

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



SÍNDROME DE LEIGH: MUTAÇÕES SUBJACENTES E DIAGNÓSTICO

Mafalda Matias Gomes

Relatório de estágio orientado pela Professora Doutora
Isabel Maria Antolin Martins de Carvalho e coorientado pelo Doutor Marco
Alexandre Mateus Prazeres Marques

Mestrado de Análises Clínicas

2025

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



SÍNDROME DE LEIGH: MUTAÇÕES SUBJACENTES E DIAGNÓSTICO

Mafalda Matias Gomes

Relatório de estágio orientado pela Professora Doutora
Isabel Maria Antolin Martins de Carvalho e coorientado pelo Doutor Marco
Alexandre Mateus Prazeres Marques

Mestrado de Análises Clínicas

2025

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, a professora Isabel Rivera, pela delicadeza, amabilidade e apoio incansável que me deu na concretização desta dissertação.

Em segundo, quero também expressar o meu agradecimento ao Dr. Marco Marques por me ter proporcionado a oportunidade de poder ter realizado o estágio no Laboratório Affidea. A todos os técnicos e especialistas no Laboratório Affidea, agradeço a paciência, a disponibilidade e todos os conhecimentos que me transmitiram durante os meses de estágio. A vossa simpatia e gentileza fez-me sentir muito bem recebida e parte integrante da equipa.

Por último, quero agradecer aos meus pais e ao meu irmão por todo o apoio que me deram ao longo da minha vida, por acreditarem sempre em mim e por me darem a liberdade de poder seguir o meu próprio caminho.

Declaração

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Conduta e de Boas Práticas da Universidade de Lisboa. Mais concretamente, afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude académica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo na íntegra as responsabilidades da autoria.

Resumo

O presente trabalho diz respeito à componente final de avaliação do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Estruturalmente, este trabalho encontra-se dividido em duas partes. A primeira parte refere-se ao relatório de estágio curricular realizado no Laboratório Affidea, enquanto a segunda parte consiste na monografia teórica.

No relatório de estágio são descritas as atividades realizadas durante o estágio no Laboratório Affidea. As áreas abordadas neste relatório são a Hematologia, a Microbiologia, a Imunologia, a Bioquímica e a Genética Molecular Humana, sendo descritas as principais metodologias e equipamentos utilizados, assim como os parâmetros analíticos determinados, realçando o seu interesse e significado clínico.

A monografia debruça-se sobre a Síndrome de Leigh, também denominada de encefalomielopatia subaguda necrotizante, que é uma doença mitocondrial neurodegenerativa que se manifesta tipicamente durante a infância. Clinicamente, a síndrome de Leigh é bastante heterogénea, possuindo, porém, algumas manifestações mais prevalentes como ataxia, atraso no desenvolvimento psicomotor, hipotonia axial e perturbações do movimento. Estas apresentações são causadas pelas características lesões necróticas focais, simétricas e bilaterais que ocorrem predominantemente nos gânglios da base, tálamo e tronco cerebral. A síndrome de Leigh pode ser causada por mutações em mais de 75 genes diferentes que codificam para proteínas envolvidas na produção de energia, comprometendo o normal funcionamento deste processo essencial das células. Tanto mutações em genes nucleares, assim como em genes presentes no genoma mitocondrial podem causar a síndrome de Leigh. Assim, os padrões de hereditariedade observados nesta doença podem ser autossómico recessivo, autossómico dominante, mitocondrial ou matrilinear, ligado ao cromossoma X, e *de novo*. Sendo uma doença rara, com uma elevada heterogeneidade clínica e genética, o seu diagnóstico carece de normas standardizadas, o que a torna difícil de ser diagnosticada e de se estabelecerem associações entre as mutações e os fenótipos apresentados. Com o surgimento dos métodos de sequenciação de nova geração (NGS), deu-se uma revolução na abordagem do diagnóstico, permitindo aumentar a capacidade de diagnóstico em conjugação com os métodos tradicionais, bem como descobrir novas mutações patogénicas.

Palavras-chave: Síndrome de Leigh, doenças mitocondriais, diagnóstico

Abstract

The present work is the final evaluation element pertaining to the Masters in Laboratorial Medicine of the Faculty of Pharmacy of the University of Lisbon. Structurally speaking, this work is divided by two main sections. The first sections refers to the report of the curricular internship that took place in the Affidea Laboratory, while the second section is the theoretical monography.

In the curricular internship report is described the activities developed during the internship in the Affidea Laboratory. The encompassed areas in this report are Hematology, Microbiology, Immunology, Clinical Biochemistry and Human Molecular Genetics. For each area is described the main methodologies and equipment used, as well as, the analytical parameters determined, emphasizing their clinical interest and significance.

The monography relates to Leigh Syndrome, also known as subacute necrotizing encephalomyelopathy, which is a neurodegenerative mitochondrial disease that often manifests in infancy or early childhood. Clinically speaking, Leigh syndrome is highly heterogeneous, although it encompasses some typical clinical presentations such as ataxia, development delay, hypotonia, and motor weakness. These presentations are caused by the characteristic symmetrical bilateral necrotic lesions in basal ganglia, thalamus and brainstem. Pathogenic mutations described in more than 75 disease genes can lead to Leigh syndrome. Most of these mutations occur in genes that encode proteins involved in oxidative phosphorylation, leading to defects in this essential cellular process. Leigh Syndrome mutations can affect genes in both the nuclear and mitochondrial genomes. Thus, this disease is associated with autosomal and X-linked patterns of inheritance for nDNA mutations and with a maternal pattern of inheritance for mutations in the mtDNA; additionally, *de novo* mutations can appear. Since Leigh syndrome is a rare disease, clinically and genetically heterogeneous, diagnosis is challenging and lacks standardized procedures. This leads to an inherent difficulty in diagnosing it and in establishing associations between the phenotype and the mutations causing it. With the rise of next-generation sequencing techniques (NGS), diagnosis approaches have shifted, contributing to a better diagnostic capacity in conjunction with other traditional methods and allowing the discovery of new pathogenic mutations.

Key-words: Leigh Syndrome, mitochondrial diseases, diagnosis

Índice

Índice de figuras.....	8
Índice de tabelas.....	10
Siglas e Abreviaturas.....	11
Parte I.....	16
1. Introdução.....	17
2. Core Laboratorial.....	17
2.1. Equipamentos Automáticos e Metodologias Utilizadas.....	18
2.2. Rotina Diária.....	20
3. Análises Realizadas no Core Laboratorial.....	21
3.1. Proteínas.....	21
3.2. Metabolismo dos Hidratos de Carbono.....	26
3.3. Metabolismo Lipídico.....	28
3.4. Função renal.....	30
3.5. Eletrólitos.....	31
3.6. Função Pancreática.....	34
3.7. Função Hepática.....	34
3.8. Função Cardíaca.....	36
3.9. Função Tiroideia.....	38
3.10. Metabolismo fosfo-cálcio.....	39
3.11. Marcadores de Anemia.....	41
3.12. Marcadores Tumorais.....	44
3.13. Sorologia Infeciosa.....	46
3.14. Radioimunoensaio (RIA).....	52
3.15. Testes Rápidos Imunocromatográficos.....	53
3.16. Testes de aglutinação.....	54
3.17. Análise da Urina Tipo II.....	56
4. Hematologia.....	61
4.1. Hemograma.....	62
4.1.1. Analisador Hematológico Yumizen H2500/H1500 Horiba Medical.....	62
4.1.2. Eritrograma.....	65
4.1.3. Leucograma.....	67
4.1.4. Plaquetograma.....	68
4.1.5. Estudo Morfológico do Sangue Periférico – Esfregaço Sanguíneo.....	69
4.2. Velocidade de sedimentação (VS).....	70

4.3. Estudo das hemoglobinopatias	71
4.3.1. Hemoglobina glicada (HbA1c).....	72
4.4. Estudo da Hemóstase.....	73
4.4.1. Tempo de Protrombina (TP).....	74
4.4.2. Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT)	75
4.4.3. Fibrinogénio	75
4.4.4. Antitrombina III (AT-III).....	76
4.4.5. D-Dímeros.....	76
4.5. Imunohematologia	76
5. Microbiologia	80
5.1. Exame Cultural.....	80
5.2. Exame microscópico	84
5.2.1. Exame a fresco.....	85
5.2.2. Exame após coloração	85
5.3. Testes de Identificação de Microrganismos - Sistema automatizado VITEK ®2	85
5.4. Teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA)	87
5.4.1. Método de microdiluição - VITEK ®2	87
5.4.2. Antibiograma manual	88
5.5. Urinas Assépticas	89
5.6. Exsudado vaginal.....	92
5.6.1. Pesquisa de <i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B)	93
5.7. Exsudado uretral	94
5.8. Pesquisa de micoplasmas urogenitais.....	94
5.9. Exsudado faríngeo	95
5.10. Exsudado nasal	98
5.11. Expetorações.....	98
5.12. Exsudados purulentos de feridas	98
5.13. Hemocultura	99
5.14. Fezes	100
5.14.1. Coprocultura.....	100
5.14.2. Exame parasitológico das fezes	101
5.14.3. Testes rápidos de imunocromatografia de fluxo lateral.....	102
6. Biologia Molecular	106
6.1. Detecção do alelo HLA-B227	106

6.2. Diagnóstico molecular de doenças sexualmente transmissíveis	108
7. Controlo da Qualidade	110
7.1. Controlo da Qualidade Interno (CQI)	110
7.2. Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)	111
Parte II	112
1. Introdução	113
1.1. Papel das mitocôndrias na célula - estrutura e função.....	113
1.2. Genoma mitocondrial e genoma nuclear diferenças e como interagem	115
2. Doenças mitocondriais	118
2.1. Doenças causadas por mutações no mtDNA.....	119
2.2. Doenças causadas por mutações no nDNA	120
3 - Síndrome de Leigh	122
3.1 - Apresentação clínica	123
3.2 - Genética da Síndrome de Leigh	125
3.2.1 – Mutações no complexo I.....	125
3.2.2 – Mutações do complexo II	128
3.2.3 – Mutações do complexo III.....	129
3.2.4. Mutações do complexo IV	131
3.2.5. Mutações do complexo V.....	132
3.2.6. Mutações do complexo piruvato desidrogenase (PDHc).....	134
4. Diagnóstico da Síndrome de Leigh	135
4.1. Perspetiva geral do diagnóstico das doenças mitocondriais.....	135
4.2. Exame clínico e história familiar.....	136
4.3. Investigação bioquímica	137
4.4. Diagnóstico imagiológico	138
4.5. Histoquímica do músculo e medição da atividade das enzimas da cadeia respiratória	139
4.6. Diagnóstico genético	141
5. Conclusão	146
6. Bibliografia.....	147

Índice de figuras

Figura 1. Módulo de entrada e saída de amostras (IOM) do sistema Aptio® Automation da Siemens Healthineers.	18
Figura 2. Linha de aparelhos Atellica® composta por um aparelho CH 930 e dois aparelhos IM 1600.	19
Figura 3. Linha de aparelhos Atellica® composta por dois aparelhos CH930 e um aparelho IM1600.	19
Figura 4. Equipamento CAPILLARYS 3 OCTA Sebia	24
Figura 5. Perfil eletroforético normal de proteínas.....	24
Figura 6. HYDRASYS 2 SCAN FOCUSING Sebia.....	26
Figura 7. Algoritmo de interpretação dos resultados	39
Figura 8. Interpretação dos resultados da serologia para Toxoplasmose, Rubéola e CMV.....	50
Figura 9. Resultado da diluição do RPR.....	51
Figura 10. Resultados Teste de TPHA	52
Figura 11. Cassete de deteção simultânea de canabinóides (THC), dos opiáceos (MOR) e da cocaína (COC).....	54
Figura 12. Monoteste reação positiva.	55
Figura 13. Equipamento Atellica® 1500 Automated Urinalysis System.....	57
Figura 14. Histogramas de distribuição de glóbulos vermelhos e plaquetas.	63
Figura 15. Representação do sistema DHSS – Horiba Medical.	65
Figura 16. Matriz LMNE. L	65
Figura 17. Analisador automático Yumizen HI500 com sistema Yumizen SPS.....	69
Figura 18. Representação esquemática de um esfregaço de sangue periférico.....	69
Figura 19. Analisador automático Ves-Matic Cube 30 Touch.....	71
Figura 20. Equipamento HLC-723G8 (G8)	72
Figura 21. Equipamento HLC-723(G11).	73
Figura 22. Analisador automático de coagulação Siemens BCS® XP	74
Figura 23. Analisador automático WA Diana da Grifols	77
Figura 24. Cassete de colunas de confirmação do grupo sanguíneo ABO e Rh (D). DG Gel® Confirm P.	78
Figura 25. Padrão de leitura dos resultados possíveis	78
Figura 26. Técnicas de sementeira por quadrantes e por estrias	84
Figura 27. Equipamento VITEK® 2 XL.....	86
Figura 28. Diferentes colónias de bactérias em meio CHROMID® CPS® Elite.	90
Figura 29. Placas com crescimento microbiológico de exsudado vaginal.....	93
Figura 30. Esfregaço de exsudado vaginal com coloração de Gram (400X).....	93
Figura 31. Colónias de Streptococcus agalactiae em meio STRB.....	94
Figura 32. Galeria de identificação Mycoplasma IST3	95
Figura 33. Colónias de Staplylococcus aureus em CNA	97
Figura 34. Teste de Identificação Rápida de Staphylococcus aureus. Na esquerda: resultado positivo, há aglutinação Na direita: resultado negativo, ausência de aglutinação.....	97
Figura 35. Teste Clearview Exact Strep A Cassette	97
Figura 36. Frascos de hemocultura.....	99
Figura 37. Sensor colorimétrico dos frascos de hemocultura	100

Figura 38. Procedimento de utilização do concentrador de parasitas MINI PARASEP®	102
Figura 39. Testes rápidos de imunocromatografia de fluxo lateral.....	103
Figura 40. Interpretação dos resultados de Giardia+ MonlabTest®. Adaptado de: (128).	103
Figura 41. Interpretação dos resultados Biotical E. coli O157:H7 card.	104
Figura 42. Heliprobe®Analyzer	105
Figura 43. Equipamento automático de extração de ácidos nucleicos GenoXtract® da Hain.....	107
Figura 44. Termociclador FluoroCycler® 12 da Hain	107
Figura 45. Interpretação dos resultados de PCR para detecção do alelo HLA-B27.	108
Figura 46. Representação esquemática da cadeia transportadora de elétrons	114
Figura 47. Genoma Mitocondrial com as principais mutações que causam doenças mitocondriais	116
Figura 48. Southern blot de mtDNA linearizado demonstrando no lado esquerdo múltiplas deleções do mtDNA, e no lado direito uma depleção do mtDNA	122
Figura 49. Manifestações clínicas da Síndrome de Leigh.....	124
Figura 50. Algoritmo de diagnóstico para a síndrome de Leigh	136
Figura 51. Imagens de ressonância magnética T2.....	138
Figura 52. Cortes histológicos de músculo esquelético com anomalias patológicas características das doenças mitocondriais	140
Figura 53. Comparação entre a abordagem tradicional de diagnóstico das doenças mitocondriais e as novas abordagens focadas na genética.	142

Índice de tabelas

Tabela 1. Frações proteicas e respectivas proteínas constituintes	25
Tabela 2. Classificação dos estádios da doença renal	30
Tabela 3. Marcadores tumorais	45
Tabela 4. Interpretação dos marcadores serológicos do HBV	47
Tabela 5. Critérios de interpretação para o HIV-1)	48
Tabela 6. Critérios de interpretação para o HIV-2.	48
Tabela 7. Parâmetros determinados por RIA e amostras utilizadas	52
Tabela 8. Parâmetros analisados no exame físico e químico do sedimento urinário com o respectivo significado clínico.....	57
Tabela 9. Valores de referencia da formula leucocitária em indivíduos adultos.....	68
Tabela 10. Interpretação dos resultados do sistema ABO.	79
Tabela 11. Interpretação dos resultados sistema Rh (antígeno D).....	79
Tabela 12. Principais meios de cultura utilizados no Laboratório Affidea.....	81
Tabela 13. Cartas de identificação usadas no Laboratório Affidea.....	86
Tabela 14. Cartas VITEK ®2 AST.....	87
Tabela 15. Principais diferenças entre o genoma mitocondrial e o genoma nuclear. ..	117
Tabela 16. Genes nos quais mutações causam síndrome de Leigh.....	126

Siglas e Abreviaturas

AAT	α 1-Antitripsina
AE	<i>Acridine ester</i> (Éster de acridínio)
ADP	Adenosina difosfato
AFP	α -Fetoproteína
ALP	<i>Alcaline phosphatase</i> (Fosfatase alcalina)
ALT	Alanina aminotransferase
AHG	Antiglobulina Humana Polivalente
Apo A1	Apolipoproteína A
Apo B100	Apolipoproteína B
APTT	<i>Activated Partial Thromboplastin Time</i> (Tempo de tromboplastina parcial ativada)
AST	Aspartato aminotransferase
AT-III	Antitrombina III
ATP	Adenosina trifosfato
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BN-PAGE	<i>Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
CA 15.3	Antigénio carbohidratado 15.3
CA 19.9	Antigénio carbohidratado 19.9
CA 125	Antigénio carbohidratado 125
CEA	Antigénio carcinoembrionário
cHDL	Colesterol HDL
CHGM	Concentração de Hemoglobina Globular Média
CK	Creatina Cinase
cLDL	Colesterol LDL
CMI	Concentrações Mínimas Inibitórias
CMV	Citomegalovírus
COX	Citocromo oxidase
CR	Cadeia respiratória

CRP	C-Reactive Protein (Proteína C Reactiva)
DCV	Doença Cardiovascular
DHSS	<i>Double Hydrodynamic Sequential System</i>
dNTPs	Desoxirribonucleótidos fosfatados
EAM	Enfarte agudo do miocárdio
EBV	<i>Epstein-Barr virus</i> (Vírus Epstein–Barr)
EDTA	<i>Ethyleneamine Tetraacetic Acid</i> (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)
FADH₂	Dinucleótido de flavina e adenina reduzido
FT3	Triiodotironina livre
FT4	Tiroxina livre
fPSA	Antigénio livre específico da próstata
GGT	Gama Glutamiltransferase
GRACILE	<i>Growth Restriction, Aminoaciduria, Cholestasis, Iron Overload, Lactoacidosis , Early death</i>
Hb	Hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina glicada
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i> (Vírus da hepatite B)
hCG	Gonodotrofina coriônica humana
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de alta densidade)
HGM	Hemoglobina Globular Média
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Ht	Hematócrito
IMT	Tecnologia de Multisensor Integrado
INR	<i>International Normalized Ratio</i> (Razão normalizada internacional)
ISI	Índice Internacional de Sensibilidade
IOM	<i>Input/Output Module</i>
KSS	Síndrome de Kearns Sayre
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LCR	Líquido cefalorraquidiano

LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de baixa densidade)
LHON	<i>Leber Hereditary Optic Neuropath</i> (Neuropatia ótica de Leber)
MELAS	<i>Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes</i>
MERRF	<i>Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers</i>
MILS	<i>Maternally Inherited Leigh Syndrome</i> (Síndrome de Leigh de Hereditariedade Matrilínea)
MNGIE	<i>Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy</i> ,
mRNA	RNA mensageiro
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina)
mtDNA	Ácido Desoxirribinucleico mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reduzido
NARP	Neuropatia, Ataxia e Retinite Pigmentosa
nDNA	Ácido Desoxirribinucleico nuclear
NGS	<i>Next-generation sequencing</i> , (Sequenciação de nova geração)
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXPHOS	<i>Oxidative Phosphorylation</i> (Fosforilação oxidativa)
PAI	Pesquisa de anticorpos irregulares
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (PCR com uso de enzimas de restrição)
PDHc	Complexo piruvato desidrogenase
PDW	Coefficiente de dispersão plaquetária
PEG	Polietilenoglicol
PEO	<i>Progressive External Ophthalmoplegia</i> (Oftalmoplegia externa progressiva)
PLT	Plaquetas
PMD	<i>Primary Mitochondrial Diseases</i> (Doenças mitocondriais primárias)
PMP	Partículas paramagnéticas

PSA	Antigénio específico da próstata
PTH	Paratormona
RBC	<i>Red blood cell</i> (Glóbulos vermelhos / Eritrócitos)
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i> (Força centrífuga relativa)
RDW	Coeficiente de dispersão eritrocitária
RHCC	Concentração celular de hemoglobina reticulocitária
RIA	Radioimunoensaio
RLU	<i>Relative Light Units</i> (Unidades de luz relativa)
RM	Ressonância magnética
RNA-seq	<i>RNA sequencing</i> (sequenciação do RNA)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies reativas de oxigénio)
RPR	Rapid Plasma Reagin
RRF	<i>Ragged Red Fibres</i> (Fibras vermelhas rasgadas)
rRNA	RNA ribossomal
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SH	Sample Handler
SDH	Succinato-desidrogenase
SMD	<i>Secondary Mitochondrial Diseases</i> (Doenças mitocondriais secundárias)
SNVs	<i>Single Nucleotide Variants</i>
SRM	<i>Storage Retrieval and Disposal Module</i>
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TFG	Taxa de filtração glomerular
THF	Ácido tetrahidrofólico
TIG	Teste imunológico de gravidez
TnT	Troponina T
TnI	Troponina I
TPHA	<i>Treponema pallidum Hemagglutination Assay</i>
TRH	Hormona de libertação de tirotropina

tRNA	Ácido Ribonucleico de transferência
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antibióticos
TSH	Hormona Tireoestimulante
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
VDRL	<i>Venereal Diseases Research Laboratory</i>
VGM	Volume Globular Médio
VMR	Volume Reticulocitário Médio
VPM	Volume Plaquetário Médio
VS	Velocidade de Sedimentação
VUS	<i>Variant of Undetermined Significance</i> (Variante de significado indeterminado)
WBC	<i>White Blood Cell</i> (Glóbulos brancos / Leucócitos)
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i> (Sequenciação completa do exoma)
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i> , (Sequenciação completa do genoma)

Parte I

1. Introdução

O presente relatório descreve as atividades realizadas durante o estágio curricular, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O estágio teve lugar no Laboratório Affidea durante os meses de março a junho, sob a supervisão do Dr. Marco Marques especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos e Diretor Técnico do laboratório.

Neste estágio foram abrangidas as áreas de Hematologia, Microbiologia, Imunologia, Bioquímica e Genética Molecular Humana. Durante o período de estágio tive a oportunidade de integrar o meio profissional, contactando com a rotina laboratorial das diferentes secções constituintes do laboratório. Foi-me possível aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do mestrado no contexto laboratorial, através do manuseamento das diferentes amostras, da execução de técnicas manuais, assim como, na utilização de diferentes equipamentos presentes no laboratório. Adicionalmente, este estágio permitiu-me adquirir competências práticas, que conduziram à consolidação dos conhecimentos obtidos durante o período de aulas do mestrado.

Neste relatório será feita uma apresentação e descrição geral de cada uma das secções do laboratório dando a conhecer um pouco da rotina laboratorial. Por cada secção serão discutidos os principais parâmetros analíticos determinados, explicitando as técnicas manuais e os equipamentos utilizados nas suas determinações, também será dada uma contextualização teórica do significado clínico de cada parâmetro discutido. Por fim, será brevemente abordado o controlo de qualidade no laboratório, referindo o controlo de qualidade interno e a avaliação externa da qualidade.

2. Core Laboratorial

O core laboratorial é uma área do laboratório altamente automatizada, na qual são processadas, diariamente, um grande volume de amostras. São realizadas diversas determinações analíticas, a partir de amostras de soro, plasma e urina nas áreas da química analítica, endocrinologia, imunologia, rastreio pré-natal e sorologia de doenças infecciosas.

A química clínica é o ramo do laboratório que estuda a química dos processos biológicos que acontecem no organismo. São doseados vários analitos que refletem as vias e processos metabólicos no organismo, permitindo detetar alterações que ocorram nestes, de modo a auxiliar no diagnóstico de patologias e monitorizar ou prevenir doenças. Alguns dos parâmetros doseados são proteínas, glúcidos, lípidos, vitaminas, sais minerais, assim como a monitorização de terapêutica de fármacos¹.

A endocrinologia é a área que estuda o funcionamento das glândulas endócrinas e as suas doenças, através do doseamento de hormonas e outros metabolitos. Doenças como diabetes, alterações da tiroide e doenças do metabolismo são objeto de estudo da endocrinologia. O doseamento dos parâmetros é feito, maioritariamente, através de técnicas de quimiluminescência, porém alguns doseamentos são realizados através de técnicas de radioimunoensaio (RIA)².

A imunologia estuda os mecanismos e reações que constituem o sistema imunitário. No contexto clínico, a imunologia foca-se no diagnóstico de doenças infecciosas, bem como no estudo de doenças autoimunes. Para o seu estudo são utilizadas técnicas que visam detetar e quantificar marcadores séricos resultantes da resposta imunológica, que são na sua maioria a deteção de antígenos e anticorpos³.

2.1. Equipamentos Automáticos e Metodologias Utilizadas

Em relação à disposição do core laboratorial, este está estruturado em vários módulos ligados em cadeia através do sistema *Aptio® Automation da Siemens Healthineers*. Este sistema é composto por um módulo de entrada e saída de amostras (Input/Output Module - IOM) três equipamentos de química clínica (*Atellica® CH 930*), três analisadores de imunoensaio (*Atellica® IM 1600 Analyzer*), e um módulo que permite o armazenamento, recuperação e descarte de amostras (Storage Retrieval and Disposal Module - SRM)⁴.

O IOM (Figura 1) constitui o módulo comum para entrada e saída de amostras, possui um canal de entrada rápida para a priorização de amostras urgentes, realiza o retorno de amostras problemáticas (amostras com volume insuficiente, amostras com erros de integridade, erros na leitura de código de barras, etc) e permite ainda, a recuperação rápida de amostras solicitadas pelo operador. Este módulo facilita a gestão e manuseamento das amostras, assim como a sua rastreabilidade⁴.



Figura 1. Módulo de entrada e saída de amostras (IOM) do sistema *Aptio® Automation da Siemens Healthineers*.

A entrada das amostras na cadeia é feita consoante a sua prioridade e a sua ordem de chegada. De acordo com as análises pedidas, estas são distribuídas pelas linhas de aparelhos. Esta distribuição é executada pelo *Atellica Magline™ Transport*, uma tecnologia patenteada de transporte magnético e bidirecional que assegura a priorização de amostras de carácter urgente, sem necessidade de interrupção do fluxo de trabalho⁴.

O core laboratorial possui duas linhas de aparelhos: uma linha é constituída por um módulo de química (*Atellica® CH 930*) e dois módulos de imunologia, e outra linha composta por dois módulos de química e um módulo de imunologia (*Atellica® IM 1600*). (Figuras 2 e 3). Os equipamentos são espelhados, isto é, certas análises são feitas em

ambas as linhas, assegurando a realização das análises caso ocorra alguma avaria num dos módulos.



Figura 2. Linha de aparelhos Atellica® composta por um aparelho CH 930 e dois aparelhos IM 1600.



Figura 3. Linha de aparelhos Atellica® composta por dois aparelhos CH930 e um aparelho IM1600.

Cada linha de aparelhos possui um *Atellica® Sample Handler* (SH), que consiste num componente de elevada capacidade de processamento e monitorização de amostras, permitindo a entrada e saída das mesmas, diretamente nas linhas e não pela cadeia⁴.

O *Atellica® CH 930* é um analisador automático de química clínica para a realização de testes de diagnóstico *in vitro*. Neste analisador são realizados ensaios químicos e imunoquímicos, usando técnicas de fotometria, turbidimetria, e uma tecnologia de multisensor integrado (IMT), para a quantificação de eletrólitos⁵. A fotometria consiste na medição da luz absorvida, num comprimento de onda específico, quando a solução é atravessada por um feixe de luz. O multisensor integrado (IMT) permite determinar as concentrações de eletrólitos por meio de método de potenciometria, cujo princípio se baseia na medição de potencial elétrico entre dois elétrodos numa célula eletroquímica⁵.

