho de função (GOF), caracterizado pela diminuição da concentração de TG, aumento da atividade da LPL antes e depois do ensaio da heparina, e redução do risco CVD (60, 92). Modelos experimentais demonstraram que a expressão da variante p.Ser474Ter, mediada por adenovírus, previne a mortalidade perinatal em ratinhos *LPL knockout* (95) e mitiga o fenótipo associado à deficiência em LPL em doentes com SQF (96). Possivelmente, a variante p.Ser474Ter pode estar em *linkage disequilibrium* com outros polimorfismos, cuja substituição nucleotídica induz uma alteração no elemento de resposta microRNA, localizado na sequência não codificante 3'UTR do mRNA LPL, e perde a complementaridade com o microRNA silenciador pós-traducional. Como resultado, ocorre uma expressão exacerbada da proteína LPL (97). A remoção dos 2 últimos aminoácidos pode ainda potenciar a interação eletrostática entre a LPL e a GPIHBP1, aumentando a estabilidade da LPL (60)

As variantes na região intrónica, particularmente na junção intrão-exão, comprometem gravemente o processamento do mRNA, *splicing* dos intrões, e a natureza e o número dos produtos proteicos sintetizados. Variantes nas sequências 5' e 3'-UTR compostas por elementos regulatórios podem influenciar positiva ou negativamente a sua expressão (89). A variante c.1322+1G>A (98) no *splice site donor* do intrão 8 causa um *splicing* aberrante do mRNA LPL, com formação de transcritos alternativos (92). Outra

variante c.-188-39 T>C induz uma alteração no elemento do promotor, complementar ao fator de transcrição Oct-1, e inibe 85% da atividade promotora (89).

A maioria das variantes responsáveis pela manifestação da SQF ocorrem nas regiões codificantes e encontram-se nos exões 5 e 6, interferindo na secreção, estabilidade e atividade catalítica da enzima (92). O exão 5 (resíduos 181 a 259) codifica a “*lid*” e parte do local que liga aos TG (resíduos Pro184 a Pro187 e Arg214 a Ile223), assim como o aminoácido Asp183 da tríade catalítica. O exão 6 (resíduos 259 a 340) codifica para duas pontes dissulfeto estruturalmente importantes (Cys291 - Cys302 e Cys305 - Cys310), assim como dois complexos de aminoácidos positivamente carregados, arginina e lisina, que ligam à heparina (89, 99). A variante *missense* c.209A>G (p.Asn70Ser) impossibilita a N-glicosilação do resíduo 43 (100). As variantes *missense* c.615T>A (p.Cys243Ser) (89) e c.798C>T (p.Cys266Trp) (101), impedem a formação de pontes dissulfeto. Variantes nos aminoácidos que constituem a tríade catalítica (c.547G>A [p.Asp183Asn], c.548A>G [p.Asp183Gly], c.547G>C [p.Asp183His]), ou próximos da tríade catalítica (c.542G>A [p.Gly181Ser], c.809G>A [p.Arg270His], c.809G>T [p.Arg270Leu]) reduzem significativamente a atividade catalítica da LPL (89). Outras variantes, como c.1306G>A (p.Gly436Arg) e c.1310A>T (p.Glu437Val), aumentam a suscetibilidade do resíduo 297 à ação da protease furina, promovendo a clivagem endoproteolítica da LPL mutante (102).

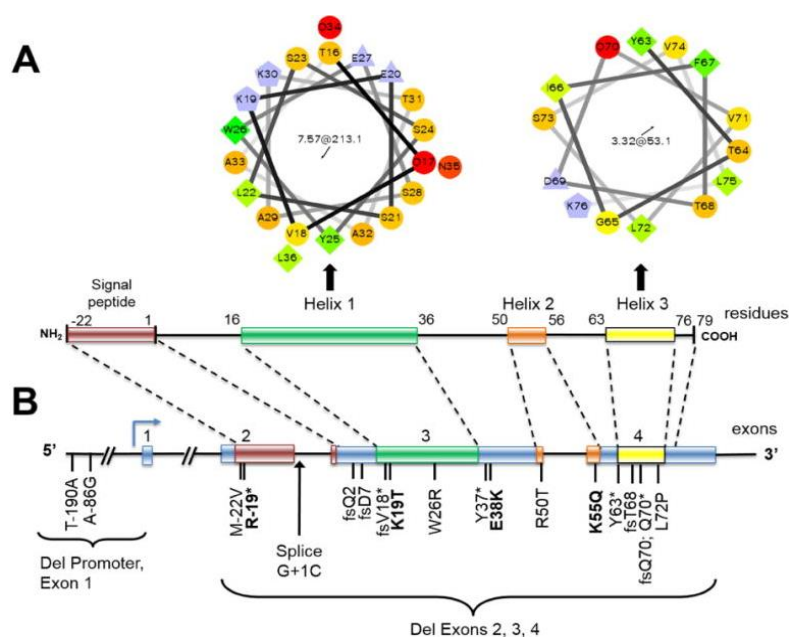
Portadores das variantes c.1211T>G (p.Met404Arg), c.1334G>A (p.Cys445Tyr) e c.602A>T (p.Asp201Val) apresentam a ligação estabelecida entre a LPL e a GPIHBP1 comprometida. A variante p.Met404Arg não interfere significativamente com a secreção e atividade catalítica da LPL, mas impede a ligação LPL-GPIHBP1, uma vez que a bolsa hidrofóbica da GPIHBP1 é incapaz de acomodar a cadeia lateral do aminoácido arginina. A variante p.Cys445Tyr não demonstra interferir com a secreção, ligação à heparina ou atividade catalítica da LPL, mas sim com a ligação da LPL à GPIHBP1 (87, 90). A variante Asp201Val causa o *misfolding* da LPL, o que impede a secreção da LPL pelas células e reduz drasticamente a atividade catalítica, devido à deficiente modulação do cofator  $\text{Ca}^{2+}$  pelo aminoácido valina no resíduo 201 (87, 90).

#### 6.5.2. **APOC2**

A apoproteína C-II, presente na superfície das lipoproteínas QM e VLDL é responsável por potenciar a ação catalítica da enzima LPL e a conversão dos TG em energia metabólica para os tecidos periféricos. Esta apoproteína é essencialmente

expressa no fígado e, moderadamente, no intestino, macrófagos, tecido adiposo, cérebro, pele, pulmões e retina (51, 92, 103).

O gene *APOC2*, codificante da apoproteína C-II, existe posicionado entre o *cluster* genético *APOE-APOC1-APOC4-APOC2* no cromossoma 19q13.2 (38, 44). Perante a expressão do gene *APOC2*, o péptido sinalizador de 22 aminoácidos é clivado e forma-se a apoproteína C-II madura, composta por 79 aminoácidos. A estrutura terciária da apoC-II revela três hélices (Figura 12). Localizada na primeira hélice, a região N-terminal (resíduos 16 a 36), rica em aminoácidos hidrofóbicos, é responsável pela ligação às lipoproteínas. Na terceira hélice, a região C-terminal (resíduos 63 a 76) é importante para a ativação da LPL e os resíduos Tyr63, Ile66, Asp69 e Gln70 (pela nomenclatura HGVS recomendada: Tyr85, Ile88, Asp91 e Gln92) formam um local de ligação para a enzima (50, 51, 92). A região C-terminal demonstra complementaridade com aminoácidos localizados proximalmente da “*lid*” na estrutura tridimensional da LPL, podendo, assim, esta região estar envolvida na alteração conformacional da “*lid*”, de forma a garantir a acessibilidade dos TG à fenda catalítica enzimática (51).



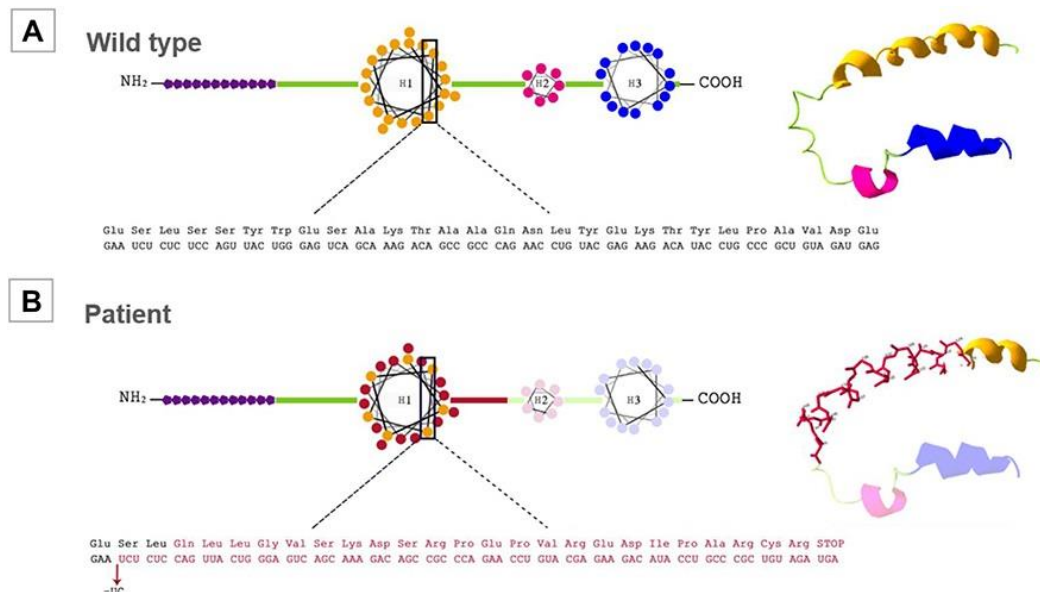
**Figura 12.** (A) Sequência primária e estrutura helicoidal da apoproteína C-II. (B) Variantes no gene *APOC2*. [Retirado de Wolska A et al. 2017 (51)]

A deficiência em apoC-II (OMIM#207750), atualmente mais conhecida como SQF, é uma doença monogénica de hereditariedade autossómica recessiva, causada por variantes patogénicas com perda de função no gene *APOC2* (14, 104, 105). Atualmente, existem menos de 30 variantes *APOC2* publicadas na literatura (HGMD: <https://www.hgmd.cf.ac.uk>), do tipo *missense*, *nonsense*, *regulatory region*, *splicing*,

*frameshift*, alterações nas regiões reguladoras, deleções, inserções, e rearranjos (14, 51). As variantes introduzem instabilidade estrutural do transcrito mutante intracelular e/ou da proteína mutante apoC-II no plasma, aumentando assim a sua taxa de degradação. Consequentemente, os portadores apresentam uma concentração diminuída ou indetetável de apoC-II plasmática, e redução da atividade catalítica ou inação da enzima LPL (106-109). Em recém-nascidos, a deficiência em apoproteína C-II pode causar deficiência mental grave, secundária à encefalopatia lipídica (109). A maioria dos doentes homozigóticos para as variantes *APOC2* são de uma linhagem familiar com consanguinidade (106, 110-114).

As variantes pontuais encontradas nas variantes apoC-II<sub>Auckland</sub> (c.255C>A [p.Tyr85Ter]) (115), apoC-II<sub>Bari</sub> (c.177C>G [p.Tyr59Ter]) (116), apoC-II<sub>Colombia</sub> (c.133\_134del [p.Ser45GlnfsTer24]) (117), apoC-II<sub>Nijmegen</sub> (c.118del [p.Val40Ter]) (118), apoC-II<sub>Padova</sub> (c.177C>A [p.Tyr59Ter]) (110), apoC-II<sub>Shanghai</sub> (c.86delinsCC [p.Asn29AlafsTer2]) (119), apoC-II<sub>Toronto</sub> (c.270del [p.Asp69ThrfsTerm7]) (120) e apoC-II<sub>Paris2</sub> (c.10C>A [p.Arg4Ter]) (121) introduzem um codão de terminação prematuramente na sequência primária de aminoácidos, resultando na síntese de uma versão truncada da apoproteína C-II, incapaz de ativar a enzima LPL devido à exclusão do domínio funcional C-terminal (Figura 13). A variante apoC-II<sub>Paris1</sub> (c.1A>G [p.Met1Val]) (107), resulta da transição A para G, com substituição do codão de iniciação AUG (metionina) para GUG (valina) no resíduo -22. A potencial iniciação da tradução no próximo codão de metionina, a jusante da variante, elimina por completo o péptido sinal, impedindo a secreção da apoproteína C-II para o plasma, assim como os primeiros 8 aminoácidos do domínio funcional N-terminal. Nas variantes apoC-II<sub>Hamburg</sub> (c.55+1G>C) (122) e apoC-II<sub>Tokyo</sub> (c.55+1G>C) (123), a transversão G para C no *splice site donor* 5', localizado no intrão 2, causa o *splicing* aberrante do pré-mRNA e exclusão do exão 2 (exão 1 diretamente conectado ao exão 3), resultando na exclusão do codão de iniciação AUG. O doente portador da variante apoC-II<sub>Hamburg</sub> apresentava apenas ~14% do mRNA *APOC2* hepático detetado em indivíduos não-portadores, uma vez que o *spliced* mRNA aberrante é instável e suscetível à degradação intracelular. A variante apoC-II<sub>Tuzla</sub> (g.17,719,326\_17,722,303del) (112), resulta de uma grande deleção de 2978 pares de base no gene *APOC2*, que abrange toda a sequência codificante, correspondente aos exões 2, 3 e 4. A deleção tem como origem a recombinação homóloga entre duas sequências *Alu* transponíveis, localizadas no intrão 1 no gene *APOC2*, e entre os genes *APOC2* e *CLPTM1*, respetivamente. Relativamente às variantes pontuais na região promotora, a transição A para G na posição -86 no promotor proximal *APOC2* (c.-25-90A>G) impede a ligação do elemento *cis*-regulador e compromete a iniciação da transcrição do gene *APOC2*; a taxa de expressão génica reduziu-se para

46% (114). À semelhança desta, a transversão T para A na posição -190 no promotor (c.-25-190T>A) reduz a atividade da transcrição do gene *APOC2* para ~20% (108).



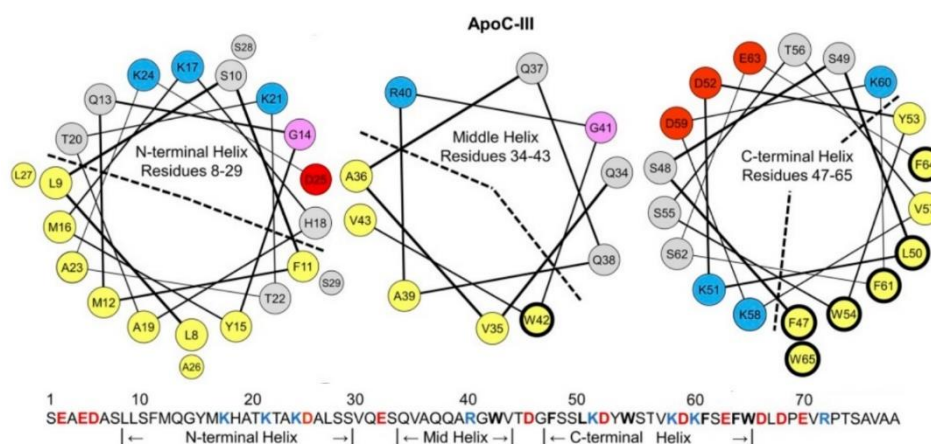
**Figura 13.** Representação esquemática da apoproteína C-II. **(A)** ApoC-II *wild type*. Polígonos roxos – Péptido sinal; H1 - Hélice 1; H2 - Hélice 2; H3 - Hélice 3. **(B)** Estrutura tridimensional da variante apoC-II (p.Ser45GlnfsTer24). Alteração da estrutura tridimensional devido ao *frameshift* na proteína. Vermelho - Alteração do aminoácido; Cor transparente - Região perdida devido à introdução do codão stop prematuro [Adaptado de Pinilla-Monsalve GD *et al.* 2020 (117)].

### 6.5.3. *APOC3*

A apoproteína C-III é um regulador chave das LRT, contribuindo para a manutenção da homeostasia plasmática dos TG via inibição da LPL, supressão da clearance hepática de LRT, e modulação da assimilação e secreção de partículas VLDL pelo fígado (52, 124, 125). A concentração de apoC-III na população saudável é 7-12 mg/dL, podendo ultrapassar os 30 mg/dL em doentes hipertrigliceridémicos (125).

O *locus APOC3*, codificante da apolipoproteína C-III, encontra-se no *cluster* multigenético *APOA5/APOA4/APOC3/APOA1*, localizado no cromossoma 11q23. *APOC3* compreende três regiões intrónicas e quatro regiões exónicas (52). A expressão do gene *APOC3* é estimulada pela glucose, via ativação dos fatores de transcrição *Carbohydrate response element binding protein* (ChREBP) e do HNF-4 $\alpha$ . Por outro lado, fatores como insulina, PPAR $\alpha$ , Rev-erb e FXR, inibem a atividade promotora deste gene (124).

A expressão do gene *APOC3* ocorre nos hepatócitos e enterócitos, onde são sintetizados os 99 aminoácidos que constituem a pré-apoproteína C-III. A clivagem do péptido sinal origina a apoC-III madura, composta por 79 resíduos de aminoácidos (52). Os aminoácidos que constituem o domínio N-terminal (resíduos 8 a 29) e a região central (resíduos 34 a 43) estão dispostos radialmente numa distribuição aleatória de resíduos negativa e positivamente carregados, descrevendo uma hélice anfipática tipo G (Figura 14). O domínio C-terminal (resíduos 47 a 65), rico em resíduos aromáticos, apresenta uma fase apolar com oito resíduos hidrofóbicos, resíduos positivamente carregados na interface polar/apolar, e resíduos negativamente carregados na fase polar (126). O C-terminal demonstrou uma capacidade significativa de ligar a vesículas lipídicas, pelo que esta região peptídica é essencial para a inativação da LPL. Variantes apoC-III desprovidas dos resíduos hidrofóbicos apresentam menor capacidade inibitória da LPL (127).



**Figura 14.** Representação gráfica da estrutura helicoidal da apoC-III. Hélices anfipáticas do N-terminal e do domínio central, com distribuição radial aleatória e resíduos ácidos e básicos (classe G). Hélice anfipática do C-terminal (classe A), com 8 resíduos hidrofóbicos na face apolar (linha tracejada), resíduos básicos na interface polar/apolar, e resíduos ácidos na face polar. Linha tracejada – Face apolar; Resíduos apolares – amarelo; Resíduos polares – cinzento; Resíduos básicos – azul; Resíduos ácidos – vermelho; Glicina – rosa. [Adaptado de Meyers NL *et al.* 2017 (126)].

Alguns estudos demonstraram que uma maior concentração de apoC-III no plasma estava significativamente correlacionada com TG elevados e risco aumentado para o desenvolvimento de aterogénese (128). Em contrapartida, portadores de variantes com perda de função no gene *APOC3* (OMIM#614028) apresentavam valores baixos de TG séricos, assim como um perfil lipídico cardioprotetor (129).

O contributo da apoC-III no desenvolvimento de hipertrigliceridemia foi reproduzido em modelos experimentais com coelhos transgênicos (130). A sobreexpressão da apoC-III humana exclusivamente no fígado de coelhos transgênicos desencadeou HTG grave, com 3 e 3,2 vezes mais TG, em período pós prandial e jejum, respetivamente, em relação aos coelhos controlo não-transgênicos. O aumento dos níveis de TG foram atribuídos à produção estimulada, e concomitante clearance reduzida de partículas do intervalo de densidades QM e VLDL. Adicionalmente, demonstrou-se uma redução da atividade catalítica LPL pós-heparina de 62,2% nos coelhos transgênicos vs. coelhos controlo não-transgênicos.

O polimorfismo c.\*40G>C, denominado Sst I (rs5128), foi o primeiro polimorfismo a ser identificado no *locus APOC3*, correspondente à transversão citosina para guanina na região não-codificante 3' UTR (124). Este polimorfismo caracteriza o alelo raro, S2, enquanto o alelo *wild type* representa o alelo mais frequente, S1. Estudos demonstram que portadores heterozigóticos do alelo S2 apresentam concentrações elevadas de apoC-III circulante, assim como um risco aumentado de desenvolver hipertrigliceridemia e doenças cardiovasculares ateroscleróticas (124, 131). Modelos experimentais *in vivo* avaliaram a expressão hepática do mRNA *APOC3* em portadores heterozigóticos do alelo S2 e controlos homozigóticos S1; 3 de 5 biópsias hepáticas demonstraram sobreexpressão do mRNA *APOC3* de 14%, 26%, e 29%, respetivamente, em relação ao grupo controlo *wild type* (132).

O mecanismo molecular pelo qual o alelo S2 induz a sobreexpressão do gene *APOC3* permanece, essencialmente, especulativo. Dada a localização na região funcional 3'UTR, o polimorfismo pode estar envolvido na regulação da expressão génica ou na estabilização do mRNA (52). O alelo S2 pode ainda agir como um marcador de outras variantes funcionais dentro do gene *APOC3*, ou em genes proximais (52). O polimorfismo SstI existe num forte *linkage disequilibrium* com dois polimorfismos no promotor do gene *APOC3*, c.-47-481T>C (rs2854117) e c.-47-454C>T (rs2854116).(13) Integradas no elemento de resposta da insulina, as substituições c.-47-481T>C e c.-47-454C>T podem comprometer significativamente a ação inibitória da insulina, promovendo a sobreprodução de apoC-III (124) Um estudo com portadores heterozigóticos para c.-47-481T>C e/ou c.-47-454C>T reportou um aumento de 30% da concentração de apoC-III em jejum, aumento de 60% da concentração de TG em jejum, e redução de 46% da clearance dos TG circulantes (133). Estudos *in silico* propõem um mecanismo de regulação pós-transcricional onde a substituição nucleotídica do polimorfismo SstI pode implicar a perda das sequências genómicas 3'UTR complementares com cinco microRNAs, silenciadores da expressão

génica (134). Outra hipótese considera que a localização do polimorfismo SstI a 40 nucleótidos da cauda poli-A (envolvida da estabilidade do transcrito, tráfego nucleocitoplasmático e tradução) possa impedir a ligação de proteínas específicas que removem a cauda poli-A, prolongando o tempo de semivida do mRNA *APOC3* (52).

Um estudo na população de Judeus Asquenazes reportou que o alelo g.116829268A>C (rs2542052), localizado no promotor do gene *APOC3*, estava associado a concentrações reduzidas de apoC-III plasmática, contribuindo para um menor risco aterosclerótico e um aumento da sensibilidade à insulina (135). No estudo *Exome Sequencing Project* (53) com 3,734 indivíduos, foram sistematicamente detetadas quatro variantes no gene *APOC3*, incluindo a variante *missense* c.127G>A (p.Ala43Thr) (substituição alanina para treonina no resíduo 43) e três variantes com perda de função: variante *nonsense* c.55C>T (p.Arg19Ter) e variantes *splice site* c.55+1G>A (transição G para A no intrão 2) e c.179+1G>T (transversão G para T no intrão 3). Ainda que apenas uma modesta proporção da população (1 em 150 pessoas) seja portadora destas variantes *APOC3*, verificou-se que o risco ASCVD dos portadores heterozigóticos identificados era 40% menor que nos portadores *wild type* (53). Da mesma forma, um segundo estudo populacional com 75,725 participantes reportou que as variantes com perda de função no gene *APOC3* causam uma redução de 44% na concentração de TG pós-prandiais e redução de 36% do risco de doenças ateroscleróticas, em portadores heterozigóticos (129).

#### 6.5.4. **APOA5**

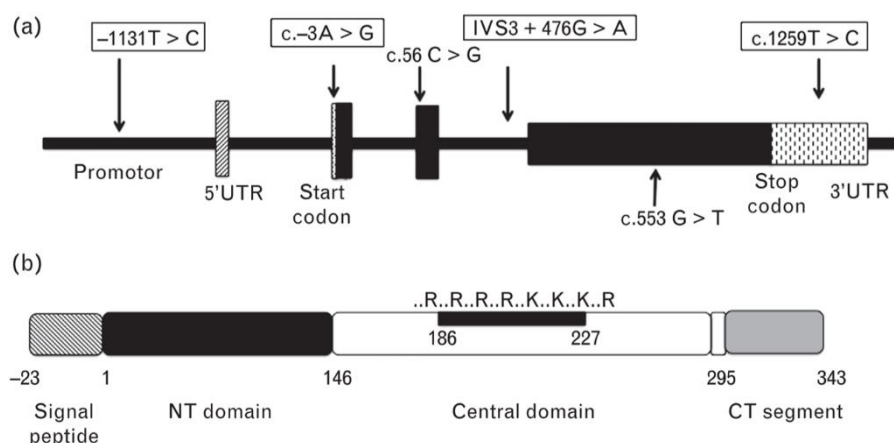
A apolipoproteína A-V é predominantemente expressa no fígado e encontra-se associada às QM, VLDL e HDL no compartimento plasmático. A sua concentração no plasma é cerca de 1000 vezes menor que a concentração de apoB (136), o que corresponde a uma molécula apoA-V por cada 24 moléculas VLDL (137). Estudos *in vivo* demonstraram que a apoA-V fortalece a interação entre as LRT e a enzima LPL, reduz a biossíntese de partículas VLDL e aumenta a *clearance* das LRT por interação com HSPG e recetores hepáticos (R-LDL, LRP1, LR11/SorLA) (136-138). Com base nestes estudos, é exetável uma relação inversa entre a apoproteína A-V e a concentração de TG plasmáticos (40). De facto, modelos experimentais com ratinhos com sobreexpressão do gene *APOA5*, via vetores de adenovírus, demonstraram uma drástica redução de 70% da concentração de TG transportados na fração lipoprotéica VLDL, comparativamente ao

ratinho *wild type*.(139). Em contrapartida, ratinhos *APOA5 knockout* demonstraram um aumento de 400% da concentração de TG, em relação ao ratinho *wild type* (140).