O *Atellica® IM 1600* é um analisador automático de imunoensaios que, através da utilização da técnica de quimiluminescência, realiza testes de diagnóstico *in vitro*. Como molécula quimiluminescente, os testes do *Atellica® IM 1600* utilizam o éster de acridina

(EA). A quimiluminescência consiste na emissão de um fóton de luz resultante de uma reação química, neste caso, as moléculas de éster de acridina na presença de H_2O_2 e a pH alcalino são oxidadas formando uma molécula instável, que espontaneamente retorna a uma forma mais estável, emitindo luz ao mesmo tempo. Quanto ao tipo de imunoenaios que são utilizados, podem ser: não competitivos (tipo sanduiche), competitivos e de captura de anticorpo⁵.

Nos imunoenaios do tipo sanduiche, para a detecção de antígenos, são usados anticorpos específicos para esse antígeno marcados com éster de acridina, que se ligam ao antígeno em estudo na amostra. De seguida, são adicionadas partículas paramagnéticas (PMP) revestidas com anticorpos específicos para o antígeno. Estas partículas vão-se ligar aos antígenos já ligados aos anticorpos marcados com éster de acridina, criando um complexo PMP-anticorpo-antígeno-anticorpo-AE. Durante a reação de quimiluminescência, a emissão de luz produzida pela oxidação do éster de acridina é medida pelo sistema em unidades de luz relativa (RLU), esta emissão de luz em RLU é diretamente proporcional à concentração de antígeno⁵.

Nos imunoenaios do tipo competitivo, podem ser empregues duas formas: uma utiliza antígenos marcados com éster de acridina que competem com o antígeno presente na amostra, para uma quantidade limitada de locais de ligação dos anticorpos que revestem as partículas paramagnéticas; na outra forma, o antígeno presente na amostra compete com um análogo desse antígeno que se encontra covalentemente ligado a partículas paramagnéticas, para uma quantidade limitada de anticorpos marcados com éster de acridina. Em ambos os casos, a concentração do antígeno específico presente na amostra, é inversamente proporcional à emissão de luz detetada pelo sistema⁵.

Os imunoenaios em formato de captura são utilizados normalmente para a detecção e quantificação de anticorpos. Por exemplo, no caso da detecção de anticorpos IgM para um determinado antígeno, são adicionadas partículas paramagnéticas revestidas com anticorpos anti-IgM humanos, que se ligam aos IgMs presentes na amostra. Posteriormente é adicionado o antígeno específico marcado com éster de acridina, que se vai ligar às IgMs específicas formando imunocomplexos. A quantidade de luz emitida é, portanto, diretamente proporcional à concentração de anticorpos na amostra⁵.

Findadas, todas as análises, as amostras são transferidas para o SRM, no qual vão ser armazenadas durante 7 dias em refrigeração. Deste modo, é possível durante esse período, fazer repetições de qualquer parâmetro ou fazer novas determinações caso sejam requisitadas análises adicionais. Por vezes é necessário fazer alíquotas das amostras, casos por exemplo de parâmetros que não determinados todos os dias da semana, as alíquotas são armazenadas num arquivo exterior durante mais ou menos um mês. Amostras em que são realizadas análises de sorologia infecciosas e do rastreio pré-natal são armazenadas numa soroteca, durante 6 meses.

2.2. Rotina Diária

Diariamente, durante o período da manhã, são executadas algumas tarefas de extrema importância de preparação dos equipamentos para a receção das amostras. Em primeiro lugar, antes de iniciar o trabalho, há que confirmar se os equipamentos realizaram as manutenções programadas sem qualquer erro. Posteriormente, procede-se à reposição de

reagentes e consumíveis do equipamento, durante a reposição deve ter-se atenção ao lote do reagente, uma vez que um novo lote de reagentes implica realizar uma calibração nova, lendo primeiro a carta da curva de calibração (se aplicável). Outras tarefas incluem avaliar a estabilidade *on-board* dos controlos, reagentes e auxiliares que se encontram armazenados dentro do aparelho. Caso tenha expirado o prazo de estabilidade, deve-se substituir e colocar novos reagentes. É importante também verificar o estado de calibração dos reagentes, normalmente, o próprio aparelho indica quando é necessário fazer novas calibrações, estas são maioritariamente feitas por lote, sendo executada nalguns casos por pack, uma vez que o reagente não se gasta com muita frequência. Por fim, a última tarefa a realizar é analisar os resultados do controlo de qualidade interno das amostras através do programa Unity Real Time BioRad.

3. Análises Realizadas no Core Laboratorial

3.1. Proteínas

As proteínas são macromoléculas essenciais ao organismo. Desempenham várias funções no organismo tais como transporte de outras moléculas, funções estruturais de tecidos e células, catalisação de várias reações, participação no sistema imunitário e manutenção da pressão oncótica, entre outras. A maioria das proteínas plasmáticas são sintetizadas no fígado, com a exceção das imunoglobulinas, que são sintetizadas por plasmócitos. Estas dividem-se em dois grupos principais: a albumina e as globulinas, sendo que dentro das globulinas existem 4 tipos diferentes de globulinas com propriedades diferentes^{6,7}.

3.1.1. Proteínas totais no soro e urina

A concentração sérica das proteínas totais reflete o estado nutricional do indivíduo. Os seus valores vão variar consoante a síntese, a distribuição a nível extracelular e as perdas no organismo. O seu doseamento é importante, na medida que é um parâmetro que auxilia no diagnóstico de várias patologias, tais como doenças hepáticas, doenças renais e distúrbios metabólicos e nutricionais^{6,7}.

O método usado para fazer o doseamento de proteínas totais no soro é o método do biureto. No qual as ligações peptídicas interagem com iões cúpricos para formar um complexo roxo que é medido a um comprimento de onda de 545 nm numa reação a ponto final⁸.

Os valores de referência para as proteínas totais no soro variam entre 6,4 e 8,3 g/dL, no indivíduo adulto. Hiperproteinémia, que consiste em níveis séricos de proteínas totais superiores a 8,3 g/dL, pode ocorrer em situações de desidratação (há um aumento proporcional de todas as proteínas plasmáticas) ou no decorrer de processos inflamatórios, devido ao aumento da síntese de proteínas de fase aguda. Hipoproteinémia, que consiste em níveis séricos de proteínas totais inferiores a 6,4g/dL, ocorre em casos

síntese hepática diminuída, doença renal, má absorção intestinal, ou na gravidez (processo fisiológico)⁶.

Também é feita a determinação do teor de proteínas totais na urina. Deve usar-se uma amostra de urina de 24 h para fazer esta determinação. O método utilizado usa o complexo vermelho de pirogalol-molibdato que reage com as proteínas formando um complexo roxo-azulado que absorve a 600 nm⁹. Um valor elevado de proteínas na urina (proteinúria) pode resultar de danos ao nível dos glomérulos ou dos túbulos renais, ou ainda de um aumento da concentração plasmática de proteínas livremente filtradas pelo rim, como a proteína de Bence-Jones^{6,7}.

3.1.2. Albumina

A albumina é uma proteína, com aproximadamente 66 kDa de peso molecular, sintetizada no fígado. É a proteína mais abundante no plasma, com uma concentração plasmática, no adulto, entre 3,5 – 5,5 g/dL. As suas principais funções são a ligação e transporte de vários compostos no sangue (Ca²⁺, hormonas tiroideias, Mg²⁺, entre outros) e a manutenção da pressão oncótica no espaço vascular. Concentrações diminuídas de albumina (hypoalbuminémia) podem verificar-se em situações de doença hepática, inflamações aguda e crónica, má-nutrição ou por aumento da sua excreção em situações de queimaduras, doenças inflamatórias intestinais ou por disfunções renais^{6,7}.

O doseamento de albumina no soro é feito usando o indicador verde bromocresol que se liga seletivamente à albumina formando um complexo corado, que é medido como uma reação de ponto final a 596nm¹⁰.

Adicionalmente, é também feita a quantificação de albumina na urina (microalbuminúria). A quantidade de albumina que é excretada na urina é bastante reduzida (< 30mg/24h), uma vez que o seu tamanho impede que seja livremente filtrada pelo glomérulo. No entanto, em situações iniciais de lesão glomerular ou tubular, os teores de albumina na urina podem aumentar, verificando-se teores de albumina urinária superiores 30 mg/24h, ao que se designa de microalbuminúria. A microalbuminúria constitui um indicador inicial de lesão glomerular, que pode ocorrer na diabetes e em várias formas de glomerulonefrite, entre outras patologias. É especialmente importante monitorizar os doentes com diabetes *mellitus*, através da microalbuminúria, uma vez que estes apresentam um risco elevado de desenvolverem nefropatia diabética¹¹.

O doseamento da microalbumina é feito através de um método de imunoturbidimetria reforçada com PEG (polientilenoglicol), no qual a albumina reage com um antissoro específico para formar um precipitado que pode ser medido de forma turbidimétrica a 340nm¹².

3.1.3. Proteínas Específicas

No Laboratório Affidea são ainda realizadas determinações quantitativas das seguintes proteínas:

- α 1- antitripsina (AAT)
- β 2 – macroglobulina

- Anti-estreptolisina
- Proteína do complemento C3
- Proteína do complemento C4
- Imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA e IgE total)
- Lipoproteína (a)
- Fator Reumatóide
- Transferrina
- Proteína C reativa

Deste conjunto irei apenas falar em detalhe de algumas. Começando pela $\alpha 1$ -Antitripsina (AAT), esta é uma glicoproteína sintetizada no fígado, cuja principal função é a inibição da elastase libertada pelos neutrófilos. A deficiência em $\alpha 1$ - antitripsina é causada por mutações no gene *SERPINA1*. Esta deficiência conduz a um risco elevado de desenvolvimento de enfisema pulmonar e cirrose hepática. Níveis elevados de $\alpha 1$ -antitripsina verificam-se em reações inflamatórias⁷. O seu doseamento é feito através de um ensaio imunotubidimétrico¹³.

As imunoglobulinas são proteínas produzidas pelos plasmócitos (linfócitos B diferenciados) e constituem as moléculas efetoras da resposta imunitária humoral. São compostas por duas cadeias pesadas idênticas e 2 duas cadeias leves também idênticas. Existem 5 classes diferentes de imunoglobulinas que são determinadas pelo tipo de cadeias pesadas que as constituem. Temos as IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, que correspondem às cadeias γ , α , μ , δ , ϵ . As cadeias leves podem ser de dois tipos kappa (κ) ou lambda (λ)¹. No laboratório Affidea são doseadas as imunoglobulinas IgG, IgA, IgM por um método de imunoturbidimetria reforçada com polietilenoglicol (PEG), e também é doseado a IgE total através de um método de imunoensaio tipo sanduíche por quimioluminescência^{14,15,16,17}.

A proteína C reativa é sintetizada no fígado e é uma das principais proteínas de fase aguda que se eleva em estados inflamatórios. A utilidade da sua medição tem que ver com o facto desta proteína em condições normais existir no plasma em concentrações muito baixas (< 5mg/L). Contudo, a sua concentração pode aumentar 100 vezes mais no decorrer de uma infeção bacteriana, viral ou devido a reações inflamatórias e enfarte do miocárdio. A proteína C reativa é, no entanto, um marcador de inflamação não específico, pois a sua elevação não permite determinar causa subjacente⁶. No laboratório Affidea, a determinação da CRP é feita por dois métodos: um método de medição de intervalo alargado, usando um ensaio por imunoturbidimetria reforçada com látex, e outro por meio de ensaios de alta sensibilidade. Este último é usado como biomarcador para a avaliação do risco de doença cardiovascular^{18,19}.

3.1.4. Eletroforese de proteínas

A eletroforese de proteínas é um método de separação das diferentes proteínas plasmáticas com base nas suas diferenças de carga elétrica e tamanho. O método usado no Laboratório Affidea é a eletroforese por capilaridade que é realizado no equipamento CAPILLARYS 3 OCTA Sebia (Figura 4). Na eletroforese por capilaridade a separação ocorre num capilar de sílica, no qual as proteínas são separadas através da sua mobilidade eletroforética a um pH específico com um tampão alcalino. A aplicação de um campo

elétrico faz migrar as moléculas com carga positiva (tampão) para o cátodo, as proteínas com carga negativa para o ânodo. No entanto, quando é aplicada alta voltagem no capilar gera-se um fluxo eletro-osmótico, que é mais forte do que a mobilidade eletroforética das proteínas, levando a que estas migrem também para o cátodo, onde se encontra um detetor de luz UV/Visível, que mede a absorvância das proteínas, permitindo a sua identificação e quantificação⁷.



Figura 4. Equipamento CAPILLARYS 3 OCTA Sebia

É através da eletroforese capilar de proteínas que se obtém um perfil eletroforético no qual é possível distinguir as diferentes frações proteicas: albumina, α 1-globulinas, α 2-globulinas, β 1-globulinas, β 2-globulinas e γ -globulinas. (Figura 5). Cada fração corresponde a uma ou mais proteínas, na tabela 1 estão descritas as diferentes proteínas que constituem cada fração.

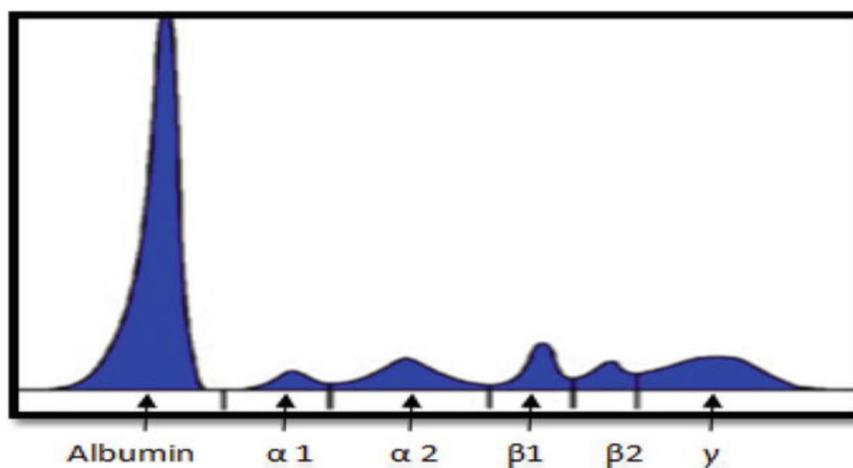


Figura 5. Perfil eletroforético normal de proteínas. Adaptado de: (20).

Tabela 1. Frações proteicas e respetivas proteínas constituintes

Fração	Proteínas
Albumina	Albumina
$\alpha 1$	$\alpha 1$ -antitripsina $\alpha 1$ -glicoproteína ácida $\alpha 1$ -fetoproteína
$\alpha 2$	$\alpha 2$ -macroglobulina Haptoglobina Ceruloplasmina
$\beta 1$	Transferrina Hemopexina
$\beta 2$	Proteínas do Complemento (C3 e C4) $\beta 2$ -microglobulina Subpopulações de IgA
γ	Imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) CRP

A grande aplicabilidade da eletroforese de proteínas é poder avaliar alterações qualitativas das diferentes frações proteicas. Em especial esta técnica é muito usada para a monitorização e deteção de gamapatias monoclonais. As gamapatias monoclonais caracterizam-se por uma proliferação aumentada de um único clone de plasmócitos. No perfil eletroforético é caracterizado pelo aparecimento de um “pico” afilado na normalmente na fração γ , mas nalguns casos pode surgir nas frações β ou α . Às imunoglobulinas monoclonais observadas nestas condições designam-se por paraproteínas ou proteína M²⁰. Um aspeto importante da eletroforese de proteínas é o tipo amostra que se deve usar, que neste caso é o soro. O soro ao contrário do plasma não contém fibrinogénio, uma vez que passa a fibrina para formar o coágulo. O problema do fibrinogénio é que migra exatamente entre a fração $\beta 2$ e γ , o que pode mascarar um pico monoclonal e dificultar a interpretação do gráfico²¹.

3.1.5. Imunofixação sérica

Em seguida à deteção de um pico monoclonal, é necessário fazer sua caracterização, isto é, determinar qual é o tipo de imunoglobulina monoclonal. Para tal no Laboratório Affidea realiza-se a imunofixação sérica por meio do aparelho HYDRASYS 2 SCAN FOCUSING Sebia. (Figura 6)



Figura 6. HYDRASYS 2 SCAN FOCUSING Sebia

Basicamente, a imunofixação sérica consiste em realizar uma eletroforese em gel das proteínas séricas que depois vai ser incubada com diversos anti-soros (anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti- κ e anti- λ) que se vão ligar especificamente às diferentes proteínas, conduzindo à sua precipitação. As proteínas não precipitadas são removidas do gel por lavagem e absorção com papel de filtro, enquanto as proteínas precipitadas ficam retidas na matriz do gel. Ao adicionar-se o corante violeta ácido, este vai ligar-se ao imunoprecipitado e permitir visualizar essas bandas. No perfil eletroforético a precipitação difusa e leve das bandas é indicativa de um padrão compatível com um perfil policlonal, enquanto a presença de uma banda estreita, com a mesma mobilidade numa pista das cadeias pesadas e numa pista das cadeias leves, indica a presença de uma banda monoclonal²¹.

3.2. Metabolismo dos Hidratos de Carbono

3.2.1. Glucose

A glucose é a fonte primária de energia para o organismo. Todas as células estão dependentes deste monossacárido para a obtenção de ATP, essencial para múltiplas atividades celulares. Em especial, o cérebro, ao contrário de outros órgãos e tecidos, apenas usa a glucose como fonte de energia. Devido a este facto, as concentrações séricas de glucose são altamente reguladas por vários mecanismos envolvendo hormonas. Num indivíduo saudável, os níveis de glucose variam entre 74 e 100 mg/dL. Valores que excedam este intervalo (hiperglicemia), ou que sejam inferiores (hipoglicémia) são indicativos de possíveis alterações no metabolismo glucídico. Por isso, a determinação quantitativa de glucose permite estabelecer o diagnóstico de doenças como a diabetes *mellitus*, hipoglicemia neonatal, hipoglicémia idiopática e sobredosagem de insulina^{6,7}.

O método usado para dosear a glucose é o método da hexocinase. Fazendo uso das enzimas hexocinase e glucose-6-fosfato-desidrogenase, é medida a absorvância a 340nm da redução do NAD^+ ²².

a) Diagnóstico e Monitorização de Diabetes *mellitus*

A diabetes *mellitus* é uma doença metabólica de etiologia múltipla, que se caracteriza por uma hiperglicemia crónica. O seu estabelecimento resulta na alteração da secreção e/ou ação da insulina. A diabetes *mellitus* pode ser classificada em diferentes tipos²³:

- Tipo 1 (resulta da destruição das células beta do pâncreas, levando a um défice absoluto ou um teor muito baixo de insulina)
- Tipo 2 (causada por um desequilíbrio progressivo entre os níveis de insulina e a sensibilidade para a insulina, conduzindo a um défice funcional de insulina)
- Gestacional (diabetes que se manifesta pela primeira vez durante a gravidez)
- Outros tipos específicos

De acordo com a norma nº002/2011 da Direcção-Geral da Saúde, o diagnóstico de diabetes é feito com base nos critérios²⁴:

- 1) Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl (ou $\geq 7,0$ mmol/l); ou
- 2) Sintomas clássicos + glicemia ocasional ≥ 200 mg/dl (ou $\geq 11,1$ mmol/l); ou
- 3) Glicemia ≥ 200 mg/dl (ou $\geq 11,1$ mmol/l) às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75g de glicose; ou
- 4) Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$.

De acordo com a mesma norma da Direcção-Geral da Saúde, o diagnóstico da diabetes gestacional faz-se com base nos seguintes valores²⁴:

- 1) Glicemia de jejum, a realizar na 1.^a consulta de gravidez, ≥ 92 mg/dl e < 126 mg/dl (ou $\geq 5,1$ e $< 7,0$ mmol/l);
- 2) Se glicemia de jejum < 92 mg/dl, realiza-se PTGO com 75 g de glicose, às 24-28 semanas de gestação. É critério para diagnóstico de diabetes gestacional, a confirmação de um ou mais valores
 - i) às 0 horas, glicemia ≥ 92 mg/dl (ou $\geq 5,1$ mmol/l);
 - ii) à 1 hora, glicemia ≥ 180 mg/dl (ou $\geq 10,0$ mmol/l);
 - iii) às 2 horas, glicemia ≥ 153 mg/dl (ou $\geq 8,5$ mmol/l).

b) Prova de Tolerância à Glucose Oral (PTGO)

A prova de tolerância à glucose oral (PTGO) consiste na determinação da glicémia, antes e depois da administração oral de 75 g de glucose. É principalmente utilizada no diagnóstico de anomalia da glicémia em jejum, tolerância diminuída à glucose e de diabetes gestacional. Esta prova avalia a *clearance* de glucose após uma sobrecarga definida em condições controladas e avalia a capacidade pancreática residual^{6,7}.

Na PTOG do adulto são feitas determinações de glucose, aos 0 minutos, antes da administração da sobrecarga, e aos 120 minutos após a sobrecarga. Em mulheres grávidas, é feita a prova entre as semanas 24 e 28 de gestação, caso a glicémia em jejum seja inferior a 92 mg/dL, e é doseada às 0h, 1h e 2h.

3.2.2. Insulina

A insulina é a hormona primária responsável pela entrada de glucose nas células. Esta é sintetizada nas células beta dos ilhéus de Langerhans do pâncreas. Aquando de uma refeição, o teor de glucose no sangue aumenta, estas células detetam este aumento promovendo a libertação de insulina para a corrente sanguínea. A insulina vai diminuir os níveis plasmáticos de glucose, aumentando a entrada de glucose no músculo e tecido adiposo por via de recetores não específicos⁷.

O método usado na determinação da insulina é um imunoenensaio do tipo sanduíche. Apesar da sua determinação não ser usada como critério de diagnóstico, esta pode ser útil no estudo da fisiopatologia da diabetes, na avaliação de utentes com hipoglicemia em jejum, na determinação da resistência à insulina na população em geral e na avaliação da função secretora das células beta²⁵.

3.3. Metabolismo Lipídico

A avaliação do metabolismo lipídico é feita com base na quantificação das principais lipoproteínas e lípidos. São medidos os níveis de colesterol total (CT), triglicéridos (TG), colesterol HDL (c-HDL) e colesterol LDL (c-LDL). Estas determinações são fundamentais para a o diagnóstico de dislipidémias, que são um dos principais fatores de risco da aterosclerose, que por sua vez é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares^{6, 26}.

3.3.1. Colesterol

É um composto álcool esteroide que pode ser produzido endogenamente no fígado e intestino, ou adquirido através da dieta (via exógena). É um componente estrutural da membrana das células, é um precursor da síntese dos ácidos biliares e está envolvido na síntese de hormonas esteroides e da vitamina D⁷. No organismo este pode existir em duas formas principais: na forma esterificada ligado a ácidos gordos ou na forma livre. Em ambas as formas, o colesterol é transportado por meio das lipoproteínas. Valores aumentados de colesterol estão correlacionados com um risco aumentado de desenvolvimento de doenças cardiovasculares^{6,7}.

O método utilizado para dosear o colesterol é um método enzimático que utiliza a as enzimas colesterol-esterase e colesterol-oxidase, seguidas de uma reação a ponto final Trinder, medindo a absorvância do produto corado a 505 nm²⁷.

Os valores de colesterol devem ser < 200 mg/dL, pois são indicativos de um risco baixo de desenvolvimento de doença cardiovascular. Valores entre 200 e 239 mg/dL apresentam um risco moderado, enquanto níveis superiores a 239 mg/dL constituem um risco elevado. Contudo, os valores de colesterol por si só não são suficientes para avaliar o risco de doença cardiovascular, devem ser interpretados com outros parâmetros nomeadamente, com o c-LDL e o c-HDL²⁶.

3.3.2. Triglicéridos

Os triglicéridos são ésteres de glicerol que constituem 95 % do armazenamento tecidual das gorduras e são uma importante fonte de energia para as células. Podem ser obtidos através da dieta ou sintetizados a nível hepático⁶. A medição dos triglicéridos é usada para auxiliar no diagnóstico de dislipidemias e na avaliação do risco cardiovascular. Os valores normais de triglicéridos no soro devem ser < 150 mg/dL⁷.

O método de doseamento dos triglicéridos utiliza as enzimas lipoproteína lipase, glicerol cinase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase para obter um produto colorido, medindo a sua absorvância a 505nm, que é diretamente proporcional à quantidade de triglicéridos na amostra²⁸.

3.3.3. Colesterol HDL e Colesterol LDL

As HDL são responsáveis pelo transporte reverso do colesterol, processo que remove o excesso de colesterol de macrófagos e outras células da parede arterial, transportando-o para o fígado. As concentrações séricas de c-HDL correlacionam-se inversamente com o risco de DCV, pelo que concentrações elevadas têm um efeito protetor, estando assim associadas a um menor risco cardiovascular. Contrariamente, valores diminuídos de c-HDL estão associados a um aumento do risco cardiovascular^{6,7}.

O doseamento do c-HDL engloba dois passos distintos: em primeiro lugar são eliminadas as quilomicras, VLDL e LDL, pela colesterol esterase e colesterol oxidase, e só depois é que se faz a determinação específica do c-HDL²⁹.

As LDL são constituídas maioritariamente por colesterol e têm como função transportar essas moléculas de colesterol para diferentes tecidos. Quando existem em teores elevados no sangue, e por terem um tempo médio de vida de 3 dias, podem sofrer modificações que as tornam irreconhecíveis pelos recetores celulares. Assim, acumulam-se e podendo depositar-se nas paredes arteriais contribuindo para a formação de placas de aterosclerose. Deste modo, níveis aumentados de c-LDL são um importante fator de risco de desenvolvimento de doença cardiovascular⁶.

A determinação quantitativa do cLDL é realizada indiretamente, através de cálculo, utilizando a fórmula de Friedwald:

$$cLDL = \text{colesterol total} - \left(cHDL + \frac{\text{Triglicéridos}}{5} \right)$$

Contudo, amostras com teores de triglicéridos superiores a 400 mg/dL, devem ser determinadas usando um método direto de medição do c-LDL. Isto deve-se ao facto de do fator Triglicéridos/5 não obter um valor correto do colesterol VLDL, conduzindo a erros no valor do c-LDL calculado^{6,7,26}.

3.3.4. Apolipoproteína A1 e Apolipoproteína B100

Apolipoproteína A1 (ApoA1) é a principal apoproteína constituinte das HDL. É ativadora da enzima LCAT, que desempenha um papel essencial no transporte reverso do colesterol. Apolipoproteína B100 (ApoB100) é a única lipoproteína das LDL, mas encontra-se presente também nas VLDL e IDL. Desempenha um papel importante no reconhecimento das LDL pelos recetores celulares. Níveis elevados de ApoB100 e níveis reduzidos de ApoA1 estão associados a um risco aumentado de doença aterosclerótica. As suas determinações servem como analitos auxiliares na avaliação do risco da aterosclerose e doenças coronárias⁷.

Os seus doseamentos são feitos por métodos imunoturbidimétricos reforçados com polietilenoglicol (PEG)^{30,31}.

3.4. Função renal

Para a avaliação da função renal são usados como parâmetros a creatinina, a ureia e o ácido úrico. Estas três moléculas são compostos azotados não proteicos que resultam do catabolismo de proteínas, ácidos nucleicos e aminoácidos, que são excretados pelo rim⁶.

3.4.1. Creatinina

A creatinina é um produto resultante do metabolismo da fosfocreatina e da creatina, que são compostos usados pelo músculo para obtenção rápida de ATP. A quantidade de creatinina, que é produzida diariamente, é bastante constante, uma vez que depende da massa muscular do indivíduo. A creatinina é livremente filtrada no glomérulo e não é reabsorvida nos túbulos renais, sendo apenas uma pequena quantidade secretada para o lúmen tubular. Constitui, assim, um excelente marcador endógeno da taxa de filtração glomerular (TFG). Os níveis de creatinina plasmática são inversamente proporcionais à taxa de filtração glomerular, ou seja, um aumento de creatinina no soro é indicativo de uma possível lesão renal. Contudo, a creatinina plasmática é um marcador pouco sensível, já que se eleva apenas em casos em que haja uma lesão renal significativa^{6,7,11}.

A clearance da creatinina mede a velocidade a que a creatinina é removida do sangue pelos rins (normalmente expressa em mL/min) e a sua determinação é utilizada para calcular a TFG. Para a determinação da clearance da creatinina, para além da amostra de soro, é necessária uma amostra de urina de 24 horas. Esta é calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Clearance creatinina (ml/min)} = \frac{U_{\text{creatinina}}(\text{mg/dL}) \times V_{\text{urina}}(\text{mL})}{P_{\text{creatinina}}(\text{mg/dL}) \times 1440 (\text{min})}$$

$U_{\text{creatinina}}$ – concentração da creatinina na urina

V_{urina} – volume excretado durante as 24h

$P_{\text{creatinina}}$ – concentração da creatinina no soro

Dependendo dos valores de TFG é possível obter estádios da doença renal crónica. Tabela 2 ilustra essa classificação.

Tabela 2. Classificação dos estádios da doença renal. Adaptado de: (11)

Estadio	Descrição	TFG (mL/min)
1	Lesão renal c/TFG normal ou aumentada	≥90
2	Lesão renal c/TFG ligeiramente diminuída	60-89
3	Lesão renal c/TFG moderadamente diminuída	30-59
4	Lesão renal c/TFG gravemente diminuída	15-29
5	Insuficiência Renal Crónica Terminal (IRCT)	<15

A creatinina é determinada através do método de Jaffé. Este é um método cinético que consiste na reação da creatinina com ácido pícrico em meio alcalino, conduzindo à formação de um complexo avermelhado ao qual se mede a sua absorvância a 505 nm³².

3.4.2. Ureia

A ureia é o principal produto de excreção do catabolismo proteico. É formada no fígado a partir dos grupos amina de aminoácidos que integram o ciclo da ureia. Desempenha uma função essencial na manutenção do equilíbrio do azoto no organismo. A ureia é livremente filtrada no glomérulo, mas uma parte significativa é reabsorvida, sendo que esta difusão depende do fluxo urinário e do nível de hidratação. É usada como marcador da função renal, no entanto existem fatores não renais que podem influenciar a sua concentração, como por exemplo o consumo de uma dieta rica em proteínas, faz aumentar a sua concentração. Em adultos saudáveis, a concentração de ureia no soro varia entre 6 e 20 mg/dL. Valores de ureia aumentados no soro designam-se por azotémia e podem ter origem em causas pré-renais, renais ou pós-renais^{6,7}.

O doseamento da ureia pode ser feito no soro e urina e tem por base o método enzimático que utiliza as enzimas urease e glutamato desidrogenase, na qual é medida a redução da absorvância de NADH a 340 nm que é diretamente proporcional à concentração de ureia³³.

3.4.3. Ácido úrico

O ácido úrico é o produto primário do catabolismo das purinas (adenosina e guanosina). Este produto é formado no fígado e é excretado pelos rins, mas o seu percurso no rim envolve uma série de ciclos de reabsorção e secreção a nível das várias regiões do nefrónio. O doseamento de ácido úrico é importante na avaliação de doenças hereditárias do metabolismo das purinas, no diagnóstico e monitorização do tratamento da gota, no auxílio ao diagnóstico de cálculos renais e também na deteção de disfunção renal. São considerados normais, valores séricos de ácido úrico entre 4,4 e 7,6 mg/dL no sexo masculino e, entre 2,3 e 6,6 mg/dL no sexo feminino^{6,7}.

O método de determinação do ácido úrico, baseia-se na reação enzimática de Fossati que utiliza a enzima uricase, que oxida o ácido úrico em alantoína, formando peróxido de hidrogénio que é medido através de uma reação de Trinder a 545 nm³⁴.

3.5. Eletrólitos

Os eletrólitos são iões que possuem carga elétrica, que desempenham funções essenciais no organismo. Os quatro principais eletrólitos do organismo são: o sódio (Na⁺), o potássio (K⁺), o cloro (Cl⁻) e o bicarbonato (HCO₃⁻). Estão envolvidos em processos como a regulação da pressão osmótica, a regulação da distribuição da água no organismo, o equilíbrio ácido-base, contração muscular entre outros^{6,7}. O ionograma consiste na avaliação de três dos principais eletrólitos, o sódio (Na⁺), o potássio (K⁺) e o cloro (Cl⁻), sendo que também irei falar sobre a determinação do HCO₃⁻.

3.5.1. Sódio

O sódio (Na^+) é o principal cátion do fluido extracelular, e é um dos principais determinantes da osmolaridade plasmática. O sódio é obtido através da dieta e é excretado na urina, suor e ao nível do intestino⁶.

Os valores séricos num indivíduo adulto saudável encontram-se entre 136 e 145 mEq/L. Concentrações séricas diminuídas de Na^+ (hiponatremia) podem ocorrer devido a uma perda aumentada (diminuição da produção de aldosterona, uso de determinados diuréticos, nefropatia, vômito prolongado), à retenção de água (insuficiência renal, cardíaca) ou a uma ingestão excessiva de água. Por outro lado, situações de hipernatremia podem resultar de uma perda aumentada de água em relação à perda de Na^+ (diabetes *insipidus*, patologia tubular renal, queimaduras severas), de uma ingestão diminuída de água, ou ainda de uma ingestão ou retenção excessivas de Na^+ (administração de soluções de sódio hipertónicas, hiperaldosteronismo)^{6,7}. É de realçar que valores de sódio < 120 ou > 160 mEq/L são considerados valores críticos³⁵.

Na obtenção de amostras para a determinação do sódio não se deverá usar plasma em EDTA, uma vez que este pode interferir na sua determinação. A hemólise não interfere de forma significativa na determinação do Na^+ .

3.5.2. Potássio

O potássio (K^+) é o principal cátion do espaço intracelular. É mantido um gradiente de concentração do potássio entre o espaço intracelular e extracelular, por ação de bombas sódio/potássio que consomem energia. Está envolvido em vários processos no organismo, nomeadamente, na concentração do músculo esquelético e cardíaco, assim como na regulação do volume do líquido intracelular. A concentração de potássio no plasma é regulada pela ação de hormona aldosterona e a função renal. Alterações na caliémia vão ter repercussões ao nível da excitabilidade das membranas celulares em especial ao nível do músculo cardíaco^{6,7}.

A hipocaliémia ($\text{K}^+ < 3,5$ mEq/L) é causada por perdas gastrointestinais (vómitos e diarreias prolongadas), ingestão insuficiente de potássio ou diminuição da sua reabsorção renal. A hipercaliémia ($\text{K}^+ > 5,1$ mEq/L), pode dever-se a estados de acidose metabólica, à toma de fármacos inibidores de aldosterona, ou a uma diminuição da sua excreção urinária, devido sobretudo a insuficiência renal^{6,7}. À semelhança do que acontece com o sódio, valores de potássio $< 3,0$ ou $> 6,1$ mEq/L são valores críticos³⁵.

Um aspeto importante na determinação do potássio é a colheita das amostras. A hemólise é um interferente na determinação deste cátion, uma vez que os eritrócitos contêm no seu interior quantidades de K^+ bastante elevadas. Ora, ao lisarem, o seu conteúdo intracelular desloca-se para o plasma fazendo elevar o teor de K^+ , conduzindo a teores falsamente aumentados deste cátion⁶.

3.5.3. Cloro

O cloro (Cl^-) é o principal anião extracelular, possui um papel fundamental na regulação dos fluidos corporais, no equilíbrio eletrolítico, na preservação da neutralidade elétrica e

no equilíbrio ácido-base. O cloro segue passivamente os níveis de sódio e, portanto, as alterações nos níveis de cloro refletem também alterações no nível de sódio, e têm origem nas mesmas causas. Os valores normais de Cl^- variam entre 98 e 107 mEq/L. A determinação da sua concentração é útil no diagnóstico diferencial de desequilíbrios ácido-base^{6,7}.

Para a determinação destes três íões o método usado é a potenciometria. Os equipamentos *Atellica® CH 930* de química possuem um multisensor integrado (IMT) que faz as determinações quantitativas de Na^+ , K^+ e Cl^- . Este multisensor possui 4 elétrodos: três desses elétrodos são seletivo para Na^+ , K^+ e Cl^- e um elétrodo de referência. Basicamente, os íões presentes nas amostras estabelecem um equilíbrio com a superfície do elétrodo gerando uma diferença de potencial. Esta diferença de potencial é depois comparada com o potencial de uma solução padrão, permitindo calcular a concentração dos íões³⁶.

3.5.4. Bicarbonato

O bicarbonato é o segundo anião mais abundante no fluido extracelular. Na medição do teor de CO_2 no sangue é usada a determinação do ião bicarbonato, uma vez que este ião compreende cerca de 95% da quantidade total de CO_2 no organismo. O bicarbonato é um dos principais tampões fisiológicos do organismo⁷.

É usado, em conjunto com outras medições, como marcador na avaliação do equilíbrio ácido-base. Os pulmões e rins são os órgãos que regulam o equilíbrio ácido-base, sendo que o controlo exercido pelo rim é feito por via do HCO_3^- . E portanto, alterações na concentração de bicarbonato são causadas por desequilíbrios ácido-base. A concentração de bicarbonato em indivíduos saudáveis está ente 23 a 30 mEq/mL. Níveis diminuídos de HCO_3^- verificam-se em situações de acidose metabólica, por diminuição da excreção de H^+ pelo rim, perdas de bicarbonato pelo trato gastrointestinal ou urina, ou aumento da produção/ingestão de H^+ . Níveis aumentados de HCO_3^- verificam-se em situações de alcalose metabólica, que pode ser causada por vômitos severos, toma de certos diuréticos, hipaldosteronismo e ingestão de bases^{7,37}.

A determinação do bicarbonato é feita através de um método enzimático que usa a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase para obtenção de oxalatoacetato. No segundo passo com recurso à malato desidrogenase, um análogo de NADH é oxidado a NAD^+ , sendo medida a redução da absorvância a 410nm, que é diretamente proporcional à concentração de HCO_3^- ³⁸.

Com os valores de Na^+ , K^+ , Cl^- e HCO_3^- é possível determinar o gap aniônico, que consiste na diferença entre os dois principais catiões e os dois principais aniões no organismo, como ilustra a fórmula:

$$\text{Gap aniônico} = ([\text{Na}^+] + [\text{K}^+]) - ([\text{Cl}^-] + [\text{HCO}_3^-])$$

Esta é uma ferramenta bioquímica que permite avaliar as causas de acidose metabólica. O valor normal de gap aniônico é entre 10 e 20 mmol/L. Aumentos no gap aniônico podem ser causados por insuficiência renal, cetoacidose diabética e acidose láctica⁷.

3.6. Função Pancreática

3.6.1. Amilase

A amilase é uma enzima pertencente à classe de hidrolases, que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 nos hidratos de carbono. Existe em vários órgãos e tecidos com maior concentração no pâncreas e nas glândulas salivares. O seu doseamento é usado principalmente como marcador de pancreatite aguda, uma vez que os seus valores aumentam substancialmente. No entanto, a amilase não é um marcador específico de pancreatite aguda, pois verifica-se que os seus níveis também aumentam noutras patologias como na gravidez ectópica, colestase, obstrução intestinal e macroamilasémia⁷.

O doseamento da amilase é feito por um método cromogéneo, no qual se utiliza um substrato para a amilase que está ligado a um grupo p-nitrofenil (incolor). Após a hidrólise produzida pela amilase, este é convertido num composto corado, o p-nitrofenol, cuja formação é monitorizada a 410 nm^{39,40}.

3.6.2. Lipase

A lipase é uma enzima que hidrolisa as ligações éster dos triglicéridos. Encontra-se principalmente no pâncreas, mas também pode estar presente no estômago e intestino delgado. O seu doseamento é útil para o diagnóstico de pancreatite aguda. É um marcador mais específico do que a amilase, mas também pode estar elevado noutras situações patológicas como carcinoma pancreático e nalgumas patologias intra-abdominais. Ambas as enzimas aumentam rapidamente no decorrer de uma pancreatite aguda, no entanto, a lipase permanece elevada durante mais tempo em relação à amilase⁷.

O doseamento da lipase é feito através de um método espectrofotométrico no qual a formação de um produto com cor é medido a 571 nm. A formação deste produto é diretamente proporcional à atividade da lipase na amostra⁴¹.

3.7. Função Hepática

3.7.1. Transaminases - Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT)

Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT) são enzimas pertencentes à classe das transferases que catalisam a transferência de um grupo amina de um α -aminoácido para um α -cetoácido. Encontram-se amplamente distribuídas no organismo, estando presentes em tecidos como o fígado, o músculo cardíaco e esquelético, os rins e os eritrócitos. São importantes marcadores de avaliação da doença hepatocelular, uma vez que existem no interior dos hepatócitos e são libertadas para a corrente sanguínea quando ocorrem danos no tecido hepático. Os valores em indivíduos saudáveis são < 34 U/L no caso da AST e entre 10 e 49 U/L no caso da ALT. A elevação dos seus teores, no contexto da função hepática, pode ser causada por hepatite aguda ou

crónica, hepatite viral, cirrose, hepatite alcoólica ou por uma neoplasia. Apesar de se verificar um aumento na concentração de qualquer uma das aminotransferases no decorrer de doença hepática, a ALT é considerada a mais específica do fígado, pois raramente se verifica um aumento da sua concentração em patologias que não sejam hepáticas^{6,7}.

Um aspeto a ter em atenção aquando da determinação da AST, é o facto desta enzima existir nos eritrócitos em quantidades apreciáveis. Ora, se amostra de soro estiver hemolisada haverá uma elevação dos teores de AST, porque ao lisarem os eritrócitos libertam o seu conteúdo intracelular para o plasma, provocando um falso aumento da AST⁶.

As transaminases são determinadas através de métodos que medem a atividade das enzimas, acoplando às reações que catalisam as enzimas malato desidrogenase, no caso da AST, e lactato desidrogenase, no caso da ALT, para a oxidação de NADH para NAD⁺. É medida a redução absorvência a 340 nm que é diretamente proporcional à atividade da enzima^{42,43}.

3.7.2. Gama – glutamiltransferase (γ GT)

A gama-glutamiltransferase é uma enzima que catalisa a transferência de um grupo γ -glutamil para outros péptidos. Está presente principalmente no rim, fígado, pâncreas e intestino. Embora o rim apresente a concentração mais elevada de γ GT, a enzima que está presente no soro tem origem essencialmente no sistema hepatobiliar. É um marcador sensível para avaliação de doenças hepatobiliares, apesar de não ser específico. Os seus teores estão elevados em situações como a obstrução biliar intra-hepática e extra-hepática, hepatites e neoplasias. Em casos de alcoolismo, a concentração de γ GT está bastante aumentada^{6,7}.

A determinação da γ GT é feita através de um ensaio cinético usando um substrato sintético, dador do grupo γ -glutamil e a glicilglicina que serve com aceitadora do grupo, permitindo a libertação do composto cromogéneo, ao qual vai ser medida a velocidade da sua formação a 410 nm, que é diretamente proporcional à atividade da γ GT⁴⁴.

3.7.3. Fosfatase alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima que catalisa a hidrólise de uma série de substratos, a pH alcalino. Está presente na maior parte dos tecidos do organismo, encontrando-se em concentrações particularmente elevadas no fígado, osso, rim e intestino. Teores aumentados da ALP verificam-se em situações de doença hepatobiliar, doença óssea, mas também está aumentada em situações fisiológicas como a gravidez (em especial no 3º trimestre) e durante o crescimento. Dentro das doenças hepatobiliares, os valores de ALP são mais elevados em casos de obstrução extra-hepática, do que na obstrução intra-hepática^{6,7}.

O doseamento da ALP deve ser feito a partir de amostras de soro ou de plasma heparinizado, uma vez que a ALP tem como cofator os iões Mg²⁺. O uso de EDTA iria impedir que fosse doseada esta enzima, pois é um agente quelante de iões divalentes⁴⁵.

3.7.4. Bilirrubina total e direta

A bilirrubina é um pigmento que se obtém a partir do catabolismo do grupo heme da hemoglobina aquando da destruição dos eritrócitos. Após a sua formação, esta é transportada para o fígado ligada à albumina, uma vez que é insolúvel em meio aquoso. No fígado ocorre o processo de conjugação com o ácido glucorónico, sendo de seguida excretada na bÍlis e posteriormente entra para o intestino. A bilirrubina existe no organismo em duas formas principais: forma conjugada (hidrossolúvel) e a forma não conjugada (não hidrossolúvel). O aumento dos níveis de bilirrubina designa-se por hiperbilirrubinémia, e pode ter origem: pré-hepática, como é o caso das anemias hemolíticas e caracteriza-se pelo aumento da fração não conjugada; hepática, que pode ser causada por alterações no metabolismo e transporte de bilirrubina ou devido a destruição e lesão hepatocelular; ou pós-hepática, que resulta de uma doença hepatobiliar obstrutiva, caracterizando-se por um aumento da fração conjugada. Um sinal visível da acumulação de bilirrubina é a icterícia^{6,7}.

No laboratório Affidea é feita a determinação da bilirrubina conjugada e da bilirrubina total (soma das frações conjugada e não conjugada). Ambos os métodos usam o vanadato para oxidarem a bilirrubina e produzir biliverdina. Esta reação de oxidação provoca uma redução na densidade ótica da cor amarela, o que é específico da bilirrubina, sendo tal medido a 451 nm. Contudo, para determinar a bilirrubina total é adicionado um detergente para solubilizar a fração não conjugada^{46,47}.

Na medição da bilirrubina há que proteger as amostras de luz solar, uma vez que a radiação UV degrada-a. Outros interferentes são a hemólise que origina valores falsamente diminuídos, e a lipémia que origina valores falsamente aumentados⁶.

3.8. Função Cardíaca

Os biomarcadores cardíacos são usados como ferramentas auxiliares ao diagnóstico e monitorização de variadas patologias cardíacas, como o enfarte agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca. Estes marcadores podem ser classificados como marcadores de lesão cardiovascular (CK, CK-MB, troponinas cardíacas e mioglobina), marcadores de *stress* hemodinâmico (péptidos natriuréticos) e, por fim, marcadores de inflamação e prognóstico (homocisteína e a proteína C reativa de alta sensibilidade)⁴⁸.

No laboratório Affidea são determinados os seguintes biomarcadores: CK, CK-MB, troponina I, mioglobina, homocisteína, proteína C reativa de alta sensibilidade e fração N-terminal do pro-BNP. Destes todos irei apenas destacar os marcadores de lesão cardíaca.

3.8.1. Creatinina Cinase

A creatina cinase é uma enzima citosólica dimérica que catalisa a fosforilação do ADP a ATP. Está presente em vários tecidos, com especial relevância no músculo esquelético, músculo cardíaco e no cérebro. Existindo 3 isoenzimas principais: CK-BB (predominante

no cérebro), CK-MM (predominante no músculo esquelético) e a CK-MB (predominante no músculo cardíaco)⁷.

Os níveis séricos elevados de CK verificam-se em situações de lesão do músculo esquelético, em especial em casos de distrofia muscular e lesão do músculo cardíaco. No entanto, o seu aumento é pouco específico para o enfarte agudo do miocárdio, sendo, portanto, necessário determinar a fração CK-MB, que é mais específica do tecido cardíaco. A elevação de CK-MB ocorre 4 a 6 horas após o início da dor torácica e atinge o pico entre 10 e 12 horas após o enfarte do miocárdio⁴⁸.

A determinação da fração CK-MB é feita através de um ensaio de imunoinibição, no qual um anticorpo anti-CK-M vai-se ligar à subunidade M da enzima, permitindo que apenas seja medida a atividade da subunidade B⁴⁹.

3.8.2. Mioglobina

A mioglobina é uma hemoproteína que tem como função assistir no transporte de oxigénio no tecido muscular. Está presente em ambos os músculo cardíaco e o músculo esquelético. No enfarte agudo do miocárdio é libertada para a circulação mais ou menos 1 hora após o dano celular atingindo o pico em cerca de 8 a 10 horas, mais rapidamente do que as troponinas e CK-MB. É um indicador precoce de dano cardíaco, embora seja inespecífico para o miocárdio, já que se verificam níveis elevados em situações de doenças do músculo esquelético, insuficiência renal e após exercício físico intenso. A mioglobina como marcador cardíaco tem sido usada como um preditor negativo de enfarte agudo do miocárdio^{7,48}.

A determinação da mioglobina é feita através de um imunoensaio tipo sanduíche com deteção por quimiluminescência⁵⁰.

3.8.2. Troponina

A troponina é um complexo de três proteínas (troponina T, I e C) que se encontram ligadas à actina do músculo cardíaco e do músculo esquelético, e que têm como função regular a contração muscular. As isoformas cardíacas das troponinas mais utilizadas para o diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio são as troponinas T (TnT) e I (TnI). Ambas são altamente específicas e sensíveis à lesão no miocárdio, sendo os marcadores preferenciais no diagnóstico do enfarte agudo do miocárdio. A troponina cardíaca I aumenta em 4 a 6 horas após o dano, atinge o pico em 12 horas e retorna aos níveis basais em 3 a 10 dias, enquanto a troponina T permanece elevada por 12 a 48 horas e volta ao normal em 10 dias^{7,48}.

No laboratório Affidea é realizada a determinação da Troponina I de alta sensibilidade (TnHI), através de um método imunoensaio tipo sanduíche com deteção por quimiluminescência⁵⁰.

3.9. Função Tiroideia

A glândula da tiroide é responsável pela produção de duas hormonas tiroideias: a tiroxina e triiodotironina, mais comumente designadas de T4 e T3, respetivamente. A avaliação funcional da tiroide pode ser feita recorrendo à medição de vários parâmetros. O objetivo desta avaliação é poder determinar as causas por detrás dos níveis levados (hipertiroidismo) e reduzidos (hipotiroidismo) das hormonas tiroideias.

No laboratório Affidea são determinadas a hormona estimulante de tiroide (TSH), T4 e T3 livre, T4 e T3 total, tiroglobulina, anticorpos anti-recetor da TSH (TRAb), anticorpos anti-peroxidase tiroideia (anti-TPO) e anticorpos anti-tiroglobulina. Irei apenas destacar com mais detalhe as determinações das hormonas tiroideias e da TSH.

3.9.1. Hormona estimulante da tiroide (TSH)

A TSH é uma glicoproteína produzida na pituitária anterior cuja função principal é estimular a glândula da tiroide a sintetizar e secretar as hormonas T3 e T4. A TSH liga-se a recetores específicos nas células foliculares da tiroide, promovendo a entrada de iodo nas células foliculares, a síntese de tiroglobulina e da peroxidase tiroideia e a proteólise da tiroglobulina que vai permitir que se obtenha T3 e T4. Ao mesmo tempo, a estimulação da TSH faz aumentar o tamanho e o número de células foliculares da tiroide. Por sua vez, a síntese de TSH na hipófise está dependente da estimulação pela hormona de libertadora de tirotrofina (TRH), que é sintetizada no hipotálamo. Deste modo, estabelece-se um eixo de regulação da produção das hormonas tiroideias, que é controlado por um mecanismo de *feedback* negativo. Concentrações elevadas de T3 e T4 no sangue inibem a síntese de TSH e TRH, enquanto concentrações diminuídas de T3 e T4 estimulam a sua secreção^{6,7}

A determinação da TSH é um marcador essencial no diagnóstico de disfunções da tiroide, especialmente para distinguir se as alterações na tiroide são causadas por alterações na própria glândula da tiroide, ou por disfunções no hipotálamo e hipófise. Em casos de hipotiroidismo primário, os níveis de TSH encontram-se aumentados, enquanto no hipotiroidismo secundário os seus níveis estão diminuídos⁷. Além disso, a determinação de TSH é importante para o diagnóstico das formas subclínicas de hipotiroidismo e hipertiroidismo.

O doseamento da TSH é realizado por um imunoensaio de 3ª geração com deteção por quimiluminescência direta. É utilizado um anticorpo antifluoresceína (anti-FITC) monoclonal ligado covalentemente a partículas paramagnéticas, um anticorpo anti-TSH marcado com fluoresceína e um anticorpo anti-TSH monoclonal de rato conjugado com albumina de soro bovino⁵².

3.9.2. T3 livre e T4 livre

As hormonas T3 e T4 produzidas na tiroide existem no organismo em duas formas: forma livre, que é metabolicamente ativa, e na forma ligada a proteínas, em especial à a globulina fixadora de tiroxina (TBG) e à albumina em menor proporção. Alterações nestas proteínas transportadoras conduzem a alterações nos teores de T3 e T4 totais, pelo que a melhor forma de avaliar a atividade funcional da tiroide é medindo as frações livres

destas hormonas. Na figura 7 encontra-se explicitado a interpretação dos resultados destes parâmetros^{6,7}.

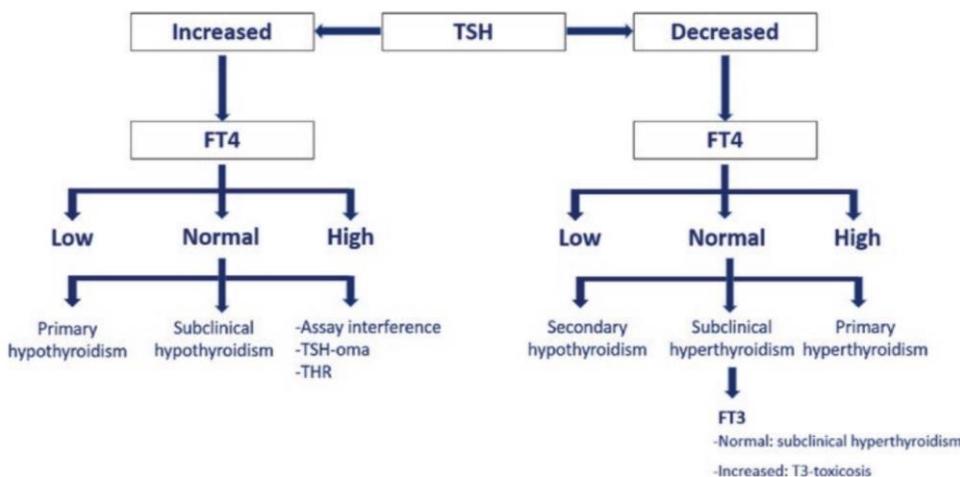


Figura 7. Algoritmo de interpretação dos resultados. Adaptado de: (53).

A causa mais comum de hipotireoidismo primário é a tiroidite de Hashimoto. Esta trata-se de uma doença autoimune na qual ocorre a destruição das células foliculares. Pode-se confirmar o diagnóstico determinando anticorpos anti-TPO. No caso do hipertireoidismo primário, a causa mais frequente é a doença de Graves, na qual autoanticorpos anti-recetor TSH (TRab) estimulam a glândula da tireoide a produzir mais hormonas. Para auxiliar no diagnóstico devem ser determinados os TRab⁵³.

O doseamento de T3 e T4 livre é feita através de um imunoensaio do tipo competitivo, no qual as hormonas na amostra competem com um análogo de T3 e T4, que está ligado a partículas paramagnéticas na fase sólida, por uma quantidade limitada de anticorpo monoclonal anti-T3 e anti-T4 marcado com éster de acridina. O sinal de quimiluminescência obtido é inversamente proporcional à concentração das hormonas na amostra^{54,55}.

3.10. Metabolismo fosfo-cálcio

3.10.1. Cálcio (Ca²⁺)

O cálcio é o catião mais abundante no organismo. A grande maioria da sua concentração no organismo encontra-se nos ossos e apenas uma pequena parte é que circula no sangue. No sangue o cálcio circula em 3 formas diferentes: 50% existe na forma ionizada ou livre (fisiologicamente ativo), 40% está ligado a proteínas (principalmente à albumina) e 10% encontra-se complexado com aniões. Este elemento desempenha várias funções no organismo entre as quais, a mineralização do esqueleto, a contração muscular, a coagulação sanguínea e no crescimento e divisão celular. A concentração de cálcio plasmático é regulada principalmente pela paratormona (PTH) e pela vitamina D. E estas hormonas atuam principalmente em três órgãos: no intestino, onde o cálcio é absorvido da dieta, nos ossos, que constitui o maior reservatório de cálcio e no rim, onde se dá a sua reabsorção e excreção^{6,7}.

Alterações no metabolismo do cálcio podem ser separadas naquelas que causam hipocalcemia (redução da concentração sérica total de cálcio) e as que causam hipercalcemia (aumento da concentração sérica total de cálcio). Dentro das causas que originam hipocalcemia podem ser, má nutrição, hipoparatiroidismo primário, a insuficiência renal crônica e deficiência em vitamina D. Causas de hipercalcemia são o hiperparatiroidismo e síndromes paraneoplásicas produtores de PTHrP (peptídeo relacionado com a PTH)^{6,7}.