A apoA-V é codificada pelo gene *APOA5*, identificado como membro integrante do *cluster* genético *APOA1-APOC3-APOA4* localizado na região cromossômica 11q23, por métodos de genômica comparativa entre o DNA humano e do ratinho (141). O mecanismo relativo à regulação do mRNA e da apoproteína A-V no fígado não é completamente conhecido.(142) Vários recetores nucleares estão positivamente implicados na regulação do gene *APOA5*, incluindo PPAR $\alpha$ , FXR, ROR $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ , TR $\beta$  e o recetor nuclear órfão Nur77. Já os fatores LXR, insulina e a glucose, via *upstream stimulatory factor* (USF), inibem a expressão do *APOA5*.(40, 143)

O gene *APOA5* compreende quatro exões e três intrões, que traduzem uma pré-apoproteína com 366 aminoácidos, dos quais 23 aminoácidos constituem o péptido sinal. A clivagem do péptido forma a apoproteína A-V madura de 343 aminoácidos, uma proteína hidrofóbica rica em alfa hélices (136). Os resíduos 1 a 146 constituem o domínio N-terminal e adotam uma conformação helicoidal anfipática, que liga às lipoproteínas, preferencialmente partículas HDL (40).

Adjacente ao N-terminal, o domínio central (resíduos 147 a 292) compreende uma região de 42 aminoácidos (resíduos 186 a 227) com oito resíduos positivamente carregados de arginina/lisina e três de histidina, que estabelecem ligações iônicas com HSPG, recetores celulares R-LDL e LR11, e GPIHBP1 (40) O aminoácido de cisteína na posição 204 apresenta potencial para formar homodímeros ou heterodímeros com proteínas plasmáticas, através da formação de pontes dissulfeto (41). Sun *et al.* demonstraram ainda que os resíduos 192 a 238 são necessários para a ligação aos lípidos e ativação da LPL (144). No domínio C-terminal (resíduos 293 a 343), quatro aminoácidos de prolina consecutivos (resíduos 293 a 296) permitem a ligação aos lípidos (Figura 15), (138, 142).



**Figura 15.** Diagrama do gene *APOA5* e da organização estrutural da apoproteína A-V. (a) Gene *APOA5* e localização dos polimorfismos mais prevalentes (-1131T>C ou c.-72-571T>C, c.-3A>G, c.56C>G, IVS3 + 478G>A ou c.162-43G>A, c.553G>T, c.1259T>C ou c.\*158T>C). (b) Organização da proteína apoA-V e respectivos domínios N-terminal, central e C-terminal. Domínio central composto por uma sequência de resíduos de aminoácidos positivamente carregados (R – arginina; K – lisina) e um segmento de tetraprolina (PPPP) (bloco branco correspondente aos resíduos 293 a 296). [Retirado de Sharma V *et al.* 2013(41)].

No *Berkeley Lipid Study Population* foram estudados os genótipos de uma população Caucasiana de 419 indivíduos não-relacionados e foi demonstrada uma elevada frequência alélica de cinco polimorfismos comuns, herdados essencialmente em três haplótipos: haplótipo *APOA5*\*1, haplótipo *APOA5*\*2 e haplótipo *APOA5*\*3 (141). O haplótipo *APOA5*\*1 é apenas composto por alelos *wild type*. O haplótipo *APOA5*\*2 é caracterizado pela prevalência dos quatro polimorfismos c.\*158T>C (rs2266788, também denominado c.1891T>C, c.1259T>C, ou SNP1), c.162-43A>G (rs2072560, também denominado IVS3+476G>A ou SNP2), c.-72-571T>C (rs662799, também denominado g.-1131T>C ou SNP3) e c.-3A>G (rs651821). Estes polimorfismos demonstraram coexistir em 100% *linkage disequilibrium*, pelo que apenas ocorrem na combinação de alelo comum c.-72-571T/-3A/\*158T (TAT) ou alelo raro c.-72-571C/-3G/\*158C (CGC) (143). Inversamente ao haplótipo *APOA5*\*2, o haplótipo *APOA5*\*3 é caracterizado pelo polimorfismo c.56C>G (rs3135506, também denominado p.S19W) e os quatro restantes alelos *wild type*.

As substituições das bases nucleotídicas introduzidas pelos polimorfismos resultam numa alteração da sequência de resíduos de aminoácidos e modificação morfológica da molécula ApoA-V. Consequentemente, os portadores expressam uma apo A-V mutante com funcionalidade comprometida ou completamente disfuncional (OMIM#606368) (138). O polimorfismo c.56C>G (p.Ser19Trp) substitui o aminoácido serina por triptofano na posição 19, localizado no péptido sinal. A introdução do aminoácido aromático no péptido sinal compromete a eficiência da translocação ao longo do retículo endoplasmático, causando uma redução de 50% da secreção celular do péptido 19W *in vitro* (145). Ensaios *in vitro* recorrendo ao gene repórter luciferase avaliaram o efeito individual dos polimorfismos c.-72-571T>C, c.-3A>G e c.\*158C>T (alelo raro CGC) na expressão. Individualmente, os polimorfismos não influenciaram significativamente a atividade luciferase (145). Em contrapartida, o alelo raro CGC reduziu significativamente a atividade luciferase em 46%, em comparação com alelo *wild type* (TAT), pelo que a expressão fenotípica destes SNPs requer uma ação cooperativa (143). O polimorfismo c.-3G>A, localizado na sequência de Kozak altamente conservada em eucariotas, que antecede o

codão de iniciação AUG, pode reduzir a eficácia da iniciação da tradução ribossomal (146). A construção de combinações moleculares *in vitro*, c.-72-571T/-3G/\*158T (TGT) e c.-3G/\*158C (GC), demonstrou esta funcionalidade do polimorfismo c.-3A>G, tendo-se detetado o maior efeito na redução da atividade luciferase, de 94% e 59%, respetivamente (143). O polimorfismo c.553G>T (rs2075291) causa a substituição do aminoácido de glicina para cisteína na posição 185 (p.Gly185Cys), no exão 4, aumentando a possibilidade de formação de pontes dissulfeto intramoleculares com o aminoácido de cisteína 204. Dada a localização da cisteína 204 numa região responsável por estabelecer interações com HSPG e recetores celulares, a alteração da conformação induzida pela ponte dissulfeto (Cys185 – Cys204), neste domínio da apoproteína, pode comprometer a hidrólise enzimática dos TG e/ou *clearance* das VLDL remanescentes (146).

Vários estudos populacionais avaliaram a relação entre os polimorfismos *APOA5*, a concentração de TG e o risco cardiovascular aterosclerótico. O *Framingham Heart Study* reportou que os SNPs c.-72-571T>C e c.56C>G se associavam positivamente com hipertrigliceridemia, mas apenas o alelo c.-72-571C afeta diretamente a concentração plasmática da apoA-V, e está relacionado com uma produção acrescida de LDL aterogénicas e rigidez arterial (41). Um estudo com doentes afetados com a doença arterial coronária (CAD) demonstrou que os alelos raros c.-72-571C e p.19W são preditores independentes da concentração de TG plasmáticos; no entanto, não se verificaram diferenças significativas relativas à distribuição destes polimorfismos entre os doentes com e sem CAD (147). Outro estudo incluindo doentes Chineses, com e sem CAD, também reportou uma ausência de correlação significativa entre os polimorfismos p.S19W e c.553G>T, e o risco cardiovascular (148).

Os polimorfismos no gene *APOA5* podem ainda influenciar os níveis dos lípidos plasmáticos, através do seu efeito nos lípidos da dieta. Um estudo na população de Porto Rico demonstrou uma correlação significativa entre os lípidos consumidos, o polimorfismo c.-72-571T>C, e a concentração de TG e colesterol total no plasma, sugerindo que os portadores heterozigóticos do alelo c.-72-571T beneficiam de uma dieta com baixo teor de gordura para apresentarem um perfil lipídico ateroprotetor (149). Na população do Mediterrâneo, observou-se uma associação positiva entre o consumo de gordura e a obesidade em portadores homozigóticos c.-72-571T, enquanto nenhuma correlação foi evidenciada entre o consumo de gordura e IMC em portadores do alelo normal c.-72-571C, demonstrando que os portadores c.-72-571T estão mais suscetíveis a ganhar peso com uma dieta rica em gordura (150).

Em conjunto, os estudos populacionais sugerem que os polimorfismos responsáveis por alterarem a concentração plasmática ou a estrutura/funcionalidade da apoproteína A-V, comprometem o metabolismo dos lípidos e, potencialmente, aumentam a suscetibilidade para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No entanto, os resultados populacionais devem ser cautelosamente interpretados, dada a multitude de variáveis metabólicas, dietéticas e genéticas interferentes (137).

Desde a descoberta do gene *APOA5*, mais de 400 variantes foram descritas na literatura (ClinVar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>).

1. Priore Oliva *et al.* (151) reportou a variante *nonsense* c.442C>T (p.Gln148Ter) ou Q148\*, associada ao desenvolvimento de quilomicronemia. A transição C→T no exão 4 introduz o codão de terminação prematuramente, na posição 148, formando uma variante truncada (144 aminoácidos) sem ambos os domínios funcionais, C-terminal e central, responsáveis pela ligação aos lípidos e HSPG/GPIHBP1/R-LDL, respetivamente (Figura 18), (142).

O probando era portador homozigótico para a variante Q148\* (XX) e para os polimorfismos p.S19W (WW) e c.-72-571T>C (TT) no gene *APOA5*, e para o polimorfismo c.-47-454C>T (TT) do gene *APOC3*. Apresentava hipertrigliceridemia grave (40-50 mmol/L), com níveis indetetáveis de apoA-V no plasma, como resultado da degradação intracelular da apoproteína truncada ou mRNA mutante, assim como redução de 40% da atividade catalítica LPL. Já nos familiares heterozigóticos para a variante p.Q148\* (QX) e haplótipo *APOA5*\*3 (p.S19W, SW), apenas se registou HTG leve-a-moderada ( $2,27 \pm 1,13$  mmol/L) nos indivíduos com mais idade ( $47,8 \pm 15,1$  anos), IMC maior (+7,5%) e glicemia mais elevada (+12%), em relação aos restantes portadores heterozigóticos (QX, SW) normolipidémicos (151).

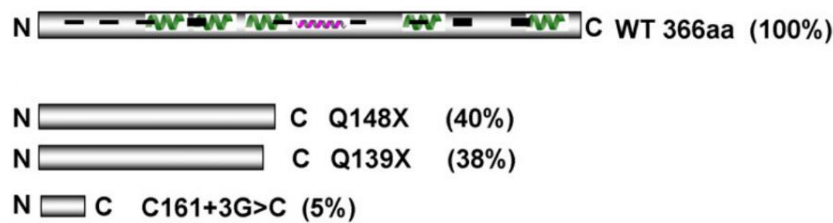
2. Marcais *et al.* (152) estudou um indivíduo e duas famílias, A e B, com quilomicronemia. O indivíduo era portador homozigótico para a variante c.415C>T (p.Gln139Ter) ou p.Q139\* gene *APOA5* (transição C→T no exão 4), responsável pela introdução do codão de terminação prematuramente e síntese de uma variante truncada (139 aminoácidos; 38% da apoA-V *wild type*) (Figura 18). Apresentava hipertrigliceridemia grave e persistente (6,5 a 65 mmol/L) e sofreu três episódios de pancreatite aguda, e um enfarte do miocárdio. Não apresentava fatores não-genéticos predisponentes para hipertrigliceridemia.

O probando da família A apresentava heterozigotia para a variante p.Q139\* (QX) e o haplótipo APOA5\*3 (SW). Sendo o único familiar com diabetes tipo 2, o probando apresentava o caso mais grave de hipertrigliceridemia grave persistente, com TG de 15-40 mmol/L e transientemente 60 mmol/L, assim como progressão detetável da placa aterosclerótica. O filho, portador heterozigótico da variante p.Q139\* (QX) e do haplótipo APOA5\*2 c.-72-571C/-3G/\*158C/162-43A, apresentava hipertrigliceridemia grave de 18 mmol/L. Os restantes familiares (não diabéticos) portadores dos haplótipos APOA5\*2 e/ou APOA5\*3 eram normolipidémicos.

A família B era composta por dois portadores heterozigóticos da variante QX e haplótipo APOA5\*3 (SW), e quatro portadores heterozigóticos QX e haplótipo APOA5\*1 (alelo comum). Os portadores heterozigóticos (QX, SW) apresentavam diabetes tipo 2 e HTG grave (24 e 80 mmol/L), enquanto os portadores QX tinham normolipidemia (TG <2 mmol/L).

Em ambas as famílias A e B, a concentração plasmática da apoA-V apresentou uma grande variabilidade entre os portadores e não portadores da variante p.Q139\*, desde 6,6 a 240 mg/L, independentemente da concentração de TG. A atividade catalítica LPL reduziu significativamente (apenas 21% da atividade “normal”) para portadores p.Q139\* hipertrigliceridémicos. Estudos adicionais de cinética da apoB-100 demonstraram perturbações da *clearance* das lipoproteínas VLDL nos portadores p.139\* hipertrigliceridémicos, e não nos p.139\* normolipidémicos.

3. Priore Oliva *et al.*(153) descreveram a variante c.161+3G>C, uma transversão g→c no *donor splice site* localizado no intrão 3, responsável pelo *splicing* aberrante do pré-mRNA e exclusão do exão 3. A ligação direta dos exões 2 e 4 causa um *frameshift* e a introdução de um codão de terminação prematuro, sintetizando-se uma apoA-V com apenas 18 aminoácidos (Figura 16). O probando era portador heterozigótico para a variante c.161+3G>C e para o polimorfismo c.-72-571T>C (TC) no gene APOA5, e homozigótico para o polimorfismo c.-47-454C>T (TT) no gene APOC3. O pai do probando era portador heterozigótico para a variante c.161+3G>C e para ambos os polimorfismo c.-72-571T>C (TC) e c.-47-454C>T (CT). Ambos (não diabéticos) apresentavam hipertrigliceridemia grave (probando: 15,9 mmol/L; pai: 47,6 mmol/L). O probando demonstrou redução significativa da atividade catalítica LPL de 47%. Paradoxalmente, a sua concentração da apoproteína A-V plasmática manteve-se dentro da normalidade (269 ng/mL).

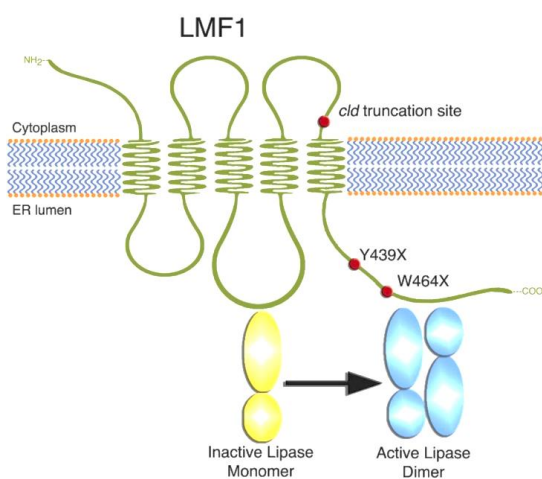


**Figura 16.** Modelo molecular da apoproteína A-V (366 aminoácidos) e as versões truncadas, resultantes das variantes p.Q148\*, p.Q139\* e c.161+3G>C, respectivamente [Retirado de Talmud PJ *et al.* 2007 (154)].

Assim, variantes descritas no gene *APOA5* determinam alterações estruturais e funcionais da apoA-V, associadas ao desenvolvimento de hipertrigliceridemia. No entanto, a baixa penetrância das variantes genéticas *APOA5* implicam a contribuição de outros fatores genéticos (polimorfismos) e não-genéticos (idade, sexo, IMC, síndromes metabólicas) para potencializar a respetiva expressão fenotípica (40). Estudos GWAS reportam que *loci* associados ao metabolismo dos lípidos explicam menos de 10-12% da variabilidade lipídica (155). *Epigenome-wide association studies* (EWAS) procuram descrever a correlação entre a metilação do DNA em citosinas, localizadas em dinucleótidos CpG, e a concentração de lípidos circulantes, onde terão identificado um pequeno número de citosinas que se associam positivamente com os níveis de TG plasmáticos (156). A citosina cg12556569, localizada na região promotora do gene *APOA5*, correlaciona positivamente com os polimorfismos c.-72-571T>C e p.S19W, assim como com outros polimorfismos localizados na proximidade do gene *APOA5* (rs964184 [g.724C>G] na região intergénica *ZNF259-APOA5*) (157). Caussy *et al.* propôs ainda que o estado de hipertrigliceridemia em portadores do haplótipo *APOA5*\*2 pode envolver a regulação pós-transcricional por microRNAs silenciadores. O microRNA miR-485-5p demonstrou complementaridade com o alelo raro c.\*158C, localizado na sequência 3'UTR do gene *APOA5*. A ligação do miR-485-5p à sequência c.\*158C reduziu significativamente a atividade do promotor *APOA5* nas células hepáticas (158).

#### 6.5.5. **LMF1**

Um estudo recente com ratinhos hipertrigliceridêmicos, portadores da variante recessiva *combined lipase deficiency (cld)*, levou à identificação de um novo gene, cujo produto proteico está envolvido na maturação da LPL e lipase hepática (*hepatic lipase*, HL) no RE (87). O homólogo humano deste gene, *lipase maturation factor 1*, encontra-se no cromossoma 16p13.3 e codifica para 567 aminoácidos da proteína transmembranar LMF1. LMF1 é uma chaperona do RE composta por 5 domínios transmembranares e o domínio conservado C-terminal, para a ativação das lípases (Figura 17) (159). O mecanismo molecular pelo qual a LMF1 atua não é conhecido. Hipoteticamente, a LMF1 pode estabilizar a LPL mediante a dimerização dos monómeros inativos (92), ou, por interação com chaperonas do RE, auxiliar na formação de pontes dissulfeto na LPL nascente (87). Esta modulação pós-tradução atua como um método de controlo da expressão da LPL (92).



**Figura 17.** Representação gráfica da estrutura e função da LMF1. A LMF1 é uma proteína do retículo endoplasmático, constituída por 5 domínios transmembranares e um domínio C-terminal conservado. O C-terminal é necessário para a maturação da LPL, através da ligação dos monómeros inativados da lipase (amarelo) ou estabilização do dímero ativado (azul). Variante *nonsense cld* (rato), p.Y439\* e p.W464\* (círculos vermelhos) forma uma variante truncada. [Adaptado de Peterfy M *et al.* 2012 (159)]

Duas variantes *nonsense* no gene *LMF1* foram identificadas em dois indivíduos homozigóticos para c.1317C>G (p.Tyr439Ter ou p.Y439\*) (160), e c.1391G>A (p.Trp464Ter ou p.W464\*) (161), respetivamente, com hipertrigliceridemia grave (TG >2500 mg/dL), episódios recorrentes de pancreatite aguda e deficiência combinada de lipase (OMIM#246650). O indivíduo homozigótico para c.1317C>G apresentava xantomas,

lipodistrofia parcial e redução significativa de 93% da atividade da LPL, enquanto o indivíduo homozigótico para c.1391G>A apresentava uma redução de 76% da atividade. A preservação de um maior número de resíduos de aminoácidos no domínio C-terminal da variante p.Trp464Ter, comparativamente à variante p.Tyr439Ter, pode justificar a divergência fenotípica observada entre as duas variantes no gene *LMF1* (159).

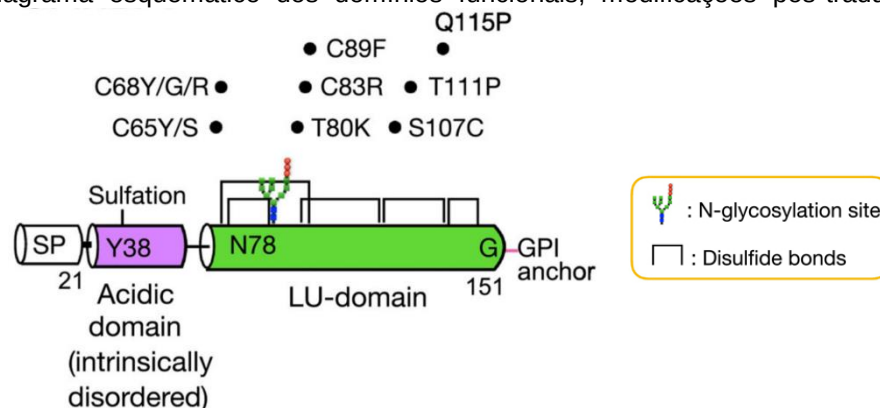
#### 6.5.6. **GPIHBP1**

A proteína de ligação à lipoproteína de alta densidade ancorada ao glicosilfosfatidilinositol pertence à superfamília de recetores de ativador de plasminogénio tipo uroquinase (*lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor*, Ly6/uPAR) rico em resíduos de cisteína. Os resíduos cisteína formam pontes dissulfeto, responsáveis pela característica conformação tridimensional *3-finger fold* das proteínas Lys6 (162). A proteína GPIHBP1, a âncora da enzima LPL nas células do endotélio capilar, num rácio estequiométrico de 1:1 (163) executa a translocação da LPL para o lúmen capilar e a marginalização do substrato lipídico ao endotélio capilar (162) e previne o *unfolding* espontâneo da LPL (90). Expressa exclusivamente pelo endotélio capilar, é codificada pelo gene GPIHBP1, localizado na região cromossómica 8q24.3 (60). O exão 2 codifica para o domínio N-terminal, composto por 21 resíduos de aminoácidos ácidos (Glu, Asp) e intrinsecamente desorganizados (90). Os exões 3 e 4 codificam para o domínio Ly6/uPAR e para o péptido sinal hidrofóbico no domínio C-terminal (Gly178), que liga covalentemente a âncora GPI, na membrana celular (Figura 18) (87).

A proteína GPIHBP1, composta por 184 resíduos de aminoácidos, é alvo de modificações pós-traducionais, como a N-glicosilação do resíduo Asn58, O-sulfatação do resíduo Tyr18 e a formação de pontes dissulfeto (Cys35-Cys69, Cys48-Cys57, Cys63-Cys90, Cys94-Cys110, Cys111-Cys116) (60). A N-glicosilação do Asp58 é necessária para o tráfego intracelular da proteína (87). As cinco pontes dissulfeto descrevem a conformação *3-finger fold* do domínio LU (resíduos 42-109). A estrutura terciária da LU é essencial para a ligação da GPIHBP1 com a LPL, e permite interações com as apolipoproteínas C-II e A-V, e as lipoproteínas na superfície endotelial (164). A região ácida estabelece interações electrostáticas com a LPL nos respetivos locais de ligação HSPG, enquanto o domínio LU interage com o domínio PLAT, localizada no C-terminal da LPL (60). Estabelecida a ligação com a LPL, a GPIHBP1 procede à translocação da enzima através das células endoteliais. Sob o lúmen vascular, o complexo LPL-GPIHBP1 causa a marginalização das LRT ao

longo do endotélio capilar, iniciando-se a hidrólise intravascular dos TG contidos nas lipoproteínas circulantes. Na ausência da GPIHBP1, a LPL permanece no espaço intersticial e as lipoproteínas continuam o seu percurso na corrente sanguínea (90).

**Figura 18.** Diagrama esquemático dos domínios funcionais, modificações pós-traducionais e



variantes no gene *GPIHBP1*. [Adaptado de Wu SA et al. 2021 (87)]

Variantes no gene *GPIHBP1* têm vindo a ser descritas em doentes com SQF (165). Os portadores homozigóticos destas variantes apresentam quilomicronemia persistente, com início na infância, e hipertrigliceridemia grave (TG > 2000 mg/dL). Uma concentração significativamente reduzida da enzima LPL e da GPIHBP1 no soro definem a deficiência em GPIHBP1 (OMIM#612757). A expressão fenotípica da deficiência em GPIHBP1 apenas ocorre em portadores homozigóticos da variante *GPIHBP1*, enquanto portadores heterozigóticos são normolipidémicos, apresentando 50% da concentração plasmática da enzima LPL (166). A maioria das variantes *missense* alteram os resíduos de cisteína intervenientes na formação de pontes dissulfeto, fundamentais para a conformação tridimensional de *3-fingers fold* do domínio LU, nomeadamente c.194G>C (p.Cys65Ser), c.194G>A (p.Cys65Tyr), c.202T>G (p.Cys68Gly), c.203G>A (p.Cys68Tyr), c.202T>C (p.Cys68Arg), c.247T>C (p.Cys83Arg), e c.266G>T (p.Cys89Phe)) (162, 163). Substituições em resíduos próximos de cisteínas também afetam a capacidade de formar as pontes dissulfeto, como c.344A>C (p.Gln115Pro) e c.331A>C (p.Thr111Pro) (166). As cisteínas ímpares induzem a multimerização das proteínas mutantes GPIHBP1, que se tornam indisponíveis para ligar à LPL (167). As variantes *missense* c.239C>A (p.Thr80Lys) e c.523G>C (p.Gly175Arg) interferem com a N-glicosilação e com o tráfego intracelular da GPIHBP1 para a membrana plasmática, respetivamente (168). Ainda que a região acídica corresponda a 30% da sequência primária da GPIHBP1 madura, não existem descritas na literatura variantes nesta região associadas ao desenvolvimento da hipertrigliceridemia (60).

## 6.6. Hipertrigliceridemia e risco de pancreatite

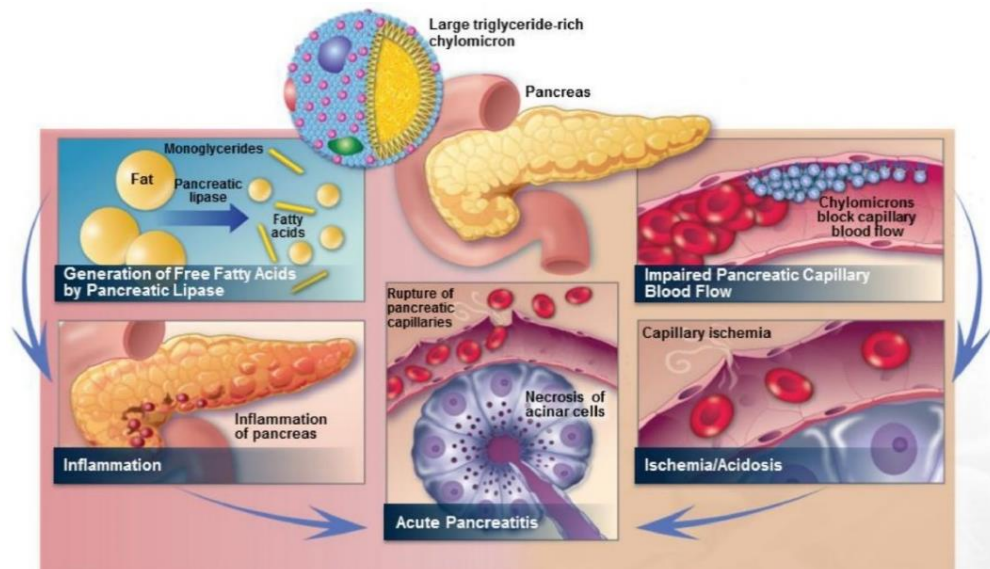
Um dos maiores desafios que os doentes hipertrigliceridêmicos enfrentam é o risco de pancreatite aguda (5, 10, 17, 169). A pancreatite aguda é um processo inflamatório agudo do pâncreas, caracterizado pela intensa dor abdominal e elevação das enzimas pancreáticas que pode ser fatal. A seguir à colelitíase e ao alcoolismo, a hipertrigliceridemia é a terceira causa mais comum de pancreatite aguda (11), sendo responsável por cerca de 9% dos eventos pancreáticos na população (5) e mais de 50% dos episódios de pancreatite gestacional (170).

Não existe um consenso quanto ao valor de referência acima do qual a concentração de TG se correlaciona positivamente com a ocorrência de um evento pancreático. A *American College of Gastroenterology* e a *Endocrine Society* propõe que concentrações de TG plasmáticos >1000 mg/dL (>11,3 mmol/L) são um fator de risco de pancreatite aguda (171), enquanto a *European Society of Cardiology* e *European Atherosclerosis Society* propõem TG >885 mg/dL (10 mmol/L) como marcador de risco pancreático (5). Não obstante, o risco de pancreatite aguda é tanto maior quanto mais elevada for a concentração de TG plasmáticos (5, 10-12). Num estudo coorte, 95 doentes com hipertrigliceridemia grave (TG > 1772 mg/dL, média de 3376 mg/dL) foram acompanhados num período de 12 anos. Em 15,8% dos participantes, foi reportado um histórico de pancreatite aguda, tendo os eventos pancreáticos ocorrido com TG >1815 mg/dL (115, 172). Linares *et al* (173) estudou 129 doentes com hipertrigliceridemia grave (TG >1000 mg/dL) durante 6 anos; 20,2% reportaram um histórico de pancreatite aguda, após exclusão de possíveis etiologias. A média da concentração de TG era significativamente elevada em doentes com pancreatite aguda, em comparação com doentes sem histórico de pancreatites (4470 vs. 2450 mg/dL, respetivamente). Relativamente aos doentes afetados, mais de 85% apresentavam valores de TG superiores a 3000 mg/dL e 65% apresentavam TG >5000 mg/dL. Um estudo coorte avaliou registos médicos, com 103 doentes hipertrigliceridêmicos (TG >2000 mg/dL), e reportou que 38% dos participantes terão sido hospitalizados pela ocorrência de um episódio pancreático agudo (23).

Como medida preventiva para a ocorrência de pancreatites, a entidade norte-americana *National Cholesterol Education Program* (NCEP) *Adult Treatment Panel III* recomenda a redução dos TG séricos para valores inferiores a 500 mg/dL (174). Christian

*et al.* (175) estudou a evolução de 41,210 adultos hipertrigliceridémicos (TG >500 mg/dL), durante 825 dias. Na avaliação *follow-up* os indivíduos cujos níveis de TG sofreram redução para valores <200 mg/dL apresentavam um risco de pancreatite significativamente menor (razão de probabilidade de 0,45), comparativamente ao grupo com TG ≥500 mg/dL.

O mecanismo pelo qual o estado hipertrigliceridémico promove a ocorrência de pancreatite aguda não é completamente conhecido. A fisiopatologia da pancreatite aguda induzida pelo estado de hipertrigliceridemia baseia-se na acumulação de AGL e a ativação da resposta inflamatória (Figura 19) (11, 176, 177). Os TG em excesso são hidrolisados em AGL pelas lípases pancreáticas, produzidas pelas células acinares do pâncreas exócrino e subsequentemente excretadas para a vasculatura pancreática (176). Os AGL em excesso são reorganizados em estruturas micelares com propriedades de detergente, capazes de danificar as células acinares e os capilares pancreáticos. Como resultado, as micelas de AGL exercem um efeito citotóxico no endotélio vascular, induzindo isquemia, acidose e ainda ativação de tripsinogénio em tripsina ativa, fatores responsáveis pela autodigestão dos tecidos pancreáticos (11). Níveis elevados de AGL também promovem a libertação do cálcio intracitosólico, que ativa o tripsinogénio e promove a necrose das células acinares (177). Por outro lado, os AGL estimulam a produção de mediadores inflamatórios, como oTNF- $\alpha$  e as interleucinas IL-6 e IL-10, que desempenham um papel importante na progressão da pancreatite aguda(11). Alterações na microcirculação pancreática, causadas pela hipertrigliceridemia, promovem a libertação acentuada do fator vasoconstritor tromboxano A2 e a redução da secreção da prostaglandina 2 que é vasodilatadora, sendo este desequilíbrio responsável pela contração e dano dos capilares pancreáticos (11). Finalmente, a hiperviscosidade induzida pelas elevadas concentrações de QM causam a obstrução dos capilares, limitação do fluxo sanguíneo e lesão isquémica do pâncreas (10).



**Figura 19.** Mecanismo proposto para a pancreatite aguda induzida pela hipertrigliceridemia. [Adaptado de Chyzhyk V et al. 2020 (104)]

## 6.7. Hipertrigliceridemia e risco cardiovascular

A aterosclerose resulta de um estado inflamatório crônico, secundário à exposição cumulativa das artérias a mediadores pró-inflamatórios e alterações da camada endotelial e vascular. A fragilização do endotélio facilita a acumulação de lipoproteínas aterogênicas circulantes, com características pró-inflamatórias, na íntima da parede arterial. As lipoproteínas LDL oxidadas (oxLDL) produzem citocinas e quimiocinas, que potenciam a quimiotaxia e diapedese dos monócitos circulantes para o local da lesão aterosclerótica. Os monócitos diferenciam-se localmente em macrófagos e estes expressam recetores *scavenger* mediadores da fagocitose macrofágica das oxLDL. A acumulação excessiva dos lípidos no interior dos macrófagos determina a sua transformação nas denominadas células espumosas, iniciando a formação da estria lipémica. As células espumosas agravam a inflamação da vasculatura, através da proliferação das células do músculo liso vascular (VSMC), síntese de fatores de crescimento, citocinas imunogénicas e metaloproteinases da matriz, perpetuando o ciclo da aterogénese (6, 8, 9, 42). Os linfócitos T ativados pelas oxLDL também interferem no processo inflamatório como ativadores da imunidade adaptativa (44), mais concretamente o subtipo linfocelular  $T_H1$  produtor de citocinas pró-inflamatórias (6, 9, 42, 45). As lipoproteínas aterogénicas e os mediadores imunoquímicos causam a indução hiperplástica das VSMCs na íntima o que contribuí para o crescimento do ateroma e consequente obstrução do fluxo sanguíneo no lúmen arterial. Gera-se hipoxia localizada, isquemia cardíaca e, finalmente, sintomatologia associada a angina *pectoris* (6,

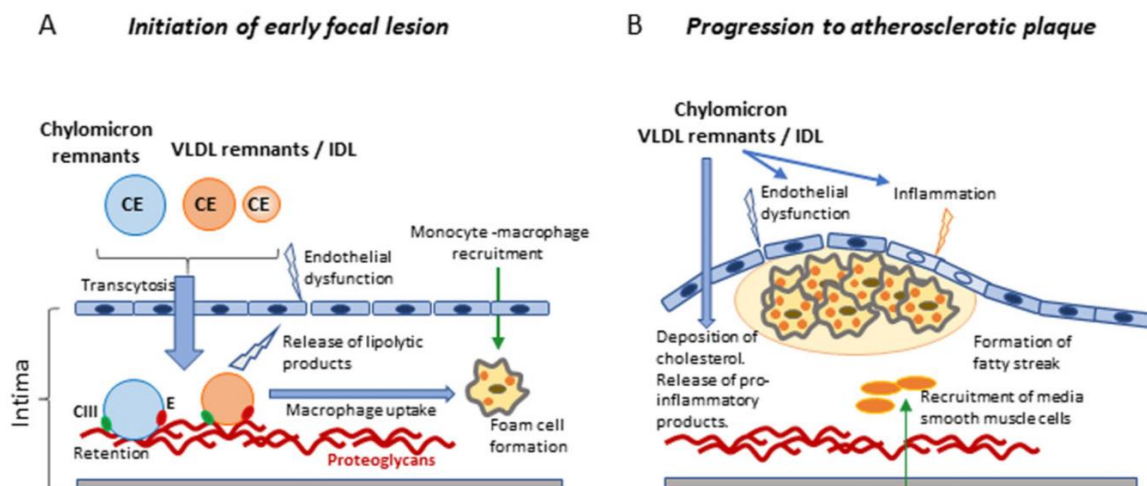
8, 9, 42). A libertação dos fatores inflamatórios e a consequente resposta celular sucedem-se ao longo de décadas, e atuam sinergicamente na iniciação e progressão da placa aterosclerótica. Eventualmente, as cascatas inflamatórias induzem a apoptose dos macrófagos, linfócitos, células espumosas, VSMCs e células endoteliais, que constituem a massa ateromatosa, desenvolvendo-se um *core* necrosado intravascular. A necrose celular impulsiona a fissura da capa fibrosa e a rutura do ateroma, que desencadeia algumas das manifestações clínicas do foro cardiovascular, como trombose das artérias coronárias e enfarte do miocárdio (6, 8, 9, 42).

As lipoproteínas compostas pelas apolipoproteínas B são fatores independentes no desenvolvimento da aterosclerose, uma vez que atuam simultaneamente como ativadoras de vias pró-inflamatórias e transportam o material lipídico que constitui o *core* ateromatoso (6, 9). Um grande número de estudos evidenciam o colesterol LDL como o fator causal da aterogénese.(4, 6, 8, 9, 42, 43). Naturalmente, indivíduos afetados com hiperbetalipoproteinemia – fenótipo lipídico característico de várias doenças hereditárias raras com concentrações de colesterol LDL extremamente elevadas (>8 mmol/L [400 mg/dL]) – estarão particularmente suscetíveis ao desenvolvimento prematuro da doença cardiovascular aterosclerótica (8, 178). No entanto, o estudo das hipertrigliceridemias e o potencial risco aterosclerótico permanece, essencialmente, inconclusivo (4-9). Outros fatores comportamentais e ambientais induzem a ativação de vias pró-inflamatórias, que fragilizam a vasculatura arterial e potenciam a progressão da lesão aterosclerótica, nomeadamente o tabagismo, hipertensão arterial, *stress*, obesidade, sedentarismo e síndromes metabólicas (adiposidade visceral, insulinoresistência, hipertrigliceridemia) (6, 9).

A distribuição Gaussiana dos níveis populacionais dos TG mostra que a maioria dos doentes hipertrigliceridémicos têm hipertrigliceridemia leve-a-moderada, pelo que o seu risco aterosclerótico é essencialmente atribuído às pequenas partículas ricas em TG e LDL pequenas e densas, que exibem um tempo de residência no plasma significativamente prolongado (17, 61). Entre os indivíduos hipertrigliceridémicos com hipertrigliceridemia grave, os níveis extremamente elevados de TG refletem a acumulação de QM e possíveis remanescentes na circulação (59, 72). O volume corpuscular da partícula QM impede a sua penetração através da barreira endotelial e acumulação na placa aterosclerótica, enquanto que as pequenas remanescentes QM podem contribuir para a aterogénese (Figura 20) (59). Indivíduos com quilomicronemia monogénica apresentam sobretudo quilomicronemia com produção residual ou ausência de remanescentes, pelo que o risco aterosclerótico é teoricamente reduzido. Em contrapartida, pessoas com quilomicronemia

multifatorial apresentam um espectro de partículas ricas em TG significativamente difuso com várias subpopulações remanescentes, pelo que o risco aterosclerótico será potencialmente maior (179).

Na hipertrigliceridemia leve-a-moderada, as partículas VLDL<sub>1</sub> apresentam um longo tempo de residência no compartimento plasmático devido à sua *clearance* incompleta via LPL, gerando uma cascata de subpopulações remanescentes metabólicas com potencial aterogénico (61, 65). A IDL e remanescentes (diâmetro corpuscular <70 nm) atravessam o endotélio via transporte ativo transmembranar e acumulam-se na camada subendotelial da parede arterial, contribuindo para a iniciação e progressão da lesão aterosclerótica (7). As partículas remanescentes distribuídas entre o espectro de densidades VLDL<sub>2</sub> e IDL contêm mais de 30% do seu peso em colesterol e podem transportar até 4 vezes mais moléculas de colesterol do que partículas LDL (10 000 vs. 2000-2700 moléculas de colesterol por partícula, respetivamente) (180). Além disso, o estado de hipertrigliceridemia potencia a formação de partículas VLDL e remanescentes ricas em apoproteínas E, estas envolvidas na ligação com proteoglicanos no endotélio arterial e com recetores *scavenger* dos macrófagos no espaço subendotelial, promovendo a deposição de colesterol remanescente na lesão aterosclerótica (7, 180). Ao contrário das partículas LDL, a aterogenicidade das remanescentes ricas em colesterol induz eficazmente a ativação dos macrófagos e formação de células espumosas, independentemente da sua modificação estrutural ou estado de oxidação (7, 180). Adicionalmente, as remanescentes e os ácidos gordos oxidados gerados durante o processo lipolítico das LRT ativam vias pró-inflamatórias e pró-apoptóticas; Estudos demonstram que os ácidos gordos oxidados podem aumentar a expressão de interleucinas e citocinas inflamatórias, causando a inflamação do endotélio vascular, enquanto as remanescentes estimulam a expressão endotelial de moléculas de adesão, ICAM-1 e VCAM-1, facilitando a migração transendotelial dos leucócitos para o local da inflamação e estimulando a resposta inflamatória (7, 181).



**Figura 20.** Efeito aterogénico das lipoproteínas ricas em triglicerídeos e remanescentes. (A) As partículas remanescentes QM e VLDL, ricas em apoC-III e apoE, atravessam a camada endotelial e interagem com os proteoglicanos da matriz extracelular. A degradação *in situ* destas partículas liberta lípidos bioativos, que causam disfunção endotelial e inflamação. Os monócitos são recrutados para remover as lipoproteínas depositadas. A fagocitose das partículas com colesterol remanescente induz a formação de células espumosas e iniciação da lesão aterosclerótica. (B) Ciclos repetitivos do influxo de lipoproteínas promovem a formação da estria lipémica. Ocorre migração das células do músculo liso para a área lesionada. Eventualmente, forma-se uma placa aterosclerótica instável, seguida de erosão ou rutura mecânica, e formação do trombo com potencial oclusão do lúmen e eventos clínicos. CE – colesterol éster; IDL – *intermediate-density lipoprotein*; VLDL – *very low-density lipoprotein* [Retirado de Ginsberg HN et al. 2021 (180)].

De acordo com estudos epidemiológicos, a hipertrigliceridemia pode ser considerada um fator causal no desenvolvimento aterosclerótico. Estudos coorte *Copenhagen City Heart Study* e *Copenhagen General Population Study* com cerca de 100 000 indivíduos, os TG pós-prandiais acima dos 496 mg/dL estão associados a um risco aumentado de cinco, três e duas vezes mais para a ocorrência de enfartes do miocárdio, AVC isquémico e mortalidade geral, respetivamente (182). Outro estudo, *Copenhagen General Population Study*, reportou que indivíduos entre os 40 e 65 anos de idade com TG > 264 mg/dL apresentavam o mesmo risco de aterosclerose que os indivíduos elegíveis para a farmacoterapia com estatinas (129). Considerando que 80% dos eventos cardíacos ocorrem em indivíduos não elegíveis para a profilaxia terapêutica com estatinas, os níveis de TG poderão ser considerados como um importante marcador de risco ASCVD (5).

No entanto, a correlação entre os TG séricos e o risco cardiovascular aterosclerótico, observada nos estudos epidemiológicos é anulada quando ajustado para

o colesterol não-HDL – uma estimativa de todas as lipoproteínas compostas por apoB (4, 5, 7-9, 179). Propõe-se que o efeito dos níveis elevados de TG atua indiretamente no risco ASCVD, mediante a produção exacerbada de LRT e remanescentes. Um estudo em Copenhaga demonstrou uma relação de causalidade entre colesterol remanescente pós-prandial (colesterol transportado pelas LRT) e o risco de isquemia cardíaca (183). Assim, o risco ASCVD associado às hipertrigliceridemias parece estar associado ao aumento de lipoproteínas circulantes compostas por uma apolipoproteína B e um *core* rico em colesterol (4, 5, 8), dois fatores determinísticos no desenvolvimento da placa aterosclerótica.

Na tentativa de colmatar as limitações condicionadas pelas multivariáveis dos estudos epidemiológicos, foram realizados estudos de randomização Mendeliana para aferir se a expressão fenotípica de variantes genéticas, que alteram o metabolismo dos TG, estão causalmente relacionadas com a ocorrência de eventos cardiovasculares. Contudo, praticamente todas as variantes genéticas que aumentavam os níveis de TG e se correlacionavam positivamente com o risco ASCVD, estão interrelacionadas com outra lipoproteína, a HDL anti-aterogénica (4-9). Variantes no gene *APOA5* foram associadas com TG elevados e risco CVD aumentado, enquanto simultaneamente associadas com níveis reduzidos de colesterol HDL (184). No gene *LPL*, a variante comum com perda de função p.D36N foi associada com TG e risco CVD elevados, respetivamente, assim como níveis de C-HDL concomitantemente reduzidos (184). Na tentativa de isolar o efeito genético no colesterol HDL e o risco CVD, modelos estatísticos demonstraram que combinações de determinantes genéticas associadas aos TG se encontravam correlacionados com o risco aumentado CVD, enquanto combinações de determinantes genéticos associados ao colesterol HDL não se correlacionaram com o risco CVD (185). Variantes raras heterozigóticas LOF no gene *APOC3* demonstram uma associação significativa com níveis de TG reduzidos e um risco CVD significativamente reduzido (129). No entanto, as variantes encontravam-se simultaneamente associadas com colesterol LDL (c-LDL) reduzido e colesterol HDL (c-HDL) aumentado. Adicionalmente, portadores de variantes raras heterozigóticas LOF no gene *APOA5* associadas com TG aumentados demonstraram um risco duas vezes superior de desenvolver CVD prematura, mas estas variantes também se associavam com c-LDL aumentado e c-HDL reduzido (186). Entre 46 891 indivíduos com a sequenciação do gene *LPL* disponibilizada, 188 eram portadores de uma variante rara no gene *LPL* e apresentavam níveis de TG superiores (~15%), c-HDL reduzido (~10%) e colesterol remanescente aumentado (~10%) em relação aos participantes não portadores (187). Também o risco CVD era superior nos portadores heterozigóticos.

Em suma, a correlação entre a hipertrigliceridemia e a aterosclerose foi demonstrada em estudos epidemiológicos, mecanísticos e mendelianos. Variantes genéticas responsáveis pelos valores de TG elevados estão relacionadas com o risco CVD. No entanto, em praticamente todos os estudos mendelianos foram observadas alterações noutro lípido em simultâneo, nomeadamente o c-HDL reduzido. É possível que os TG representem uma componente de um fenótipo conjunto com o colesterol HDL, ou que atuem como marcadores de alterações metabólicas que não são usualmente quantificados em estudos epidemiológicos e genéticos (179).

## 7. Conclusão

A hipertrigliceridemia é uma condição clínica geneticamente e fenotipicamente complexa. A literatura descreve uma multitude de fatores genéticos e fatores não genéticos significativamente correlacionados com o desenvolvimento da hipertrigliceridemia. Variantes homozigóticas, ou em heterozigotia combinada, com perda de função nos cinco genes canônicos diretamente envolvidos no metabolismo dos TG (*LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *GPIHBP1* e *LMF1*) induzem a expressão de um fenótipo relativamente homogêneo, caracterizado pela hipertrigliceridemia grave em jejum (quilomicronemia). Em contrapartida, variantes patogénicas, em heterozigotia, nos cinco genes canônicos podem desencadear um espectro fenotípico amplamente heterogêneo, variando desde normolipidemia a hipertrigliceridemia grave. A variabilidade fenotípica observada nos portadores heterozigóticos deve-se à penetrância incompleta das variantes genéticas. Polimorfismos comuns em genes canônicos e candidatos, reportados em GWAS, encontram-se significativamente sobrerrepresentados em indivíduos hipertrigliceridémicos, pelo que a acumulação de polimorfismos comuns está correlacionada positivamente com o desenvolvimento da hipertrigliceridemia. Cumulativamente, as variantes heterozigóticas raras e os polimorfismos comuns induzem um estado de suscetibilidade para o desenvolvimento da hipertrigliceridemia, sendo o fenótipo tanto mais grave quanto maior o score de variantes genéticas presentes.

A hipertrigliceridemia grave é o traço fenotípico que caracteriza os doentes com quilomicronemia familiar, portadores de variantes bialélicas nos genes canônicos, e os doentes com quilomicronémia multifatorial, portadores de variantes heterozigóticas e/ou carga cumulativa de polimorfismos comuns. Com base nos casos de probandos afetados com hipertrigliceridemia descritos na literatura, a quilomicronémia familiar apresenta sempre um fenótipo exuberante de hipertrigliceridemia grave, enquanto a quilomicronémia multifatorial é predominantemente dependente da presença de fatores não genéticos para expressar um fenótipo extremo.

Os doentes com SQF e QMM sofrem de elevada morbilidade e mortalidade, e relatam uma perda significativa de qualidade de vida, associada às manifestações clínicas causadas pela hipertrigliceridemia grave, nomeadamente problemas psicossociais, dores abdominais, e episódios recorrentes de pancreatite aguda potencialmente fatais. De facto, o risco de pancreatite aguda associado à hipertrigliceridemia é inequívoco. Já o risco da doença aterosclerótica cardiovascular permanece pouco conclusivo. Estudos epidemiológicos, mecanísticos e mendelianos têm vindo a demonstrar consistentemente uma correlação significativa entre os níveis de TG e o risco ASCVD, comprovando o efeito

aterogénico da hipertrigliceridemia na saúde cardiovascular. Dados os riscos associados com a hipertrigliceridemia, é importante que haja uma identificação e diagnóstico definitivo da hipertrigliceridemia, de forma a controlar a progressão da doença e prevenir a manifestação de complicações clínicas, secundárias à exposição cumulativa ao longo da vida de concentrações patologicamente elevadas dos TG plasmáticos.

## Referências

1. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(2):112-24.
2. Illingworth DR. Lipoprotein Metabolism. *American Journal of Kidney Diseases*. 1993;22(1):90-7.
3. Shlomo Melmed RK, Clifford Rosen, Richard Auchus, Allison Goldfine. *Williams Textbook of Endocrinology*: Elsevier; 2019.
4. Packard CJ, Boren J, Taskinen MR. Causes and Consequences of Hypertriglyceridemia. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:252.
5. Laufs U, Parhofer KG, Ginsberg HN, Hegele RA. Clinical review on triglycerides. *Eur Heart J*. 2020;41(1):99-109c.
6. Helkin A, Stein JJ, Lin S, Siddiqui S, Maier KG, Gahtan V. Dyslipidemia Part 1--Review of Lipid Metabolism and Vascular Cell Physiology. *Vasc Endovascular Surg*. 2016;50(2):107-18.
7. Peng J, Luo F, Ruan G, Peng R, Li X. Hypertriglyceridemia and atherosclerosis. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):233.
8. Authors/Task Force M, Guidelines ESCCfP, Societies ESCNC. 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2019;290:140-205.
9. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):56.
10. Goldberg RB, Chait A. A Comprehensive Update on the Chylomicronemia Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:593931.
11. Yang AL, McNabb-Baltar J. Hypertriglyceridemia and acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2020;20(5):795-800.
12. Simha V. Management of hypertriglyceridemia. *BMJ*. 2020;371:m3109.
13. Johansen CT, Kathiresan S, Hegele RA. Genetic determinants of plasma triglycerides. *J Lipid Res*. 2011;52(2):189-206.
14. Johansen CT, Hegele RA. Allelic and phenotypic spectrum of plasma triglycerides. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(5):833-42.
15. Dron JS, Wang J, Cao H, McIntyre AD, Iacocca MA, Menard JR, et al. Severe hypertriglyceridemia is primarily polygenic. *J Clin Lipidol*. 2019;13(1):80-8.
16. Brahm A, Hegele RA. Hypertriglyceridemia. *Nutrients*. 2013;5(3):981-1001.
17. Dron JS, Hegele RA. Genetics of Hypertriglyceridemia. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:455.
18. Falko JM. Familial Chylomicronemia Syndrome: A Clinical Guide For Endocrinologists. *Endocr Pract*. 2018;24(8):756-63.
19. Hegele RA, Berberich AJ, Ban MR, Wang J, Digenio A, Alexander VJ, et al. Clinical and biochemical features of different molecular etiologies of familial chylomicronemia. *J Clin Lipidol*. 2018;12(4):920-7 e4.