No laboratório Affidea, o cálcio total é doseado através de uma reação com Arsenazo III, formando um composto colorido estável a pH ácido. A formação deste composto é medida a 658 nm, sendo proporcional à concentração total de cálcio⁵⁶.

Para a determinação do cálcio não podem ser usadas amostras de plasma em EDTA, já que este anticoagulante é um agente quelante de íons divalentes, o que iria conduzir a resultados falsamente reduzidos deste íon.

3.10.2. Fósforo

O fósforo no organismo existe em duas formas: na forma orgânica, que está presente principalmente nos tecidos moles, e na forma inorgânica, que está presente principalmente no osso (hidroxiapatite) e uma pequena parte no líquido extracelular. É esta fração inorgânica no soro e plasma que é doseada. No plasma o fosfato inorgânico pode estar sob a forma de íons monovalentes (H_2PO_4^-) ou divalentes (HPO_4^{2-}). Em semelhança ao que acontece com o cálcio, o fosfato pode circular na forma livre, complexado a catiões, ou ligado a proteínas. Este elemento desempenha funções relacionadas com mineralização óssea, contração muscular, armazenamento de energia (ATP), e tem um papel estrutural nos ácidos nucleicos e nos fosfolípidos. É normalmente determinado em conjunto como cálcio, pois alterações nas concentrações de cálcio podem também influenciar as concentrações de fosfato. A hiperfosfatemia pode ter origem em doenças como insuficiência renal e hipoparatiroidismo, enquanto a hipofosfatemia pode ser causada por deficiência de vitamina D, hipertparatiroidismo ou uma tubulopatia renal^{6,7}.

O doseamento de fósforo é baseado numa reação com o molibdato de amónia na presença de ácido sulfúrico, que conduz à formação de um composto de fosfomolibdato, cuja absorvância é medida a 340 nm⁵⁷.

Para a determinação de fósforo plasmático deve ser usado uma amostra de soro ou plasma heparinizado. O EDTA não deve ser usado, uma vez que interfere na formação do complexo de fosfomolibdato.

3.10.3. Paratormona (PTH)

A paratormona (PTH) é sintetizada pelas células principais das glândulas paratiroides. Desempenha um papel essencial na regulação da concentração do cálcio sérico e fosfato. Atua ao nível dos ossos, estimulando a reabsorção óssea pelos osteoclastos, nos rins aumenta a reabsorção tubular renal de cálcio e a excreção de fosfato, e também favorece conversão de 25-hidroxivitamina D a 1,25-dihidroxivitamina D, através da estimulação da atividade da 1α hidroxilase renal, estimulando indiretamente a absorção de cálcio no

intestino. Nas glândulas da paratiroide existem recetores de cálcio especializados, que estimulam ou inibem a produção de PTH face às concentrações diminuídas ou aumentadas de cálcio no sangue, respetivamente. Para além da concentração de cálcio sérico, também a concentração vitamina D regula a síntese da PTH, sendo que níveis aumentados de vitamina D vão inibir a síntese de PTH^{6,7}.

O doseamento da PTH no soro é útil no diagnóstico diferencial de hipercalcemia e hipocalcemia, bem como na avaliação da função das glândulas paratiroides em patologias ósseas e na insuficiência renal⁶.

A determinação da PTH é feita através de um imunoensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais com deteção por eletroquimiluminescência direta⁵⁸.

3.10.4. Vitamina D

A vitamina D é uma hormona esteroide que tem como função estimular a absorção de cálcio e fósforo no intestino delgado, e desempenha funções importantes na mineralização óssea. A sua origem provém de duas fontes: síntese endógena na pele que origina vitamina D3 ou proveniente da alimentação (fonte exógena). Ambas as formas são convertidas em 25-hidroxivitamina D no fígado e só no rim sofrem uma segunda hidroxilação originando o metabolito ativo, 1,25-dihidroxivitamina D. Para a determinação dos níveis séricos de vitamina D, não é usada a forma ativa da hormona, mas sim a sua precursora, a 25-hidroxivitamina D. Isto deve-se ao facto de a 1,25-dihidroxivitamina D ter um tempo de meia-vida muito curto no sangue e os seus níveis serem altamente regulados pela PTH, cálcio e fosfato, ou seja, mesmo em casos severos de deficiência de vitamina D, os seus níveis nunca se alteraram significativamente. Assim, o uso de 25-hidroxivitamina D é um indicador mais fidedigno da quantidade de vitamina D obtida através da ingestão alimentar e da exposição à luz solar, assim como da vitamina D que será convertida na forma ativa^{6,7}.

O doseamento da vitamina D tem como objetivo determinar o estado nutricional desta hormona. Concentrações de vitamina D entre 30 e 100 ng/mL são consideradas como níveis suficientes, concentrações entre 20 e 30 ng/mL são indicadoras de insuficiência de vitamina D, e concentrações inferiores a 20 ng/mL são consideradas como uma deficiência em vitamina D⁶.

O doseamento de 25-hidroxivitamina D é feito por um imunoensaio do tipo competitivo por quimiluminescência, no qual a quantidade de luz detetada será inversamente proporcional à quantidade de vitamina D na amostra⁵⁹.

3.11. Marcadores de Anemia

A anemia é definida como uma redução do conteúdo de hemoglobina no sangue. O seu diagnóstico é feito através do uso de um contador hematológico que permite obter a contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito, os índices eritrocitários e a contagem de plaquetas e glóbulos brancos. Contudo, para auxiliar na determinação etiológica da anemia podem ser realizados outros testes laboratoriais.

Dentro da química analítica podem ser determinados parâmetros relacionados com o metabolismo do ferro (ferro total sérico, transferrina, ferritina sérica, capacidade total de fixação do ferro) no caso de anemias microcíticas, mas também podem ser doseados os teores de ácido fólico e vitamina B₁₂ para auxiliar no estudo de anemias macrocíticas⁶⁰.

3.11.1. Ferro

O ferro é um elemento essencial ao organismo. Participa em vários processos tais como, reações de oxidação-redução na cadeia transportadora de elétrons e é necessário à síntese de proteínas transportadoras de oxigênio, nomeadamente a hemoglobina e a mioglobina. O ferro é obtido através da alimentação, sobretudo na forma férrica (Fe³⁺), sendo posteriormente absorvido no intestino na sua forma ferrosa (Fe²⁺). No plasma o ferro é transportado ligado à transferrina na forma férrica, sendo preferencialmente direcionado para a medula óssea para a produção de eritrócitos. Todo o ferro que não é necessário no imediato é armazenado sob a forma de ferritina e hemossiderina. A ferritina constitui as reservas de ferro no organismo que são rapidamente mobilizáveis, enquanto a hemossiderina são as reservas que são lentamente mobilizáveis. A regulação das concentrações de ferro é feita através do controlo das quantidades de ferro que são absorvidas no intestino, sendo tal dependente das reservas existentes no organismo, assim como da atividade eritropoética^{6,7,60}.

A determinação do ferro total sérico é utilizada para o estudo de alterações do metabolismo do ferro, em particular permite auxiliar no diagnóstico diferencial e monitorização de anemias. Valores diminuídos de ferro podem ser causados por um baixo aporte de ferro na dieta, uma absorção deficiente, por perdas como hemorragias e menstruação, e também por patologias inflamatórias crónicas. Valores séricos totais de ferro aumentados têm origem em patologias como a hemocromatose ou patologias hepáticas^{6,7,60}.

Para o doseamento de ferro, este é primeiramente desagregado da transferrina em meio ácido, levando à sua redução para a forma ferrosa. O ferro ferroso é depois complexado à ferrozina, produzindo um cromóforo colorido que absorve a 571 nm⁶¹.

3.11.2. Ferritina

A ferritina é constituída por uma proteína, a apoferritina, e moléculas de Fe³⁺ que se ligam a ela. A sua função é de armazenamento do ferro no organismo. Esta proteína existe em várias células do corpo, com maior relevância nas células do sistema reticuloendotelial, mas também, no baço, medula óssea e fígado. A ferritina armazena o excesso de ferro intracelular, permitindo que face a uma situação aguda da necessidade de ferro, este seja prontamente mobilizável. A concentração sérica de ferritina reflete o estado das reservas de ferro do organismo. Por isso, é utilizada como marcador sensível de deficiência em ferro. Em conjunto com os outros marcadores de avaliação do metabolismo do ferro permite diferenciar casos de anemias ferropénicas de anemias das doenças crónicas, como também de anemias causadas por talassémias ou hemocromatose^{6,60}.

O doseamento da ferritina é feito por meio de um imunoensaio tipo sanduiche com deteção por quimiluminescência direta⁶².

3.11.3. Transferrina

A transferrina é uma glicoproteína, produzida no fígado, constituída por apotransferrina e Fe^{3+} . A sua principal função é transportar o ferro no sangue, fazendo-o chegar às células que possuem recetores da transferrina nas suas membranas, como os eritroblastos na medula óssea. No estado fisiológico encontra-se saturada a mais ou menos 30%. O seu doseamento representa a capacidade latente de fixação do ferro. Os seus níveis estão elevados em situações de deficiência de ferro, gravidez e hepatites. Os níveis reduzidos de transferrina verificam-se em situações de inflamação aguda (proteína de fase aguda negativa), doença hepática crónica e hemocromatose^{6,60}.

O seu doseamento é feito por um método imunotubidimétrico reforçado com PEG. A amostra reage com um antissoro específico para formar um precipitado que pode ser medido de forma turbidimétrica a 340/596 nm⁶³.

3.11.4. Capacidade total de fixação do ferro (TIBC)

Capacidade total de fixação do ferro consiste na soma da concentração de ferro sérico (transferrina saturada) com a capacidade latente de fixação do ferro (transferrina não saturada). Este parâmetro permite avaliar a capacidade da transferrina se ligar ao ferro, permitindo distinguir anemias ferropénicas de anemias das doenças crónicas. No caso de anemia ferropénica o TIBC encontra-se aumentado, pois a quantidade de ferro é baixa para a quantidade de transferrina disponível, enquanto na anemia das doenças crónicas o TIBC é menor. Em situações de excesso de ferro como a hemocromatose, o TIBC também está diminuído⁶⁰.

Para se determinar o TIBC é utilizado um método sequencial monitorizado espectrofotometricamente. No primeiro passo é medido o ferro presente no soro por meio da formação de um complexo colorido com Chromazurol B, em pH ácido. No segundo passo é medido a transferrina, o pH da reação aumenta e a transferrina livre liga-se ao ferro dissociando-o do complexo anteriormente formado. A redução da absorvância do complexo colorido é diretamente proporcional à TIBC⁶⁴.

3.11.5. Vitamina B₁₂

A vitamina B₁₂ ou cianocobalamina é obtida através da dieta exclusivamente a partir do consumo de produtos de origem animal. Para que seja absorvida no intestino, esta necessita de se ligar à proteína fator intrínseco que é produzida pelas células parietais do estômago. Uma vez chegado ao íleo, o complexo fator intrínseco-vitamina B₁₂ liga-se a recetores específicos e passa para o sangue portal. Na corrente sanguínea, a vitamina B₁₂ é transportada pela proteína transcobalamina, levando-a para as células da medula óssea, nomeadamente os eritroblastos. O excesso de Vitamina B₁₂ é armazenado no fígado. A vitamina B₁₂ funciona como cofator a várias enzimas, em particular nas enzimas metionina sintase e metilmalonil-CoA mutase. Desempenha um papel indireto na síntese do DNA por meio da conversão de metil-THF em THF, que é o substrato para a síntese 5,10-metileno tetrahidropoliglutamato. Esta última coenzima está envolvida na síntese de timidina, que é usada na síntese de DNA^{6,65}.

A deficiência em vitamina B₁₂ está associada à ao estabelecimento de uma anemia macrocítica megaloblástica. Tendo como causas subjacentes, uma absorção diminuída, principalmente devida a uma produção deficiente de fator intrínseco (anemia perniciososa), mas também outras patologias de má absorção intestinal ou mesmo uma ingestão insuficiente da vitamina podem causar uma deficiência em vitamina B₁₂⁶⁵.

Para dosear a vitmanina B₁₂ é usado um imunoensaio competitivo com detecção por quimioluminescência. Existindo uma relação inversa entre a quantidade de vitamina B₁₂ na amostra e quantidade de sinal emitido⁶⁶.

3.11.6. Folatos (ácido fólico)

Os folatos é o termo genérico atribuído a um conjunto de compostos que englobam o ácido fólico e os seus derivados, sendo que as formas metabolicamente ativas são o ácido dihidrofólico (DHF) e o ácido tetrahidrofólico (THF), com derivados metil e metileno. Os folatos são obtidos através da alimentação na forma de poliglutamatos e são absorvidos ao nível do jejuno, onde são cindidos em monoglutamatos passando para a corrente sanguínea na forma de metil-THF. Os folatos funcionam como coenzimas ou co-substratos envolvidos em reações de transferência de grupos metilo, necessários para a síntese de ácidos nucleicos e o metabolismo de aminoácidos. Em particular, o metil-THF é dador de grupos metilo para a conversão de homocisteína em metionina, nesta reação também intervém a vitamina B₁₂. Os folatos são também necessários para a metilação de dTMP, que é um precursor do nucleótido de timidina e constitui um dos quatros precursores necessários à síntese de DNA. Assim, uma deficiência em folatos vai comprometer a síntese de DNA que é fundamental para a normal divisão celular^{7,65}.

Em semelhança ao que acontecia com a vitamina B₁₂, uma deficiência em folatos vai causar o estabelecimento de uma anemia macrocítica ou megaloblástica. A deficiência em folatos pode ser causada por uma ingestão insuficiente, má absorção ou ainda, a uma necessidade acrescida como no caso da gravidez⁶⁵.

O doseamento dos folatos é feito por um imunoensaio competitivo com detecção por quimioluminescência. Existindo uma relação inversa entre a quantidade de folatos na amostra e quantidade de sinal emitido⁶⁷.

3.12. Marcadores Tumorais

Os marcadores tumorais são moléculas que funcionam como indicadores bioquímicos mensuráveis da presença de um tumor. Estas moléculas podem ser produzidas pelas próprias células tumorais, ou serem produzidas em resposta ao tumor pelas células não tumorais. Os marcadores tumorais englobam vários tipos de moléculas, que podem ser enzimas, hormonas, antigénios oncofetais, glicoproteínas, proteínas, recetores, entre outros^{6,7,68}.

Idealmente, um marcador tumoral deveria ser específico para um tipo de cancro, estar ausente num individuo saudável e ser sensível o suficiente para permitir detetar tumores ainda nas fases iniciais, permitindo obter um diagnóstico mais precoce. Contudo, a grande

maioria destes marcadores são pouco específicos, uma vez que muitos são produzidos tanto em células normais como em células cancerígenas. Além disso, os marcadores tumorais muitas vezes não são detetáveis em estádios iniciais do cancro e alguns destes podem ser detetados em mais do que um tipo de cancro. Posto isto, a utilidade do doseamento de marcadores tumorais é mais na ótica da avaliação e progressão da neoplasia após o tratamento, ou como indicador de prognóstico ou de recidivas^{6,7,68}.

Na tabela 3, estão explicitados os diferentes marcadores que são doseados no laboratório Affidea, com exceção do PSA, que irei falar em maior detalhe. São apresentadas as suas características principais e a sua utilidade clínica.

Tabela 3. Marcadores tumorais

Marcador Tumoral	Características	Utilidade Clínica
α-Fetoproteína	Glicoproteína estruturalmente semelhante à albumina. É produzida durante o desenvolvimento embrionário pelo saco vitelino e posteriormente pelo fígado fetal	Marcador de prognóstico e monitorização da terapêutica do carcinoma hepatocelular
CA 15.3	Glicoproteína de superfície celular pertencente ao grupo das mucinas	Marcador de monitorização do tratamento e da progressão do carcinoma da mama metástico
CA 19.9	Glicoproteína de superfície	Marcador de monitorização e determinação do prognóstico do carcinoma do pâncreas e outros carcinomas gastrointestinais (colorretal e gástrico)
CEA (antigénio carcinoembrionário)	Glicoproteína de superfície pertencente à família das imunoglobulinas	Marcador de monitorização pós-tratamento do carcinoma colorretal e monitorização de carcinomas da mama, pulmão e gastrointestinais.
CA 125	Glicoproteína de superfície celular pertencente ao grupo das mucinas	Marcador de monitorização da resposta ao tratamento e deteção de recidivas do carcinoma do ovário.

3.12.1. Antigénio Específico da Próstata (PSA) e Antigénio Livre Específico da Próstata (fPSA)

O antigénio específico da próstata (PSA) é uma glicoproteína produzida exclusivamente pelas células epiteliais dos ácinos e ductos da glândula da próstata. É uma protease serina que tem como função regular a viscosidade do líquido seminal, dissolvendo o muco cervical. Em indivíduos saudáveis são detetáveis níveis séricos baixos desta proteína. O

PSA existe em circulação sob duas formas: na forma livre (PSA livre) e na forma complexada a proteínas como a α 1-antitripsina e a α 2-macroglobulina^{6,7}.

Os níveis elevados de PSA podem ser detetados no cancro da próstata, mas também noutras patologias benignas como prostatite, hipertrofia benigna da próstata e na idade avançada. Deste modo, é importante distinguir valores elevados PSA que são causados por condições benignas, daqueles que tem origem numa neoplasia. Para tal é recorre-se à determinação do PSA livre e do PSA total. Quando os valores de PSA total se encontram dentro de intervalo de 4 – 10 μ g/L, designada de zona cinzenta, deve-se determinar o PSA livre, para que se calcule a razão PSA livre/PSA total. O que acontece é que, no caso de a elevação ser causada por uma neoplasia a existe mais PSA na forma complexada, e menos PSA na forma livre, quando comparado com uma hiperplasia benigna da próstata^{6,7}.

Para a deteção de ambos o PSA livre e PSA total é utilizado um imunoensaio do tipo sanduiche com deteção por quimiluminescência^{69,70}.

3.13. Sorologia Infeciosa

A sorologia infecciosa consiste na determinação quantitativa e qualitativa de anticorpos específicos (IgG e IgM) que são desenvolvidos pelo organismo em resposta a um agente patogénico. Consiste numa abordagem indireta de fazer o diagnóstico a diferentes infeções causadas por vírus, bactérias e parasitas. Para além da determinação de anticorpos podem também ser determinados antigénios específicos dos agentes infecciosos. A vantagem de utilizar esta metodologia prende-se com o facto de vários agentes patogénicos serem de crescimento difícil em meio de cultura, nomeadamente vírus ou até mesmo bactérias como o *Treponema pallidum*.

No laboratório Affidea são realizados sorologias para os seguintes microrganismos: Vírus Hepatite A, B e C, *Toxoplasma gondii*, Vírus da Rubéola, Citomegalovírus (CMV), Vírus Epstein-Barr (EBV), HIV e *Treponema pallidum*. Os ensaios são realizados no Atellica® IM 1600, com exceção do Vírus Epstein-Barr e das repetições de resultados duvidosos e confirmação de alguns testes, que são realizados no aparelho VIDAS®.

3.13.1. Vírus da Hepatite B

O Vírus da Hepatite B (HBV) é um dos principais agentes causadores de hepatites virais. É transmitido por contacto direto com sangue, contacto sexual e por verticalmente de mãe para o feto. Possui tropismo para os hepatócitos e induz uma inflamação aguda deste órgão, que em cerca de 90-95% dos casos leva a uma convalescença e cura com imunidade protetora. Contudo, cerca de 5% das infeções primárias podem evoluir para uma infeção crónica, com replicação viral persistente por mais de 6 meses. Nestes casos à uma probabilidade acrescida do desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular⁷¹.

No diagnóstico de uma infecção por HBV devem ser detetados os seguintes antígenos e anticorpos: antígeno HBs, antígeno HBe, anticorpo anti-HBs, anticorpo anti-HBc IgM e IgG e anticorpo anti-HBe. Através da combinação destes marcadores serológicos é possível identificar as diferentes fases da infecção por HBV, como se pode observar na tabela 4.

Tabela 4. Interpretação dos marcadores serológicos do HBV. Adaptado de (71)

HBsAg	HBeAg	Anti-HBc total	Anti-HBc IgM	Anti-HBe	Anti-HBs	Interpretação
+	+/-	-	-	-	-	Fase de incubação
+	+	+	+	-	-	Fase aguda da infecção
-	-	+	-	+/-	-	Período de “janela” ou anti-HBs com título baixo; ou falso positivo.
-	-	+	-	+/-	+	Imunidade após infecção pelo HBV
+	+	+	-	-	-	Infeção crónica portador com alta infecciosidade
+	-	+	-	+	-	Infeção crónica portador assintomático com baixa infecciosidade
-	-	-	-	-	+	Imunidade após vacinação
-	-	-	-	-	-	Sem contacto prévio

3.13.2. Vírus da imunodeficiência humana (HIV)

O HIV é um retrovírus pertencente ao género *Lentivirus*, são reconhecidas duas espécies o HIV-1 e o HIV-2. São transmitidos por contacto sexual, contacto direto com sangue e verticalmente de mãe para o feto. Possuem tropismo para linfócitos, monócitos e células dendríticas, causando a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) que se caracteriza por uma depleção de linfócitos T CD4⁺⁷¹.

No diagnóstico do HIV, no laboratório Affidea é utilizado um teste de rastreio de 4^a geração que combina a deteção em simultâneo de anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2 e do antígeno p24. A deteção destes é feita usando um imunoensaio tipo sanduíche por quimiluminescência, no qual os anticorpos são detetados por ligação a antígenos biotinilados dos vírus HIV-1 e HIV-2, e o antígeno p24 presente na amostra, é detetado por ligação a anticorpos anti-p24. Este ensaio permite reduzir o tempo após a infecção inicial durante o qual não há resultados positivos, uma vez que os anticorpos só atingem níveis detetáveis 4 semanas após a infecção. Contudo, o antígeno p24 é detetável mais ou menos 2 a 3 semanas após a infecção⁷². No laboratório, caso haja um resultado positivo

este é confirmado pelo ensaio realizado no aparelho VIDAS. Uma vez confirmado, é pedida uma repetição de colheita, e é a partir desta que se vai realizar o teste confirmatório do HIV, *Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay*. Este teste é um teste imunocromatográfico que permite diferenciar os anticorpos individuais para o HIV-1 e HIV-2⁷³. É constituído por seis bandas que correspondem a diferentes proteínas constituintes dos vírus HIV:

- Banda 1: gp36 (glicoproteína do invólucro do HIV-2)
- Banda 2: gp140 (glicoproteína do invólucro do HIV-2)
- Banda 3: p31 (polimerase HIV-1)
- Banda 4: gp160 (invólucro HIV-1)
- Banda 5: p24 (proteína da cápside do HIV-1)
- Banda 6: gp41 (glicoproteína do invólucro do HIV-, Grupo M e O)
- Banda 7: proteína A (banda de controlo)

A interpretação dos resultados é feita de acordo com o aparecimento das bandas, como se pode observar nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Critérios de interpretação para o HIV-1. Adaptado de: (73)

Interpretação	Critérios <i>BioRad</i>
Positivo	Quaisquer 2 bandas das 4 linhas de teste de HIV-1 com pelo menos 1 ENV - gp160 (Banda 4) ou gp41 (Banda 6)
Negativo	Ausência de bandas
Indeterminado	Só um abanda ENV (Banda 4 ou 6) Só uma banda GAG (Banda 5) Só uma banda POL (Banda 3) Uma banda GAG e uma banda POL (Bandas 5 e 3)

Tabela 6. Critérios de interpretação para o HIV-2. Adaptado de: (73)

Interpretação	Critérios <i>BioRad</i>
Positivo	As duas do HIV-2 tem de estar presentes gp36 (Banda 1) e gp140 (Banda 2)
Negativo	Ausência de bandas
Indeterminado	Apenas a banda 1 está presente Apenas a banda 2 está presente

3.13.3. Toxoplasmose, Rubéola e Citomegalovírus – Grupo TORCH

O grupo TORCH representa um grupo de agentes patogénicos que conseguem atravessar a barreira placentária e causarem infeções congénitas, levando muitas vezes a

consequências graves para o feto. Deste grupo incluem-se agentes como *Toxoplasma gondii*, vírus da rubéola, citomegalovírus (CMV), o vírus herpes simplex e outros agentes como a *Treponema pallidum* ou HIV. Deste modo, torna-se fundamental rastrear a mulher grávida para possíveis primo-infecções por estes agentes, uma vez que é nestes casos que ocorre a transmissão vertical⁷⁴.

O *Toxoplasma gondii* é um parasita protozoário intracelular obrigatório. O seu hospedeiro principal é o gato e é transmitido aos humanos principalmente pela ingestão de alimentos ou água contaminados com fezes de gato que contém esporozoítos. A toxoplasmose é frequentemente uma infecção assintomática ou com sintomas ligeiros, no entanto, é no contexto de indivíduos imunodeprimidos ou em mulheres grávidas, que a infecção pode ser mais grave. Se durante a gravidez a mulher for infetada pela primeira vez pelo *Toxoplasma gondii*, há um risco de haver uma infecção congénita. Como consequências desta infecção, podem ocorrer alterações e lesões fetais que podem levar ao aborto, a um parto prematuro e recém-nascidos com anomalias graves como microcefalias.

O vírus da rubéola é transmitido por gotículas de saliva e secreções nasofaríngeas sendo esta infecção muito comum ocorrer em idades na faixa do pré-escolar. Origina infecções autolimitadas sem sintomatologia ou pode originar uma erupção maculo-papulosa na face característica, acompanhada de febre moderada e linfadenopatia. De igual modo ao que acontece na toxoplasmose, as primoinfecções durante a gravidez, em especial durante o 1º trimestre, podem ser transmitidas verticalmente por via placentária, provocando complicações graves no feto. No caso de uma reinfeção, raramente está associado o perigo de transmissão vertical⁷¹.

O citomegalovírus (CMV) é um vírus pertencente à família dos *Herpesviridae*. Causa infecções benigna, assintomáticas ou com uma síndrome mononucleósica, ficando depois latente em células como monócitos e macrófagos, podendo ocasionar reativações. Na mulher grávida, o CMV é o principal agente viral que causa infecções congénitas, sendo que uma infecção primária na gravidez resulta numa probabilidade de 40% de o feto ser infetado e 10% de probabilidade de se desenvolverem anomalias no recém-nascido⁷¹.

O diagnóstico pré-natal de infecções por estes agentes é imperioso na mulher grávida. Para tal são determinados os anticorpos da classe IgM e IgG específicos para cada um destes microrganismos (anti-toxoplasma, anti-rubéola e anti-CMV). O objetivo deste rastreio é poder diferenciar situações de primo-infecção de situações de reinfeção, uma vez que é durante a primoinfecção que se dá a transmissão vertical. Numa reinfeção, a gestante já possui imunidade protetora como sendo as IgG específicas. Na figura 8 está explicitada a interpretação resumida dos resultados para estas três infecções.