20. Hegele RA, Ban MR, Hsueh N, Kennedy BA, Cao H, Zou GY, et al. A polygenic basis for four classical Fredrickson hyperlipoproteinemia phenotypes that are characterized by hypertriglyceridemia. *Hum Mol Genet.* 2009;18(21):4189-94.
21. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard BG, Kuivenhoven JA, Aversa M, et al. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014;2(8):655-66.
22. Shemesh E, Zafir B. Hypertriglyceridemia-Related Pancreatitis In Patients With Type 2 Diabetes: Links And Risks. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2019;12:2041-52.
23. Esparza MI, Li X, Adams-Huet B, Vasandani C, Vora A, Das SR, et al. Very Severe Hypertriglyceridemia in a Large US County Health Care System: Associated Conditions and Management. *J Endocr Soc.* 2019;3(8):1595-607.
24. Carr RA, Rejowski BJ, Cote GA, Pitt HA, Zyromski NJ. Systematic review of hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis: A more virulent etiology? *Pancreatol.* 2016;16(4):469-76.
25. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. *Endocrinology and metabolism clinics of North America.* 1998;27(3):503-19.
26. Tiwari S, Siddiqi SA. Intracellular trafficking and secretion of VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(5):1079-86.
27. Chait A, Ginsberg HN, Vaisar T, Heinecke JW, Goldberg IJ, Bornfeldt KE. Remnants of the Triglyceride-Rich Lipoproteins, Diabetes, and Cardiovascular Disease. *Diabetes.* 2020;69(4):508-16.
28. Hussain MM. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Current Opinion in Lipidology.* 2014;25(3):200-6.
29. Shepherd J. Lipoprotein metabolism. An overview. *Drugs.* 1994;47:1-10.
30. Louis C. Smith HJP, Antonio M. Gotto Jr. The Plasma Lipoproteins: Structure and Metabolism. *Annual Review of Biochemistry.* 1978;47:751-77.
31. Blanc V, Davidson NO. APOBEC-1-mediated RNA editing. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010;2(5):594-602.
32. Hesse D, Jaschke A, Chung B, Schurmann A. Trans-Golgi proteins participate in the control of lipid droplet and chylomicron formation. *Biosci Rep.* 2013;33(1):1-9.
33. Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(12):1695-727.
34. de Beer MC, Castellani LW, Cai L, Stromberg AJ, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. ApoA-II modulates the association of HDL with class B scavenger receptors SR-BI and CD36. *J Lipid Res.* 2004;45(4):706-15.
35. Ben-Aicha S, Badimon L, Vilahur G. Advances in HDL: Much More than Lipid Transporters. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3).
36. He P, Gelissen IC, Ammit AJ. Regulation of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) expression: cholesterol-dependent and - independent signaling pathways with relevance to inflammatory lung disease. *Respir Res.* 2020;21(1):250.
37. Josep Ribalta J-CV, Josefa Girona, Lluís Masana. Apolipoprotein and apolipoprotein receptor genes, blood lipids and disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* 2003 6(2):177-87.

38. Pownall HJ. Rethinking apolipoprotein A-II in lipid metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2018;108(1):4-5.
39. Su X, Peng D. The exchangeable apolipoproteins in lipid metabolism and obesity. *Clin Chim Acta.* 2020;503:128-35.
40. Nilsson SK, Heeren J, Olivecrona G, Merkel M. Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. *Atherosclerosis.* 2011;219(1):15-21.
41. Sharma V, Forte TM, Ryan RO. Influence of apolipoprotein A-V on the metabolic fate of triacylglycerol. *Curr Opin Lipidol.* 2013;24(2):153-9.
42. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(8 Suppl):C7-12.
43. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017;38(32):2459-72.
44. Boren J, Williams KJ. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27(5):473-83.
45. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 2011;12(3):204-12.
46. Galema-Boers JM, van Lennep JE. Dyslipidemia testing: Why, for whom and when. *Maturitas.* 2015;81(4):442-5.
47. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid Research.* 1984;25(12):1277-94.
48. Meyers NL, Wang L, Small DM. Apolipoprotein C-I binds more strongly to phospholipid/triolein/water than triolein/water interfaces: a possible model for inhibiting cholesterol ester transfer protein activity and triacylglycerol-rich lipoprotein uptake. *Biochemistry.* 2012;51(6):1238-48.
49. Wolska A, Reimund M, Remaley AT. Apolipoprotein C-II: the re-emergence of a forgotten factor. *Curr Opin Lipidol.* 2020;31(3):147-53.
50. Wolska A, Lo L, Sviridov DO, Pourmoussa M, Pryor M, Ghosh SS, et al. A dual apolipoprotein C-II mimetic-apolipoprotein C-III antagonist peptide lowers plasma triglycerides. *Sci Transl Med.* 2020;12(528).
51. Wolska A, Dunbar RL, Freeman LA, Ueda M, Amar MJ, Sviridov DO, et al. Apolipoprotein C-II: New findings related to genetics, biochemistry, and role in triglyceride metabolism. *Atherosclerosis.* 2017;267:49-60.
52. Dib I, Khalil A, Chouaib R, El-Makhour Y, Noureddine H. Apolipoprotein C-III and cardiovascular diseases: when genetics meet molecular pathologies. *Mol Biol Rep.* 2021;48(1):875-86.
53. Tg, Hdl Working Group of the Exome Sequencing Project NHL, Blood I, Crosby J, Peloso GM, Auer PL, et al. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med.* 2014;371(1):22-31.
54. Getz GS, Reardon CA. Apoprotein E and Reverse Cholesterol Transport. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11).

55. Marais AD. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology*. 2019;51(2):165-76.
56. Li J, Li L, Guo D, Li S, Zeng Y, Liu C, et al. Triglyceride metabolism and angiopoietin-like proteins in lipoprotein lipase regulation. *Clin Chim Acta*. 2020;503:19-34.
57. Kumari A, Kristensen KK, Ploug M, Winther AL. The Importance of Lipoprotein Lipase Regulation in Atherosclerosis. *Biomedicines*. 2021;9(7).
58. Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(7):919-33.
59. Lewis GF, Xiao C, Hegele RA. Hypertriglyceridemia in the genomic era: a new paradigm. *Endocr Rev*. 2015;36(1):131-47.
60. Kristensen KK, Leth-Espensen KZ, Kumari A, Grønnemose AL, Lund-Winther AM, Young SG, et al. GPIHBP1 and ANGPTL4 Utilize Protein Disorder to Orchestrate Order in Plasma Triglyceride Metabolism and Regulate Compartmentalization of LPL Activity. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:702508.
61. Chris J. Packard JS. Lipoprotein Heterogeneity and Apolipoprotein B Metabolism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997;17(12):3542-56.
62. C. E. Tan LF, M. J. Caslake, D. Bedford, T. D. G. Watson, M. McConnell, C. J. Packard, J. Shepherd. Relations Between Plasma Lipids and Postheparin Plasma Lipases and VLDL and LDL Subfraction Patterns in Normolipemic Men and Women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1995;15(11):1839 - 48.
63. James Shepherd CJP, Jennifer M. Stewart, Ragheb F. Atmeh, Robert S. Clark, David E. Boag, Kay Carr, A. Ross Lorimer, David Ballantyne, H. Gemmell Morgan, T. D. Veitch Lawrie. Apolipoprotein A and B (Sf 100-400) metabolism during bezafibrate therapy in hypertriglyceridemic subjects. *The Journal of Clinical Investigation*. 1984;74(6):2164-77.
64. J Shepherd CJP. Metabolic heterogeneity in very low-density lipoproteins. *American Heart Journal*. 1987;113(2 Pt 2):503-8.
65. C J Packard AM, A R Lorimer, A M Gotto, J Shepherd. Metabolism of apolipoprotein B in large triglyceride-rich very low density lipoproteins of normal and hypertriglyceridemic subjects. *The Journal of Clinical Investigation*. 1984;74(6):2178-92.
66. M J Caslake CJP, J J Series, B Yip, M M Dagen, J Shepherd. Plasma triglyceride and low density lipoprotein metabolism *European Journal of Clinical Investigation*. 1992;22(2):96-104.
67. Shepherd J, Caslake MJ, Lorimer AR, Vallance BD, Packard CJ. Fenofibrate reduces low density lipoprotein catabolism in hypertriglyceridemic subjects. *Arteriosclerosis*. 1985;5(2):162-8.
68. Krauss RM, Blanche PJ. Detection and quantitation of LDL subfractions. *Current Opinion in Lipidology*. 1992;3(6):377-83.
69. Robert A Hegele HNG, M John Chapman, Børge G Nordestgaard, Jan Albert Kuivenhoven, Maurizio Averna, Jan Borén, Eric Bruckert, Alberico L Catapano, Olivier S Descamps, G Kees Hovingh, Steve E Humphries, Petri T Kovanen, Luis Masana, Päivi Pajukanta, Klaus G Parhofer, Frederick J Raal, Kausik K Ray, Raul D Santos, Anton F H Stalenhoef, Erik Stroes, Marja-Riitta Taskinen, Anne Tybjærg-Hansen, Gerald F Watts, Olov Wiklund; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. *The lancet; Diabetes & endocrinology*. 2014;2(8):655-66.
70. Hegele RA, Pollex RL. Hypertriglyceridemia: phenomics and genomics. *Mol Cell Biochem*. 2009;326(1-2):35-43.

71. Gallo A, Beliard S, D'Erasmo L, Bruckert E. Familial Chylomicronemia Syndrome (FCS): Recent Data on Diagnosis and Treatment. *Curr Atheroscler Rep.* 2020;22(11):63.
72. Paquette M, Bernard S, Hegele RA, Baass A. Chylomicronemia: Differences between familial chylomicronemia syndrome and multifactorial chylomicronemia. *Atherosclerosis.* 2019;283:137-42.
73. Moulin P, Dufour R, Aversa M, Arca M, Cefalu AB, Noto D, et al. Identification and diagnosis of patients with familial chylomicronaemia syndrome (FCS): Expert panel recommendations and proposal of an "FCS score". *Atherosclerosis.* 2018;275:265-72.
74. Hart PA, Bellin MD, Andersen DK, Bradley D, Cruz-Monserrate Z, Forsmark CE, et al. Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2016;1(3):226-37.
75. D R MacLean AP, M Nargundkar, P W Connelly, E MacLeod, A Edwards, P Hessel. Canadian heart health surveys: a profile of cardiovascular risk. Survey methods and data analysis. Canadian Heart Health Surveys Research Group. *CMAJ.* 1992;146(11):1969-74.
76. Babirak SP, Iverius PH, Fujimoto WY, Brunzell JD. Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis.* 1989;9(3):326-34.
77. Julien P, Vohl MC, Gaudet D, Gagne C, Levesque G, Despres JP, et al. Hyperinsulinemia and abdominal obesity affect the expression of hypertriglyceridemia in heterozygous familial lipoprotein lipase deficiency. *Diabetes.* 1997;46(12):2063-8.
78. Johansen CT, Wang J, McIntyre AD, Martins RA, Ban MR, Lanktree MB, et al. Excess of rare variants in non-genome-wide association study candidate genes in patients with hypertriglyceridemia. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012;5(1):66-72.
79. Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, Wang J, Peter J, Defesche JC, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med.* 2012;272(2):185-96.
80. Dron JS, Wang J, McIntyre AD, Cao H, Robinson JF, Duell PB, et al. Partial LPL deletions: rare copy-number variants contributing towards severe hypertriglyceridemia. *J Lipid Res.* 2019;60(11):1953-8.
81. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature.* 2010;466(7307):707-13.
82. Wang J, Ban MR, Zou GY, Cao H, Lin T, Kennedy BA, et al. Polygenic determinants of severe hypertriglyceridemia. *Hum Mol Genet.* 2008;17(18):2894-9.
83. Johansen CT, Wang J, Lanktree MB, McIntyre AD, Ban MR, Martins RA, et al. An increased burden of common and rare lipid-associated risk alleles contributes to the phenotypic spectrum of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(8):1916-26.
84. Amanda J Brahm RAH. Chylomicronaemia--current diagnosis and future therapies. *Nature Reviews Endocrinology.* 2015;11(5):352-62.
85. Mathilde Di Filippo CM, Sybil Charrière, Oriane Marmontel, Martine Broyer, Mireille Delay, Micheline Merlin, Axel Nollace, René Valéro, Michel Lagarde, Valérie Pruneta-Deloche, Philippe Moulin, Agnès Sassolas. Post-heparin LPL activity measurement using VLDL as a substrate: a new robust method for routine assessment of plasma triglyceride lipolysis defects. *PLoS One.* 2014;9(5):e96482.

86. Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(2):E271-88.
87. Wu SA, Kersten S, Qi L. Lipoprotein Lipase and Its Regulators: An Unfolding Story. *Trends Endocrinol Metab.* 2021;32(1):48-61.
88. M R Hayden YM. Molecular genetics of human lipoprotein lipase deficiency. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 1992;113(2):171-6.
89. V Murthy PJ, C Gagne. Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. *Pharmacology and Therapeutics.* 1996;70(2):101-35.
90. Birrane G, Beigneux AP, Dwyer B, Strack-Logue B, Kristensen KK, Francone OL, et al. Structure of the lipoprotein lipase-GPIHBP1 complex that mediates plasma triglyceride hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(5):1723-32.
91. Gehrish S. Common mutations of the lipoprotein lipase gene and their clinical significance. *Current atherosclerosis reports.* 1999;1(1):70-8.
92. Ramasamy I. Update on the molecular biology of dyslipidemias. *Clin Chim Acta.* 2016;454:143-85.
93. McGladdery SH, Pimstone SN, Clee SM, Bowden JF, Hayden MR, Frohlich JJ. Common mutations in the lipoprotein lipase gene (LPL): effects on HDL-cholesterol levels in a Chinese Canadian population. *Atherosclerosis.* 2001;156(2):401-7.
94. Fisher RM, Humphries SE, Talmud PJ. Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1997;135(2):145-59.
95. Ross CJ, Liu G, Kuivenhoven JA, Twisk J, Rip J, van Dop W, et al. Complete rescue of lipoprotein lipase-deficient mice by somatic gene transfer of the naturally occurring LPLS447X beneficial mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(10):2143-50.
96. Scott LJ. Alipogene tiparvovec: a review of its use in adults with familial lipoprotein lipase deficiency. *Drugs.* 2015;75(2):175-82.
97. Caussy C, Charriere S, Meirhaeghe A, Dallongeville J, Lefai E, Rome S, et al. Multiple microRNA regulation of lipoprotein lipase gene abolished by 3'UTR polymorphisms in a triglyceride-lowering haplotype harboring p.Ser474Ter. *Atherosclerosis.* 2016;246:280-6.
98. Han P, Wei G, Cai K, Xiang X, Deng WP, Li YB, et al. Identification and functional characterization of mutations in LPL gene causing severe hypertriglyceridaemia and acute pancreatitis. *J Cell Mol Med.* 2020;24(2):1286-99.
99. Rahalkar AR, Giffen F, Har B, Ho J, Morrison KM, Hill J, et al. Novel LPL mutations associated with lipoprotein lipase deficiency: two case reports and a literature review. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009;87(3):151-60.
100. J Kobayashi HI, Y Fujita, G Talley, N Morisaki, S Yoshida, Y Saito, S S Fojo, H B Brewer Jr. A naturally occurring mutation at the second base of codon asparagine 43 in the proposed N-linked glycosylation site of human lipoprotein lipase: in vivo evidence that asparagine 43 is essential for catalysis and secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1994;205(1):506-15.
101. M M Hoffmann SJ, D Luft, R M Schmülling, K Rett, W März, H U Häring, S Matthaei. Type I hyperlipoproteinemia due to a novel loss of function mutation of lipoprotein lipase, Cys(239)-->Trp, associated with recurrent severe pancreatitis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2000;85(12).

102. Gin P, Goulbourne CN, Adeyo O, Beigneux AP, Davies BS, Tat S, et al. Chylomicronemia mutations yield new insights into interactions between lipoprotein lipase and GPIHBP1. *Hum Mol Genet.* 2012;21(13):2961-72.
103. Jean-Paul Pégorier CLM, Jean Girard. Control of gene expression by fatty acids. *The Journal of Nutrition*,. 2004;134(9):2444S–9S.
104. Chyzyk V, Brown AS. Familial chylomicronemia syndrome: A rare but devastating autosomal recessive disorder characterized by refractory hypertriglyceridemia and recurrent pancreatitis. *Trends Cardiovasc Med.* 2020;30(2):80-5.
105. Wang J, Cao H, Ban MR, Kennedy BA, Zhu S, Anand S, et al. Resequencing genomic DNA of patients with severe hypertriglyceridemia (MIM 144650). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(11):2450-5.
106. S Tuzgöl SMB, T Bruin, J J Kastelein, M R Hayden. Apolipoprotein CII-Padova (Tyr37-->stop) as a cause of chylomicronaemia in an Italian kindred from Siculiana. *Journal of Medical Genetic.* 1994;31(8):622-6.
107. Fojo SS, de Gennes JL, Chapman J, Parrott C, Lohse P, Kwan SS, et al. An Initiation Codon Mutation in the ApoC-II Gene (ApoC-II Paris) of a Patient with a Deficiency of Apolipoprotein C-II. *Journal of Biological Chemistry.* 1989;264(35):20839-42.
108. Chen CH, Cao YL, Hu WC. Apolipoprotein C-II promoter T-->A substitution at position -190 affects on the transcription of the gene and its relationship to hyperlipemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354(1):62-5.
109. Callum J Wilson CPO, Franco Maggi, Alberico L Catapano, Sebastiano Calandra. Apolipoprotein C-II deficiency presenting as a lipid encephalopathy in infancy. *Annals of Neurology.* 2003;53(6):807-10.
110. S S Fojo PL, C Parrott, G Baggio, C Gabelli, F Thomas, J Hoffman, H B Brewer Jr. A nonsense mutation in the apolipoprotein C-IIPadova gene in a patient with apolipoprotein C-II deficiency. *The Journal of Clinical Investigation.* 1989;84(4):1215–9.
111. P W Connelly GFM, J A Little. Apolipoprotein CIISt. Michael. Familial apolipoprotein CII deficiency associated with premature vascular disease. *The Journal of Clinical Investigation.* 1987;80(6):1597–606.
112. Okubo M, Toromanovic A, Ebara T, Murase T. Apolipoprotein C-II Tuzla: a novel large deletion in APOC2 caused by Alu-Alu homologous recombination in an infant with apolipoprotein C-II deficiency. *Clin Chim Acta.* 2015;438:148-53.
113. H Inadera AH, J Kobayashi, T Kanzaki, K Shirai, S Yukawa, Y Saito, S Yoshida. A missense mutation (Trp 26-->Arg) in exon 3 of the apolipoprotein CII gene in a patient with apolipoprotein CII deficiency (apo CII-Wakayama). *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1993;193(3):1174-83.
114. Streicher R, Geisel J, Weisshaar C, Avci H, Oette K, Müller-Wieland D, et al. A single nucleotide substitution in the promoter region of the apolipoprotein C-II gene identified in individuals with chylomicronemia. *Journal of Lipid Research.* 1996;37(12):2599-607.
115. Callum J Wilson CPO, Franco Maggi, Alberico L Catapano, Sebastiano Calandra. Apolipoprotein C-II deficiency presenting as a lipid encephalopathy in infancy. *Annals of Neurology.* 2003;53(6):807-10.
116. C Crecchio AC, G Pepe. Identification of the mutation responsible for a case of plasmatic apolipoprotein CII deficiency (Apo CII-Bari). *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;168(3):1118-27.

117. Pinilla-Monsalve GD, Lores J, Pachajoa H, Lopez-Ponce de Leon JD, Lopez A, Rodriguez-Rojas LX, et al. A Novel APOC2 Mutation in a Colombian Patient with Recurrent Hypertriglyceridemic Pancreatitis. *Appl Clin Genet*. 2020;13:63-9.
118. Fojo SS, Stalenhoef AF, Marr K, Gregg RE, Ross RS, Brewer HB. A deletion mutation in the ApoC-II gene (ApoC-II Nijmegen) of a patient with a deficiency of apolipoprotein C-II. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(34):17913-6.
119. Jiang J, Wang Y, Ling Y, Kayoumu A, Liu G, Gao X. A novel APOC2 gene mutation identified in a Chinese patient with severe hypertriglyceridemia and recurrent pancreatitis. *Lipids Health Dis*. 2016;15:12.
120. D W Cox DEW, F Quan, P N Ray. A deletion of one nucleotide results in functional deficiency of apolipoprotein CII (apo CII Toronto). *Journal of Medical Genetic*. 1988;25(10):649-52.
121. Parrott CL, Alsayed N, Rebouret R, Santamarina-Fojo S. ApoC-II<sup>Paris2</sup>: a premature termination mutation in the signal peptide of apoC-II resulting in the familial chylomicronemia syndrome. *Journal of Lipid Research*. 1992;33(3):361-7.
122. S S Fojo UB, U Beil, K Higuchi, M Bojanovski, R E Gregg, H Greten, H B Brewer Jr. Donor splice site mutation in the apolipoprotein (Apo) C-II gene (Apo C-II<sup>Hamburg</sup>) of a patient with Apo C-II deficiency. *The Journal of Clinical Investigation*. 1988;82(5):1489-94.
123. M Okubo YH, Y Aoyama, T Murase. A G+1 to C mutation in a donor splice site of intron 2 in the apolipoprotein (apo) C-II gene in a patient with apo C-II deficiency. A possible interaction between apo C-II deficiency and apo E4 in a severely hypertriglyceridemic patient. *Atherosclerosis*. 1997;130(1-2):153-60.
124. Jin JL, Guo YL, Li JJ. Apoprotein C-III: A review of its clinical implications. *Clin Chim Acta*. 2016;460:50-4.
125. Yan H, Niimi M, Matsuhisa F, Zhou H, Kitajima S, Chen Y, et al. Apolipoprotein CIII Deficiency Protects Against Atherosclerosis in Knockout Rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(9):2095-107.
126. Meyers NL, Larsson M, Vorrso E, Olivecrona G, Small DM. Aromatic residues in the C terminus of apolipoprotein C-III mediate lipid binding and LPL inhibition. *J Lipid Res*. 2017;58(5):840-52.
127. Larsson M, Vorrso E, Talmud P, Lookene A, Olivecrona G. Apolipoproteins C-I and C-III inhibit lipoprotein lipase activity by displacement of the enzyme from lipid droplets. *J Biol Chem*. 2013;288(47):33997-4008.
128. Ramms B, Gordts P. Apolipoprotein C-III in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2018;29(3):171-9.
129. Jorgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *N Engl J Med*. 2014;371(1):32-41.
130. Ding Y, Wang Y, Zhu H, Fan J, Yu L, Liu G, et al. Hypertriglyceridemia and delayed clearance of fat load in transgenic rabbits expressing human apolipoprotein CIII. *Transgenic Res*. 2011;20(4):867-75.
131. Song Y, Zhu L, Richa M, Li P, Yang Y, Li S. Associations of the APOC3 rs5128 polymorphism with plasma APOC3 and lipid levels: a meta-analysis. *Lipids Health Dis*. 2015;14:32.
132. Harald Esterbauer EH, Franz Krempler, Wolfgang Patsch. Allele-specific differences in apolipoprotein C-III mRNA expression in human liver. *Clinical Chemistry*. 1999;45(3):331-9.

133. Petersen KF, Dufour S, Hariri A, Nelson-Williams C, Foo JN, Zhang XM, et al. Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2010;362(12):1082-9.
134. Dancer M, Caussy C, Di Filippo M, Moulin P, Marcais C, Charriere S. Lack of evidence for a liver or intestinal miRNA regulation involved in the hypertriglyceridemic effect of APOC3 3'UTR variant SstI. *Atherosclerosis*. 2016;255:6-10.
135. C.C.Shoulders PJH, L.Lagrost, S.E.White, N.F.Shah, J.D.North, M.Gilligan, P.Gambert, M.J.Ball. Variation at the apo AI/CIII/A1V gene complex is associated with elevated plasma levels of apo CIII. *Atherosclerosis*. 1991;87(2-3):239-47.
136. Hubacek JA. Apolipoprotein A5 fifteen years anniversary: Lessons from genetic epidemiology. *Gene*. 2016;592(1):193-9.
137. May-Zhang L, Liu M, Black D, Tso P. Apolipoprotein A5, a unique modulator of fasting and postprandial triglycerides. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2022;1867(9):159185.
138. Garelnabi M, Lor K, Jin J, Chai F, Santanam N. The paradox of ApoA5 modulation of triglycerides: evidence from clinical and basic research. *Clin Biochem*. 2013;46(1-2):12-9.
139. van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JH, Ottenhoff R, Looije N, Wesseling JG, et al. Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;295(5):1156-9.
140. O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, Ulmer M, Boodhoo A, Knierman MD, et al. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem*. 2005;51(2):351-9.
141. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science*. 2001;294(5540):169-73.
142. Trudy M Forte ROR. Apolipoprotein A5: Extracellular and Intracellular Roles in Triglyceride Metabolism. *Current Drug Targets*. 2015;16(12):1274-80.
143. Palmen J, Smith AJ, Dorfmeister B, Putt W, Humphries SE, Talmud PJ. The functional interaction on in vitro gene expression of APOA5 SNPs, defining haplotype APOA52, and their paradoxical association with plasma triglyceride but not plasma apoAV levels. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1782(7-8):447-52.
144. Sun G, Bi N, Li G, Zhu X, Zeng W, Wu G, et al. Identification of lipid binding and lipoprotein lipase activation domains of human apoAV. *Chem Phys Lipids*. 2006;143(1-2):22-8.
145. Talmud PJ, Palmen J, Putt W, Lins L, Humphries SE. Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. *J Biol Chem*. 2005;280(31):28215-20.
146. Sharma V, Ryan RO, Forte TM. Apolipoprotein A-V dependent modulation of plasma triacylglycerol: a puzzlement. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(5):795-9.
147. Martinelli N, Trabetti E, Bassi A, Girelli D, Friso S, Pizzolo F, et al. The -1131 T>C and S19W APOA5 gene polymorphisms are associated with high levels of triglycerides and apolipoprotein C-III, but not with coronary artery disease: an angiographic study. *Atherosclerosis*. 2007;191(2):409-17.
148. Zhou J, Xu L, Huang RS, Huang Y, Le Y, Jiang D, et al. Apolipoprotein A5 gene variants and the risk of coronary heart disease: a case-control study and meta-analysis. *Mol Med Rep*. 2013;8(4):1175-82.

149. Mattei J, Demissie S, Tucker KL, Ordovas JM. Apolipoprotein A5 polymorphisms interact with total dietary fat intake in association with markers of metabolic syndrome in Puerto Rican older adults. *J Nutr.* 2009;139(12):2301-8.
150. Sanchez-Moreno C, Ordovas JM, Smith CE, Baraza JC, Lee YC, Garaulet M. APOA5 gene variation interacts with dietary fat intake to modulate obesity and circulating triglycerides in a Mediterranean population. *J Nutr.* 2011;141(3):380-5.
151. Priore Oliva C, Pisciotto L, Li Volti G, Sambataro MP, Cantafora A, Bellocchio A, et al. Inherited apolipoprotein A-V deficiency in severe hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(2):411-7.
152. Marcais C, Verges B, Charriere S, Pruneta V, Merlin M, Billon S, et al. ApoA5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2862-9.
153. Priore Oliva C, Tarugi P, Calandra S, Pisciotto L, Bellocchio A, Bertolini S, et al. A novel sequence variant in APOA5 gene found in patients with severe hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis.* 2006;188(1):215-7.
154. Talmud PJ. Rare APOA5 mutations--clinical consequences, metabolic and functional effects: an ENID review. *Atherosclerosis.* 2007;194(2):287-92.
155. Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, Peloso GM, Gustafsson S, Kanoni S, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat Genet.* 2013;45(11):1274-83.
156. Guardiola M, Ribalta J. Update on APOA5 Genetics: Toward a Better Understanding of Its Physiological Impact. *Curr Atheroscler Rep.* 2017;19(7):30.
157. Lai CQ, Wojczynski MK, Parnell LD, Hidalgo BA, Irvin MR, Aslibekyan S, et al. Epigenome-wide association study of triglyceride postprandial responses to a high-fat dietary challenge. *J Lipid Res.* 2016;57(12):2200-7.
158. Caussy C, Charriere S, Marcais C, Di Filippo M, Sassolas A, Delay M, et al. An APOA5 3' UTR variant associated with plasma triglycerides triggers APOA5 downregulation by creating a functional miR-485-5p binding site. *Am J Hum Genet.* 2014;94(1):129-34.
159. Peterfy M. Lipase maturation factor 1: a lipase chaperone involved in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(5):790-4.
160. Peterfy M, Ben-Zeev O, Mao HZ, Weissglas-Volkov D, Aouizerat BE, Pullinger CR, et al. Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat Genet.* 2007;39(12):1483-7.
161. Cefalu AB, Noto D, Arpi ML, Yin F, Spina R, Hilden H, et al. Novel LMF1 nonsense mutation in a patient with severe hypertriglyceridemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11):4584-90.
162. Rabacchi C, D'Addato S, Palmisano S, Lucchi T, Bertolini S, Calandra S, et al. Clinical and genetic features of 3 patients with familial chylomicronemia due to mutations in GPIHBP1 gene. *J Clin Lipidol.* 2016;10(4):915-21 e4.
163. Lima JG, Helena CNL, Moura Bandeira FT, Pires Sousa AG, Medeiros de Araujo Macedo TB, Cavalcante Nogueira AC, et al. A novel GPIHBP1 mutation related to familial chylomicronemia syndrome: A series of cases. *Atherosclerosis.* 2021;322:31-8.
164. Young SG, Davies BS, Voss CV, Gin P, Weinstein MM, Tontonoz P, et al. GPIHBP1, an endothelial cell transporter for lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* 2011;52(11):1869-84.

165. Baass A, Paquette M, Bernard S, Hegele RA. Familial chylomicronemia syndrome: an under-recognized cause of severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med.* 2020;287(4):340-8.
166. Young SG, Fong LG, Beigneux AP, Allan CM, He C, Jiang H, et al. GPIHBP1 and Lipoprotein Lipase, Partners in Plasma Triglyceride Metabolism. *Cell Metab.* 2019;30(1):51-65.
167. Beigneux AP, Gin P, Davies BS, Weinstein MM, Bensadoun A, Fong LG, et al. Highly conserved cysteines within the Ly6 domain of GPIHBP1 are crucial for the binding of lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 2009;284(44):30240-7.
168. Ariza MJ, Martinez-Hernandez PL, Ibarretxe D, Rabacchi C, Rioja J, Grande-Aragon C, et al. Novel mutations in the GPIHBP1 gene identified in 2 patients with recurrent acute pancreatitis. *J Clin Lipidol.* 2016;10(1):92-100 e1.
169. Paragh G, Nemeth A, Harangi M, Banach M, Fulop P. Causes, clinical findings and therapeutic options in chylomicronemia syndrome, a special form of hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis.* 2022;21(1):21.
170. C C Chang YYH, H D Tsai, T C Yang, L S Yeh, T Y Hsu. Acute pancreatitis in pregnancy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei).* 1998;61(2):85-92.
171. Tenner S, Baillie J, DeWitt J, Vege SS, American College of G. American College of Gastroenterology guideline: management of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 2013;108(9):1400-15; 16.
172. Supna Sandhu AA-S, Catalin Taraboanta, Jiri Frohlich, Gordon A Francis. Incidence of pancreatitis, secondary causes, and treatment of patients referred to a specialty lipid clinic with severe hypertriglyceridemia: a retrospective cohort study. *Lipids in health and disease.* 2011;10(157):2-7.
173. Célia Lloret Linares ALP, Sébastien Czernichow, Anne Claire Vergnaud, Dominique Bonnefont-Rousselot, Philippe Levy, Philippe Ruszniewski, Eric Bruckert. Acute pancreatitis in a cohort of 129 patients referred for severe hypertriglyceridemia. *Pancreas.* 2008;37(1):13-2.
174. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection E, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002;106(25):3143-421.
175. Christian JB, Arondekar B, Buysman EK, Jacobson TA, Snipes RG, Horwitz RI. Determining triglyceride reductions needed for clinical impact in severe hypertriglyceridemia. *Am J Med.* 2014;127(1):36-44 e1.
176. Valdivielso P, Ramirez-Bueno A, Ewald N. Current knowledge of hypertriglyceridemic pancreatitis. *Eur J Intern Med.* 2014;25(8):689-94.
177. Wang Y, Sternfeld L, Yang F, Rodriguez JA, Ross C, Hayden MR, et al. Enhanced susceptibility to pancreatitis in severe hypertriglyceridaemic lipoprotein lipase-deficient mice and agonist-like function of pancreatic lipase in pancreatic cells. *Gut.* 2009;58(3):422-30.
178. Hegele RA, Boren J, Ginsberg HN, Arca M, Aversa M, Binder CJ, et al. Rare dyslipidaemias, from phenotype to genotype to management: a European Atherosclerosis Society task force consensus statement. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(1):50-67.
179. Dron JS, Hegele RA. Genetics of Triglycerides and the Risk of Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2017;19(7):31.

180. Ginsberg HN, Packard CJ, Chapman MJ, Boren J, Aguilar-Salinas CA, Aversa M, et al. Triglyceride-rich lipoproteins and their remnants: metabolic insights, role in atherosclerotic cardiovascular disease, and emerging therapeutic strategies-a consensus statement from the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 2021;42(47):4791-806.
181. Wang L, Gill R, Pedersen TL, Higgins LJ, Newman JW, Rutledge JC. Triglyceride-rich lipoprotein lipolysis releases neutral and oxidized FFAs that induce endothelial cell inflammation. *J Lipid Res*. 2009;50(2):204-13.
182. Nordestgaard BG, Varbo A. Triglycerides and cardiovascular disease. *The Lancet*. 2014;384(9943):626-35.
183. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Jorgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol as a causal risk factor for ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(4):427-36.
184. Triglyceride Coronary Disease Genetics C, Emerging Risk Factors C, Sarwar N, Sandhu MS, Ricketts SL, Butterworth AS, et al. Triglyceride-mediated pathways and coronary disease: collaborative analysis of 101 studies. *Lancet*. 2010;375(9726):1634-9.
185. Do R, Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, Gao C, Peloso GM, et al. Common variants associated with plasma triglycerides and risk for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2013;45(11):1345-52.
186. Lim GB. Genetics: Mutations in APOA5 or LDLR increase risk of myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol*. 2015;12(2):64.
187. Khera AV, Won HH, Peloso GM, O'Dushlaine C, Liu D, Stitzel NO, et al. Association of Rare and Common Variation in the Lipoprotein Lipase Gene With Coronary Artery Disease. *JAMA*. 2017;317(9):937-46.

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

# **Relatório de Estágio Profissional**

Mara Alves

**M**  
**2022**





**Orientador:**

Doutora Ana Maria Teixeira Dias de Abreu

Diretora Técnica do Laboratório de Análises Clínicas Vale do Sousa

## **Agradecimentos**

Gostaria de expressar os meus agradecimentos às pessoas que contribuíram para a realização do relatório de estágio profissional:

À Doutora Ana Maria Teixeira Dias de Abreu, pela orientação, pelos conhecimentos de prática clínica que me transmitiu durante o estágio, e pela disponibilidade de me receber no Laboratório de Análises Clínicas Vale do Sousa.

À equipa técnica do Laboratório de Análises Clínicas Vale do Sousa, pela receptividade, pela simpatia, e pelo auxílio na execução das diversas atividades laboratoriais.

## **Resumo**

O presente documento corresponde ao relatório de estágio profissional, realizado no Laboratório de Análises Clínicas Vale do Sousa, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, ministrado pela Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. O relatório de estágio profissional descreve as diversas atividades laboratoriais executadas nas secções da Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia Clínica, e Biologia Molecular, nomeadamente a metodologia dos instrumentos analíticos automatizados e técnicas manuais, a importância clínica dos parâmetros caracterizados no laboratório, e o impacto dos resultados clínicos no diagnóstico e monitorização de patologias humanas.

Palavras-chave: Hematologia, Microbiologia, Bioquímica.

## **Abstract**

The document refers to my internship in the *Vale do Sousa* Clinical Laboratory, under the master's degree of Clinical Analysis by University of Porto. This report describes the clinical laboratory essays carried out within the valences of Haematology, Microbiology, Biochemistry and Clinical Immunochemistry, and Molecular Biology, namely the methodologies applied by analytical instruments, the clinical significance of parameters determined within the laboratory, and the impact of the laboratory results for diagnosis and screening of human pathologies.

Keywords: Haematology, Microbiology, Biochemistry.

## **Abreviaturas**

**AEQ** – Avaliação Externa de Qualidade

**CHCM** – Concentração de hemoglobina corpuscular média

**CQI** – Controlo de Qualidade Interno

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético

**HbA1c** – Hemoglobina A1c

**HDL** – *High - density lipoprotein*

**LDL** – *Low - density lipoprotein*

**MIC** – Concentração Mínima Inibitória

**MRSA** – *Staphylococcus Aureus Resistente à Meticilina*

**RDW** – Distribuição do diâmetro de eritrócitos

**rRT-PCR** – *Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

**SARSCoV-2** – *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

**SLS** – Lauril Sulfato de Sódio

**TP** – Tempo de protrombina

**TPHA** – *Treponema pallidum haemagglutination*

**TT** – Tempo de trombina

**TTPa** – Tempo de tromboplastina parcial ativada

**UFC** – Unidade Formadora de Colónias

**UTI** – Infecção do trato urinário

**VDRL** – *Venereal Disease Research Laboratory*

**VS** – Velocidade de sedimentação eritrocitária

## Índice

|                                                        |     |
|--------------------------------------------------------|-----|
| Agradecimentos.....                                    | iv  |
| Resumo.....                                            | v   |
| Abstract.....                                          | vi  |
| Abreviaturas.....                                      | vii |
| 1. Introdução.....                                     | 1   |
| 2. Laboratório de Análises Clínicas Vale do Sousa..... | 2   |
| 3. Controlo de qualidade.....                          | 2   |
| 4. Processo de análise.....                            | 4   |
| 5. Hematologia.....                                    | 5   |
| 5.1. Hemograma.....                                    | 7   |
| 5.1.1. Eritrograma.....                                | 8   |
| 5.1.2. Leucograma.....                                 | 9   |
| 5.1.3. Plaquetas.....                                  | 10  |
| 5.2. Esfregaço sanguíneo.....                          | 11  |
| 5.3. Provas de coagulação.....                         | 12  |
| 5.3.1. Tempo de protrombina.....                       | 13  |
| 5.3.2. Tempo de tromboplastina parcial ativada.....    | 14  |
| 5.3.3. Tempo de trombina.....                          | 14  |
| 5.4. Velocidade de sedimentação eritrocitária.....     | 14  |
| 5.5. Hemoglobina glicada.....                          | 15  |
| 5.6. Tipagem eritrocitária.....                        | 16  |
| 5.7. Prova de Coombs.....                              | 16  |
| 6. Microbiologia.....                                  | 17  |
| 6.1. Urina.....                                        | 17  |
| 6.1.1. Exame químico e microbiológico.....             | 18  |
| 6.1.2. Exame de microscopia a fresco.....              | 18  |
| 6.1.3. Exame cultural.....                             | 19  |
| 6.2. Fezes.....                                        | 20  |
| 6.2.1. Exame macroscópico.....                         | 20  |
| 6.2.2. Exame microscópico.....                         | 20  |
| 6.2.3. Exame cultural.....                             | 21  |
| 6.2.4. Exame imunológico.....                          | 22  |
| 6.3. Exsudato vaginal e endocervical.....              | 23  |
| 6.3.1. Exame microscópica.....                         | 23  |

|          |                                                                        |    |
|----------|------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.3.2.   | Exame cultural.....                                                    | 24 |
| 6.4.     | Exsudatos nasofaríngeos.....                                           | 25 |
| 6.4.1.   | Exame microscópico.....                                                | 25 |
| 6.4.1.1. | Pesquisa de eosinófilos.....                                           | 25 |
| 6.4.1.2. | BK direto.....                                                         | 26 |
| 6.4.2.   | Exame cultural.....                                                    | 26 |
| 6.4.2.1. | Pesquisa de MRSA.....                                                  | 26 |
| 6.5.     | Esperma.....                                                           | 27 |
| 6.5.1.   | Exame macroscópico.....                                                | 27 |
| 6.5.2.   | Exame microscópico.....                                                | 27 |
| 6.5.3.   | Exame cultural.....                                                    | 28 |
| 6.6.     | Exsudatos purulentos.....                                              | 28 |
| 6.6.1.   | Exame microscópico.....                                                | 28 |
| 6.6.2.   | Exame cultural.....                                                    | 29 |
| 6.7.     | Antibiograma e sistema de identificação bacteriana.....                | 29 |
| 6.8.     | Rastreio de drogas.....                                                | 30 |
| 7.       | Bioquímica.....                                                        | 30 |
| 7.1.     | Parâmetros bioquímicos.....                                            | 31 |
| 8.       | Imunologia.....                                                        | 34 |
| 8.1.     | Testes serológicos.....                                                | 35 |
| 8.1.1.   | Sífilis.....                                                           | 35 |
| 8.1.2.   | Salmonelose e Brucelose.....                                           | 36 |
| 9.       | Biologia molecular.....                                                | 36 |
| 9.1.     | Extração e purificação do RNA.....                                     | 37 |
| 9.1.1.   | <i>Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i> ..... | 38 |
| 10.      | Conclusão.....                                                         | 39 |
|          | Referências.....                                                       | 40 |

## **Índice de tabelas**

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Tubos de colheita e tipos de análises executadas.....                | 5  |
| <b>Tabela 2.</b> Bactérias comensais da flora intestinal e bactérias patogénicas..... | 21 |
| <b>Tabela 3.</b> Marcadores tumorais.....                                             | 33 |

## 1. Introdução

O estudo de fluídos biológicos humanos remonta para 300 anos A C e acompanha os primeiros passos da medicina laboratorial. Desde a gustação da urina por Hipócrates ao exame do sangue com lentes óticas por Bacon, a aplicação de técnicas primitivas possibilitaram aos analistas pioneiros da época os primeiros marcadores diagnósticos de patologias.(1) Estas descobertas primordiais serviram de base ao que conhecemos hoje como o laboratório de análises clínicas, recentemente designado como “o nervo central da medicina de diagnóstico” (2).

Cerca de 70% dos diagnósticos de pacientes dependem da realização de testes laboratoriais, cujo peso financeiro é relativamente baixo (2). O impacto do laboratório de análises clínicas é sentido tanto a nível da pessoa singular como da população em geral. Na perspetiva do indivíduo, as análises clínicas servem como prevenção e diagnóstico antecipado de patologias, acompanhamento da evolução da doença e monitorização da resposta à terapêutica, permitindo o exercício de uma medicina personalizada e preventiva (3). Na perspetiva da população em geral, as análises clínicas permitem o despiste, vigilância e deteção de ameaças emergentes à saúde pública (4). A presente pandemia desencadeada pela infeção SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavírus*) veio a evidenciar o importante papel desempenhado pelos laboratórios, que contribuíram largamente para a mitigação, controlo da transmissão e diagnóstico do COVID-19 (5).

Aliadas à nova era tecnológica, as infraestruturas laboratoriais beneficiaram da automatização das técnicas analíticas, capacitando a análise de um elevado número de amostras e a obtenção de resultados consistentemente exatos e precisos. Consequentemente, a rápida obtenção dos resultados e o respetivo enquadramento clínico realizado pelo analista diminuem significativamente o tempo de reação interventiva por parte da clínica (2). Isto posto, é importante lembrar que o laboratório não é uma mera rede instrumentalizada e exportadora de resultados analíticos apenas e só, sendo a sua colaboração essencial para a eficácia da resposta clínica. O analista faz uma cuidadosa interpretação de todos os valores compreendidos no boletim analítico do paciente, construindo a ponte entre o resultado analítico e o diagnóstico.

Estudos têm vindo a reforçar a importância de uma estreita colaboração entre o analista e o médico, de forma a evitar interpretações erróneas, que gravemente influenciam o sucesso clínico, nomeadamente diagnósticos tardios, aumento da mortalidade e custos médicos (6). Para além disso, cabe ao analista pela escolha da metodologia analítica e instrumentação das análises, instauração de programas de controlo de qualidade,

resolução de problemas técnicos dos equipamentos instrumentais, entre outras responsabilidades relativas ao funcionamento das infraestruturas do laboratório.

A realização deste relatório de estágio tem como objetivo demonstrar a aplicabilidade e consolidar os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos no Mestrado em Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, no laboratório de análises clínicas de rotina. O estágio profissional foi realizado no Laboratório de Análises Clínica Vale do Sousa, entre Janeiro de 2022 e Maio de 2022, correspondendo a 450 horas de estágio laboratorial, sob a orientação da Diretora Técnica do laboratório, Dra. Ana Maria Teixeira Dias de Abreu.

## **2. Laboratório de Análises Clínicas Vale do Sousa**

O Laboratório de Análises Clínicas Vale do Sousa foi fundado a 1 de setembro de 1978 na cidade de Penafiel, ramificando-se em 35 unidades de colheitas geograficamente dispersas no norte do país. As suas infraestruturas estão prontamente equipadas para efetuar diversas análises nas valências da Hematologia, Bioquímica, Imunologia, Microbiologia e Biologia Molecular. O laboratório Vale do Sousa está associado ao laboratório externo CERBA, recorrendo dos seus serviços para execução de análises específicas cujo número de requisições não justifica a implementação dessas técnicas. A direção técnica do laboratório Vale do Sousa é executada pela Dra. Ana Maria Teixeira Dias de Abreu (Diretora Técnica), Dra. Conceição Magalhães (Diretora Técnica Adjunta), Dr. João Pedro Alvarenga (Diretor Técnico Adjunto), e Dra. Mary Conception Fecha Duro (Diretora Técnica Adjunta).

## **3. Controlo de qualidade**

Em estudos recentes na Alemanha e EUA, médicos especialistas terão reportado que cerca de 60% a 70% das decisões médicas são afetadas pelos resultados analíticos laboratoriais, e que pelo menos 80% das normas estipuladas para a execução de um diagnóstico clínico, ou relativas ao controlo de uma doença, requerem testes laboratoriais. Assim, é de elevada importância que os laboratórios clínicos implementem sistemas de controlo de qualidade, de forma a reduzir ao máximo o risco de interpretar erradamente os resultados analíticos dos pacientes (7). Os sistemas de controlo de qualidade incluem Controlo de Qualidade Interno (CQI) e Avaliação Externa de Qualidade (AEQ).

Convencionalmente, o CQI baseia-se na utilização de material de controlo manufaturado, ou amostras de controlo, e de regras de controlo estatisticamente derivadas, para identificar potenciais falhas nos ensaios analíticos, estas introduzidas por alterações nos reagentes, nas configurações, ou na calibração do respetivo instrumento analítico automático (7). CQI é realizado periodicamente, de forma a assegurar a performance do método instrumental conforme as especificações preestabelecidas pelo fabricante do instrumento analítico, e assim, manter a precisão dos resultados analíticos (8). As amostras de controlo manufaturadas simulam as amostras humanas e apresentam uma composição definida. As amostras de controlo são subcategorizadas em controlo positivo, quando representam uma amostra fisiológica, ou controlo negativo, quando representam uma amostra patológica. Respeitando as instruções do fabricante, as amostras de controlo (positivo e negativo) são introduzidas diariamente nos respetivos instrumentos analíticos, nas secções da Hematologia, Microbiologia e Biologia Molecular; alternadamente (controlo positivo ou controlo negativo) na secção da Bioquímica; e com menor frequência na secção da Imunologia, no laboratório Vale do Sousa.

AEQ é uma oportunidade educacional que promove a improvação dos laboratórios de análises clínicas, com objetivo de avaliar e melhorar a qualidade global da performance dos ensaios analíticos, assim como avaliar a robustez dos métodos analíticos para interferências clinicamente significativas, e promover a comunicação entre os laboratórios clínicos (7). As amostras de controlo são enviadas pela entidade externa, e processadas e analisadas como amostras comuns pelo laboratório. Os resultados analíticos são exportados e enviados para a entidade externa. Posteriormente, o laboratório recebe um relatório de desempenho, comparando a sua performance individual com os restantes laboratórios participantes. Assim, a AEQ avalia a exatidão do método analítico do laboratório e promove a padronização dos resultados analíticos interlaboratoriais. O laboratório Vale do Sousa participa nos programas de avaliação externa das entidades Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), *Randox International Quality Assessment Schemes* (RIQAS), *United Kingdom National External Quality Assessment Service* (UKNEQAS) e *Quality Club*. Quando necessário, são implementadas medidas corretivas, de forma a otimizar os resultados analíticos.

#### **4. Processo de análise**

As etapas decorridas desde a receção do paciente ao laboratório até à emissão do respetivo boletim de análises enquadram-se em três fases consecutivas: fase pré-analítica, fase analítica e fase pós-analítica.

A fase pré-analítica inclui todas as operações executadas na amostra que antecedem a análise da mesma. Esta fase responsabiliza-se por 32% a 75% do erro total dos resultados analíticos, pelo que é de elevada importância respeitar rigorosamente os procedimentos da fase pré-analítica (8).

Quando o utente se dirige à receção do laboratório, deve obrigatoriamente de se fazer acompanhar pela requisição das análises clínicas prescritas pelo médico. As informações pessoais do utente e a receita das análises clínicas são introduzidas no sistema informático Apollo. O utente é informado relativamente à sua preparação física prévia à execução da colheita do produto biológico, e, quando a colheita é executada pelo próprio, o utente é cuidadosamente informado quanto ao procedimento da colheita. Junto com o utente, os profissionais do laboratório devem confirmar o cumprimento dos requisitos pré-colheita, nomeadamente o cumprimento do jejum de 12 horas, realização de atividade física recente, ou administração de medicação (9). Verificados os requisitos, procede-se à atribuição de um código de barras e um número mecanográfico ao utente e às respetivas amostras biológicas, estas colhidas pelo próprio (amostras de urina, fezes, sémen), ou por profissionais (amostras sanguíneas, nasofaríngeas, uretrais, vaginais). As amostras biológicas são colhidas para tubos ou contentores especificamente designados, estes posteriormente encaminhados para triagem nas respetivas secções do laboratório. As amostras provenientes dos postos de colheita chegam às instalações laboratoriais pelo serviço de transportação afiliada ao laboratório Vale de Sousa. Na triagem, as amostras devem ser cuidadosamente examinadas a olho nu, procurando por potenciais critérios de rejeição, como colheita em tubo com aditivos inapropriados, tubos fora do prazo de validade, identificação errada ou ausência de identificação do utente, espécimes hemolisados ou lipémicos, presença de coágulos sanguíneos, volume de espécimen inadequado, ou amostras indevidamente acondicionadas no transporte (8, 9). Caso as amostras apresentem alguns dos critérios de rejeição, devem ser rejeitadas, e o laboratório deve contactar e solicitar ao utente uma nova amostra.

**Tabela 1.** Tubos de colheita e tipos de análises executadas. [Adaptado de (8)]

| Amostra         | Tubo                                                                    | Tipo de análise                     |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Soro            | Tubo com ativador do coágulo e sílica                                   | Bioquímica<br>Imunologia            |
| Sangue completo | Tubo com K <sub>2</sub> EDTA em spray/ seco (quelata Ca <sup>2+</sup> ) | Hematologia                         |
| Plasma          | Tubo com citrato de sódio (quelata Ca <sup>2+</sup> )                   | Hematologia<br>Provas de coagulação |
| Plasma          | Tubo com fluoreto de sódio ou oxalato de potássio (inibe glicólise)     | Provas à glucose                    |
| Urina           | Contentor estéril                                                       | Bioquímica<br>Microbiologia         |
| Urina 24 horas  | Contentor estéril                                                       | Bioquímica<br>Microbiologia         |
| Fezes           | Contentor para fezes                                                    | Imunologia<br>Microbiologia         |
| Sémen           | Contentor estéril                                                       | Microbiologia                       |
| Exsudados       | Contentor com zaragatoa embebida no meio específico                     | Microbiologia                       |

A fase analítica compreende todo o processamento e procedimentos analíticos, sejam estes automaticamente ou manualmente executados, a que as amostras biológicas são sujeitas. À medida que os resultados clínicos são reportados pelo equipamento analítico e comunicados ao sistema informático Apollo, o técnico de laboratório executa a validação analítica dos mesmos, atentando por possíveis valores anómalos que exijam uma segunda leitura pelo instrumento analítico.

A fase pós-analítica compreende a validação dos resultados clínicos pelo especialista em análises clínicas, que interpreta cuidadosamente todos os parâmetros analíticos doseados. Os resultados clínicos validados são impressos no boletim analítico do utente.

## 5. Hematologia

A hematologia clínica estuda os elementos celulares que circulam no compartimento plasmático e constituem o sangue. Os elementos celulares em suspensão

no plasma são os eritrócitos, leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos), e plaquetas, produzidos pelo processo de hematopoiese. As células estaminais hematopoiéticas na medula óssea são capazes de se autorrenovarem e diferenciarem, dando origem às linhagens celulares linfoide, eritroide, granulocítica, monocítica e megacariocítica (10).