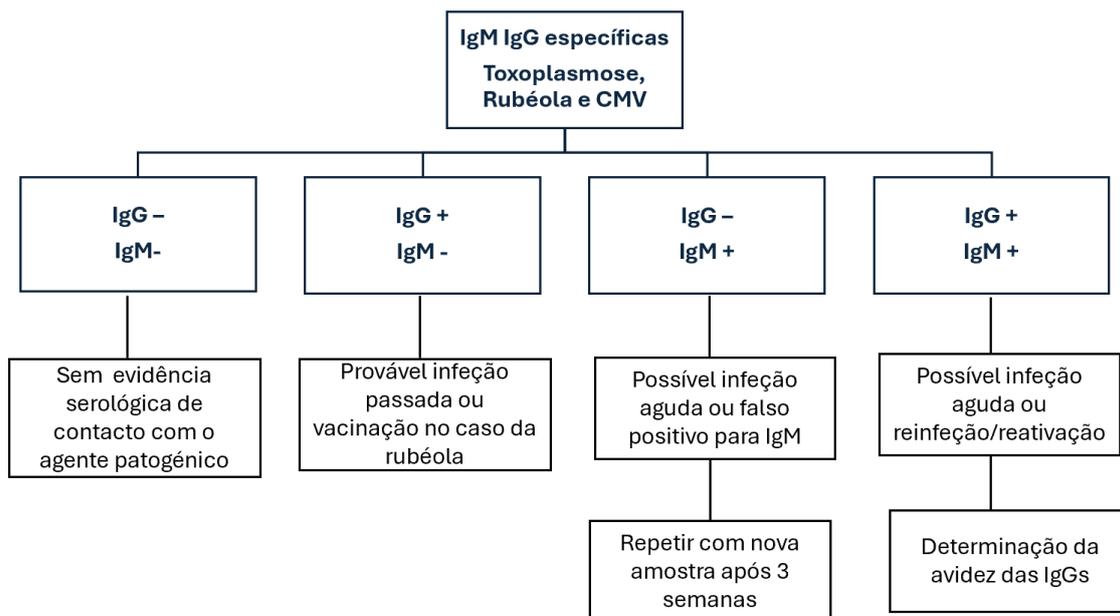


Figura 8. Interpretação dos resultados da serologia para Toxoplasmose, Rubéola e CMV

Os métodos usados para determinar a anticorpos IgM e IgG para estes agentes são imunoensaios tipo sanduíche com deteção por quimioluminescência. No laboratório Affidea, caso o resultado dos ensaios de determinação das IgM der reativo, é feita a confirmação no aparelho VIDAS. No caso da toxoplasmose é ainda feito um ensaio para avaliar a avidéz das IgGs, que utiliza a ureia como agente dissociador da ligação anticorpo-antígeno. Neste ensaio é medida a força de ligação das IgGs ao seu antígeno, sendo que IgGs com alta avidéz são encontradas em infeções com mais de 4 meses, por outro lado IgGs de baixa avidéz são características de infeções mais recentes (com menos de 4 meses).

3.13.4. Sífilis

A sífilis é uma doença causada pela bactéria *Treponema pallidum*. É transmitida por via sexual, sanguínea e vertical. A sífilis se não for devidamente tratada pode durar vários anos e apresenta diferentes etapas com apresentações clínicas distintas. A sífilis precoce engloba a sífilis primária, a sífilis secundária e a sífilis latente precoce, sendo que é nestas fases em que se dá a transmissão da bactéria. A sífilis tardia consiste na sífilis latente tardia e sífilis terciária (neurosífilis, cardiossífilis e goma), nesta fase já não ocorre transmissão⁷⁴.

A bactéria *Treponema pallidum* tem a particularidade de não crescer em meios de cultura, e de apenas ser observável ao microscópio ótico em microscopia de campo escuro ou recorrendo a colorações com fluorescência. Assim, o diagnóstico da sífilis é feito maioritariamente recorrendo a testes serológicos de deteção de anticorpos. São usadas duas técnicas principais para o diagnóstico da sífilis: testes não treponémicos e testes treponémicos. Os testes não treponémicos medem os anticorpos IgM e IgG que se desenvolvem quando as células infetadas libertam material lipídico durante os estádios

iniciais da doença (também denominados de anticorpos anti-reaginas). Os testes mais comumente usados são o VDRL (Venereal Diseases Research Laboratory) e o RPR (Rapid Plasma Reagin). São métodos de screening e também como forma de monitorização da terapêutica, uma vez que, se esta for bem-sucedida, os testes revertem para resultados não reativos. Um resultado positivo nestes testes deve ser confirmado com um teste treponémico, pois pode haver falsos positivos com outras situações como doenças autoimunes, gravidez ou após uma vacinação⁷⁵.

No laboratório Affidea é usado o método RPR. Neste método é usado um reagente de partículas de carvão vegetal revestidas com um complexo lipídico, cardiolipina, lectina e colesterol, que é adicionado ao soro dos pacientes. Caso dê um resultado positivo observa-se aglutinação das partículas. Este é um método semi-quantitativo, uma vez que permite por meio de diluições seriadas obter o título de anticorpos, como se pode observar na figura 9. O título dos anticorpos corresponde ao inverso da menor diluição em que se verifica aglutinação.

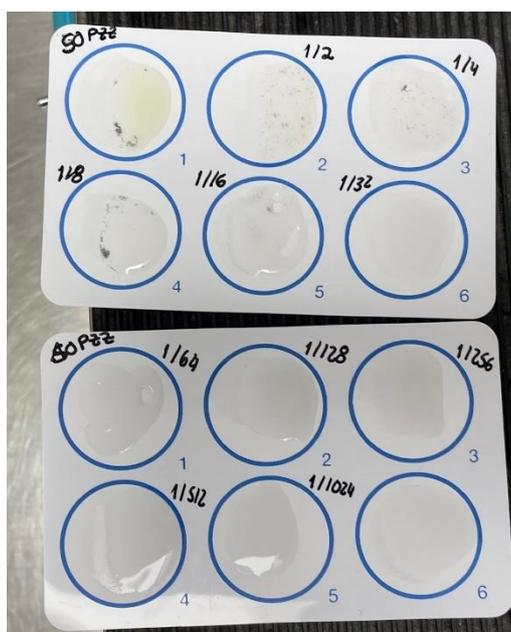


Figura 9. Resultado da diluição do RPR (positivo até 1/32)

Os testes treponémicos detetam anticorpos específicos anti-*Treponema pallidum*. Estes testes são mais sensíveis e específicos quando comparados aos testes não treponémicos. São utilizados para a deteção da sífilis precoce, uma vez que positivam antes dos testes não treponémicos, mas não são bons métodos para avaliação da terapia uma vez que os anticorpos anti-*Treponema pallidum* vai ser sempre positivos durante a vida toda⁷⁵.

No laboratório Affidea são usados dois testes treponémicos. O primeiro é o teste Syph que é feito nos Atellica IM, que consiste num teste qualitativo, imunoensaio direto tipo sanduíche com deteção por quimiluminescência⁷⁶. O segundo é o TPHA (*Treponema*

pallidum hemagglutination assay) que usa eritrócitos revestidos com antígenos do *Treponema pallidum* e ao reagirem com o soro de doentes infetados formam uma aglutinação. Permite que se determine o título de anticorpos anti- *Treponema pallidum* por meio de diluições seriadas, como se pode observar na figura 10.



Figura 10. Resultados Teste de TPHA

3.14. Radioimunoensaio (RIA)

O radioimunoensaio é técnica, que utiliza isótopos radioativos, principalmente o ^{125}I , como marcadores, para a medição quantitativa de vários analitos. A principal vantagem das técnicas de RIA tem que ver com a sua elevada sensibilidade, uma vez que as interações antígeno-anticorpo que ocorrem nestes imunoensaios são muito específicas, o que permite determinar baixas concentrações de analitos^{6,7}. No laboratório Affidea é usada a técnica de RIA para dosear os parâmetros apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros determinados por RIA e amostras utilizadas

Parâmetro	Amostra
Renina	Plasma EDTA
Aldosterona	Soro e urina
Testosterona Livre	Soro
17 α -Hidroxiprogesterona	Soro
Androstenediona	Soro

É usado um imunoensaio competitivo, para dosear a aldosterona, testosterona livre, 17 α -hidroxiprogesterona e androstenediona. Dois antígenos, um marcado com o isótopo radioativo (*tracer*) e outro não marcado (amostra) competem para a ligação com um anticorpo específico que reveste o tubo onde ocorre a reação. Após a lavagem que elimina as ligações não específicas, é medida a radiação gamma usando um contador de radiação gamma, o GAMMA-C12. O valor de radiação obtido é inversamente proporcional à concentração do analito na amostra. Para a determinação da renina é usado um imunoensaio tipo sanduíche e, portanto, a radiação medida é diretamente proporcional à quantidade de renina na amostra. Para converter as medições de radiação em concentrações, são utilizados calibradores com concentrações conhecidas e crescentes para se construir uma curva de calibração, para cada um dos analitos medidos⁷⁷⁻⁸⁰.

3.15. Testes Rápidos Imunocromatográficos

3.15.1. TIG – Teste Imunológico da Gravidez

É utilizado um dispositivo de testagem rápida de imunoensaio cromatográfico para a detecção qualitativa da gonodotrofina coriônica humana (hCG) a partir de uma amostra de urina, para auxiliar na detecção precoce da gravidez. A hCG é uma glicoproteína produzida pelos sinciotrofoblastos da placenta que é detetada normalmente tanto no soro como na urina uma semana após a fertilização. É um importante marcador na detecção da gravidez, uma vez que só no primeiro trimestre os níveis de hCG no soro e urina aumentam exponencialmente⁸¹. Este teste utiliza dois anticorpos monoclonais para detetar os níveis de hCG na urina, um encontra-se no poço da cassette conjugado com ouro coloidal de cor bordô e outro encontra-se impregnado na linha de teste. Na linha de controlo, está presente um anticopor anti-IgG. A amostra ao migrar por capilaridade ao longo da membrana reage com o conjugado positivo. Amostras positivas reagem com o anticorpo específico de hCG para formar uma linha colorida na zona de linha de teste da membrana. A ausência desta linha significa um resultado negativo. Deverá aparecer sempre uma linha colorida na zona de controlo, indicando que o teste é válido e foi adicionado volume suficiente.

3.15.2. Testes de detecção de drogas na urina

Os testes de detecção de drogas consistem em ensaios imunocromatográficos do tipo competitivo que permitem a determinação qualitativa de variadas drogas e metabolitos de drogas a partir de amostras de urina. Ao contrário do que acontece com os testes imunológicos de gravidez, num resultado positivo para uma droga não aparece a linha de teste na cassette, uma vez que a droga presente na amostra se liga aos anticorpos presentes na zona de imersão do teste, saturando todos os locais de ligação dos anticorpos, impedindo que estes se liguem à droga alvo impregnada na zona de linha de teste. No caso, de amostra não ter a droga em estudo, os anticorpos conjugados com partículas de ouro estão livres e ligam-se à droga alvo impregnada e aparece uma linha vermelha na zona de linha de teste da cassette⁸². Várias drogas são analisadas no Laboratório Affidea, sendo que o teste mais frequente é a detecção de canabinóides (THC), dos opiáceos (MOR - mais especificamente da morfina) e da cocaína (COC) (Figura 11).



Figura 11. Cassete de detecção simultânea de canabinóides (THC), dos opiáceos (MOR - mais especificamente da morfina) e da cocaína (COC).

3.16. Testes de aglutinação

No laboratório Affidea são realizados vários testes de aglutinação em cards que permitem detetar rapidamente a presença de diferentes tipos de anticorpos que são desenvolvidos face a infeções bacterianas, virais ou até mesmo em casos de doenças autoimunes. Os testes realizados são os seguintes: Monoteste, teste L.E.S. látex, teste Waller-Rose, teste Widal, teste de Weil-Felix e o teste de Rosa de Bengala. Nas próximas secções irei destacar alguns destes testes, que correspondem aos que tive oportunidade de ver fazer com mais frequência.

3.16.1. Monoteste (Teste de Paul Bunnell)

O Monoteste consiste num teste rápido de aglutinação para a detecção de anticorpos heterófilos a partir de uma amostra de soro. A produção de anticorpos heterófilos está associada à mononucleose infecciosa e resulta de ativação não específica das células B pelo vírus Epstein-Barr que conduz à produção de anticorpos, maioritariamente IgM que reagem com antigénios presentes em eritrócitos de várias espécies. Os anticorpos heterófilos aparecem, normalmente, na mesma altura em que surgem os sintomas e podem permanecer detetáveis durante vários meses. São utilizados como indicador de infeção pelo vírus Epstein-Barr, no entanto, são muito pouco específicos havendo frequentemente reações falsamente positivas e negativas. Uma reação positiva deve ser sempre confirmada com o esfregaço de sangue periférico e contagem de células (especialmente o número de linfócitos) e também olhar para o perfil das transaminases que costumam estar elevadas na mononucleose⁷¹.

O Monoteste consiste num reagente de partículas de látex revestidas com glicoproteínas parcialmente purificadas de glóbulos vermelhos bovinos, que é adicionado ao soro do paciente. Numa reação positiva ocorre aglutinação (Figura 12), enquanto a ausência de aglutinação informa a inexistência destes anticorpos na amostra⁸³.

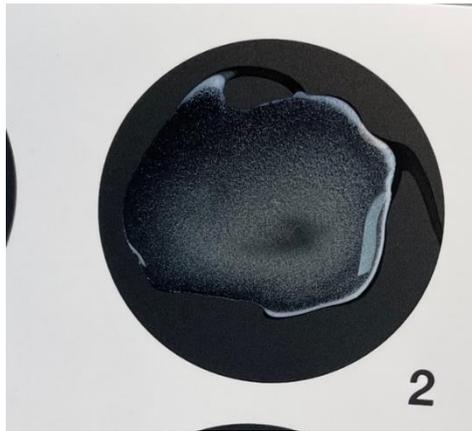


Figura 12. Monoteste reação positiva (com aglutinação).

3.16.2. Teste Waller-Rose

Teste Waller-Rose é um teste de aglutinação usado para a determinação qualitativa e semi-quantitativa do fator reumatóide a partir de amostras de soro. O fator reumatóide são auto-anticorpos, normalmente IgMs, que são polireativos às regiões Fc de IgGs. Estes auto-anticorpos ligam-se a IgGs circulantes formando imunocomplexos que se podem depositar nas articulações. Está presente em doenças autoimunes como a artrite reumatóide⁸⁶.

O teste Waller-Rose consiste na adição de um reagente, que contém eritrócitos cobertos com IgGs, a amostras de soro. Caso exista fator reumatóide, haverá uma reação de aglutinação⁸⁶. Os resultados obtidos por este devem estar em concordância com o teste do fator reumatóide executado pela cadeia dos Attelicas.

3.16.3. Teste Widal

Teste Widal é um teste de aglutinação usado na detecção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos associados a infecções pela bactéria *Salmonella* spp. São usados quatro reagentes coloridos que contém diferentes suspensões de bactérias inativas:

- *Salmonella typhi* O
- *Salmonella typhi* H
- *Salmonella paratyphi* AO
- *Salmonella paratiphy* BO

Estes reagentes são misturados à amostra de soro e se houver aglutinação com algum dos reagentes anteriores confirma-se a presença do respectivo anticorpo, procede-se à confirmação do resultado por meio de titulação dos anticorpos através de diluições seriadas, que devem ir desde 1/20 até 1/640⁸⁷. É essencial complementar esta avaliação com outros métodos como a hemocultura ou a coprocultura para a confirmação destes resultados.

3.16.4. Teste Weil-Felix

Teste Weil-Felix é um teste de aglutinação para a determinação de anticorpos associados a infecções por Rickettsias. As Rickettsias são bactérias intracelulares obrigatórias que são transmitidas por meio de vetores, em particular pela picada de carraças. As Rickettsias não crescem em meios de cultura artificiais, pelo que o diagnóstico destas infecções é feito através de testes serológicos.

O teste de Weil-Felix baseia-se na particularidade de que certos serotipos de *Proteus* produzem reações antigénicas cruzadas espécies de rickettsias. Assim, são utilizados antigénios OX de proteus (antigénio OXK, antigénio OX19, antigénio OX2) para detetar anticorpos anti-rickettsias. Este é, no entanto, um teste de aglutinação não específico pelo que pode haver resultados falsamente positivos. Quando um resultado dá positivo nalgum dos antigénios no teste de aglutinação, deve ser depois confirmado fazendo uma determinação do título de anticorpos, em tubo, através de diluições seriadas, que devem ir desde 1/20 até 1/640⁸⁸.

3.17. Análise da Urina Tipo II

A análise de urina tipo II, também designada de exame sumário da urina, é uma das análises mais frequentemente realizadas no laboratório. Através desta é possível obter-se informações clínicas úteis não só para a deteção de doenças que afetam o trato urinário, como também, permite a deteção de outras doenças sistémicas, em particular, doenças metabólicas e endócrinas⁸⁹.

A análise de urina tipo II compreende três exames: o exame físico, a análise química e o exame microscópico do sedimento urinário. A amostra preferencialmente a ser usada, deve ser a primeira urina da manhã, uma vez que esta é a mais concentrada, assegurando a deteção de substâncias químicas ou de elementos figurados que possam não ser detetados numa amostra aleatória, adicionalmente, possibilita a avaliação de proteinúria ortostática⁸⁹.

No laboratório Affidea, a análise sumária da urina é realizada no equipamento Atellica® 1500 Automated Urinalysis System (Figura 13). Este sistema automatizado é composto por dois analisadores, CLINITEK Novus® que faz a análise química da urina e o Atellica™ UAS 800, que realiza o exame microscópico do sedimento urinário.



Figura 13. Equipamento Atellica® 1500 Automated Urinalysis System.

No analisador CLINITEK Novus®, para a análise química da urina, são usadas tiras-testes que permitem a avaliação de: pH, proteínas, cetona, bilirrubina, sangue, glucose, esterase leucocitária, nitritos e urobilinogênio. No exame físico são analisados a cor, turvação e a densidade⁹⁰. Na tabela 8 estão explicitados os parâmetros analisados no exame físico e químico do sedimento urinário e o seu respectivo significado clínico.

Tabela 8. Parâmetros analisados no exame físico e químico do sedimento urinário com o respectivo significado clínico. Adaptado de: (89).

Parâmetro	Significado clínico
Análise Química	
Glucose	<ul style="list-style-type: none"> - Só é detetável na urina quando a concentração plasmática ultrapassa o limiar de reabsorção renal - Há glicosúria na <i>diabetes mellitus</i> e na doença tubular renal
Proteínas	<ul style="list-style-type: none"> - Quantidade aumentada de proteínas na urina é indicativa de patologia renal - Faz-se o doseamento de proteínas urinárias quando a tira revela um valor $\geq 3\text{g/L}$
Sangue	<ul style="list-style-type: none"> - Um resultado positivo na tira teste indica a presença de eritrócitos (hematúria), hemoglobina (hemoglobinúria) ou mioglobina (mioglobinúria) - Associado a patologias de origem renal ou urogenitais, hemólise intravascular e dano muscular
pH	<ul style="list-style-type: none"> - O pH normal da urina é cerca de 5,5 – 6,0 - O pH pode estar alterado face ao tipo de dieta, a presença de litíase renal, infecções bacterianas e em distúrbios ácido-base
Urobilinogênio	<ul style="list-style-type: none"> - Pigmento biliar presente nas urinas normais - Valores aumentados são observados em doença hepática e doença hemolítica

Tabela 8 (cont). Parâmetros analisados no exame físico e químico do sedimento urinário com o respetivo significado clínico. Adaptado de: (89).

Bilirrubina	- A sua presença na urina é indicativa de possível obstrução do ducto biliar, hepatite e colestase
Corpos cetónicos	- Ausente em urinas de indivíduos saudáveis - Aparecem em situações de cetoacidose diabética, jejum prolongado
Nitritos	- O seu surgimento na urina é indicativo de uma possível infeção urinária, já que algumas bactérias são capazes de reduzir o nitrato a nitrito
Esterase leucocitária	- Atividade da esterase leucocitária é usada como marcador para a deteção (indireta) de leucócitos na urina - O número elevado de leucócitos na urina pode indicar a presença de uma infeção urinária
Exame Físico	
Cor	- Pode variar entre incolor a preto - Cor amarela devido á presença do pigmento urocromo - Outras variações na core podem ser devidas á presença de eritrócitos, pigmentos biliares ...
Densidade	- Valores de densidade normais entre 1.016 a 1.022 - Indica o estado de hidratação do individuo, da capacidade de concentração dos rins
Turvação	- Refere-se à transparência da urina - Urina é por norma límpida podendo por vezes apresentar turvação não patológica causada por células epiteliais de escamação e muco - Turvação patológica causada pela presença de leucócitos, eritrócitos, bactérias, cristais, lípidos...

3.17.1. Exame microscópico do sedimento urinário

O exame microscópico do sedimento urinário tem como principal objetivo identificar e quantificar os componentes insolúveis presentes no sedimento urinário, que muitas vezes não conseguem ser detetados apenas com o exame físico-químico. Neste exame podem ser observados vários elementos entre os quais células, cristais, cilindros e microrganismos. A presença destes elementos não implica necessariamente uma situação patológica, a não ser que estejam presentes em quantidades elevadas⁸⁹.

Com já foi referido anteriormente, o sedimento urinário é analisado pelo módulo Atellica™ UAS 800 permitindo fazer a deteção de:

- Eritrócitos - quando em número elevado podem sugerir lesão renal e do trato urinário inferior⁸⁹.
- Leucócitos – em urinas de indivíduos saudáveis é comum existirem cerca de 5 leucócitos por campo, sendo que nas mulheres este número pode ser ligeiramente mais elevado. A presença de piúria é indicativa de infeção ou inflamação do trato urinário⁸⁹.
- Células epiteliais de escamação – são as células mais frequentemente observadas no sedimento urinário e refletem a descamação normal do trato urinário⁸⁹.
- Células tubulares renais - quando presentes podem ser resultado de necrose tubular com possibilidade de comprometimento da função renal⁸⁹.
- Cristais - formam-se devido à precipitação de sais urinários face a alterações no pH, temperatura e concentração que alteram a sua solubilidade. Na identificação do tipo de cristais é importante saber o pH da urina, uma vez que este é que determina que tipo de cristais é que se formam. Por exemplo, urinas ácidas levam à precipitação de cristais de ácido úrico e cristais de urato. Apenas os cristais de cisteína e leucina são inerentemente patológicos quando presentes, os restantes cristais como oxalato de cálcio ou ácido úrico possuem apenas significado clínico quando estão presentes em quantidades elevadas⁸⁹.
- Cilindros - são os únicos elementos encontrados no sedimento urinário cuja origem é exclusivamente renal. Podem ter várias formas, aparências e tamanhos, sendo que os mais comumente encontrados são os cilindros hialinos, que consistem essencialmente em proteínas de Tamm-Horsfall. Os cilindros existem em número reduzido na urina de indivíduos saudáveis, porém podem surgir em elevado número no caso de doença renal. A sua formação aumenta em casos de pH reduzido, aumento da concentração iónica na presença de estase ou obstrução do nefrónio e quando a concentração de proteínas nos túbulos renais está aumentada⁸⁹.
- Bactérias
- Fungos
- Espermatozoides
- Muco

Os resultados das quantidades relativas de cada um dos elementos são expressos sob a forma de: “raros”, “alguns”, “muitos” e “abundantes”.

Antes de serem transcritos para o boletim, os resultados da análise do sedimento urinário emitidos pelo aparelho têm de ser previamente validados. Nesta validação à que verificar se os resultados estão de acordo com as imagens/fotografias do sedimento. Isto é, muitas vezes o equipamento pode identificar incorretamente certos achados microscópicos, para tal é sempre essencial examinar as imagens do sedimento urinário e confirmar se estão bem identificadas. Deve-se também olhar para o exame físico-químico, de modo a corroborar o que se observa no sedimento. Por exemplo, no caso de o equipamento identificar eritrócitos no sedimento urinário, deverá aparecer a presença de sangue no

exame químico, ou no caso de serem observados cristais de fosfato de amónia ou magnésio, o exame químico deverá revelar que a urina possui um pH alcalino.

4. Hematologia

A hematologia é a área que se dedica ao estudo do sangue e dos seus constituintes, dos órgãos hematopoiéticos, e mecanismos de hemóstase. Por meio de várias análises é possível prevenir, detetar e diagnosticar várias doenças hematológicas, assim como algumas doenças sistémicas que provocam alterações nas células sanguíneas⁶⁰.

No laboratório Affidea, as análises realizadas na secção de hematologia são: o hemograma, a determinação da velocidade de sedimentação (VS), estudo morfológico do sangue periférico, o estudo das hemoglobinopatias, a determinação dos níveis de hemoglobina glicada (HbA1c), a avaliação da coagulação e o estudo da imunohematologia.

Quanto à disposição da secção da hematologia esta é constituída por vários aparelhos. Existem três analisadores hematológicos automáticos, sendo que dois destes são Yumizen H2500, que permitem adicionalmente à determinação dos parâmetros do hemograma, a contagem de reticulócitos e a contagem plaquetas por densidade ótica. O outro analisador hematológico é um Yumizen H1500, que está acoplado ao Yumizen SPS, que é um aparelho que realiza esfregaços automaticamente. Para a determinação da velocidade de sedimentação existem 3 aparelhos Dienes Ves-Matic Cube 30 Touch. Quanto à coagulação existem dois analisadores automáticos de hemóstase BCS® XP System. Existem dois equipamentos de HPLC HLC-723G11 (G11) para a determinação da hemoglobina glicada e um analisador automático HLC-723G8 (G8) para a deteção de hemoglobinas anormais. Por fim, para o estudo da imunohematologia é usado o analisador automático WA Diana, Grifols.

Relativamente ao processamento das amostras, estas são triadas primeiramente, conferindo as análises que são requisitadas e o seu estado, isto é, se por exemplo existir algum coágulo no tubo, a amostra é rejeitada e é requisitada uma nova colheita. A ordem de processamento das amostras é feita de acordo com a ordem de chegada, dando apenas prioridade a amostras urgentes. Na hematologia são usados dois tipos de tubos para a colha de sangue:

- Sangue total colhido em tubo com K2 EDTA, que é usado para se fazer o hemograma, a VS, a determinação de HbA1c, a eletroforese de hemoglobinas e para a determinação do grupo sanguíneo e o teste de Coombs; O EDTA remove o Ca^{2+} através de um processo irreversível de quelação, impedindo a coagulação do sangue.
- Sangue total colhido para um tubo com anticoagulante de citrato trissódico, utilizado para os testes da hemóstase. O citrato trissódico impede a coagulação do sangue por neutralização dos iões cálcio num processo reversível. Nestes tubos, é especialmente importante ter em atenção a proporção de sangue para anticoagulante, pois se não for mantida os resultados dos testes de hemóstase poderão vir alterados. A proporção a manter é de 9 volumes de sangue para 1 volume de anticoagulante^{60,91}.

No caso do estudo da coagulação e da imunohematologia, os tubos devem ser previamente centrifugados a 1000 RCF durante 15 minutos, para se obter o plasma

separado dos elementos figurados do sangue. Relativamente à sequência de passagem pelos equipamentos, os tubos de EDTA passam primeiro pelos analisadores hematológicos, para ser realizado o hemograma, caso seja pedido a determinação de VS são depois passados para lá, e no caso ainda seja preciso dosear a HbA1c, este é o último equipamento pelo qual passam as amostras. As amostras que requerem eletroforese de hemoglobinas passam primeiramente por uma pesquisa de hemoglobinas anormais por HPLC e, se forem identificados picos característicos de hemoglobinas anormais, é então realizada a eletroforese.

4.1. Hemograma

O hemograma agrupa uma série de parâmetros que avaliam a integridade quantitativa e qualitativa dos elementos figurados presentes no sangue: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. É um dos exames mais requisitados no laboratório, uma vez que permite através de várias determinações obter informações sobre a função hematológica e ajuda a diagnosticar uma série de doenças, bem como monitorizar a progressão das mesmas e a resposta a diferentes tratamentos.

O hemograma engloba três exames: o eritrograma, que constitui o exame do perfil hematológico da série vermelha, o leucograma, que é a análise da série branca e por fim o plaquetograma, que é o estudo da série plaquetária. Como já foi referido anteriormente, no laboratório Affidea o hemograma é realizado no analisador hematológico automático Yumizen H2500/H1500 Horiba Medical.

4.1.1. Analisador Hematológico Yumizen H2500/H1500 Horiba Medical

O analisador Hematológico Yumizen H2500/H1500 Horiba Medical é um equipamento automático capaz de processar 120 amostras/hora, possui um mecanismo de homogeneização automática por rotação a 360° e ainda, de uma câmara de contagem termostaticada a 37°C, o que permite a estabilidade dos resultados. Este equipamento é capaz de determinar até 55 parâmetros, incluindo as plaquetas óticas. O equipamento utiliza canais de reação distintos e diferentes métodos analíticos, tais como impedância elétrica, fotometria, citometria de fluxo, fluorometria, citoquímica e o sistema DHSS (Double Hydrodynamic Sequential System), para realizar as diferentes determinações⁹².