A linhagem linfoide origina os linfócitos B e T, a partir do precursor linfoblasto na medula óssea, pelo processo de linfopoiese. Como células imunologicamente competentes, os linfócitos auxiliam a fagocitose contra infecções e apresentam capacidade de gerar especificidade antigénica e memória imunológica (11).

A linhagem eritroide origina os eritrócitos, pelo processo de eritropoiese. Por divisão celular e maturação do precursor proeritroblasto na medula óssea, formam-se os reticulócitos. Os reticulócitos são libertados para o sangue periférico, onde maturam durante 1 a 2 dias e dão origem aos eritrócitos maduros, responsáveis pelo suprimento de oxigénio para os tecidos. Os eritrócitos são ricos em moléculas de hemoglobina, que transportam o oxigénio para os tecidos, e o dióxido de carbono para os pulmões. O eritrócito tem um tempo média de vida de 120 dias (10).

A linhagem granulocítica origina os granulócitos – neutrófilos, eosinófilos e basófilos – pelo processo de granulopoiese. A sucessiva diferenciação e maturação dos precursores granulócitos (mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito) na medula óssea origina os granulócitos maduros. A porção de granulócitos libertados para o sangue periférico circula durante 6 a 10 horas, até se moverem para os tecidos, onde desempenham a sua função fagocitária contra agentes etiológicos (11).

A linhagem monocítica origina os monócitos, pelo processo de monocitopoiese, por diferenciação celular dos precursores promonócitos, na medula óssea (10). Os monócitos libertados para o sangue periférico circulam durante 20 a 40 horas, até se moverem para os tecidos, onde maturam e desempenham as suas funções.

A linhagem megacariocítica origina as plaquetas, pelo processo de trombocitopoiese, a partir do precursor megacarioblasto na medula óssea. As plaquetas libertadas para o sangue periférico circulam durante 7 a 10 dias. Até um terço das plaquetas são retidas no baço, podendo este valor alcançar os 90% em casos de esplenomegalia severa. As plaquetas desempenham uma função crucial na formação do coágulo sanguíneo, durante uma resposta hemostática fisiológica à lesão da vasculatura (11).

Existem vários ensaios clínicos no laboratório Vale do Sousa designados para a avaliação quantitativa e qualitativa das populações celulares que constituem o sangue. O hemograma, também denominado como contagem total do sangue, é a análise mais

frequentemente executada na hematologia clínica. Quando necessário, o hemograma é complementado pela observação ao microscópio do esfregaço sanguíneo. Outras análises hematológicas incluem a velocidade de sedimentação eritrocitária, a hemoglobina glicada (HbA1c), fenotipagem eritrocitária e provas de coagulação.

### 5.1. Hemograma

O hemograma dá informação quanto à contagem, tamanho, diâmetro e percentagens das diferentes populações celulares presentes no sangue periférico, nomeadamente os eritrócitos, leucócitos, plaquetas e, quando presentes na circulação, células precursoras ou anormais (12). Dada a variedade de parâmetros hematológicos que esta análise permite estudar, a execução do hemograma é essencial para rastrear, diagnosticar e monitorizar diversas patologias do sistema hematológico. Naturalmente, o hemograma é a análise clínica mais requisitada nos exames de rotina recebidos no laboratório Vale do Sousa. Atualmente, os analisadores hematológicos automatizados proporcionam fiabilidade, eficiência e baixos custos económicos, contribuindo para a afluência de prescrições de hemogramas (13).

O laboratório Vale do Sousa disponibiliza do analisador hematológico automatizado Sysmex XN para a execução do hemograma. A amostra de sangue venoso, colhida num tubo com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), importante para a preservação das estruturas celulares, é introduzida no equipamento Sysmex XN. O analisador processa a informação sobre as características bioquímicas e biofísicas das diferentes populações celulares na amostra sanguínea, obtida pelos métodos de citometria de fluxo, impedância elétrica e SLS-hemoglobina.

- Método de citometria de fluxo

O método de citometria de fluxo avalia as diversas características físicas da célula individual em suspensão, de forma a analisar e diferenciar as populações celulares na amostra de sangue. O princípio da citometria de fluxo baseia-se na dispersão da luz e emissão de fluorescência, que ocorre mediante a irradiação da célula em suspensão com um raio laser. A dispersão da luz está diretamente relacionada com as propriedades estruturais e morfológicas da célula: a dispersão frontal da luz (*forward scatter*) é proporcional à área ou tamanho celular, enquanto a dispersão lateral da luz (*side scatter*), que mede a luz refratada e refletida a 90 graus do raio laser, é proporcional à granularidade celular ou complexidade interna

(14). A emissão de fluorescência é proporcional à quantidade de sondas fluorescentes que ligam às estruturas da célula, como ácidos nucleicos e organelos. Com algoritmos e tecnologia digital, o Sysmex XN interpreta a dispersão da luz e a emissão da fluorescência, para diferenciar e contar leucócitos, eritrócitos nucleados, reticulócitos e plaquetas, assim como detectar células precursoras e anormais (15).

- Método de impedância elétrica

O método de impedância elétrica permite contar os eritrócitos e as plaquetas. As células fluem individualmente através do orifício e geram um pulso elétrico. O pulso elétrico captado pelo instrumento é processado e convertido em volume celular (15).

- Método SLS-hemoglobina

O método SLS-hemoglobina utiliza o composto Lauril Sulfato de Sódio (SLS), para quantificar a concentração de hemoglobina. A exteriorização da hemoglobina contida nos eritrócitos ocorre após a hemólise induzida pelo SLS. A interação entre a hemoglobina e o SLS causa a oxidação do ferro bivalente ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a ferro trivalente ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Forma-se o composto estável SLS-hemoglobina, cuja absorvância é lida por espectrofotometria e convertida em concentração de hemoglobina (15).

#### 5.1.1. Eritrograma

O eritrograma corresponde ao estudo quantitativo e qualitativo dos eritrócitos, sendo particularmente útil na classificação morfológica das anemias.

- **Contagem de eritrócitos (RBC):** Corresponde ao número de eritrócitos por unidade de volume de sangue total ( $\text{RBC} \times 10^{12}/\text{L}$ ).
- **Hemoglobina (Hb):** Corresponde à quantidade de hemoglobina por volume de sangue total (g/L). Na prática, valores de Hb reduzidos cursam na anemia microcítica (12).
- **Hematócrito (Hct):** Corresponde ao volume que os eritrócitos ocupam no volume de sangue total (L/L ou %). O valor de Hct pode apresentar-se elevados na presença de eritrócitos com morfologia anormal, como células falciforme ou esferócitos, devido ao aprisionamento do plasma (12).

- **Volume corpuscular médio (VCM):** Indica o volume médio dos eritrócitos (fL). O parâmetro VCM é utilizado para a classificação morfológica das anemias como microcítica (VCM <80 fL), anemia normocítica (VCM 80 – 95 fL) e anemia macrocítica (VCM >95 fL) (11).
- **Hemoglobina corpuscular média (HCM):** Indica a quantidade média de hemoglobina contida nos eritrócitos (pg). O parâmetro HCM é utilizado para a classificação morfológica da anemia hipocrômica (HCM <27pg) (11).
- **Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM):** Corresponde à concentração de hemoglobina contida nos eritrócitos (g/dL). Um valor significativamente aumentado da CHCM sugere a presença de crioaglutininas e aglutinação dos eritrócitos, sendo facilmente normalizado com o aquecimento do espécimen a 37°C, por 10 a 15 minutos (13).
- **Distribuição do diâmetro de eritrócitos (RDW):** Indica a variação do tamanho dos eritrócitos, denominada anisocitose eritrocitária, expressa em percentagem. Na prática, o RDW é mais frequentemente utilizado para diferenciar entre anemia ferropriva (RDW 15-25%) e talassemia (RDW 12-15%). Deve ser considerada a esferocitose hereditária para RDW de 17-20%, quando associado com CHCM elevado. Em casos de anemia microcítica severa com RDW >25%, deve ser considerada a anemia sideroblástica (12).

Quando requisitado na prescrição médica, a avaliação dos reticulócitos é incluída no hemograma: contagem de reticulócitos (RET#), percentagem de reticulócitos (RET%), fração de reticulócitos imaturos (IRF), e concentração de Hb nos reticulócitos (RET-He). O estudo dos reticulócitos é particularmente útil na avaliação da eritropoiese, assim como na designação dos quadros de anemia e monitoramento das terapêuticas com ferro.

#### 5.1.2. Leucograma

O leucograma corresponde ao estudo quantitativo e qualitativo das subpopulações leucocitárias, sendo particularmente útil no rastreio e monitorização de pacientes leucémicos.

- **Contagem dos leucócitos (WBC):** Corresponde ao número de leucócitos por volume de sangue total ( $10^9/L$ ). Valores de WBC elevados ( $WBC > 11 \times 10^9/L$ )

são designados como leucocitose e estão associados a diversos cenários patológicos, como processos infecciosos, reações alérgicas, ou condições mieloproliferativas (8, 12). Valores de WBC reduzidos ( $WBC < 4 \times 10^9/L$ ) são designados como leucopenia e podem estar associados a uma pancitopenia generalizada, ou sépsis por bactérias Gram negativas (6).

- **Contagem diferencial leucocitária:** Corresponde à contagem absoluta ( $10^9/L$ ) e contagem relativa (%) das subpopulações leucocitárias, nomeadamente os neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos, e granulócitos imaturos.

A deteção de blastos, precursores mieloides, linfócitos atípicos ou *left shift* (desvio à esquerda no histograma representativo de um maior número de leucócitos imaturos, tipicamente granulócitos imaturos, como neutrófilos em banda, metamielócitos, ou mielócitos) é sinalizado (*flag*) pelo analisador hematológico Sysmex XN e reportado no leucograma. Posteriormente, é obrigatório executar o estudo citológico dos leucócitos através da observação do esfregaço sanguíneo ao microscópio (12).

### 5.1.3. Plaquetas

Esta secção corresponde, sobretudo, ao estudo quantitativo das plaquetas e permite identificar coagulopatias.

- **Contagem de plaquetas (PLT):** Corresponde ao número de plaquetas por volume de sangue total ( $10^9/L$ ). PLT elevado ( $PLT > 600 \times 10^9/L$ ) é designado por trombocitose e pode estar associado com infeções, reações de fase aguda, anemias, deficiência em vitamina E, doenças mieloproliferativas, medicação, entre outras causas. PLT reduzidos ( $PLT < 150 \times 10^9/L$ ) é designados trombocitopenia e pode estar associado com associado leucemias, terapêuticas citotóxicas, púrpura trombocitopénica imune (PTI), ou coagulação intravascular disseminada (CID) (16).

Outros parâmetros hematológicos das plaquetas avaliados pelo instrumento analítico incluem: volume plaquetário médio (MVP), em femtolitros (fL); distribuição do tamanho das plaquetas (PDW%); plaquetócrito (PTC%), que corresponde ao volume ocupado pelas plaquetas no volume de sangue total; e fração de plaquetas imaturas (IPF%).

Mais frequentemente, uma contagem de  $PLT < 150 \times 10^9/L$  deve-se ao fenómeno de pseudotrombocitopenia. A presença de autoanticorpos (IgG, IgA e IgM), direccionados contra epítomos crípticos das plaquetas (complexo GpIIbIIIa, fosfolípidos negativamente

carregados), induzem a aglutinação das plaquetas *In vitro*. Estes epítomos são expostos mediante a interação das plaquetas com o anticoagulante EDTA, que causa modificações conformacionais nos neoantigénios (17). Outros anticoagulantes, como o citrato de sódio, não demonstram o mesmo efeito na conformação dos epítomos plaquetários. Demais causas da trombocitopenia incluem satelitismo plaquetário (citoaderência das plaquetas aos monócitos ou neutrófilos, induzida pelo EDTA), presença de crioaglutininas, ou formação de coágulos visíveis a olho nu, em amostras incorretamente colhidas e/ou com volume de anticoagulante insuficiente (18).

## 5.2. Esfregaço sanguíneo

A observação do esfregaço sanguíneo ao microscópio compreende o estudo citológico das diferentes populações celulares do sangue, sempre que os valores reportados no hemograma não correspondam aos valores de referência, ou sejam identificadas células anómalas pelo instrumento analítico. A interpretação do esfregaço engloba o histórico clínico do paciente, bem como outros resultados de análises clínicas de rotina (velocidade de sedimentação, parâmetros bioquímicos).

O esfregaço sanguíneo é executado por deslizamento de uma gota de sangue, obtido de um tubo de colheita com anticoagulante EDTA, sobre uma lâmina de vidro esmerilada e corretamente desengordurada, obtendo-se um filme com espessura intermédia e 3 zonas distinguíveis (cabeça, corpo e cauda). Posteriormente, o esfregaço é corado com a coloração de Wright. A coloração das diferentes estruturas celulares dependem da afinidade acidófila ou basófila das mesmas, permitindo a diferenciação estrutural e identificação das respetivas células sanguíneas ao microscópio.

No microscópio ótico, é realizada uma avaliação global da qualidade do esfregaço numa ampliação 40x. Procede-se à escolha de um campo de visualização com densidade celular intermédia, evitando a sobreposição dos eritrócitos. Numa ampliação de 100x, é realizada a observação da morfologia das células sanguíneas (12).

Alterações morfológicas tipicamente registadas nos eritrócitos incluem esferócitos (característicos de esferocitose hereditária, incompatibilidade ABO, anemia hemolítica autoimune), acantócitos (característicos de deficiência em cinase piruvato), queratócitos (deficiência de G6PD), células alvo (anemia ferropriva, talassemia, hemoglobinopatias), ou formação de *rouleaux* (reações de fase aguda). Outras inclusões anómalas nas células eritrocitárias incluem parasitas intracelulares (*Plasmodium*), corpos de Howell-Jolly, ou

pontuado basófilo. A observação de precursores eritroides deverá ser reportado no boletim analítico do paciente (12).

Alterações morfológicas tipicamente registadas nos leucócitos incluem Sombras de Gumprecht ou *smudge cells* (características de leucemia linfóide crónica), bastões de *Auer* (característicos de leucemia mieloide aguda), granulação tóxica, vacuolização tóxica e corpos de Döhle (característicos de infeções) (11).

Alterações morfológicas tipicamente registadas nas plaquetas incluem a presença de plaquetas gigantes (características de CID e PTI) (16). A pseudotrombocitopenia é confirmada mediante a observação de agregados plaquetários ou satelitismo plaquetário no esfregaço sanguíneo. Após confirmação da pseudotrombocitopenia, é requisitada uma nova amostra de sangue ao paciente, especificamente colhida para um tubo de colheita com o anticoagulante citrato de sódio.

### 5.3. Provas de coagulação

O sistema hemostático corresponde ao equilíbrio dinâmico entre mecanismos procoagulantes e mecanismos anticoagulantes, que atuam na formação do coágulo sanguíneo após lesão da barreira endotelial, de forma a restaurar a integridade da vasculatura e, assim, evitar perdas significativas de sangue e manter o volume sanguíneo (19). A resposta hemostática procede de forma minuciosamente organizada e envolve a intervenção das plaquetas, fatores de coagulação, inibidores da coagulação, sistema fibrinolítico e vasos sanguíneos (11).

A resposta hemostática ocorre em três fases distintas: hemóstase primária, coagulação e fibrinólise. A hemóstase primária compreende a ativação das plaquetas pelo colagénio subendotelial exposto após lesão da barreira endotelial. As plaquetas ativadas participam na agregação plaquetária e formam um coágulo plaquetário instável.

Seguidamente, ocorre a etapa da coagulação, que corresponde à ativação sequencial dos fatores de coagulação plasmáticos, com objetivo de proporcionar estabilidade ao coágulo plaquetário mediante a formação de uma rede de monómeros de fibrina. A coagulação compreende a via intrínseca e a via extrínseca, que originam separadamente e convergem numa via comum final, onde ocorre a conversão do fibrinogénio em fibrina. A via intrínseca consiste nos fatores de coagulação XII, XI, IX, VIII, II, e I, iniciando-se com a ativação do fator XII após contacto com superfícies ou moléculas negativamente carregadas, como os fosfolípidos membranares da plaqueta (20). A via

extrínseca consiste nos fatores de coagulação VII, X, II, e I, iniciando-se com a ativação do fator VII após libertação da fator tecidual pelas células endoteliais localizadas na lesão vascular (21). A via comum consiste nos fatores X, VIII, V, II, e I (22).

Por fim, ocorre a fibrinólise, que corresponde à dissolução do coágulo plaquetário mediante a ação do ativador do plasminogénio tecidual (tPA) (21).

A existência de um cenário patológico pode induzir o desequilíbrio do sistema hemostático, desencadeando a ocorrência de eventos trombóticos ou hemorrágicos. Tais patologias podem ser rastreadas através das provas de coagulação *in vitro*, denominadas tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), e tempo de trombina (TT) (21). As provas de coagulação permitem avaliar a eficácia das vias de coagulação, monitorizar estratégias terapêuticas com anticoagulantes, e despistar o risco hemorrágico em pacientes admitidos para procedimentos cirúrgicos (19).

O laboratório Vale do Sousa dispõe do instrumento analítico STA Compact Max para a execução das provas de coagulação em amostras de plasma sanguíneo, obtido por centrifugação (3200 rpm por 15 minutos) de sangue venoso colhido para um tubo de colheita com citrato de sódio. O método fundamenta-se na deteção mecânica da amplitude de oscilação da esfera metálica, contida na cuvette, sujeita a um campo eletromagnético. A alteração da viscosidade do meio induzida pela formação do coágulo sanguíneo diminui a amplitude de oscilação. Os sensores do equipamento analítico detetam a alteração da amplitude de oscilação, que será posteriormente convertida em TP, TTPa, e TT (tempo de coagulação em segundos).

#### 5.3.1. Tempo de protrombina

O TP avalia a atividade dos fatores de coagulação intervenientes da via extrínseca (VII, X, V, protrombina e fibrinogénio). Esta análise é particularmente requisitada para pacientes sob terapêutica com antagonistas da vitamina K, permitindo ao profissional clínico reavaliar a eficácia do esquema semanal terapêutico (4).

O princípio do TP consiste em comparar o tempo de coagulação da amostra de plasma sanguíneo humano, após adição do reagente tromboplastina cálcica, com o tempo de coagulação da amostra controlo. As tromboplastinas disponibilizadas pelas casas comerciais são obtidas por diversas técnicas e origens, pelo que se recorre à padronização dos valores de TP obtidos através do cálculo da Razão Normalizada Internacional (INR). O INR permite a normalização dos valores de TP obtidos à escala global, evitando

interpretações errôneas dos resultados TP e potenciais complicações relativas ao esquema terapêutico com antivitaminas K (19).

$$INR = \left( \frac{TP \text{ paciente}}{TP \text{ controle}} \right)^{ISI}$$

ISI – Índice Internacional de Sensibilidade

Valores de TP superiores aos valores de referência podem estar associados com deficiências congênitas ou adquiridas dos fatores da via extrínseca, insuficiência hepática, administração de antivitaminas K, ou hipovitaminose K induzida por desnutrição ou desordens da absorção (23).

#### 5.3.2. Tempo de tromboplastina parcial ativada

O TTPa permite avaliar os fatores de coagulação intervenientes na via intrínseca (XII, XI, IX, VIII, protrombina e fibrinogénio), proporcionando uma visão global da cascata de coagulação. Após a introdução da amostra no instrumento analítico, são adicionados um ativador do fator XII, cálcio, e um substituto dos fosfolípidos membranares da plaqueta, a cefalina (23). Esta é uma análise particularmente útil para a monitorização de estratégias terapêuticas com heparina, pesquisa do anticorpo lúpico, e rastreamento de doenças congénitas, nomeadamente a hemofilia A (deficiência em fator VIII) e hemofilia B (deficiência em fator IX) (4).

#### 5.3.3. Tempo de trombina

O TT avalia a conversão do fibrinogénio em fibrina, o último passo da via comum. Após introdução da amostra de plasma no instrumento analítico, são adicionados cálcio e trombina exógena em excesso, que promove a conversão do fibrinogénio em monómeros de fibrina. Esta análise é particularmente útil para identificar deficiências congénitas ou adquiridas em fibrinogénio (4).

#### 5.4. Velocidade de sedimentação eritrocitária

A velocidade de sedimentação eritrocitária (VS) é uma análise que permite identificar a ocorrência de uma resposta de fase aguda durante um processo inflamatório. Apesar de ser uma análise não específica, a VS continua a ser um exame frequentemente

requisitado no laboratório clínico. A VS permite diagnosticar e monitorizar processos infecciosos e doenças inflamatórias, nomeadamente a artrite reumatoide, arterite das células gigantes, e polimialgia reumática (24).

Os eritrócitos são células negativamente carregadas e exercem forças de repulsão entre si, forças estas que contribuem para a reduzida agregação entre os eritrócitos. Na presença de proteínas plasmáticas de fase aguda positivamente carregadas, a superfície eritrocitária será neutralizada, e, consequentemente, a redução da repulsão eletrostática aumentará a agregação entre os eritrócitos. Logo, os processos inflamatórios induzem o aumento da velocidade de sedimentação eritrocitária (25).

O laboratório Vale do Sousa dispõe do instrumento analítico VES Matic Cube 200, que utiliza o método de *Westergren* modificado. O instrumento é composto por um sensor digital, que executa a leitura do nível de sedimentação eritrocitária. Após 20 min da introdução da amostra no equipamento analítico, a diferença da densidade ótica capturada pelo instrumento é convertida em taxa de *Westergren* convencional (mm/h) (24).

#### 5.5. Hemoglobina glicada

O doseamento da hemoglobina A1c (HbA1c) é considerado o marcador mais importante para monitorização a longo-prazo do controlo glicémico de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2 (26). A determinação da HbA1c deve ser realizada, no mínimo, semestralmente para utentes com diabetes. Para diabéticos cujo tratamento sofreu alterações recentemente, ou que não alcançaram as metas terapêuticas preconizados, a análise deve ser realizada com intervalo mínimo de 3 meses.

A glicação da hemoglobina é uma reação não-enzimática entre a glucose intraeritrocitária e o grupo amino N-terminal das cadeias beta-hemoglobínicas. A taxa de formação da hemoglobina glicada varia em função da glicemia, uma vez que a concentração de glucose intraeritrocitária não depende da ação da insulina, mas da disponibilidade de glucose no sangue. Atendendo que os eritrócitos têm um tempo de vida de 120 dias, o doseamento da hemoglobina glicada permite monitorizar a “integração” de todas as variações glicémicas ocorrentes nas 8-12 semanas prévias (26).

O laboratório Vale do Sousa utiliza o instrumento Cappillarys 2 Flex-Piercing, que automatiza o método de eletroforese por capilar, permitindo a separação e quantificação da fração de hemoglobina glicada. Esta análise é executada com sangue venoso completo,

colhido num tubo de colheita com EDTA. A amostra é hemolisada e o conteúdo hemoglobínico libertado para a solução tampão de pH alcalino. As frações de hemoglobina são separadas e o instrumento quantifica a fração individual de hemoglobina A1c, por deteção direta a 415 nm. A resolução do instrumento permite ainda detetar hemoglobinas HbA1c labelis, carbamiladas, acetiladas e variantes de hemoglobina (27).

#### 5.6. Tipagem eritrocitária

A caracterização do grupo sanguíneo implica a determinação dos sistemas ABO e Rh. O sistema ABO é definido pela presença ou ausência dos antígenos A e/ou B na membrana eritrocitária e de anticorpos no plasma ou soro, correspondentes aos antígenos ausentes no eritrócito. O sistema Rh define-se pela existência do antígeno D na membrana eritrocitária e a ausência de anticorpos naturais anti-D no plasma, sendo que estes surgem apenas em caso de imunização. A determinação destes sistemas é importante para evitar a ocorrência de aloimunizações por transfusão de sangue, transplantação de órgãos, hemorragia fetomaterna nas grávidas, e doença hemolítica do recém-nascido.

O laboratório Vale do Sousa utiliza cards de plástico DG Gel para a determinação dos grupos sanguíneos, cujo método se baseia na deteção de reações de aglutinação de eritrócitos. Os card DG Gel contém microtubos preenchidos com solução de gel tamponada, composta por anticorpos monoclonais específicos (anti-A, anti-B e anti-D). A aglutinação ocorre quando os antígenos dos eritrócitos reagem com os anticorpos correspondentes presentes no gel. A coluna de gel funciona como um filtro, que retém os eritrócitos aglutinados durante a centrifugação. Os eritrócitos aglutinados concentram-se no topo do gel, enquanto os não-aglutinados sedimentam no fundo do microtubo.

#### 5.7. Prova de Coombs

A Prova de Coombs Direta e Indireta é útil para o rastreamento e tipagem de anticorpos eritrocitários irregulares, evitando situações de aloimunização. A execução desta prova exige o uso de globulinas anti-humanas, que detetam eritrócitos opsonizados por imunoglobulinas IgG. A prova de coombs direta deteta eritrócitos sensibilizados *in vivo* com imunoglobulinas, enquanto a prova de coombs indireta deteta anticorpos eritrocitários no plasma ou soro do paciente. As provas têm como finalidade avaliar a significância clínica

dos anticorpos presentes quer em amostras do paciente, quer em amostras de dadores (28).

O laboratório Vale do Sousa utiliza Cards de plástico DG Gel Coombs para executar as provas de coombs. Os cards contém microtubos preenchidos com solução de gel tamponada, composta por uma mistura de anti-globulinas humanas (anti-IgG) policlonais com anticorpos anti-C3d monoclonais. A aglutinação ocorre quando os eritrócitos sensibilizados *in vivo* ou *in vitro* com anticorpos humanos IgG ou frações complementares reagem com os anticorpos anti-globulinas humanas. A coluna de gel funciona como um filtro que retém os eritrócitos aglutinados durante a centrifugação. Os eritrócitos aglutinados concentram-se no topo e ao longo do gel, enquanto os não-aglutinados sedimentam no fundo do microtubo. Nos casos positivos, a amostra deve ser sujeita a sucessivas diluições, permitindo a titulação dos anticorpos detetados (28).