A contagem total de células é feita usando a tecnologia de impedância elétrica. Este método baseia-se no facto de as células serem maus condutores de electricidade. Para tal, a amostra de sangue é diluída numa solução tampão de eletrólitos (ABX Diluent) e, após homogeneização, é aspirada por uma micro-abertura calibrada onde é aplicada uma corrente elétrica contínua, por meio de dois elétrodos. A abertura é de tal modo estreita que permite apenas a passagem de uma célula de cada vez. Quando a célula passa por essa abertura, há uma interrupção da corrente elétrica, a que se chama impedância. Esta interrupção é quantificada como um pequeno pulso elétrico, sendo que o número de pulsos corresponde ao número de células. Adicionalmente, a altura do pulso, ou seja, a resistência elétrica entre os dois elétrodos, é proporcional ao volume das células, permitindo fazer uma discriminação na contagem de células com um volume específico.

Posteriormente, o equipamento processa os dados eletronicamente para obter os dados padronizados, construindo um histograma que representa a distribuição do volume de células contadas em função do seu número relativo (Figura 14).

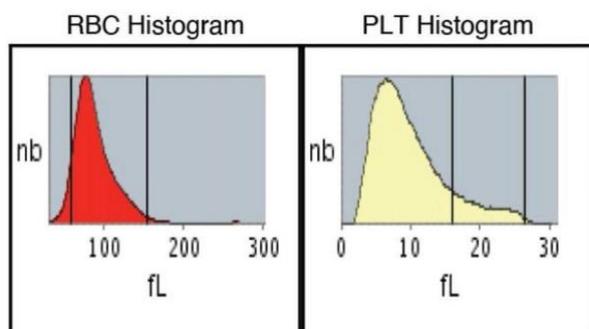


Figura 14. Histogramas de distribuição de glóbulos vermelhos (esquerda) e plaquetas (direita). Adaptado de: (91).

Para a contagem total das células são usados dois canais distintos^{60,92,93}:

- Canal RBC/PLT: dedicado à contagem de eritrócitos e plaquetas
- Canal WBC/HGB: dedicado à contagem de leucócitos e à quantificação de hemoglobina

O doseamento da hemoglobina é feito através de um método espectrofotométrico. A amostra é diluída com o reagente ABX Lysebio, conduzindo à lise dos eritrócitos e libertando a hemoglobina. O ferro presente no grupo heme é oxidado e estabilizado com a consequente formação de metahemoglobina. Todos os complexos resultantes da oxidação são quantificados espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 550 nm, sendo depois as absorvências convertidas em concentração de hemoglobina^{92,93}.

Para a contagem dos reticulócitos é usada uma tecnologia de citometria de fluxo, usando o método de impedância para a contagem e um método fluorométrico para diferenciar os reticulócitos. É adicionado à amostra um reagente, ABX Fluocyte, que contém na sua composição um fluorocromo, o tiazol de laranja, que é específico para os ácidos nucleicos. Assim, as moléculas de corante atravessam a membrana dos eritrócitos e fixam-se às moléculas de RNA ainda presentes no citoplasma dos reticulócitos. Através de um laser na câmara de citometria é medido o volume celular e a fluorescência das células, permitindo gerar uma matriz de reticulócitos. De igual modo, a detecção ótica de plaquetas é também realizada na câmara de RET, e é usado o mesmo reagente, ABX Fluocyte. A amostra é enviada para o citómetro onde são medidos o volume celular por impedância e a absorvência ótica por citoquímica. Esta medição ao contrário do método de contagem de plaquetas por impedância permite melhor distinguir as plaquetas de eritrócitos microcíticos, por exemplo, uma vez que a fluorescência permite diferenciar as plaquetas dos eritrócitos^{92,93}.

Quanto aos leucócitos a sua contagem é realizada em três canais: o canal TNC/HGB, no qual se faz uma contagem global de células, o canal LMNE, que permite fazer a contagem diferencial de leucócitos e o canal BASO/TNC2 para a contagem de basófilos⁹⁴.

Começando pela contagem de basófilos esta é feita através de um método de impedância, no canal BASO/TNC2. É adicionado à amostra o reagente Abx Basolyse que vai causar a lise de todos os leucócitos, com a exceção dos basófilos, permitindo fazer a sua contagem sem a interferência dos outros leucócitos. No canal LMNE é realizada a contagem e classificação diferencial das diferentes linhagens de leucócitos, mais a contagem de células imaturas^{94,95,96}

A tecnologia aplicada para realizar esta contagem é a citometria de fluxo com um sistema sequencial hidrodinâmico duplo (DHSS), ilustrado na figura 15. Esta tecnologia combina um método de impedância com medição da transmissão ótica. Em primeiro lugar é adicionado um reagente lítico específico, o Abx Nucleodiff, de maneira a promover a lise dos eritrócitos e a estabilizar os leucócitos. De seguida, as células passam por uma abertura uma a uma, para serem contadas através de um método de impedância elétrica, como se pode observar na figura 15. Adicionalmente, cada uma das células atravessa um feixe de luz a um ângulo de 0°, de modo a avaliar o seu volume/complexidade. Uma parte da luz é absorvida, outra é desviada e a restante passa através da célula (transmissão ótica). A absorbância é determinada a partir dessa transmissão ótica, possibilitando a construção de uma matriz LMNE, presente na figura 16. Nesta matriz, o eixo dos y corresponde à absorbância, e o eixo dos x corresponde ao volume celular. Assim, a distribuição das células na matriz depende do seu volume e complexidade interna, permitindo uma clara diferenciação das populações de leucócitos^{94,95,96}.

Os linfócitos encontram-se posicionados na parte inferior do eixo do y e do eixo do x, uma vez que são células com tamanho pequeno e possuem um citoplasma condensado e pobre em granulações com um núcleo simples. Os monócitos encontram-se na área à direita dos linfócitos, pois são células maiores com citoplasma grande com algum material intracelular e com alguns vacúolos, o que as faz absorver mais luz em comparação com os linfócitos. Em relação aos neutrófilos, estes apresentam material granular no seu citoplasma, juntamente com um núcleo segmentado. Estes ficam posicionados no eixo dos x, entre os linfócitos e monócitos, mas mais acima no eixo dos y. Os eosinófilos assemelham-se aos neutrófilos em termos de tamanho, contudo, apresentam maior granulação no citoplasma, situando-se mais acima no eixo dos y. Adicionalmente, na matriz LMNE é possível ainda distinguir as populações de linfócitos atípicos e de células grandes e imaturas. O grupo das células grandes e imaturas engloba três populações distintas: a linhagem linfóide imatura (IML), a linhagem monocítica imatura (IMM) e as células granulocíticas imaturas (IMG). Por fim, é possível ainda distinguir a população de eritroblastos (NRBC)^{94,95,96}.

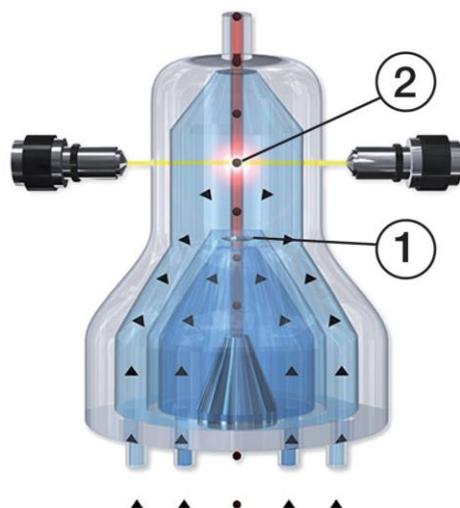


Figura 15. Representação do sistema DHSS – Horiba Medical. (1) Medição da impedância; (2) Medição da absorbância. Adaptado de: (95).

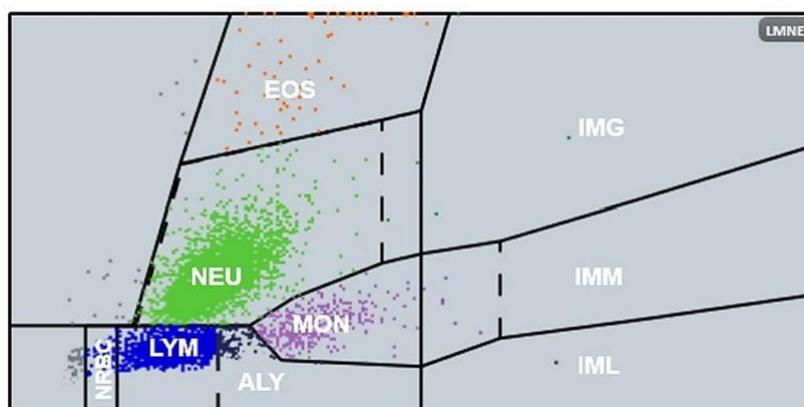


Figura 16. Matriz LMNE. Linfócitos (LYM), monócitos (MON), neutrófilos (NEU), eosinófilos (EOS), granulócitos imaturos (IMG), monócitos imaturos (IMM), linfócitos imaturos (IML), linfócios atípicos (ALY), eritroblastos (NRBC). Adaptado de: (96)

4.1.2. Eritrograma

O eritrograma constitui a parte do hemograma que faz a avaliação da série vermelha. Este é constituído por várias análises, que pretendem aferir parâmetros quantitativos e qualitativos dos eritrócitos. As suas partes constituintes são:

a) Contagem de eritrócitos

A contagem de eritrócitos constitui o número de eritrócitos presentes por volume de sangue. As unidades utilizadas são número de células por litro. Este parâmetro reflete o estado de produção de eritrócitos e o seu tempo de vida. Valores normais em adulto rondam os $4,5 \pm 0,5 \times 10^{12}$ células/L, sendo que situações como policitemia vera os valores encontram-se aumentados, e em situações de anemia, hemorragias e algumas leucemias os valores podem estar diminuídos^{60,94}.

b) Hematócrito

O hematócrito corresponde ao volume relativo ocupado pelos eritrócitos, num dado volume de sangue total. É calculado indiretamente através da fórmula do VGM e é expresso em % de volume de sangue ou L/L. Os valores de referência normais do hematócrito são entre 40-52 % para o sexo masculino e 36-48 % para o sexo feminino^{60,65,94}.

c) Concentração de hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é a proteína responsável pelo transporte de oxigénio dos pulmões para os tecidos. É uma metaloproteína constituída por dois pares de globulinas e quatro grupos hemes, que contém ferro complexado a um anel protoporfirina. A determinação da concentração de hemoglobina é o principal parâmetro na avaliação das anemias, uma vez que uma diminuição na concentração de hemoglobina é indicativa de uma anemia. É importante que sejam mantidas as concentrações normais de hemoglobina, uma vez que a sua concentração reflete a quantidade de oxigénio que chega aos tecidos. Outras situações como uma diminuição do hematócrito ou uma diminuição da contagem de eritrócitos podem também conduzir a níveis reduzidos de hemoglobina. A concentração de hemoglobina é expressa em g/dL. As concentrações de hemoglobina normais num indivíduo adulto são entre 14-18 g/dL para o sexo masculino e 12-16 g/dL para o sexo feminino^{60,94}.

d) Índices eritrócitários

Os índices eritrócitários são parâmetros que revelam informações sobre o tamanho dos eritrócitos e a quantidade de hemoglobina contida em cada célula. Estes índices podem ser determinados diretamente ou indiretamente com recurso a fórmulas. Os índices eritrócitários são ainda ferramentas essenciais na classificação morfológica das anemias^{60,94}.

i) Volume globular médio (VGM)

O VGM indica o volume médio de um eritrócito e expressa-se em fentolitros (fL, 10^{-5} L). O VGM é calculado diretamente a partir do histograma dos glóbulos vermelhos. Os valores do VGM permitem classificar os eritrócitos relativamente ao seu tamanho: são microcíticos se o valor de VGM for < 80 fL, normocíticos se o valor de VGM se encontrar entre 80-100 fL e são macrocíticos caso, o VGM seja > 100 fL^{60,94}.

ii) Hemoglobina globular média (HGM)

O HGM indica o peso médio de hemoglobina contida num glóbulo vermelho e expressa-se em picogramas (pg, 10^{-12} g). Os valores normais de HGM variam entre 26 e 32 pg. A determinação do HGM é feita pelo equipamento através de um cálculo matemático^{60,94}:

$$HGM (pg) = \left(\frac{Hb (g/dl)}{GV (\times 10^{12}/L)} \right) \times 10$$

iii) Concentração de hemoglobina globular média (CHGM)

O CHGM indica a concentração média de hemoglobina por unidade de volume de glóbulos vermelhos, expressa-se g/dL. Indica a cromia dos eritrócitos. Eritrócitos normocrómicos possuem CHGM entre 32 e 36 g/dl, eritrócitos hipocrómicos, que são comumente encontrados em situações de anemias ferropénicas e em talassemias

possuem CHGM < 32 g/dL. A determinação do CHGM pelo equipamento é feita com recurso à fórmula^{60,94}:

$$CHGM (g/dL) = \frac{Hb (g/dL)}{Ht (L/L)} \times 100$$

iv) **Coefficiente de dispersão do volume eritrocitário (RDW)**

O RDW é um índice de distribuição do volume de eritrócitos, este permite quantificar a anisocitose e contribui para a caracterização de anormalidades morfológicas dos eritrócitos. Existem duas maneiras de expressar o RDW: RDW-SD (fL) consiste no desvio padrão do volume dos glóbulos vermelhos, calculado diretamente da curva de distribuição (histograma) dos RBC independente do VGM, e o RDW-CV (%) que é calculado usando o VGM e o desvio padrão. Valores > 15% de RDW são indicativos de anisocitose^{60,94}.

e) **Reticulócitos**

A contagem de reticulócitos não é um parâmetro obrigatório do eritrograma, mas pode ser útil a sua realização em certas situações. Os reticulócitos são os precursores imediatos dos eritrócitos maduros, possuem ainda alguns restos de RNA no seu citoplasma e tem tamanhos maiores do que os eritrócitos. A sua contagem é útil na avaliação da eritropoiese da medula óssea. O número de reticulócitos no sangue periférico encontra-se aumentado em situações de anemias regenerativas, e diminuído em situações de anemias arregenerativas, por exemplo. A contagem de reticulócitos também pode ser usada na monitorização de tratamentos de anemias e como indicador da função medular após quimioterapia⁶⁰.

4.1.3. Leucograma

O leucograma corresponde à avaliação da série leucocitária no hemograma, e é constituído pela contagem total de leucócitos e pela fórmula leucocitária.

a) **Contagem total de leucócitos**

A contagem total de leucócitos consiste, como o próprio nome indica, no número de leucócitos que existem num dado volume de sangue, expressando-se em células por litro. Os valores normais de leucócitos encontram-se entre 4,0 e 11,0 x 10⁹ células/L. Um aumento no número de leucócitos (leucocitose) pode ser devido a causas benignas, como infeções, processos inflamatórios ou reações de hipersensibilidade, mas também pode se dever a alterações malignas. Valores diminuídos de leucócitos (leucopenia) podem ser observados em situações de quimioterapia, infeções virais, síndromes mielodisplásicas, imunodeficiências, entre outras⁶⁰.

b) **Fórmula leucocitária**

A fórmula leucocitária corresponde à contagem de cada um dos diferentes tipos de leucócitos: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Os resultados são expressos em valor absoluto (número de células por litro) e em percentagem, como se pode observar na tabela 9.

Tabela 9. Valores de referência da fórmula leucocitária em indivíduos adultos. Adaptado de: (60)

	Porcentagem	Valor absoluto
Neutrófilos	47 - 70 %	1,8 – 7,5 x 10 ⁹ /L
Eosinófilos	1 – 5 %	0,04 – 0,44 x 10 ⁹ /L
Basófilos	0 – 1 %	0,01 – 0,1 x 10 ⁹ /L
Linfócitos	20 – 40 %	1,5 – 3,5 x 10 ⁹ /L
Monócitos	2 – 10 %	0,2 – 0,8 x 10 ⁹ /L

É a partir da contagem diferencial dos leucócitos que se consegue identificar a população ou populações de leucócitos que tem os seus valores alterados. Adicionalmente, permite detetar e identificar células imaturas e células anormais presentes no sangue. Diferentes patologias benignas e malignas podem alterar os valores absolutos de uma ou mais linhagem dos leucócitos, por exemplo, numa situação de infeção bacteriana, pode-se observar uma neutrofilia (aumento do número de neutrófilos) e um desvio à esquerda, isto é, o aumento de elementos imaturos da série mieloide no sangue periférico, particularmente os neutrófilos em banda. Na mononucleose infecciosa, por exemplo, é comum haver uma leucocitose moderada com a presença de linfócitos atípicos, e uma inversão da fórmula leucocitária, na qual a quantidade de linfócitos é superior à quantidade de neutrófilos⁶⁰.

4.1.4. Plaquetograma

O plaquetograma refere-se ao estudo da série plaquetária, e inclui a contagem de plaquetas, o volume plaquetário médio e o índice distribuição plaquetário.

a) Contagem de plaquetas

A contagem de plaquetas diz respeito ao número de plaquetas existentes num dado volume de sangue e é expressa em número de células por litro. As plaquetas são fragmentos do citoplasma dos megacariócitos, desempenham funções essenciais na coagulação, intervindo na formação do trombo plaquetário permitindo a formação do coágulo estável de fibrina. Os valores de referência normais das plaquetas encontram-se entre 150 – 400 x 10⁹/L. Valores aumentados (trombocitose) verificam-se em neoplasias mieloproliferativas, policitemia vera, ou em resposta a uma hemorragia aguda, por exemplo. Valores diminuídos (trombocitopenia) podem ser causados por uma diminuição da produção medular de megacariócitos, a um aumento da destruição das plaquetas face a um consumo aumentado ou devido a um aumento da sequestração esplénica⁶⁰.

b) Volume plaquetário médio (VPM)

O volume plaquetário médio indica o volume médio das plaquetas de um indivíduo e é expresso em fL. Este é determinado pelo equipamento através do histograma das plaquetas⁹². Os valores de referência normais encontram-se entre 7,0 – 12,0 fL⁶⁰.

c) Índice distribuição plaquetária (PDW)

No que diz respeito ao coeficiente de dispersão plaquetária (PDW), este é calculado através da curva de distribuição das plaquetas, e revela a variação do volume das plaquetas e permite quantificar a anisocitose plaquetária⁹⁴.

4.1.5. Estudo Morfológico do Sangue Periférico – Esfregaço Sanguíneo

O esfregaço sanguíneo consiste na preparação de uma fina camada de células sanguíneas sobre uma lâmina de vidro para exame microscópico. Os esfregaços e a coloração dos mesmos são realizados pelo equipamento Yumizen SPS que se encontra acoplado ao analisador Yumizen H1500 (Figura 17).



Figura 17. Analisador automático Yumizen H1500 com sistema Yumizen SPS.

Este aparelho permite obter um esfregaço liso, regular, homogêneo e com bordos bem definidos. O esfregaço deve apresentar três zonas: a cabeça, corpo e cauda (ou franja), com diminuição da espessura da cabeça para a cauda, como se pode ver representado na figura 18. As colorações utilizadas pelo equipamento são a coloração de May Grunwald Giemsa e a coloração de Wright.

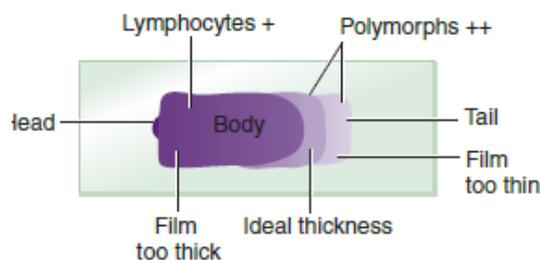


Figura 18. Representação esquemática de um esfregaço de sangue periférico. Adaptado de: (91).

Através do esfregaço sanguíneo é possível analisar as três linhagens celulares, permitindo confirmar e detetar possíveis alterações quantitativas e qualitativas que possam ocorrer. Ao nível dos eritrócitos é possível observar alterações no tamanho, na cor, na forma a presença de inclusões eritrocitárias e a presença de eritroblastos. Quanto aos leucócitos, a observação do esfregaço permite estabelecer a fórmula leucocitária e detetar alterações morfológicas no núcleo e citoplasma dos leucócitos, como por exemplo a hipersegmentação de neutrófilos. Adicionalmente, é também possível serem detetados os precursores das linhagens mielóides e linfóides^{60,65,97}.

Normalmente, os esfregaços de sangue são realizados quando há um pedido clínico para ser estudado a morfologia do sangue periférico, ou aquando da validação dos resultados dos hemogramas sejam emitidos alarmes pelos analisadores hematológicos. Por exemplo caso seja detetado um número de plaquetas reduzidos no hemograma ou a presença de formas imaturas, é pedida a realização de um esfregaço de sangue, com o intuito de confirmar este alarme. Muitas vezes, as trombocitopénias detetadas pelos contadores hematológicos não são de facto verdadeiras, trata-se apenas de pseudotrombocitopénias induzidas pelo EDTA, que levam à formação de agregados plaquetários, que não são reconhecidos pelo aparelho como plaquetas⁹⁸.

4.2. Velocidade de sedimentação (VS)

A velocidade de sedimentação consiste na medição da velocidade de queda espontânea dos eritrócitos, em suspensão no plasma durante 1 hora. A velocidade de sedimentação resulta da diferença da gravidade específica existente entre os eritrócitos e o plasma e da atração eletrostática que se gera entre os eritrócitos, que possuem cargas elétricas negativas na superfície das suas membranas, e certas proteínas plasmáticas (fibrinogénio, imunoglobulinas e outras proteínas de fase aguda), que possuem cargas elétricas positivas, conduzindo à formação de *rouleaux*. Em situações estados inflamatórios, infeções ou doenças autoimunes, ocorre o aumento da concentração destas proteínas plasmáticas, conduzindo a um aumento na velocidade de sedimentação dos eritrócitos. Contudo, a VS não é um teste específico para as doenças inflamatórias, podendo estar elevada noutras condições como gravidez, anemias ou a idade avançada. Os valores de referência para a VS em indivíduos adultos são entre 0 e 15 mm/h no sexo masculino, 0 e 20 mm/h no sexo feminino, ambos até aos 50 anos de idade. Após os 50 anos, verifica-se um aumento dos valores, sendo entre 0 e 20 mm/h no sexo masculino e 0 e 30 mm/h no sexo feminino^{60,99}.

A determinação da VS é feita através do equipamento Ves-Matic Cube 30 Touch, da A.Menarini diagnostics (Figura 19), sendo executada de forma totalmente automática a partir do tubo de EDTA usado no hemograma. A grande vantagem deste equipamento é que permite fazer a determinação da VS em apenas 20 minutos, com resultados comparáveis com os obtidos pelo método de Westergren em 1 hora. Contudo, para ser feita a determinação da VS pelo método automático é necessário que a amostra contenha um volume mínimo de 1,5mL. Caso tal não se verifique, é necessário recorrer ao método manual de Westergreen modificado. No método manual de Westergreen é usada uma pipeta de Westergreen graduada (0-200 mm), para a aspirar a amostra até à marca de 0 mm. Findada a aspiração, deve-se manter o tubo na vertical e em repouso durante 1 hora, ao fim da qual ler-se-á os resultados de acordo com a separação entre o plasma e os glóbulos vermelhos^{60,99,100}.



Figura 19. Analisador automático Ves-Matic Cube 30 Touch.

4.3. Estudo das hemoglobinopatias

A hemoglobina (Hb) é uma proteína tetramérica constituída por dois pares diferentes subunidades proteicas, globinas, e quatro grupos heme, ligados a cada uma das globinas. A sua função principal no organismo é fazer o transporte de oxigénio dos pulmões para os tecidos, tal é conseguido pela capacidade desta proteína se ligar reversivelmente ao oxigénio. Num indivíduo adulto existem três tipos de hemoglobinas: a Hb A ($\alpha_2\beta_2$) que é a maioritária, constituindo cerca da 95-98% da hemoglobina total, Hb A2 ($\alpha_2\delta_2$) que está presente em quantidades que rondam os 1,5 até 3,5% e por fim, a Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) que existe apenas em quantidades vestigiais de cerca de 1%, sendo que esta última é a principal hemoglobina presente no sangue do feto e do recém-nascido^{60,65}.

As hemoglobinopatias são um grupo de patologias genéticas autossómicas recessivas que afetam a síntese de hemoglobina. Os genes afetados pelas mutações podem codificar para a as próprias cadeias globínicas constituintes da hemoglobina ou para proteínas envolvidas na síntese ou na regulação da síntese das cadeias globínicas. A síntese da hemoglobina pode ser afetada de duas formas^{60,65}:

- Defeito qualitativo, na qual a mutação subjacente resulta numa alteração da estrutura e função da cadeia globínica, originando uma hemoglobina variante. Exemplos são a drepanocitose (HbS), HbD e HbE.
- Defeito quantitativo, neste caso a mutação subjacente conduz a uma ausência ou diminuição da síntese de uma cadeia globínica. Aqui incluem-se as α e β -talassemia.

As hemoglobinopatias são acompanhadas de alterações nos parâmetros do hemograma em particular na concentração de hemoglobina que está persistentemente reduzida, ou seja, são acompanhadas de anemia. Nalguns casos como na drepanocitose, pode ser útil fazer um esfregaço sanguíneo, de forma a observar a presença de drepanócitos.

No laboratório Affidea, os métodos usados para a identificação e quantificação de hemoglobinopatias são a técnica de HPLC e a eletroforese capilar de hemoglobinas. Sendo que, primeiramente é realizada a análise por HPLC para a pesquisa de hemoglobinas anormais e caso sejam detetadas hemoglobinas não identificáveis pelo método de HPLC é realizada a eletroforese capilar.

A técnica de HPLC de troca catiónica é realizada no analisador automático HLC-723G8 (G8) da TOSOH (Figura 20) no modo *Beta-thala analysis*, na qual uma mistura de hemoglobinas carregadas é separada nas diferentes hemoglobinas através da adsorção à fase estacionária (carregada negativamente) presente numa coluna cromatográfica seguida de eluição pela fase móvel. A fase móvel é uma solução líquida com uma concentração crescente de cátions, que vão competir com as hemoglobinas na ligação à fase estacionária. As frações de hemoglobina eluídas são detetadas por um detetador de luz UV/visível e são identificadas com base no seu tempo de retenção e quantificadas através da área dos picos obtidos no cromatograma. Através deste método é possível identificar e quantificar as HbA2, HbF e HbA1 (corresponde ao somatório da HbA0, L-HbA1c e s-HbA1c), bem como detetar outras hemoglobinas anormais¹⁰¹.



Figura 20. Equipamento HLC-723G8 (G8)

4.3.1. Hemoglobina glicada (HbA1c)

A hemoglobina glicada resulta de uma reação não enzimática irreversível entre a glucose em circulação na corrente sanguínea e os grupos amina livres da hemoglobina dos eritrócitos. A glicação das proteínas, na qual se inclui a hemoglobina, é um processo fisiológico que ocorre no organismo. Contudo, com o aumento prolongado da concentração de glucose no sangue (o que acontece no caso da diabetes *mellitus*), ocorre também o aumento destas reações de glicação em proteínas, e, portanto, há o aumento da quantidade HbA1c. A hemoglobina tem a particularidade de possuir um tempo médio de vida de cerca 120 dias o que a faz uma das proteínas com maior tempo de vida no plasma. Assim, a análise da hemoglobina glicada (HbA1c) no sangue fornece evidências sobre os níveis médios de glucose no sangue durante os 2 a 3 meses anteriores, que correspondem ao tempo de meia-vida no plasma. Outras situações para além da concentração de glucose podem afetar os valores de HbA1c tais como, situações que alterem o tempo de vida média dos eritrócitos, isto é, hemoglobinopatias, anemias ferropénicas, ou anemias hemolíticas^{102, 103}.

Em diabéticos os valores são $\geq 6,5\%$ e são tanto mais elevados, quanto maiores e mais prolongadas forem as glicémias. A determinação da HbA1c é feita, por rotina, em todas as pessoas com *diabetes mellitus*, para avaliar o grau de controlo glicémico. Estas determinações devem ser realizadas semestralmente ou de 3 em 3 meses, no caso de indivíduos com diabetes cujo tratamento mudou recentemente ou que não alcançaram os

objetivos terapêuticos preconizados. Normalmente, os valores de HbA1c vêm acompanhados de um valor da glicemia média estimada, que é obtida por cálculo a partir do valor da HbA1c em porcentagem e pelo resultado em mmol/mol, de acordo com a IFCC¹⁰³.