## 6. Microbiologia

A secção da Microbiologia compreende a análise de diferentes produtos biológicos para a identificação presuntiva do agente etiológico responsável pela manifestação patológica do doente, rastreio de portadores assintomáticos, e testagem de suscetibilidade antibiótica. As análises microbiológicas consistem em exames de microscopia, exames de cultura e testes rápidos.

Diariamente, chegam ao laboratório vários produtos biológicos, nomeadamente amostras de urina, fezes, exsudados genitais e uretrais, sémen, exsudados nasofaríngeos e exsudados purulentos. As amostras rececionadas no laboratório são cuidadosamente inspecionadas, garantindo sempre que estas estão adequadamente acondicionadas e identificadas com o respetivo código de barras. A qualidade das amostras recebidas são um fator determinante para o resultado clínico, pelo que o não cumprimento dos requisitos de acondicionamento implica a rejeição da amostra e a solicitação de uma nova colheita.

### 6.1. Urina

A urianálise é a análise mais frequentemente requisitada aos laboratórios de análises clínicas, pela facilidade de execução, acessibilidade financeira e relevância clínica. Na área da microbiologia, a análise da urina tem como principal objetivo o rastreio

da infecção do trato urinário (UTI), através da execução do exame químico e microbiológico, exame microscópico a fresco do sedimento urinário, e exame cultural. Uma vez que a urina é um fluido instável e suscetível a alterações assim que eliminado por micção, a amostra de urina deve ser analisada o mais rapidamente possível, para não comprometer a integridade do espécimen (29). Alternativamente, a urina deve ser refrigerada a 4°C até 24h. Após as 24h, a amostra é considerada inviável para a urianálise.

#### 6.1.1. Exame químico e microbiológico

No exame químico e microbiológico, estudam-se os parâmetros da urina, como o pH, proteínas, eritrócitos, glucose, bilirrubina conjugada, urobilinogénio, corpos cetónicos, nitritos, esterase leucocitária, e a Unidade Formadora de Colónias (UFC). O laboratório recorre aos equipamentos analíticos, Sysmex UC-3500 e Sysmex UC-4000, que automatiza a impregnação das tiras reagentes de urina nas amostras e, por citometria de fluxo, determina a UFC.

#### 6.1.2. Exame de microscopia a fresco

O exame ao microscópio compreende o estudo do sedimento urinário, obtido por centrifugação da urina (1500 rpm por 10 minutos). O sedimento é ressuspenso nas gotículas de urina residuais e observado ao microscópio, entre lâmina e lamela. Com o microscópio na objetiva de 40x, diafragma em baixo e luz pouco intensa, procede-se ao estudo das diferentes estruturas no sedimento. O parafuso micrométrico é repetidamente ajustado, revelando a refringência de leucócitos, eritrócitos, cristais, cilindros, moléculas lipídicas ou microrganismos (30).

Em indivíduos saudáveis, é frequente a presença de células epiteliais escamosas e de transição (10-20 por campo), leucócitos e eritrócitos (0-5 por campo), e raras bactérias ou leveduras. Em casos de UTI, o microrganismo patogénico induz o processo inflamatório e lesões nas células epiteliais do trato urinário, pelo que o sedimento urinário deverá revelar um número aumentado de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos e cilindros. Em estádios infecciosos mais avançados, podem ser observadas células epiteliais do trato urinário superior, como células tubulares renais (29).

Os cilindros são compostos por uma matriz de mucoproteínas Tamm-Horsfall translúcidas e de conteúdo celular acumulado nos túbulos renais. Em condições fisiológicas, apenas devem ser observados cilindros hialinos ou granulados. Os cilindros dissolvem-se em 10 a 30 minutos, pelo que o exame microscópico do sedimento urinário deve ser executada dentro deste intervalo. Estas estruturas são características da UTIs, desidratação ou patologias renais (31).

Os produtos do metabolismo estão bastante concentrados quando excretados na urina, acabando por precipitar na forma de cristais. A formação de estruturas cristalinas podem estar associadas com alterações metabólicas, ainda que na maioria dos casos sejam benignos (29).

#### 6.1.3. Exame cultural

O exame cultural da urina permite o crescimento de colónias bacteriana em meios de cultura, que são posteriormente observados e interpretados para diagnóstico da UTI. Os principais agentes responsáveis pelo desenvolvimento de infeções urinárias são as bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus agalactiae*, e o fungo *Candida albicans*. Os meios de cultura são escolhidos de acordo com as necessidades nutricionais da bactéria ou fungo alvo, de forma a potenciar o crescimento de colónias puras do agente patogénico (29-31).

Na camara de fluxo laminar, as amostras de urina são homogeneizadas manualmente e semeadas no meio Brilliance UTI Clarity Agar, permitindo o isolamento dos agentes patogénicos mais frequentemente responsáveis pelas UTIs. A composição do meio compreende uma mistura de cromogéneos, suscetíveis à ação enzimática das diferentes espécies bacterianas. A utilização específica dos cromogéneos por parte de cada bactéria promove alteração do pH do meio de cultura, originando modificações colorimétricas essenciais para o diagnóstico diferencial (32).

Com o uso intensivo e arbitrário de antibióticos, tem-se vindo a registar um incremento de infeções oportunistas graves pela microbiota comensal da zona urogenital, como *Candida* spp. Quando se suspeita que a infeção urinária possa ser causada por fungos (contagem de leveduras  $\geq 100$  leveduras/ $\mu$ L), a urina é semeada no meio Oxoid Brilliance Candida Agar e incubada por 24 a 48 horas, na estufa a 37°C (30).

Ocasionalmente, as UTIs são causadas por organismos com crescimento fastidioso e necessidades nutricionais exigentes. A amostra de urina deve ser semeada em meios de cultura com gelose de sangue e gelose de chocolate. Além de nutritivamente enriquecidos, os meios de gelose de sangue permitem a apreciação de fenômenos hemolíticos pela bactéria patogénica, o que auxilia a sua identificação.

O crescimento bacteriano observado nas sementeiras deverá ser interpretado consoante os parâmetros e observações registados no do exame químico e microbiológico e no exame microscópico.

## 6.2. Fezes

A análise às fezes é uma ferramenta de rastreamento e monitorização do estado fisiopatológico do sistema gastrointestinal. A completude desta análise compreende o exame macroscópico, microscópico, bacteriológico e imunológico.

### 6.2.1. Exame macroscópico

Durante a examinação macroscópica, avaliam-se parâmetros como cor, consistência, quantidade, forma, odor e presença de muco. Em indivíduos saudáveis, as fezes são moldadas e de cor marron, podendo incorporar pequenas quantidades de muco (33). A evacuação de fezes líquidas, esbranquiçadas ou mucossanguinolentas está associada a distúrbios gastrointestinais, resultantes da colonização invasiva por bactérias, vírus ou parasitas. Em casos de parasitose por helmintas, poderão ser visíveis estruturas parasitárias nas fezes, como proglotes ou vermes adultos (34).

### 6.2.2. Exame microscópico

O exame microscópico às fezes compreende a pesquisa de achados anormais, possivelmente associados aos distúrbios do trato intestinal. O bolo fecal é predominantemente constituído por fibras alimentares não digeríveis, que se movimentam ao longo do trato intestinal, incorporando parte da microbiota comensal (enterobactérias e

leveduras). Ocasionalmente, alguns achados vestigiais, como gorduras não digeridas ou pólen inalado, podem ser observáveis ao microscópio. Achados anormais nas fezes incluem eritrócitos, numerosos leucócitos, ou elementos parasitários.

Para a pesquisa parasitológica, o paciente deve colher 3 amostras fecais consecutivas em frascos estéreis, sem higienização prévia. As fezes são posteriormente sujeitas a métodos de enriquecimento, que concentram a carga parasitária das amostras. Entre lâmina e lamela, com o diafragma posicionado em baixo e luz pouco intensa, faz-se um varrimento geral da matéria fecal ao microscópio (40x). O analista deve procurar por ovos, larvas, proglotes, vermes adultos, quistos ou trofozoitos (apenas íntegros até 1 hora após eliminação das fezes). O parafuso macrométrico é repetidamente ajustado, revelando a refringência característica de estruturas parasitárias (*Giardia Lamblia* tem refringência verde) ou celulares, como leucócitos e eritrócitos. Raramente são observáveis leucócitos em fezes parasitadas, devido à ação desintegradora do parasita.

### 6.2.3. Exame cultural

O exame cultural das fezes é um método diagnóstico da doença diarreica, causada por enterobactérias patogénicas. Frequentemente, a doença do trato intestinal está associada ao consumo de águas ou alimentos pobremente cozinhados e contaminados por espécies bacterianas patogénicas ao ser humano. Também as enterobactérias da flora intestinal podem ocasionar infeções oportunistas em imunossuprimidos, ou, por obtenção de genes de virulência, tornarem-se patogénicas para o hospedeiro (*E. coli*). Em condições hospitalares, as infeções nosocomiais nos neonatos e imunossuprimidos são comumente causadas por bactérias da família *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella* e *Serratia* (35).

**Tabela 2.** Bactérias comensais da flora intestinal e bactérias patogénicas. [Adaptado de (36)]

| Bactérias comensais da flora intestinal | Bactérias patogénicas        |
|-----------------------------------------|------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>                 | <i>Salmonella typhi</i>      |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>            | <i>Shigella</i>              |
| <i>Proteus mirabilis</i>                | <i>Yersinia pestis</i>       |
| <i>Enterobacter</i>                     | <i>Campylobacter</i>         |
| <i>Morganella</i>                       | <i>Aeromonas</i>             |
| <i>Serratia</i>                         | <i>Bacillus cereus</i>       |
| <i>Citrobacter</i>                      | <i>Vibrio</i>                |
|                                         | <i>Clostridium difficile</i> |

Para o exame bacteriológico das fezes, o paciente deve colher 1 amostra de fezes (5ml; 0,5-2g/cultura) num frasco esterilizado, respeitando as normas instruídas pelo procedimento operativo técnico. As fezes são previamente inoculadas num meio líquido de enriquecimento, para inibir o crescimento de coliformes ou estreptococos fecais e promover a recuperação de *Salmonella* e *Shigella*. Após uma incubação de 12-18 horas, a 32°C, as bactérias em suspensão são inoculadas em meios de cultura XLD (xilose-lisina-desoxicolato) e SS Agar (*Salmonella-Shigella*), para identificação presuntiva de *salmonellae* e *shigellae*. A utilização dos constituintes cromogéneos do meio de cultura pela maquinaria enzimática da respetiva espécie bacteriana determina o aspeto da colónia (37).

Adicionalmente, a amostra de fezes é inoculada em meios de gelose de sangue, permitindo o crescimento e recuperação de espécies *Aeromonas*, *Vibrio* ou comensais oportunistas. O crescimento de colónias bacterianas puras no meio de cultura podem ter como origem contaminação por espécies bacterianas comensais da flora intestinal, pelo que o crescimento de colónias no meio de cultura deverá ser cuidadosamente interpretado.

A pesquisa de *Campylobacter* é condicionada por alguns fatores ambientais. O seu crescimento *in vitro* exige temperaturas elevadas (42°C) e condições atmosféricas microaerófilas (5%-7% O<sub>2</sub>, 5%-10% CO<sub>2</sub>), pelo que é necessário recorrer a sistemas comerciais geradores do gás, de forma a proporcionar um ambiente propício à bactéria *Campylobacter* (38). A amostra de fezes é diretamente inoculada no meio de cultura seletivo CCDA, cuja formulação inibe o crescimento de coliformes.

#### 6.2.4. Exame imunológico

O exame imunológico é o teste da pesquisa de sangue oculto nas fezes, que permite executar o prognóstico de patologias do trato gastrointestinal inferior e superior. A presença de sangue nas fezes poderá ser indicativo de pólipos ou cancro na região colorretal ainda em fase inicial, bem como hemorragias altas de estômago e duodeno, alertando para a necessidade de intervenção clínica e contribuindo para a diminuição da mortalidade por cancro colorretal.

O laboratório Vale de Sousa utiliza os kits comerciais NADAL FOB, que tem por base uma metodologia imunoquímica para a deteção semiquantitativa da hemoglobina humana nas fezes. O kit contém anticorpos anti-hemoglobina humana imobilizados na

região da linha de teste na membrana. A hemoglobina presente nas fezes reage com os anticorpos anti-Hb humana, conjugados com partículas cromogénicas. Forma-se uma linha colorida e confirma-se a positividade da amostra por interpretação visual.(39)

### 6.3. Exsudato vaginal e endocervical

A análise dos exsudatos vaginais e endocervicais é regularmente prescrita a mulheres grávidas e/ou com sintomatologia vulvovaginal, para o rastreio de infeções do trato urogenital. Esta análise compreende a examinação microscópica e cultural das amostras, colhidas por profissionais devidamente habilitados e enviadas ao laboratório.

A mucosa vaginal estabelece uma relação de comensalismo com várias espécies fúngicas e bacterianas. *Lactobacillus* spp. dominam a comunidade saprófita e contribuem para a homeostasia da flora da zona, através da elaboração de ácidos e bacteriocinas que impedem a proliferação e colonização de espécies potencialmente patogénicas. O decréscimo de espécies lactobacilares está associado à instalação de infeções urogenitais por *Gardnerella vaginalis* e outras bactérias anaeróbias (vaginose bacteriana), ou por *Candida albicans* (candidose) (40). A proximidade anatómica vaginorretal poderá justificar a considerável frequência de infeções por *E.coli* ou *Enterococcus* spp. O rastreio de infeções urogenitais é imperativo no serviço de obstetrícia, pelo risco de aborto espontâneo ou infeção grave neonatal, por infeção com *Streptococcus agalactiae*, que podem originar septicemias neonatais. Alguns patógenos exógenos, transmitidos por via sexual, são a *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus ducreyi* (associado ao cancro mole) ou *Trichomonas vaginalis* (tricomóníase).

#### 6.3.1. Exame microscópica

O exame ao microscópio dos exsudatos vaginais e endocervicais permite a avaliação da composição multicelular do trato genital feminino. Em condições fisiológicas, a preparação a fresco revela células de descamação epiteliais, filamentos mucoides, grandes bactérias em bastonete Gram-positivas correspondentes a lactobacilos, raras leveduras e leucócitos isolados (menos de 10/hpf). Percorrendo os vários campos microscópicos, faz-se uma pesquisa por achados anómalos ou alterações sugestivas de infeção:

- Exame parasitológico – Pesquisa de protozoária flagelada *Trichomonas vaginalis*, com movimentos originados pelo flagelo longo (movimentos de chicote); abundantes leucócitos (>25 leucócitos/hpf) (31).
- Exame micológico – Pesquisa de blastósporos, pseudohifas e abundantes leveduras; raros leucócitos (40).
- Exame bacteriológico – Pesquisa de células *clue*, correspondentes a células epiteliais com cocobacilos Gram variável (*Gardnerella* spp.) ou bacilos pleomórficos Gram-negativos aderentes (*Mobiluncus*); redução ou ausência de bactérias *Lactobacillus* e células epiteliais de descamação. Deve de ser pesquisar a presença de diplococos Gram-positivos intracelulares (*Neisseria gonorrhea*) em exsudatos cervicais mucopurulentos (40).

A interpretação clínica do exame microscópico é ancorada pela execução de simples testes adicionais, como coloração de Gram, medição do pH, adição de KOH 10% para o estudo das hifas, e teste de *whiff* com KOH para suspeita de vaginose bacteriana (31).

#### 6.3.2. Exame cultural

O estudo dos exsudatos vaginal e endocervical é complementado pelo exame cultural. O crescimento de colónias *in vitro* deve ser interpretado paralelamente às observações registadas durante o exame microscópico, considerando-se sempre a pluralidade comensal da vagina e a possibilidade de contaminação.

Os exsudatos vaginais e endocervicais são semeados nos meios de cultura Candida Agar, UTI Clarity Agar, gelose de sangue e gelose de chocolate. Após as 24 e 48 horas de incubação na estufa, a 37°C, onde a GS e GC são incubadas em atmosfera de CO<sub>2</sub>, procede-se à leitura das placas e contextualização clínica do crescimento bacteriano.

Para a pesquisa de *Streptococcus agalactiae*, frequentemente prescrita a mulheres grávidas, as amostras são inoculadas no meio de cultura seletivo e diferencial para a espécie *S. agalactiae*, Brilliance GBS Agar.

O estudo bacteriológico pode ser complementado com a pesquisa de agentes etiológicos sexualmente transmissíveis, como *Haemophilus ducreyi*, *Mycoplasma* spp., e *Ureoplasma* spp, em kits comerciais de identificação bacteriana e estudo de suscetibilidade

antimicrobiana. O *kits* contém poços revestidos por compostos cromogénicos e/ou antibióticos, suscetíveis à utilização enzimática do respetivo microrganismo. A reação colorimétrica determina um sistema de identificação presuntiva da espécie bacteriana, e a respetiva suscetibilidade ou resistência antimicrobiana. Após 24 e 48 horas de incubação, a 37°C, procede-se à leitura dos *kits* (41).

#### 6.4. Exsudatos nasofaríngeos

A análise de exsudatos nasofaríngeos é uma ferramenta auxiliar no prognóstico de patologias associadas ao trato respiratório, como asma, rinite alérgica, portadores de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), ou tuberculose pulmonar, e acompanhamento de farmacoterapias com tuberculostáticos. As amostras nasofaríngeas, colhidas por profissionais devidamente habilitados, são depois submetidas a um exame bacteriológico (exame cultural e exame microscópico).

A cavidade nasal abriga uma diversa comunidade de microrganismos comensais, capazes de suprimir a colonização e proliferação de patógenos oportunistas, através da competição pelo espaço e nutrientes ou elaboração de toxinas antimicrobianas. A disbiose do microbioma nasofaríngeo está implícita na fisiopatologia de várias doenças respiratórias, abordadas nesta secção.

##### 6.4.1. Exame microscópico

###### 6.4.1.1. Pesquisa de eosinófilos

A asma e a rinite alérgica caracterizam-se pela infiltração de eosinófilos e hiperresponsividade brônquica, que se evidenciam durante a examinação do exsudato nasal. A técnica consiste na realização de um esfregaço nasal, posteriormente fixado à chama e corado com a Coloração de Giemsa. No microscópio ótico, o analista percorre os vários campos de ampliação (40x) e avalia os constituintes celulares do exsudato. A presença de apenas um eosinófilo, contextualizada no quadro clínico do paciente, confirma o estado inflamatório das vias brônquicas associado à asma e rinite alérgica.

#### 6.4.1.2. BK direto

*Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico responsável pela tuberculose pulmonar. Atualmente, o diagnóstico da tuberculose ainda depende de exames microbiológicos, os quais requerem um manuseio cuidadoso e um transporte rápido da amostra. Apesar da baciloscopia facultar um diagnóstico presuntivo rápido, o isolamento cultural do *Mycobacterium tuberculosis* mantém-se como o método de referência. No entanto, a cultura desta micobactéria é um processo moroso de até 60 dias, tornando o método da sementeira pouco prático (42).

O exame microscópico compreende a execução de um esfregaço nasal, seguido da fixação à chama e coloração da lâmina pela técnica de Ziehl-Neelsen. A metodologia de Ziehl-Neelsen baseia-se na composição da parede celular do *M. tuberculosis*, cuja membrana rica em lípidos confere ao patogénico resistência à descoloração por álcool-ácidos. Os bacilos álcool ácido resistente (BAAR) revelam uma cor avermelhada após a lavagem álcool-ácida. A lâmina é observada ao microscópio, devendo o analista atentar pela formação de estruturas “fator corda”, correspondentes à agregação de micobactérias bacilares avermelhadas. A positividade do exame microscópico do exsudato nasal deve ser interpretada no contexto clínico, ancorando o diagnóstico presuntivo da tuberculose.

#### 6.4.2. Exame cultural

##### 6.4.2.1. Pesquisa de MRSA

Apesar de constituir parte do microbioma cutâneo e nasal de vários indivíduos saudáveis, a bactéria *Staphylococcus aureus* possui um alarmante potencial patogénico. A proliferação disseminada deste comensal oportunista origina infeções invasivas específicas ao órgão (tecidos moles, pneumonia, meningite). O uso e abuso de antibióticos para tratamento destas infeções impulsionou a emergência de estirpes *S. aureus* multirresistentes, limitando a eficácia de antibióterapias. Portadores de estirpes MRSA são reservatórios de transmissão e estão suscetíveis à infeção por MRSA, pelo que devem ser prontamente identificados. A pesquisa de estirpes MRSA em utentes imunossuprimidos, e nas admissões em unidades hospitalares ou lares de terceira idade, é essencial, para mitigar a cadeia de transmissão e diminuir a morbimortalidade associada à infeção (43).

A colheita é feita com zaragatoa com meio de transporte, e o exsudato nasal é semeada no meio de cultura diferencial Brilliance MRSA 2 AGAR, cuja formulação

cromogénea promove o crescimento de grandes colónias azuis de estirpes MRSA. Os meios são incubados na estufa a 37°C, durante 18-24 horas.

## 6.5. Esperma

A análise laboratorial do esperma determina o estado de fertilidade masculina, por avaliação da capacidade espermatogénica e da fisiopatologia geniturinária do homem. Esta análise envolve a execução do espermograma e, quando clinicamente relevante, espermocultura.

O paciente é responsável pela colheita da amostra de esperma e deve respeitar as indicações instruídas pela receção do laboratório. São necessários três dias de abstinência sexual antes de poder executar esta análise. A amostra é depois direcionada para a área laboratorial.

### 6.5.1. Exame macroscópico

A amostra é primeiramente sujeita a um exame macroscópico inicial, avaliando-se parâmetros como o tempo de liquefação, viscosidade, aparência, volume e pH do esperma. Entre 30 a 60 minutos após ejaculação, à temperatura ambiente, o esperma coagulado e semissólido deverá liquefazer a uma consistência homogénea aguada. Após liquefação, a viscosidade é estimada com auxílio de uma pipeta descartável, por queda gravítica do espécimen em pequenas gotas discretas. O sémen liquefeito tem uma aparência cinza opalescente, sendo a opacidade determinada pela concentração espermática. O volume é diretamente medido num tubo graduado. Recorrendo a tiras de medição de pH, é determinado o pH do esperma, cujo valor deve superar o limiar de 7,2.

### 6.5.2. Exame microscópico

O espermograma compreende o estudo citológico, a determinação da concentração de espermatozoides, e a avaliação da respetiva motilidade progressiva, através da microscopia de contraste de fase numa preparação a fresco de esperma.

Os campos de ampliação são explorados (ampliação 40x) e o conteúdo espermático é brevemente avaliado. Deve-se pesquisar por elementos celulares não espermáticos, como células epiteliais do trato geniturinário, células germinativas imaturas, leucócitos, eritrócitos ou microrganismos tipo bactérias ou leveduras. Regista-se ainda a observação de variantes citomorfológicas dos espermatozoides, nomeadamente espermatozoides bifurcados, amorfos, em anel, pontiagudos, bicéfalos, agregados ou aglutinados

A contagem de espermatozoides é executada numa câmara de contagem descartável. O esperma flui para o compartimento da câmara e procede-se à observação do esperma ao microscópio. Nesta etapa, são contados os espermatozoides com motilidade progressiva à 1ª e 2ª hora. A partir das contagens de espermatozoides, são efetuados os cálculos da percentagem de espermatozoides móveis à 1ª e 2ª hora, da concentração de espermatozoides por mililitro de esperma, e da concentração de espermatozoides absoluta.

#### 6.5.3. Exame cultural

A sintomatologia geniturinária, associada à observação de leucócitos, eritrócitos, bactérias e/ou leveduras no exame a fresco determinam a execução da espermocultura. A amostra de esperma é semeada nos meios de cultura Candida Agar, UTI Clarity Agar, gelose de sangue e gelose de chocolate, e incubadas a 37°C durante 24 horas.

#### 6.6. Exsudatos purulentos

Amostras de exsudatos purulentos, ulcerações, ou feridas cutâneas são enviadas ao laboratório e submetidas a exames de microscopia e cultura.

##### 6.6.1. Exame microscópico

A preparação a fresco do exsudado purulento, colhido com zaragatoa com soro fisiológico, é observado entre lâmina e lamela. Poderão ser encontrados leucócitos,

eritrócitos, leveduriformes, hifas ou estruturas cocobacilares representativas do agente infeccioso. A observação de numerosas células epiteliais de descamação é um forte indicador de contaminação da amostra pela superfície cutânea.

#### 6.6.2. Exame cultural

As infeções podem ser causadas por vários agentes etiológicos, com diferentes requisitos nutricionais, ambientais de incubação – bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas, micobactérias e fungos. É importante informar devidamente o laboratório quanto à zona anatómica e o tipo de ferimento purulento, para se semear nos meios onde os possíveis patogéneos associados à infeção possam desenvolver.

Os exsudados purulentos são semeados em meios de cultura como gelose de sangue, gelose de chocolate e UTI Clarity Agar, e posteriormente incubados a 37°C.

#### 6.7. Antibiograma e sistema de identificação bacteriana

O setor da Microbiologia está equipado com o aparelho MicroScan WalkAway 40 plus, que automatiza o procedimento manual para identificar espécies bacterianas e a respetiva suscetibilidade antimicrobiana.

A identificação bacteriana é obtida através da leitura de painéis com poços, onde se desenvolvem as reações colorimétricas dos testes bioquímicos convencionais. A utilização dos açúcares e a descarboxilação de aminoácidos pela bactéria causa uma alteração do pH e, consequentemente, gera uma mudança da cor do poço, sendo o fenómeno fotométrico detetado pelo leitor do aparelho. O antibiograma decorre em painéis de microtitulação, cujos poços se encontram revestidos com concentrações crescentes de antibióticos para determinar a Concentração Mínima Inibitória (MIC). O crescimento da colónia dá origem a uma turvação e, assim, permite determinar a MIC e descrever o perfil de suscetibilidade antibiótica da bactéria como suscetível, intermédio, ou resistente (44).

#### 6.8. Rastreio de drogas

Os testes de rastreio de drogas permitem detetar e monitorizar o abuso de fármacos/drogas. O laboratório Vale do Sousa utiliza os testes rápidos Nal von minden Drug-Screen, cuja metodologia imunoquímica permite a deteção qualitativa de diversas drogas e dos seus metabolitos na urina humana. Um método analítico secundário (GC-MS, LC-MS) deve ser utilizado em resultados positivos, de forma a garantir a precisão dos resultados.