A determinação da HbA1c é feita pela técnica de HPLC pelo analisador HLC-723 (G11) da TOSOH (Figura 21) que apresenta um funcionamento muito semelhante ao G8. Este equipamento é mais rápido na análise quando comparado com o G8, processando um maior número de amostras.



Figura 21. Equipamento HLC-723(G11).

4.4. Estudo da Hemóstase

A hemóstase engloba um conjunto complexo de processos que mantém o sangue circulante num estado fluído, e aquando de uma lesão vascular permite a formação de um coágulo que impede uma hemorragia descontrolada. A hemóstase compreende vários intervenientes fundamentais, sendo eles os vasos sanguíneos, as plaquetas, os fatores de coagulação, os inibidores anticoagulantes e o sistema fibrinolítico. Todos estes intervenientes interagem estabelecendo um equilíbrio dinâmico que mantém controlado o risco de hemorragia e o risco de trombose no organismo^{6,89}.

A hemóstase divide-se em três fases principais: a hemóstase primária, hemóstase secundária e a hemóstase terciária. A hemóstase primária refere-se ao papel que os vasos sanguíneos e as plaquetas desempenham aquando de uma lesão vascular, culminando na formação do trombo plaquetário. A hemóstase secundária ou a coagulação consiste na ativação proteolítica em cascata de várias proteínas precursoras (fatores da coagulação), resultando na formação de trombina, que por sua vez vai converter o fibrinogénio plasmático em fibrina, originando o coágulo estável de fibrina. Finalmente, a hemóstase terciária ou fibrinólise consiste no processo de remoção do coágulo de fibrina dos vasos danificados, desempenhando um papel importante na remodelação e reparação dos tecidos após lesões^{65,89}.

A avaliação da hemóstase, consiste na realização de uma série de testes específicos que têm como objetivo detetar alterações em qualquer das fases da hemóstase. Deste modo, hemóstase primária pode ser estudada através de testes como a contagem plaquetária ou o doseamento do fator de von Willebrand, a hemóstase secundária é avaliada através de

testes coagulimétricos que medem a formação do coágulo de fibrina, assim como o doseamento de fatores de coagulação específicos, enquanto na avaliação da fibrinólise são usadas determinações dos produtos de degradação do coágulo e o doseamento de outras proteínas específicas^{65,89}.

No laboratório Affidea são realizadas algumas determinações que permitem auxiliar o estudo da coagulação e hemóstase, tais como: Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT), o doseamento de fibrinogénio, doseamento da antitrombina III (AT-III) e o doseamento dos D-Dímeros.

Para a realização dos testes de hemóstase são utilizadas amostras de plasma que são obtidas a partir da centrifugação de sangue total colhido num tubo com anticoagulante citrato trissódico. Os equipamentos utilizados para a realização dos testes são o analisador automático de coagulação Siemens BCS® XP (Figura 22), e o imunoanalisador automático Vidas® da Biomérieux, apenas para o doseamento dos D-dímeros.



Figura 22. Analisador automático de coagulação Siemens BCS® XP

O equipamento Siemens BCS XP utiliza fotometria para efetuar a leitura dos resultados e permitem realizar três tipos de testes: coagulométricos, cromogénicos e imunológicos. Os métodos coagulométricos são utilizados para a determinação do PT, APTT e do fibrinogénio. Basicamente, é usado um método turbidimétrico através do qual o equipamento deteta uma alteração da densidade ótica do plasma quando ocorre a formação do coágulo. A determinação da antitrombina é feita através de um método cromogénico, no qual é adicionado ao plasma um excesso de fator Xa e heparina. Na presença de heparina uma percentagem da enzima é complexada e inativada pela antitrombina presente na amostra. O fator Xa em excesso não inibido cliva depois um substrato cromogénico sintético. Este ao ser clivado liberta um cromóforo, a p-nitroanilina (pNA), que é monitorizado pelo aumento do valor de absorvência a um comprimento de onda de 405 nm. A libertação do corante é inversamente proporcional à atividade inibidora de antitrombina na amostra de plasma^{65,104}.

4.4.1. Tempo de Protrombina (TP)

O tempo de protrombina permite avaliar a via extrínseca da cascata da coagulação e a via comum. Permite determinar deficiências congénitas ou adquiridas dos fatores que constituem a via extrínseca e a via comum (fatores V, X, VII, protrombina e fibrinogénio). Este teste serve também para monitorizar a terapêutica anticoagulante e ainda na avaliação da função hepática. O TP encontra-se aumentado em situações como, deficiência nos fatores X, VII, V ou II, insuficiência hepática que causa a diminuição da

síntese de vários fatores de coagulação, ou situações de deficiência de vitamina K, devido a má-absorção desta vitamina ou por tratamento com anticoagulantes antagonistas da vitamina K como é o caso da varfarina^{60,65,91}.

Para a determinação do TP é adicionado ao plasma tromboplastina, que consiste numa mistura de fator tecidual e fosfolípidos. Esta mistura é mantida a 37°C ao qual depois é adicionado o cálcio, levando à coagulação, sendo o tempo decorrido até à formação do coágulo medido. Uma vez que as amostras de tromboplastina diferem consideravelmente de reagente para reagente, observou-se que os resultados do TP em segundos variavam substancialmente entre laboratórios. Posto isto, foi introduzido o INR (Razão Normalizada Internacional) pela OMS, de modo a uniformizar os resultados obtidos nos diferentes laboratórios. O INR é calculado a partir da seguinte fórmula:

$$INR = \left(\frac{TP \text{ amostra (seg)}}{MNTP} \right)^{ISI}$$

O ISI consiste no Índice de Sensibilidade Internacional e varia de acordo com o lote do reagente, sendo que este reflete a sensibilidade da tromboplastina utilizada relativamente a uma preparação de referência internacional, que por definição tem um ISI de 1,0. O MNPT consiste na média geométrica do tempo de protrombina na população normal. Os valores de INR para indivíduos que não tomem anticoagulantes antagonistas da vitamina K devem situar-se entre 1,00 e 1,20, caso tomem esta medicação o intervalo vai de 2,50 a 3,50. Caso o valor de INR seja superior a 4,0 deve ser repetida a medição para a confirmação do valor. Caso este valor se confirme deve observar-se a amostra e verificar se o volume está correto ou se se encontra coagulada, hemolisada, ictérica ou lipémica^{60,65,89}.

4.4.2. Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT)

O APTT avalia a via intrínseca e a via comum da cascata da coagulação, sendo sensível aos fatores constituintes de ambas as vias (fatores XII, XI, IX, VIII, X, V, II e fibrinogénio). Permite também detetar a presença do anticoagulante lúpico, que por norma causa um aumento do APTT. Por fim, é possível monitorizar a terapêutica com heparina não fracionada, através da medição do APTT, sendo que o prolongamento do tempo de coagulação é proporcional ao nível de heparina^{65,91}.

Para determinar o APTT é adicionada ao plasma da amostra uma mistura de fosfolípidos com um ativador de contacto e cloreto de cálcio, levando a uma ativação da via intrínseca da cascata da coagulação, sendo medido o tempo decorrido até à formação do coágulo^{60,91}.

4.4.3. Fibrinogénio

O fibrinogénio ou fator I é uma proteína plasmática sintetizado no fígado, que se converte em fibrina para a formação do coágulo, sob a ação da trombina. Níveis diminuídos de fibrinogénio são encontrados em casos de hipofibrinogenemia ou afibrinogenemia congénitas ou adquiridas, sendo estas últimas causadas por exemplo por insuficiência hepática ou coagulopatia intravascular disseminada, devido a um aumento do consumo de fatores de coagulação. Os valores de fibrinogénio aumentam em idades avançadas e situações de inflamação, já que esta é uma proteína de fase aguda positiva^{60,91}.

A determinação quantitativa do fibrinogénio é feita usando um método de Klaus, no qual é adicionado ao plasma diluído uma quantidade excessiva de trombina, sendo depois medido o tempo de formação do coágulo. Deste modo, a formação do coágulo não depende da quantidade de trombina presente na amostra, permitindo estabelecer uma relação do tempo de formação do coágulo com a quantidade de fibrinogénio presente na amostra^{60,91}.

4.4.4. Antitrombina III (AT-III)

A antitrombina é uma glicoproteína plasmática sintetizada no fígado, que tem como função principal inibir a trombina, mas também inibe os fatores Xa, IXa e XIa. A antitrombina liga-se à trombina covalentemente formando um complexo antitrombina-trombina inativo, esta ligação é potenciada pela heparina. A quantificação de AT-III ativa funcional tem por objetivo auxiliar no diagnóstico de défices hereditários ou adquiridos em AT-III^{65,89}.

4.4.5. D-Dímeros

Os D-dímeros são um dos produtos de degradação do coágulo de fibrina. Na degradação do coágulo, o plasminogénio é convertido em plasmina, que vai conduzir à degradação da fibrina vários fragmentos D, E, X, Y e em D-dímeros. Os D-dímeros em particular são um produto específico da degradação da fibrina estabilizada insolúvel após ação da trombina e do fator XIIIa, distinguindo-o dos restantes produtos de degradação. São um marcador útil no diagnóstico de tromboembolismo venoso, uma vez que tem um elevado valor preditivo negativo para esta patologia. Podem também ser utilizados no auxílio do diagnóstico da coagulação disseminada vascular (CID).

O método usado para o seu doseamento é um imunoensaio do tipo sanduíche com deteção final por fluorescência^{60,105}.

4.5. Imunohematologia

A imunohematologia é a área que estuda os antigénios presentes nos vários componentes do sangue total (eritrócitos, plaquetas, leucócitos), os anticorpos que reconhecem estes antigénios e as interações estabelecidas entre eles¹⁰⁶.

No laboratório Affidea, são realizadas as determinações dos grupos sanguíneos do sistema ABO e Rh (D), bem como a realização dos testes de Coombs Diretos e indiretos através da técnica de hemaglutinação em gel. Todas estas determinações são realizadas no Analisador automático WA Diana da Grifols (Figura 23), permitindo processar as amostras mais rapidamente do que no método manual.



Figura 23. Analisador automático WA Diana da Grifols

As amostras usadas para as técnicas de imunohematologia são tubos de sangue total colhido em EDTA, os quais são centrifugados, permitindo obter plasma e um sedimento de eritrócitos. O sedimento de eritrócitos é usado nas determinações dos Grupos Sanguíneos ABO e Rh.

O sistema ABO é caracterizado pela presença ou ausência de um ou ambos os antígenos A e B nos eritrócitos, assim como a presença de anticorpos no soro correspondentes ao antígeno ou antígenos ausentes. Estes antígenos são estruturas de carboidratos que se encontram à superfície dos eritrócitos e correspondem a um produto indireto da expressão de um gene. Os genes ABO codificam para enzimas (glicosiltransferases) que transferem um monossacárido específico a uma cadeia oligossacarídica precursora. Existem 4 grupos sanguíneos neste sistema: A, B, AB e O. Apenas no fenótipo O não ocorre a transferência de um monossacárido, uma vez que não há a expressão de uma enzima ativa. Os anticorpos surgem durante os primeiros meses de vida em resposta a antígenos semelhantes aos antígenos A e B existentes substâncias obtidas através da dieta e existentes no ambiente. Assim, um indivíduo com o grupo A apenas vai desenvolver anticorpos anti-B, em indivíduos do grupo B são desenvolvidos anticorpos anti-A, no grupo O desenvolvem-se ambos e no grupo AB não são desenvolvidos anticorpos. Normalmente, estes anticorpos pertencem à classe IgM, tirando alguns casos de indivíduos do grupo O que podem produzir IgGs. A existência destes anticorpos é que leva à rejeições de dádivas (reações transfusionais hemolíticas) de sangue que não apresentem compatibilidade^{65,91,108}.

O sistema Rh(D) é definido pela presença ou ausência do antígeno D nos eritrócitos. Este antígeno consiste numa proteína transmembranar que é altamente imunogénica, sendo de elevada importância clínica a sua determinação. Não existem anticorpos naturais como no sistema ABO, apenas se desenvolvem como resultado de uma aloimunização, principalmente através de transfusões ou gravidez. Estes anticorpos são da classe das IgGs e, portanto, são capazes de atravessar a barreira placentária. Deste modo, é importante fazer este teste em mulheres grávidas, uma vez que ao atravessarem a barreira placentária vão sensibilizar os eritrócitos do feto, os quais vão ser prematuramente eliminados estabelecendo-se um quadro de anemia hemolítica imune. É de realçar que apenas

gestantes Rh(D)⁻ previamente imunizadas é que vão desenvolver estes anticorpos e comprometer a saúde do feto^{65,91,108}.

A determinação do grupo ABO e Rh(D) é feita através de um método de aglutinação em colunas de gel (Figura 24). Nestas colunas encontram-se microesferas de gel de dextrano e acrilamida polimerizadas misturados com um reagente que contém anticorpos específicos. Os eritrócitos ao entrarem em contacto com os anti-soros formam imunocomplexos que aglutinam. As cassetes com as colunas são centrifugadas e a coluna de gel atua como um filtro que retém os eritrócitos aglutinados à medida que a atravessam durante a centrifugação do cartão. Os eritrócitos não aglutinados, após a centrifugação, depositam-se no fundo da coluna formando um sedimento, enquanto os eritrócitos aglutinados ficam retidos no topo do tubo. Esta última é classificada como uma reação positiva e o número de células capturadas no gel é indicativo da força do anticorpo, como se pode observar na figura 25^{91,108}. Na tabela 10 e 11 encontram-se explicitados os possíveis resultados que podem ser obtidos para os testes de determinação do sistema ABO e do sistema Rh.

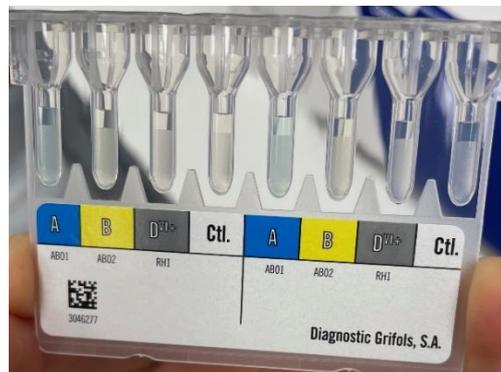


Figura 24. Cassete de colunas de confirmação do grupo sanguíneo ABO e Rh (D). DG Gel® Confirm P.

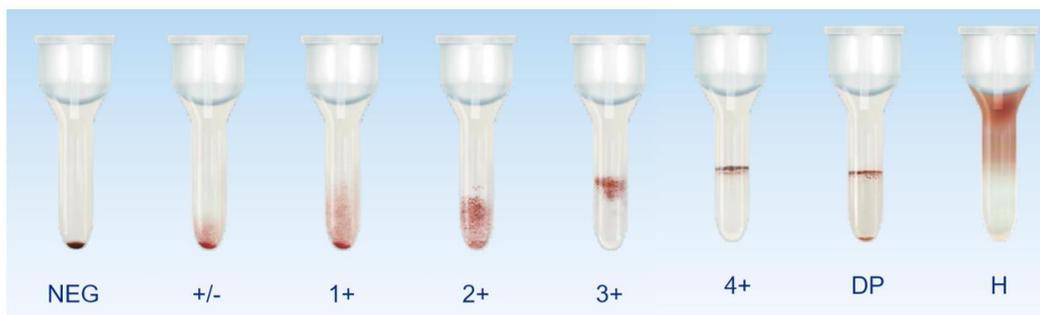


Figura 25. Padrão de leitura dos resultados possíveis. Legenda: NEG – sem aglutinação; +/- - pequenos aglutinados apenas visíveis no fundo da coluna; 1+ - alguns aglutinados de células na metade de baixo da coluna; 2+ acumulação de aglutinados de células médios ou pequenos por toda a coluna; 3+ - presença de aglutinados de tamanho médio na metade de cima da coluna; 4+ - banda bem definida de aglutinação de eritrócitos no topo da coluna; DP – população dupla (banda dupla de hemácias no fundo e parte superior da coluna); H – hemólise. Adaptado: (105).

Tabela 10. Interpretação dos resultados do sistema ABO. Legenda: + - reação positiva; 0 – reação negativa. Adaptado: (105)

Microtubo A	Microtubo B	Microtubo Ctl.	Grupo ABO
0	0	0	O
+	0	0	A
0	+	0	B
+	+	0	AB

Tabela 11. Interpretação dos resultados sistema Rh (antígeno D). Adaptado: (105).

Microtubo D	Microtubo Ctl.	Interpretação
+	0	D positivo
0	0	D negativo

O teste de Coombs ou o teste da antiglobulina é um teste usado para a detecção de anticorpos anti-eritrocitários que são responsáveis pelo estabelecimento de reações hemolíticas. O teste de Coombs pode ser realizado de duas formas: teste de Coombs direto e o teste de Coombs indireto^{89,106}.

O teste de Coombs direto é usado para detectar eritrócitos sensibilizados por imunoglobulinas ou frações do complemento *in vivo*. Neste teste adiciona-se aos eritrócitos do paciente o reagente de Antiglobulina Humana Polivalente (AHG), que vai levar à aglutinação dos eritrócitos caso estes já se encontrem sensibilizados previamente *in vivo*. Assim, o teste de Coombs direto positivo confirma a presença de anticorpos ligados aos eritrócitos. Os casos que se verificam testes de Coombs positivos são em anemias hemolíticas autoimunes, reações hemolíticas transfusionais e na doença hemolítica do recém-nascido^{89,106}.

No teste de Coombs indireto é testado o plasma dos pacientes para a detecção de anticorpos anti-eritrocitários irregulares circulantes. Estes anticorpos são potencialmente causadores de hemólise dos eritrócitos. Neste teste, a amostra de soro ou plasma do paciente é incubada primeiramente com eritrócitos testes. Se existirem anticorpos anti-eritrócitos no soro do paciente, estes ir-se-ão ligar aos eritrócitos. Posteriormente, é adicionado o reagente AHG, que vai conduzir à aglutinação dos eritrócitos. No caso de um resultado positivo no teste de Coombs, devem ser realizados testes de identificação da especificidade dos anticorpos irregulares encontrados. O teste de Coombs indireto é realizado em grávidas no contexto de vigilância da gravidez^{89,106,107}.

5. Microbiologia

O laboratório de microbiologia clínica desempenha um papel importante no diagnóstico, tratamento e monitorização de doenças infecciosas de etiologia bacteriana, micológica e parasitológica¹⁰⁸.

Ao laboratório de microbiologia chegam diversos tipos de amostras: urina, sangue, fezes, amostras respiratórias (expectoração) e exsudados (vaginal, retal, faríngeo, purulentos profundos e superficiais, entre outros). A partir destes produtos biológicos, realizam-se várias técnicas e procedimentos que visam fazer pesquisa, identificação e caracterização dos diferentes microrganismos que possam estar presentes nessas amostras. São também realizados testes de suscetibilidade a antibióticos e fungicidas, com o intuito de auxiliar o clínico na escolha da terapia mais adequada.

No tempo que estive no laboratório de microbiologia, tive a oportunidade de contactar com os vários métodos utilizados e familiarizar-me com o trajeto de processamento e manuseamento dos diferentes produtos biológicos. Adicionalmente, foi-me possível desenvolver um olhar crítico e interpretativo dos resultados obtidos.

De um modo resumido o processamento geral das amostras ocorre dentro dos seguintes moldes: as amostras são recebidas, triadas no laboratório e tratadas pela ordem de chegada. De seguida realiza-se o exame cultural e o exame microscópico (quando aplicável) e nos dias seguintes observa-se o crescimento microbiológico nas placas estabelecendo correlações com o exame microscópico. Observa-se a morfologia das colónias nas quais que são avaliadas características como o tamanho, cor, forma, aspeto, cheiro e alterações no meio de cultura provocadas pelo crescimento dos microrganismos. Quando existem resultados valorizáveis parte-se para as técnicas de identificação dos microrganismos e a realização de testes de sensibilidade aos antibióticos (TSA). Esta é só uma visão geral de como se desenrolam as atividades no laboratório de microbiologia, obviamente existem exceções a este procedimento.

5.1. Exame Cultural

O exame cultural consiste na inoculação de amostras em diferentes meios de cultura, com o propósito de permitir o crescimento suficiente e desenvolvimento de microrganismos a partir das amostras biológicas. Além disso, o exame cultural tem como objetivo a obtenção de culturas puras, que garante que os passos seguintes de identificação dos microrganismos e a realização dos TSA seja fidedigna e se obtenham resultados claros¹¹⁰.

Existe uma panóplia de meios de cultura com diferentes composições que garantem o crescimento de quase todos os microrganismos. Estes podem ser meios sólidos (geloses) ou meios líquidos (caldos), estes últimos são usados como meios de enriquecimento, com o objetivo de enriquecer o conteúdo bacteriano da amostra. Outra classificação dos meios de cultura prende-se com a sua seletividade ou não no crescimento dos microrganismos. Por isso podemos ter: meios não seletivos enriquecidos, meios seletivos e meios deferenciais^{110,111}. A escolha dos meios a usar vai depender do tipo de amostra, e do tipo

de microrganismos que se pretende isolar. Na tabela 12 encontram-se listados os meios que são usados no laboratório Affidea.

Tabela 12. Principais meios de cultura utilizados no Laboratório Affidea

Meio de cultura	Características
Gelose CHROMID® CPS® Elite (CPSE)	<ul style="list-style-type: none"> - Meio cromogénico para isolamento, contagem e identificação direta ou presuntiva de microrganismos infecciosos do trato urinário - Identificação direta para <i>Escherichia coli</i> - Identificação presuntiva para <i>Enterococcus</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Morganella</i> spp. e <i>Providencia</i> spp.
Gelose Mac Conkey (MCK)	<ul style="list-style-type: none"> - Meio para isolamento seletivo de bactérias Gram negativas - Presença de sais biliares e cristais de violeta que inibem o crescimento de bactérias Gram positivas - Deteta a fermentação de lactose através da alteração da cor do meio para vermelho - Microrganismos fermentadores de lactose originam colónias cor-de-rosa a vermelho - Microrganismos não fermentadores de lactose originam colónias incolores ou beges
Gelose ANC + 5% de sangue de carneiro (CNA)	<ul style="list-style-type: none"> - Meio para isolamento seletivo de bactérias Gram positivas - Presença de sangue no meio permite a deteção do padrão de hemólise - A presença de ácido nalidíxico e colimicina inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram negativas e <i>Bacillus</i>
Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (COS)	<ul style="list-style-type: none"> - Meio de isolamento nutritivo muito rico que permite o crescimento da maioria das espécies bacterianas - Presença de sangue no meio permite a deteção do padrão de hemólise
Gelose de Mueller Hinton E (MHE)	<ul style="list-style-type: none"> - Meio que se destina à realização de antibiogramas por difusão e à determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI) utilizando o método ETEST - Permite o crescimento de bactérias não exigentes (enterobactérias, bacilos Gram negativos não fermentadores, <i>staphylococci</i> e <i>enterococci</i>)

Tabela 13 (cont). Principais meios de cultura utilizados no Laboratório Affidea

Gelose Campyloset (CAMPY)	<ul style="list-style-type: none"> - Meio seletivo para isolamento de <i>Campylobacter</i> spp. a partir de amostras de fezes - As colónias de <i>Campylobacter</i> spp. são pequenas e acinzentadas. - Contém antibióticos e antifúngicos que inibem o crescimento da maior parte das bactérias e fungos
Gelose CASA	<ul style="list-style-type: none"> - Meio seletivo cromogénico para <i>Campylobacter</i> spp. - Colónias de <i>Campylobacter</i> spp.: cor de tijolo
Gelose CHROMID® Strepto B (STRB)	<ul style="list-style-type: none"> - Meio seletivo e de rastreio para <i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B) - Colónias de <i>Streptococcus agalactiae</i>: rosa-pálidas a vermelhas, redondas em forma de pérola - Os restantes microrganismos são inibidos de crescerem ou podem crescer, mas as suas colónias apresentam cores diferentes
Gelose CHROMID® MRSA SMART (MRSM)	<ul style="list-style-type: none"> - Meio cromogénico para rastreio de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina (MRSA) - Colónias de estipes de MRSA: rosa a vermelho
Gelose CHROMID CARBA SMART (CARB/OXA)	<ul style="list-style-type: none"> - Meio cromogénico seletivo para isolar enterobactérias produtoras de carbapenemases - Meio <i>bi-plate</i> - Permite a deteção simultânea de estirpes produtoras de KPC e NDM-1 num lado, e noutro lado estirpes produtoras de OXA-48
Caldo Coração -Cérebro (BHI-T)	<ul style="list-style-type: none"> - Meio líquido composto por uma base rica nutritiva com peptonas e extrato de cérebro e coração. - Permite o crescimento de microrganismos aeróbios exigentes
Caldo de selenito	<ul style="list-style-type: none"> - Meio enriquecido para o isolamento de <i>Salmonella</i> spp. e de algumas espécies de <i>Shigella</i>. - O selenito de sódio inibe o crescimento de outras bactérias de Gram + e de Gram – presentes em amostras fecais
Gelose Chocolate Haemophilus 2 (HAE)	<ul style="list-style-type: none"> - Meio de isolamento seletivo para as diferentes espécies de <i>Haemophilus</i> spp. - Possui uma base nutritiva rica em fatores X (hemina) e V (NAD) - Inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram positivas e leveduras graças à presença de variados antibióticos e antifúngicos

Tabela 14 (cont). Principais meios de cultura utilizados no Laboratório Affidea

Gelose Chocolate PolyViteX (PVX)	<ul style="list-style-type: none"> - Meio de isolamento para o crescimento de microrganismos exigentes como os pertencentes aos géneros <i>Neisseria</i>, <i>Haemophilus</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i>. - Possui uma base nutritiva rica em fatores X (hemina) e V (NAD)
Gelose Chocolate PolyViteX™ VCAT3 (VCA3)	<ul style="list-style-type: none"> - Meio de isolamento seletivo para <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> - Possui uma base nutritiva rica em fatores X (hemina) e V (NAD) - Inibe o crescimento das bactérias e leveduras não pesquisadas graças à presença de variados antibióticos e antifúngicos
Gelose CHROMID® Candida (CAN2)	<ul style="list-style-type: none"> - Meio cromogénico para o isolamento seletivo de fungos leveduriformes e identificação direta de <i>Candida albicans</i> - Colónias azuis: <i>Candida albicans</i> - Colónias rosas: <i>Candida tropicalis</i> - Colónias brancas/bejes: <i>Candida spp.</i>
Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2 (SGC2)	<ul style="list-style-type: none"> - Isolamento seletivo de fungos leveduriformes e filamentosos - Dextrose e peptonas favorecem o crescimento de fungos - A ação conjunta da gentamicina e cloranfenicol permite inibir o crescimento bacteriano
Gelose Hektoen (HEKT)	<ul style="list-style-type: none"> - Meio de isolamento seletivo de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Shigella</i> spp. a partir de amostras de fezes - Microrganismos produtores de H₂S formam colónias com centro preto - Microrganismos que fermentem um dos três açúcares constituintes do meio forma colónias amarelas ou cor-de-rosa amarelado; os outros produzem colónias verdes a verdes-azuladas - Colónias de <i>Salmonella</i> spp.: cor verde a verde-azulado com ou sem centro preto - Colónias de <i>Shigella</i> spp.: cor verde a verde-azulado sem um centro preto

A forma de como se faz a inoculação da amostra nos meio sólidos difere consoante o produto biológico e o objetivo da inoculação. Na maioria dos produtos biológicos é utilizada a técnica de sementeira por esgotamento, ou por quatro quadrantes, ilustrada na figura 26, sendo para isso utilizada uma ansa calibrada de 10 µL. Esta técnica permite obter colónias isoladas e fazer uma análise semi-quantitativa das colónias no meio de cultura. Para a semear as amostras de urina utiliza-se uma técnica de sementeira por estrias (Figura 26), para a qual é utilizada uma ansa calibrada de 10 µL. Esta técnica ao contrário da anterior é quantitativa, permitindo determinar o número de unidades formadoras de colónias (UFC) por mililitro na amostra.