Os testes Nal von minden Drug-Screen têm anticorpos conjugados com ouro na membrana da cassette. Com amostras negativas, os anticorpos mantêm-se livres e ligam-se à região T da membrana, dando origem a uma linha vermelha. O aparecimento da linha vermelha representa um resultado negativo. No caso de uma amostra positiva, os anticorpos ligam-se às substâncias alvo presentes na urina. Não ocorre formação da linha vermelha T e, por interpretação visual, determina-se a negatividade do teste (45).

Os kits nal von minden Drug-Screen incluem ainda testes de parâmetros de adulteração, de forma a detetar métodos de adulteração na hora de testagem. Os resultados são lidos por comparação do campo de reação com o cartão de cores fornecido.

### 7. Bioquímica

A Bioquímica Clínica estuda uma multitude de biomoléculas associadas com a funcionalidade dos órgãos. A partir das análises bioquímicas, é possível diagnosticar e monitorizar várias patologias humanas.

Os parâmetros bioquímicos são quantificados em amostras de soro, plasma ou urina. Para amostras sanguíneas, a escolha do tubo de colheita é condicionada pelo tipo de análises bioquímicas descritas na requisição médica. Os tubos de colheita são direcionados para o laboratório e integrados no sistema Apollo. As amostras devem estar devidamente identificadas. Certos aspetos podem implicar a rejeição da amostra, como a escolha inadequada do tubo, volume insuficiente de amostra, soro ou plasma hemolisado, ou amostras ictéricas ou lipémicas. Os tubos são centrifugados a 3500 rpm por 15 minutos para separação do soro.

O laboratório Vale do Sousa utiliza o instrumento analítico Alinity ci System para a determinação quantitativa dos parâmetros bioquímicos. O equipamento aplica os métodos de fotometria, potenciometria, e quimioluminiscência:

- Fotometria – Baseia-se na medição da luz detetada pelo fotodetector. A fonte luminosa emite um feixe de luz monocromática, que incide sobre a amostra. O analito absorve um comprimento de onda específico e transmite a restante luz. O fotodetector deteta a absorvância, que é posteriormente convertida em concentração de analito, pela lei de *Beer* (46).
- Potenciometria – Baseia-se na medição do potencial elétrico entre dois eletrodos. A diferença de potencial, gerada entre o eletrodo de referência e o eletrodo na amostra (analito iónico), é convertida em concentração de analito, pela equação de *Nernst* (46).
- Quimioluminescência – Corresponde à emissão de luz resultante de uma reação química. À amostra são adicionados anticorpos revestidos com marcadores quimioluminescentes. A emissão de quimioluminescência detetada pelo sensor digital é proporcional à concentração de analito (46).

O laboratório Vale do Sousa utiliza o equipamento Capillarys Protein(E) 6 para a determinação quantitativa das proteínas plasmáticas através do método de eletroforese capilar. As frações das proteínas plasmáticas são registadas graficamente no eletroferograma. Por interpretação visual dos padrões eletroforéticos das proteínas, são identificadas anomalias associadas a estados patológicos.

### 7.1. Parâmetros bioquímicos

Os painéis bioquímicos compreendem um grupo específico de parâmetros, doseados no soro ou urina, cuja interpretação permite ao profissional clínico realizar o diagnóstico de várias condições patológicas. Muitas patologias induzem alterações a um conjunto de parâmetros bioquímicos, nomeadamente a diabetes, risco aterosclerótico, alterações da função hepática, função renal, função tiroideia, anemias, pesquisa de marcadores tumorais, infeções virais, entre outras.

- Diabetes

Diabetes *mellitus* manifesta-se pela inação ou a produção inadequada da insulina – a hormona que estimula o aporte celular de glucose pelos GLUT4 – tendo como consequência níveis elevados da glucose sérica. A concentração de glucose sérica, em

jejum, é um indicador para um possível diagnóstico da diabetes. Para valores inferiores a 140 mg/dL em jejum, é realizada uma Prova de Tolerância à Glucose Oral, onde é doseada a concentração de glucose ao fim da 2ª hora após a ingestão de 75g de glucose. Adicionalmente, pacientes diabéticos doseiam a microalbumina na urina.

- Risco aterosclerótico

A formação da placa aterosclerótica, associada ao risco cardiovascular, é fortemente determinada pela carga de lípidos circulantes. Valores elevados de colesterol total, LDL (*low - density lipoprotein*) e triglicerídeos plasmáticos demonstram uma correlação significativa com a ocorrência de eventos cardiovasculares, enquanto o colesterol HDL (*high - density lipoprotein*) demonstra uma ação protetora contra a ocorrência de tais eventos. Assim, o doseamento dos parâmetros colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos plasmáticos são essenciais para monitorizar o risco de desenvolver doenças cardiovasculares.

- Hipotiroidismo e Hipertiroidismo

Hipotiroidismo e hipertiroidismo caracterizam-se pela disfuncionalidade da glândula tiroidea e consequente alteração do metabolismo energético basal. A tiroide produz as hormonas tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), responsáveis pelo controlo do metabolismo nos tecidos. T3 e T4 são estimuladas pela hormona hipofisária tireoestimulante (TSH). A quantificação das hormonas TSH, T3 livre e T4 livre avaliam a funcionalidade tiroidea (46).

- Anemias

A anemia é definida como um défice de oxigenação tecidual, mais comumente associado à baixa contagem de eritrócitos, ou do respetivo conteúdo hemoglobínico. A caracterização do estado anémico requer um estudo de vários marcadores bioquímicos, como o metabolismo do ferro (capacidade total da fixação do ferro (CTFF), % saturação da transferrina, concentração plasmática do ferro e da ferritina), concentração de vitamina B12, concentração de ácido fólico, concentração de haptoglobina e doseamento da hormona eritropoietina (46).

- Insuficiência renal

A insuficiência renal é caracterizada pela redução progressiva da taxa de filtração glomerular e detecção de proteinúria. A função renal é avaliada com os valores da *clearance* de creatinina, microalbuminúria, azoto ureico no sangue (BUN) e eletrólitos séricos (cálcio, cloro, fosforo, potássio, sódio) (46).

- Marcadores tumorais

Os marcadores tumorais são proteínas produzidas em grandes quantidades pelas células cancerígenas, doseadas no soro. Os marcadores podem ser utilizados para rastreio da população assintomática, prognóstico, estadiamento do cancro, e, fundamentalmente, para a monitorização da eficácia terapêutica anticancerígena (46).

**Tabela 3.** Marcadores tumorais. [Adaptado de (46)]

|                                       |                                                                                                          |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Antigénio prostático específico (PSA) | Marcador tumoral da próstata                                                                             |
| Antigénio carcinoembrionário (CEA)    | Marcador tumoral colorretal, pulmonar, mamário, hepático, pancreático e da bexiga (baixa especificidade) |
| Antigénio cancerígeno 125 (CA125)     | Marcador tumoral do ovário                                                                               |
| Antigénio cancerígeno 15-3 (CA 15-3)  | Marcador tumoral da mama e do ovário                                                                     |
| Alfa-fetoproteína (AFP)               | Marcador tumoral hepático, ovárico e testicular                                                          |

- Mieloma múltiplo

Os padrões eletroforéticos permitem avaliar a distribuição quantitativa da albumina e das globulinas alfa, beta e gama. No caso do mieloma múltiplo (MM), o interesse clínico focaliza-se particularmente na fração das gamaglobulinas, região para onde migram as imunoglobulinas tipo IgG de origem maligna. O mieloma múltiplo resulta duma neoplasia da linhagem das células B, responsável pela proliferação de células plasmáticas anómalas, que produzem a proteína M (47). Na eletroforese, a proteína M aparece como um pico íngreme na região gama, designada “espícula M” ou paraproteína. O estudo do MM é complementado pela eletroforese das proteínas de Bence Jones (cadeias leves kappa/lambda livres) na urina.

- Hepatites virais

A hepatite aguda é caracterizada pela elevação dos níveis séricos das enzimas hepáticas, alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), perante a desintegração dos hepatócitos, causada pelas partículas infecciosas do vírus. O diagnóstico das hepatites víricas é feito através da determinação do antígeno HBS (hepatite B), anticorpos anti- HCV (hepatite C), e anticorpos anti-HAV IgM e IgG (hepatite A) (46).

## 8. **Imunologia**

A área da imunologia estuda as várias desordens do sistema imunológico, através da caracterização dos componentes químicos, proteicos e celulares, que integram o complexo sistema imunitário. Em particular, são estudadas as alergias, desordens autoimunes e infeções.

A alergia é a manifestação clínica das reações de hipersensibilidade, após exposição ao alérgeno. Os anticorpos IgE, sensibilizados por compostos exógenos comuns, desencadeiam a desgranulação dos mastócitos e basófilos e a libertação de mediadores imunoquímicos (histamina). A manifestação alérgica inclui bronquiocãostricção, permeabilidade vascular e choque anafilático, potencialmente fatal (48). Os alérgenos mais comuns são encontrados em produtos alimentícios, pólen, animais ou vegetação. Já as desordens autoimunes resultam do colapso da tolerância imunológica, mediada pela produção de anticorpos IgM e IgG, direcionados contra autoantígenos moleculares, celulares ou tecidulares. O diagnóstico clínico das condições alérgicas e autoimunes é feito através da quantificação dos anticorpos IgE e IgG (49).

O laboratório Vale do Sousa dispõe do autoanalisador ImmunoCAP phadia 250, que utiliza metodologias tipo FEIA (fluoroenzimoimunoensaio) para rastreio e diagnóstico clínico das alergias e desordens autoimunes.

- ImmunoCAP Specific IgE – A tecnologia ImmunoCAP Specific IgE quantifica os anticorpos IgE específicos ao alérgeno, no soro ou plasma sanguíneo, para o diagnóstico das manifestações alérgicas acionadas por imunoglobulinas tipo IgE. Os alérgenos testados são de origem alimentar, vegetal ou animal. Após introdução da amostra, o alérgeno covalentemente ligado ao ImmunoCAP reage com o anticorpo IgE específico da amostra. São adicionados anticorpos anti-IgE (Ac), marcados com uma enzima e o respetivo substrato enzimático. O produto enzimático emite fluorescência, sendo a fluorescência emitida

diretamente proporcional à quantidade de IgE. Pela curva de calibração, a resposta fluorescente é convertida em concentração de IgE (50).

- EliA – A tecnologia EliA permite a quantificação de autoanticorpos tipo IgG direcionados contra proteínas humanas, no soro ou plasma sanguíneo, para o diagnóstico clínico das desordens autoimunes. Os poços do instrumento são revestidos com a proteína alvo. Os autoanticorpos IgG presentes no soro/plasma ligam aos antígenos proteicos. São adicionados anticorpos anti-IgG marcados com uma enzima e o respectivo substrato enzimático. O produto enzimático emite radiação fluorescente, sendo a fluorescência emitida diretamente proporcional à quantidade de IgG. A resposta fluorescente é posteriormente convertida em concentração de IgG (50).

### 8.1. Testes serológicos

Os testes serológicos manuais de aglutinação são utilizados para o diagnóstico de algumas patologias infecciosas, como sífilis, salmonelose e brucelose. Para o efeito, são utilizadas amostras de soro ou plasma sanguíneo. Uma amostra seropositiva forma imunocomplexos, quando adicionada à suspensão de antígenos bacterianos, dando origem a uma aglutinação. A positividade do teste é determinada pela formação de aglutinados na lâmina em agitação.

#### 8.1.1. Sífilis

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível, causada pelo *Treponema pallidum*, uma espiroqueta que não cresce em meios de cultura ou em cultura de tecidos. A infecção sífilítica induz a produção de anticorpos não-treponémicos (reaginas) e anticorpos anti-treponémicos específicos (51). O diagnóstico clínico e a monitorização da infecção é realizado através dos testes serológicos VDRL (*venereal disease research laboratory*) e TPHA (*Treponema pallidum haemagglutination*).

O VDRL é um teste de aglutinação em lâmina, útil para a determinação qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos não-treponémicos IgM e IgG, doseados na doença ativa. Normalmente, a seroconversão ocorre na 3ª semana após a infecção com *T. pallidum*, mas pode ocorrer até à 6ª semana. Consequentemente, falsos negativos serão obtidos em

pacientes recentemente infetados com sífilis. Adicionalmente, falsos positivos do teste não-treponémico terão sido descritos em pacientes com infecções sistêmicas, nomeadamente tuberculose, lepra, hepatite e endocardites (52). Devido à não especificidade do teste VDRL, resultados positivos devem ser confirmados pelo teste específico TPHA.

O TPHA é um teste treponémico, executado para a determinação e titulação dos níveis de anticorpos específicos ao antígeno treponémico. As amostras seropositivas determinam a formação de um padrão característico de hemaglutinação, no fundo dos poços da placa de microtitulação (51). Resultados falsos-positivos podem ocorrer devido a outras infecções ou doenças inflamatórias, nomeadamente a lúpus eritematoso sistémico (52).

#### 8.1.2. Salmonelose e Brucelose

A Salmonelose é a manifestação clínica da infeção pela *Salmonella*, caracterizada por gastroenterite diarreica e doença febril entérica (febre tifoide). O diagnóstico clínico baseia-se na caracterização do perfil antigénico, através de testes serológicos contra os antígenos somático (O) e flagelar (H) da bactéria salmonela (53).

A Brucelose é uma doença febril aguda, desencadeada da infeção pela bactéria *Brucella*. O diagnóstico é definido pela caracterização antigénica da bactéria, com testes serológicos contra os antígenos de superfície *abortus* (A) e *melitensis* (M). O serodiagnóstico de WRIGHT permite efetuar o diagnóstico serológico das formas agudas de brucelose. Este teste quantitativo torna-se positivo muito precocemente, a partir do 10º ou 12º dia, na forma aguda da brucelose. Por interpretação visual do fenómeno de aglutinação, determina-se a positividade da amostra.

### 9. Biologia molecular

A área da biologia molecular explora o processo de replicação, transcrição e translação do material genético (RNA/DNA) e respetivos reguladores e intervenientes bioquímicos, através de técnicas laboratoriais de genética molecular e bioinformática.

A emergência e globalização do novo coronavírus SARS-CoV-2 determinou um novo rumo ao laboratório clínico, particularmente à área da biologia molecular, que se

tornou exclusivamente dedicada à contenção e mitigação da pandemia COVID-19, através da disponibilização de testes rápidos diagnósticos de SARS-CoV-2 à comunidade.

SARSCoV-2 foi identificado como o agente etiológico da doença do coronavírus de 2019 (COVID-19). A doença afeta desproporcionadamente a população idosa e imunossuprimida, podendo progredir para insuficiência respiratória grave. Fatores como o elevado índice de transmissibilidade via aerossóis, longo período de incubação (14 dias) e infeções assintomáticas, dificultam o rastreamento das cadeias de transmissão e a contenção da infeção COVID. Face à morbilidade e mortalidade associada à doença COVID, surge a necessidade de se implementar medidas de distanciamento social e desenvolver métodos específicos de deteção SARS-CoV-2 (54).

Atualmente, o método de referência para o diagnóstico laboratorial de infeções COVID-19 é o *Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (rRT-PCR). Outros métodos, como o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para testes serológicos, são apenas indicados para complementar o estudo da infeção por SARS-CoV-2, reportar a ocorrência de infeções passadas, direcionar farmacoterapias ou para fins estatísticos (55).

As amostras de exsudado nasofaríngeo são colhidas com a zaragatoa e acondicionadas num sistema de embalagem tripla, designado para o transporte de espécimen infecciosos. Ao contentor primário é adicionado um meio de transporte viral, para inativar o vírus e prevenir a contaminação dos técnicos aquando o manuseio das amostras. A inativação viral é mediada pela ação de agentes surfactantes, que solubilizam a membrana celular das partículas virais. Adicionalmente, o meio é enriquecido com agentes protetores, que preservam a integridade do RNA viral. As amostras são conservadas, entre 2°C a 8°C, e encaminhadas para o laboratório.

No laboratório, os técnicos avaliam o acondicionamento dos produtos nasofaríngeos. As amostras devem estar corretamente identificadas e com a informação relativa ao doente. É preenchido um inquérito ao doente, onde se registam sintomas e contactos com pessoas infetadas com SARS-CoV-2. Aprovados todos os requisitos, as amostras são integradas no sistema informático Apollo e seguem para a fase analítica.

### 9.1. Extração e purificação do RNA

O RNA genómico das partículas virais, contidas no exsudado nasofaríngeo, é isolado e purificado pelo equipamento de extração RNA/DNA, BIOER. A metodologia do

equipamento fundamenta-se nas propriedades físicas das micropartículas magnéticas utilizadas, que ligam aos ácidos nucleicos expostos, em condições de pH favoráveis.

Na lâmina de fluxo laminar, os tubos de amostra são vortexados e o respetivo conteúdo transferido para os poços na placa de extração. A placa é introduzida no extrator e inicia-se a corrida. As partículas virais são lisadas, libertando o conteúdo genómico do vírus, que adere às micropartículas magnéticas. As nucleases são inativadas e eliminadas, junto com outros detritos celulares. Por fim, o RNA viral isolado é eluído nos respetivos poços.

## 9.2. *Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction*

Dentro do genoma SARS, três genes foram descritos como altamente conservados: o gene *RdRp* (enzima RNA polimerase), gene *E* (proteína do envelope) e gene *N* (proteína da nucleocápside). O diagnóstico da infeção COVID-19 baseia-se na deteção qualitativa destas três regiões genómicas, através do método molecular rRT-PCR (54).

Antes de se iniciar o PCR, é preparada a *master mix* com o kit comercial GeneFinder™ COVID-19, contendo todos os reagentes necessários à reação de polimerização: transcriptase reversa, polimerase, *primers forward* e *reverse* específicos aos genes SARS, dNTPs, sondas fluorescentes e controlos positivo e negativo. A *master mix* e o RNA, extraído e purificado, são adicionados no termociclador CFX96, onde são programadas as corridas PCR (56).

Essencialmente, o método consiste na transcrição reversa do RNA em DNA complementar e posterior amplificação em ciclos programados. O termociclador executa 45 ciclos de amplificação, produzindo  $2^{45}$  cópias das sequências nucleotídicas dos genes *RdRp*, *E* e *N*. Sondas complementares aos genes SARS emitem fluorescência, aquando o processo de amplificação. A fluorescência emitida é diretamente proporcional ao número de cópias *RdRp*, *E* e *N*. A positividade das amostras é determinada pela geração de três gráficos sigmóides, correspondentes aos genes SARS.

## **10. Conclusão**

A oportunidade de realizar um estágio profissional integrado ao Mestrado de Análises Clínicas foi uma experiência profundamente enriquecedora para a minha formação académica, profissional e pessoal. O estágio profissional proporcionou uma oportunidade única para observar e participar nas diversas atividades laboratoriais que decorrem no dia-a-dia de um laboratório de análises clínicas, onde tive o privilégio de ser constantemente acompanhada por profissionais especializados e altamente experientes, que tiveram a gentileza de me transmitirem os seus conhecimentos e o fascínio pelo mundo das análises clínicas.

## Referências

1. Robinson AT. Pathology-The Beginnings of Laboratory Medicine. *Lab Med.* 2021;52(4):e66-e82.
2. Plebani M. Clinical laboratories: production industry or medical services? *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(7):995-1004.
3. Plebani M, Lippi G. Personalized (laboratory) medicine: a bridge to the future. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(4):703-6.
4. Naidoo MLBJELP. Clinical Laboratory 2022 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535358/>].
5. Sojit Tomo SK, Karthick Dharmalingam, Dharmveer Yadav, Praveen Sharma. The Clinical Laboratory: A Key Player in Diagnosis and Management of COVID-19. *EJIFCC.* 2020;31(4):326–46.
6. Mitsuru Yanai YU, Michiko Yagoshi, Kazunari Kumasaka. [Interpretation of the results of blood culture and interventional role by clinical laboratory physicians]. *Rinsho Byori.* 2006;54(10):1059-65.
7. Badrick T. Integrating quality control and external quality assurance. *Clin Biochem.* 2021;95:15-27.
8. Matthew R. Pincus MSL, Jay L. Bock. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* 24 ed.
9. Magnette A, Chatelain M, Chatelain B, Ten Cate H, Mullier F. Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thromb J.* 2016;14:49.
10. Madhumita Jagannathan-Bogdan LIZ. Hematopoiesis. *Development.* 2012;140(12):2463-7.
11. A. Victor Hoffbrand PAHM. *Essential Haematology.* 5 ed: Wiley -BlackWell.
12. Celkan TT. What does a hemogram say to us? *Turk Pediatri Ars.* 2020;55(2):103-16.
13. Gulati G, Song J, Florea AD, Gong J. Purpose and criteria for blood smear scan, blood smear examination, and blood smear review. *Ann Lab Med.* 2013;33(1):1-7.
14. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2017;37(2):163-76.
15. Bula do equipamento Sysmex XN
16. Robier C. Platelet morphology. *Journal of Laboratory Medicine.* 2020;44(5):231-9.
17. Lardinois B, Favresse J, Chatelain B, Lippi G, Mullier F. Pseudothrombocytopenia-A Review on Causes, Occurrence and Clinical Implications. *J Clin Med.* 2021;10(4).
18. Moreno A, Menke D. Assessment of platelet numbers and morphology in the peripheral blood smear. *Clin Lab Med.* 2002;22(1):193-213, vii.
19. Winter WE, Flax SD, Harris NS. Coagulation Testing in the Core Laboratory. *Lab Med.* 2017;48(4):295-313.
20. Grover SP, Mackman N. Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(3):331-8.
21. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth.* 2014;58(5):515-23.
22. Raheel Chaudhry SMU, Hani M. Babiker. *Physiology, Coagulation Pathways* 2022 [updated 2022 Dec 19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482253/>].

23. Bula do equipamento STA Compact Max.
24. Hofmann B, Schröder C, Geisler N, Stamminger G. Evaluation and implementation of the STA R Max® hemostaseology analyzer in the central laboratory of a major hospital. *LaboratoriumsMedizin*. 2017;41(s1).
25. Gupta KTV. Erythrocyte Sedimentation Rate 2023 [updated April 23, 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557485/>.
26. Heylen O, Van Neyghem S, Exterbille S, Wehlou C, Gorus F, Weets I. Evaluation of the Sebia CAPILLARYS 2 flex piercing for the measurement of HbA(1c) on venous and capillary blood samples. *Am J Clin Pathol*. 2014;141(6):867-77.
27. Bula do equipamento CAPILLARYS Hb A1c.
28. Manual de instrução DG Gel Coombs.
29. Jialal DAQMI. Urinalysis [updated May 1, 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557685/>.
30. Karah N, Rafei R, Elamin W, Ghazy A, Abbara A, Hamze M, et al. Guideline for Urine Culture and Biochemical Identification of Bacterial Urinary Pathogens in Low-Resource Settings. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(10).
31. H Kenneth Walker WDH, J Willis Hurst. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. Boston: Butterworths; 1990.
32. Bula meio de cultura Brilliance UTI Clarity Agar ThermoFisher SCIENTIFIC.
33. Adams GW. Routine Examination of the Feces: With Special Reference to Parasites. *J Natl Med Assoc*. 1923;15(2):101–2.
34. MacPherson DW. Enteric parasitology. Interpreting laboratory reports. *Can Fam Physician*. 1995;41:1729-31.
35. Christopher Giuliano M, Chandni R. Patel, Pramodini B. Kale-Pradhan. *A Guide to Bacterial Culture Identification And Results Interpretation*. P T. 2019;44(4):192–200.
36. Lee JY, Cho SY, Hwang HSH, Ryu JY, Lee J, Song ID, et al. Diagnostic yield of stool culture and predictive factors for positive culture in patients with diarrheal illness. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(30):e7641.
37. Bulas meios de cultura XLD ThermoFisher SCIENTIFIC.
38. Humphries RM, Linscott AJ. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Diagnosis of Bacterial Gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(1):3-31.
39. Manual de instrução Kit NADAL FOB.
40. Frobenius W, Bogdan C. Diagnostic Value of Vaginal Discharge, Wet Mount and Vaginal pH - An Update on the Basics of Gynecologic Infectiology. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2015;75(4):355-66.
41. Bula meio de cultura MYCO WELL D-ONE.
42. Isabelle Suárez SMF, Stefan Kröger, Jessica Rademacher, Gerd Fätkenheuer, Jan Rybníker. The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Dtsch Arztebl Int*. 2019;116(43):729-35.
43. Josée Rioux JE, Lauren Bresee, Adrian Abu-Ulba, Stephen Yu, Deonne Dersch-Mills, Ben Wilson. Nasal-Swab Results for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Associated Infections. *Can J Hosp Pharm*. 2017;70(2).
44. Bula equipamento MicroScan WalkAway 40 plus.

45. Manual de instrução kits nal von minden Drug-Screen.
46. Bula do equipamento Alinity ci System
47. Tripathy S. The role of serum protein electrophoresis in the detection of multiple myeloma: an experience of a corporate hospital. *J Clin Diagn Res.* 2012;6(9):1458-61.
48. Sanjuan MA, Sagar D, Kolbeck R. Role of IgE in autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(6):1651-61.
49. D A Smith DRG. Introduction to immunology and autoimmunity. *Environ Health Perspect.* 1999;107:661-5.
50. Sanchez-Borges M, Martin BL, Muraro AM, Wood RA, Agache IO, Ansotegui IJ, et al. The importance of allergic disease in public health: an iCAALL statement. *World Allergy Organ J.* 2018;11(1):8.
51. Manual de instrução TPHA Thermofisher.
52. Henao-Martinez AF, Johnson SC. Diagnostic tests for syphilis: New tests and new algorithms. *Neurol Clin Pract.* 2014;4(2):114-22.
53. G.G. Alton JRLF. *Brucella. Medical Microbiology.* 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch: Baron S, editor; 1996.
54. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano.* 2020;14(4):3822-35.
55. Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, Oleynikov MD, Blomberg WR, Bajwa N, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nat Mater.* 2021;20(5):593-605.
56. Manual de instrução GeneFinder™ COVID-19 Plus RealAmp Kit.