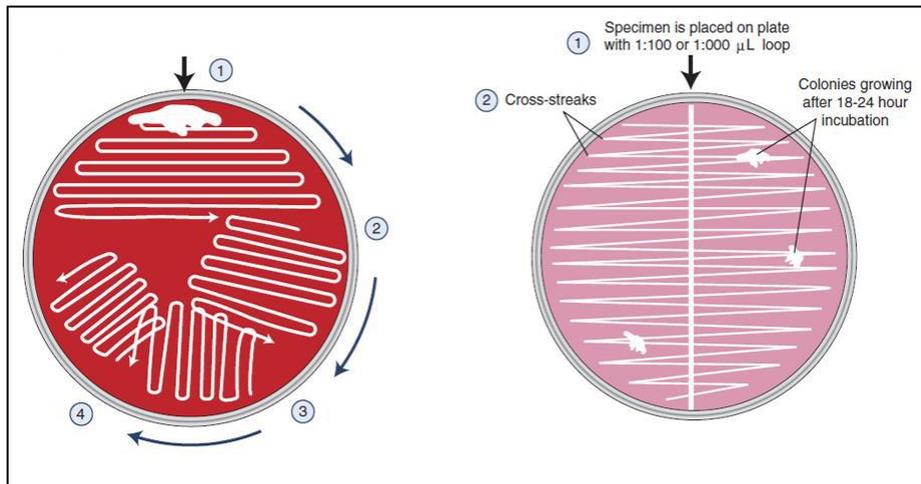


Figura 26. Técnicas de sementeira por quadrantes (esquerda) e por estrias (direita). Adaptado de: (111)

Além dos nutrientes fornecidos pelos meios de cultura é necessário fornecer aos microrganismos as condições ambientais ideais ao seu crescimento. Estas incluem a temperatura e atmosfera de incubação (O_2 e CO_2). Assim, após a inoculação nos meios de cultura, estes devem ser colocados dentro de estufas para serem incubados de maneira a promover o seu crescimento. A grande maioria de culturas são incubadas a temperaturas de 35-37°C, embora alguns microrganismos como sendo os fungos filamentosos precisem de temperaturas que rondem os 25-30°C. Os microrganismos aeróbios crescem em atmosfera normal, enquanto os microrganismos anaeróbios, são incapazes de crescerem na presença de oxigénio, e os microaerófilos necessitam de crescer em ambientes com quantidades de O_2 reduzidas e de CO_2 aumentadas. Para se obterem as atmosferas ideais ao crescimento de cada um destes grupos de microrganismos são usadas jarras geradoras de CO_2 . Quanto ao tempo de incubação necessário para o crescimento, este depende dos microrganismos, sendo que geralmente os meios de cultura são incubados durante 24-48 horas. No caso dos anaeróbios, o tempo de crescimento pode ser superior, sendo necessária a incubação durante um maior período de tempo^{110,111}.

5.2. Exame microscópico

O exame microscópico é uma das etapas constituintes do processo de análise de amostras biológicas. Tem como objetivo auxiliar na identificação preliminar ou definitiva de microrganismos. Também pode ser usado para caracterizar melhor os microrganismos que crescem em cultura. No contexto clínico, a observação ao microscópio é usada para detetar a presença de bactérias, elementos leveduriformes, elementos filamentosos e parasitas (ovos, larvas ou formas adultas)¹¹⁰. O exame microscópico abrange o exame a fresco e o exame após coloração.

5.2.1. Exame a fresco

O exame a fresco é o método com a preparação mais simples, bastando apenas colocar o produto a analisar entre lâmina e lamela e observar ao microscópio com a objetiva de 40X. A preparação do esfregaço vai depender do tipo de amostra biológica.

5.2.2. Exame após coloração

Muitas vezes a observação a fresco das mostras biológicas não é suficientemente capaz de fornecer informação sobre que tipo de microrganismos estão presentes nas amostras. Posto isto, é necessário recorrer a colorações diferenciais que permitem determinar com mais detalhe as características morfológicas dos microrganismos. Além disso, a própria afinidade para os corantes de certas estruturas celulares dos microrganismos permite a sua identificação¹¹¹. No laboratório Affidea são utilizadas duas colorações: a coloração de Gram e a coloração de Ziehl-Neelsen.

A coloração de Gram é a mais comumente usada no laboratório de microbiologia. Permite diferenciar os dois grupos principais de bactérias, as bactérias de Gram positivo e as de Gram negativo. Esta diferenciação tem por base a afinidade para os corantes utilizados, que é determinada por diferenças na estrutura da parede celular das bactérias. Nesta coloração, adiciona-se em primeiro lugar o corante cristal de violeta (roxo), seguido de uma solução de lugol (iodo) que aumenta a ligação do corante à parede celular das bactérias, e depois uma solução descorante de álcool-acetona, que remove o corante. Por fim, adiciona-se o corante safranina (rosa). As bactérias de Gram positivo retém o cristal-violeta devido a sua camada espessa de peptidoglicano, adquirindo uma coloração roxa. As bactérias de Gram negativo, pelo contrário, não possuem uma camada espessa de peptidoglicano, pelo que perdem o cristal-violeta durante o processo de descoloração. Ficam apenas coradas pelo segundo corante, a safranina, adquirindo uma coloração rosa^{110,111}.

A coloração de Ziehl-Neelsen é usada para a deteção de bactérias álcool-ácido resistentes (BAAR), nomeadamente as bactérias do género *Mycobacterium*, como o *M. tuberculosis*. A parede celular das bactérias álcool-ácido resistentes é constituída por ácidos micólicos, pelo que as torna resistentes à descoloração por soluções álcool-ácidas. Deste modo, ao adicionar-se o primeiro corante, carbofucsina, este fica retido nas bactérias álcool-ácido resistentes e mantém-se após a aplicação da solução descorante (álcool-ácido). Posteriormente, cobre-se o esfregaço com o corante azul de metileno, que vai corar as células e outros microrganismos. Assim, as bactérias álcool-ácido resistentes adquirem uma coloração rosa, ao passo que os outros elementos ficam corados de azul. No laboratório Affidea, esta coloração é usada para corar esfregaços provenientes de amostras de expetoração^{110,111}.

5.3. Testes de Identificação de Microrganismos - Sistema automatizado VITEK® 2

Nos casos em que a observação das colónias das placas não nos permite esclarecer qual é exatamente a espécie causadora de infeção recorre-se ao equipamento VITEK® 2 XL

(Figura 27). Este aparelho automatizado permite por meio de cartas de identificação, que contém 64 poços com diferentes substratos, fazer uma identificação definitiva da espécie. O equipamento faz uma monitorização contínua do crescimento e da atividade dos microrganismos em cada poço de teste, fazendo essa medição através de um sistema ótico de transmitância. A cada 15 minutos o aparelho faz uma medição da transmitância até ao fim do tempo de incubação das cartas. A capacidade ou incapacidade de utilizar certos substratos por parte dos microrganismos origina reações com produtos coloridos que são medidos pelo sistema ótico. Ao conjugar os resultados de todas as reações é possível fazer a identificação do microrganismo¹¹².



Figura 27. Equipamento VITEK® 2 XL

Na tabela 13 estão organizadas as diferentes cartas de identificação do VITEK® 2 usadas no laboratório. Para a preparação das amostras no VITEK® é necessário fazer-se uma suspensão de microbiana. Para tal repicam-se colónias de placas de culturas puras e suspendem-se numa solução salina estéril até obter-se uma turvação específica na escala de Mac Farland. Dependendo da carta que se vai utilizar este valor de turvação varia. Para as cartas VITEK® GN e VITEK® GP a suspensão deverá ter uma turvação de entre 0,5 – 0,55 Mac Farland. No caso das cartas VITEK® NH e VITEK® ANC, a suspensão deverá ter uma turvação entre 2,7 – 3,3 Mac Farland. Por fim, na carta de identificação de fungos, VITEK® YST, a suspensão a utilizar deverá ser de 1,8 – 2,20 Mac Farland. A turvação das suspensões é medida com recuso a um densitómetro (DensiCHECK™).

Tabela 15. Cartas de identificação usadas no Laboratório Affidea. Adaptado de: (113)

Carta de identificação	Utilização
VITEK® GN	Identificação de bacilos Gram negativos não fermentadores e fermentadores
VITEK® GP	Identificação de bactérias Gram positivas
VITEK® NH	Identificação de <i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp. e outras bactérias Gram negativas fastidiosas
VITEK® ANC	Identificação de bactérias anaeróbias e corineformes
VITEK® YST	Identificação de leveduras e microrganismos similares

5.4. Teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA)

O objetivo do teste de sensibilidade aos antibióticos é determinar o perfil de resistências aos antibióticos de bactérias isolados de amostras clínicas, de forma a auxiliar o clínico na escolha de uma terapia eficaz contra o agente patogénico. São também realizados testes de sensibilidade aos antifúngicos. Estes testes têm por base métodos que permitem determinar da Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI), isto é a menor concentração de antibiótico que inibe o crescimento de um microrganismo *in vitro*¹¹⁰. No laboratório Affidea, a determinação da suscetibilidade a antibióticos pode ser feita por dois métodos: método de difusão em disco ou método de microdiluição usando o equipamento VITEK®2.

5.4.1. Método de microdiluição - VITEK®2

O VITEK®2 permite a realização do teste de sensibilidade aos antibióticos, fazendo uso de diferentes cartas AST que contém antibióticos selecionados, em concentrações crescentes, desidratados e com meio de cultura. O princípio por de detrás das cartas AST é basicamente o método das microdiluições. Cada carta possui 64 poços, sendo que um poço é o controlo, apenas possuindo meio de cultura. Os restantes poços são constituídos por antibióticos selecionados, em concentrações crescentes, juntamente com meio de cultura. Na tabela 14 encontram-se as diferentes cartas VITEK®2 AST que são utilizadas no laboratório¹¹².

Tabela 16. Cartas VITEK®2 AST. Adaptado de: (114)

Carta de AST	Utilização
VITEK® AST-N246	Determinação da sensibilidade de bacilos Gram-negativos aeróbios a antibióticos
VITEK® AST-N427	Determinação da sensibilidade de bacilos Gram-negativos aeróbios a antibióticos. Usada para <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Acinetobacter</i> spp. e quando um microrganismo tenha muitas resistências aos antibióticos na carta AST-N426
VITEK® AST-P648	Determinação da sensibilidade de <i>Staphylococcus</i> spp. a antibióticos
VITEK® AST-P586	Determinação da sensibilidade de <i>Enterococcus</i> spp. a antibióticos
VITEK® AST-ST03	Determinação da sensibilidade de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Streptococcus</i> do grupo A a antibióticos
VITEK® AST-YS08	Determinação de sensibilidade aos antifúngicos

Para a preparação das amostras no VITEK® é necessário fazer-se uma suspensão bacteriana. Para tal repicam-se colónias e suspendem-se numa solução salina estéril até obter-se uma turvação específica na escala de Mac Farland. O valor de turvação necessário é entre 0,5 – 0,55 Mac Farland.

5.4.2. Antibiograma manual

Outro método utilizado para a determinação da sensibilidade aos antibióticos é através do método da difusão em discos (ou método de Kirby-Bauer). Neste caso, faz-se uma suspensão de bactérias repicando colônias e suspendendo-as numa solução salina estéril até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 de Mac Farland (1×10^6 UFC/ml), sendo isto medido num turbidímetro. De seguida, embebe-se uma zaragatoa estéril nesta suspensão e semeia-se em meio Mueller-Hinton em todas as direções da placa de forma a abranger toda a superfície. Posteriormente, são colocados os discos impregnados com os antibióticos na placa e esta vai ser incubada a 37°C durante 18 – 24 horas. Durante o período de incubação, os antibióticos difundem-se radialmente e, caso o microrganismo seja sensível aos mesmos, verifica-se um halo de inibição de crescimento. Findado o período de incubação, utiliza-se uma régua para medir os diâmetros dos halos inibitórios. É de realçar que a concentração de antibiótico diminui a distâncias maiores do disco². No caso das amostras de exsudado vaginal para a pesquisa de *Streptococcus* do grupo B, quando positivas, o antibiograma não é feito em Mueller-Hinton, mas sim em COS. De igual modo, amostras semeadas em PVX para pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* ou de *Haemophilus influenzae* (que são identificados pela carta VITEK® NH), o antibiograma é feito em PVX. Assim como os microrganismos identificados pela carta VITEK® ANC, o antibiograma é feito em COS. No caso dos fungos, o antibiograma é na maioria das vezes feitos pelo método de difusão em discos em meio Sabouraud.

Discos usados na rotina do laboratório:

- Amoxicilina
- Amoxicilina + ácido clavulânico
- Trimetoprim – sulfametoxazol (STX)
- Fosfomicina
- Nitrofurantoína
- Cefuroxima
- Ciprofloxacina
- Cefotaxime (nas bactérias de Gram positivo em COS)

No caso do antibiograma manual para os isolados de *Streptococcus agalactiae* (do grupo B) de amostras vaginais e retais:

- Clindamicina
- Eritromicina
- Penicilina

No antifungograma manual, realizado em Sabouraud são usados:

- Fluconazol
- Nistatina
- Cetoconazol
- Clotrimazol

5.5. Urinas Assépticas

A colheita de urina deverá ser a primeira da manhã por micção “jato médio”, ou seja, descartando o primeiro jato urinário e recolhendo o jato intermédio diretamente para recipiente esterilizado. A urina é um líquido biológico estéril. Contudo, a sua passagem através da uretra durante a micção arrasta os microrganismos que a colonizam, podendo induzir erros na interpretação da urocultura. Assim, de forma a manter as condições de assepsia o utente deverá fazer uma higienização correta dos genitais externos¹¹⁵.

Para a cultura em placa utiliza-se uma ansa calibrada de 10 µl que é imersa na urina e semeia-se pelo método de espalhamento em meio CHROMID® CPS® Elite (meio cromogénico que permite diferenciar alguns microrganismos). Este posteriormente é incubado a 37°C em aerobiose durante 18-24h na estufa. Algumas amostras que são provenientes de hospitais ou lares o seu processamento é feito de maneira ligeiramente diferente. Além de se fazer a sementeira em meio CPS, faz-se também em meio Mac Conkey e em meio CNA. A razão prende-se com a possibilidade de nestas amostras ocorrerem infeções mistas, pelo que pode haver uma ocultação do crescimento de um microrganismo por outro em CPS.

O tubo para a análise do sedimento a fresco é colocado e analisado pelo aparelho Atellica 1500 Siemens. Dentro do aparelho as urinas são centrifugadas e o módulo de microscópio incorporado no equipamento permite a obtenção de várias imagens. Nalguns casos, como por exemplo um tubo de urina com volume insuficiente para o aparelho, a análise do sedimento pode ser feita manualmente com recurso a um microscópio ótico. No exame a fresco do sedimento urinário, o que se pretende observar é a presença ou ausência de bactérias, leucócitos, células epiteliais, leveduras, hemácias, cristais e cilindros e fazer uma contagem destes. Esta contagem é garantida pelo Atellica® 1500 Automated Urinalysis System.

Na manhã do dia seguinte é quando as amostras do dia anterior são analisadas. Para que uma amostra possa ser considerada como uma infeção urinária existem alguns pré-requisitos que esta deve cumprir. Em primeiro lugar, a leucocitúria, que é um marcador muito indicativo de infeção urinária. Em segundo, se há crescimento microbiano na placa e se este poderá ser devido a uma possível infeção urinária, ou se, pelo contrário, se deve a uma possível contaminação vaginal/uretral, ou seja, uma má colheita, que não foi feita de acordo com as condições de assepsia. É importante olhar também para os parâmetros da urina tipo II, se tiver sido pedida, nomeadamente se tem nitritos positivos e esterase leucocitária positiva. Por fim, conjugar todos estes dados com a idade, o sexo e se o utente apresenta sintomatologia de infeção urinária, para se poder concluir se o utente tem de facto uma infeção urinária e posteriormente proceder à identificação do agente etiológico e realizar-se o teste de sensibilidade aos antibióticos.

A utilização do meio CPS como primeiro meio para realizar a sementeira garante que seja possível fazer uma identificação direta de *E.coli* e uma identificação presuntiva de outros microrganismos. O meio CPS permite também distinguir colónias de bactérias de Gram negativo de colónias de bactérias de Gram positivo. No primeiro grupo, as colónias são maiores, mais translúcidas e possuem um aspeto “mucoide”. As colónias de bactérias de Gram positivo são menores, e têm uma aparência mais opaca, conferindo-lhes um aspeto mais “leitoso”.

O meio CPS tem a vantagem de colónias de microrganismos diferentes poderem produzir cores diferentes, o que facilita a sua identificação e ajuda a definir os passos seguintes, isto é, se se deve partir para identificação e antibiograma ou apenas basta fazer o antibiograma, uma vez que a identificação é clara pelo tipo de colónia. As colónias de *E.coli* em CPS têm uma coloração rosa forte de estirpes produtoras de beta-glucuronidase (beta-GUR) ou beta-galactosidase (beta-GAL). Os microrganismos do género *Enterococcus* em CPS originam colónias de coloração azul com tom turquesa, de tamanho pequeno. O grupo KESC engloba as bactérias dos géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*, e, em meio CPS as suas colónias apresentam-se em tons de azul a verde. Já os *Proteus*, *Morganella* e *Providencia* em CPS originam colónias em tons amarelos-acastanhados, sendo que no caso de *Proteus mirabilis* é comum estas colónias apresentarem swarming e terem um cheiro a amónia característico. É possível ainda identificar outros microrganismos em CPS, designadamente *Staphylococcus saprophyticus*, que se caracteriza pelo aparecimento de colónias pequenas em tons de rosa-claro, e, *Streptococcus agalactiae*, que dá origem a colónias em tons violeta-azulado. Outros microrganismos como *Staphylococcus aureus* obtém-se colónias brancas ou incolores, mas nestes casos é requerida sempre uma identificação do microrganismo, que é feita pelo VITEK 2. As colónias anteriormente descritas em meio CPS podem ser observadas na figura 28.

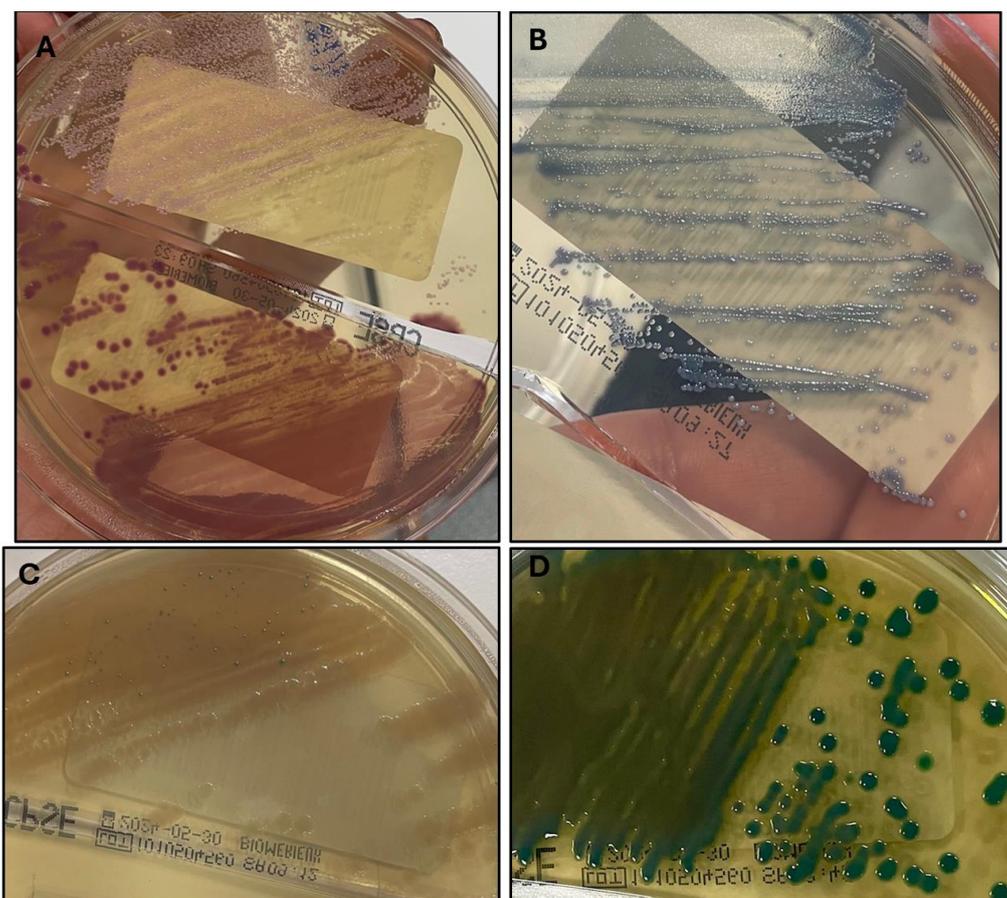


Figura 28. Diferentes colónias de bactérias em meio CHROMID® CPS® Elite. (A) Em cima: *Staphylococcus saprophyticus*; em baixo: *Escherichia coli*; (B) *Sterptococcus agalactiae*; (C) *Pseudomonas aeruginosa*; (D) *Klebsiella spp.*

Durante o processo de validação dos resultados é importante ter em atenção alguns aspetos:

- Utentes grávidas vão ter leucócitos elevados na urina. No entanto, esta presença é fisiológica na grávida pelo que não se deve ter em conta como indicador válido de infeção urinária nesta população. É importante olhar para a placa e verificar se são obtidas culturas puras ou pelo contrário há vários tipos de bactérias na placa. Ainda falando das grávidas é importante estar alerta para a presença de *Streptococcus agalactiae* (grupo B), na urina uma vez que uma infeção por este agente pode ter consequências graves para o feto.
- A presença em elevado número de células epiteliais na urina poderá indicar que a colheita foi feita de forma incorreta, podendo estar contaminada com exsudado vaginal ou uretral.
- O crescimento polimicrobiano nas placas, isto é de vários tipos de colónias de microrganismos, pode ser indicativo de contaminação/falta de assepsia durante a colheita da amostra de urina. No entanto, é sempre importante olhar para o teor de leucócitos e a sintomatologia.
- Os nitritos positivos na urina são um parâmetro de alerta para uma possível infeção urinária, uma vez que existem bactérias capazes de reduzir nitratos a nitritos. (Atenção a falsos positivos nos nitritos: teores elevados de bilirrubina e hemoglobina na urina).
- Placas com crescimento bacteriano inferior a 10^3 UFC/ml e leucócitos inferiores a 10^4 /ml (leucócitos abaixo de 12 por campo) são consideradas como negativas.
- Uma situação que pode ocorrer é nos homens mais jovens apresentarem sintomas de infeção urinária, terem leucócitos elevados, mas apresentarem uma placa limpa. Nestes casos é importante fazer uma nova cultura, mas desta vez em meio PVX, que é mais rico e permite o crescimento de microrganismos fastidiosos, nomeadamente a *Neisseria gonorrhoeae*.
- Caso exista crescimento de mais do que um microrganismo na placa e os leucócitos estejam elevados, deve-se fazer um re-isolamento de cada uma das colónias em CPS ou CNA e MCK para se obterem culturas puras e fazer-se posteriormente o TSA. Desta maneira é possível estabelecer o perfil de sensibilidade dos antibióticos de cada bactéria em separado, sem haver interferência.
- Se os resultados presentes na placa, não forem concordantes com os resultados da análise do sedimento e com a sintomatologia, deve-se fazer uma nova cultura escolhendo os meios de MCK e CNA e/ou PVX.

As infeções do trato urinário (UTI) são das infeções mais frequentes no ser humano. O principal agente causador destas infeções é a *E.coli*, mas também outras bactérias como *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, podem desencadear infeções urinárias. O *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* também podem causar infeções urinárias, no entanto são apenas relevantes em doentes do sexo masculino, pois existe uma maior propensão de homens desenvolverem infeções urinárias causadas por *Enterococcus spp.*

do que as mulheres¹¹⁶. Também pode haver infecções urinárias causadas por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, mais frequente em utentes hospitalizados. Bactérias como *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus saprophyticus*, também podem originar infecções urinárias, sendo o primeiro mais comum em mulheres grávidas e o segundo em jovens mulheres sexualmente ativas.

5.6. Exsudado vaginal

Para a análise dos exsudados vaginais são necessárias pelo menos duas zaragatoas. Uma zaragatoa transportada num tubo com meio de transporte, que vai ser usada para fazer a cultura, e outra zaragatoa seca que servirá para fazer o esfregaço do exame microscópico. Normalmente, o esfregaço para a análise microscópica é feito no posto de colheitas e, portanto, já chega a lâmina pronta ao laboratório, sendo só necessário fazer a coloração de Gram. Adicionalmente, se for pedida a pesquisa de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp., é necessária uma zaragatoa seca adicional. A zaragatoa é introduzida no canal vaginal por cerca de 5 cm e roda-se a suavemente nas paredes da vagina durante mais ou menos 30 segundos. Para fazer a pesquisa de *Neisseria* spp., *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp. deve fazer-se colheita no endocérvix. Para tal é necessário usar um espéculo para facilitar a introdução da zaragatoa no endocérvix¹¹⁵.

Recebidas as amostras, a zaragatoa em meio de transporte é inoculada em vários meios de cultura, são eles: CNA, PVX e CAN2, pela técnica de esgotamento. A ordem de inoculação da zaragatoa é do meio menos seletivo, para o meio mais seletivo. As placas são incubadas durante 48h a 35 -37°C, sendo que a os meios de CNA e PVX são incubados em anaerobiose (atmosfera 5% CO₂) e CAN2 é incubado em aerobiose. Quanto ao exame microscópico, a lâmina é corada com a coloração de Gram, para observação no microscópio ótico. É também feito um exame fresco direto que é observado no Atellica® 1500 Automated Urinalysis System.

Os principais agentes etiológicos causadores de infecções vaginais, que são a *Candida* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus* do grupo B, entre outros¹¹⁰. Passadas as 48h de incubação, é observado o crescimento microbiológico nas placas. É de realçar que a vagina é colonizada por uma flora saprófita variada e, portanto, é expectável haver sempre crescimento microbiano nas placas. O que é importante é saber identificar o tipo de colónias que os microrganismos causadores de infecções vaginais apresentam nos diferentes meios, como se pode observar na figura 29. Adicionalmente, é essencial correlacionar o crescimento microbiano das placas com as observações microscópicas do exsudado vaginal. O que se vai observar são os bacilos de Doderlein, células epiteliais, a presença ou ausência de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*, formas leveduriformes, cocos Gram negativos intracelulares agrupados aos pares característicos de *Neisseria gonorrhoeae* e as *Clue Cells* características da *Gardnerella vaginalis*. No exame a fresco direto, o que se pretende observar é a presença de leucócitos, células epiteliais, células leveduriformes e trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* (Figura 30).

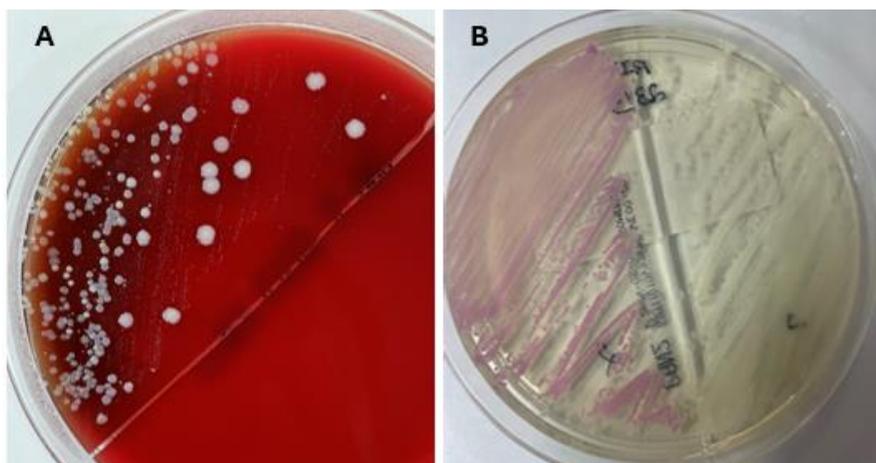


Figura 29. Placas com crescimento microbiológico de exsudado vaginal. **(A)** Colônias de *Gardnerella vaginalis* (colônias mais pequenas e brilhantes) em CNA; **(B)** Meio CAN2; Lado esquerdo: colônias de *Candida tropicalis*; lado direito: colônias de *Candida* spp.

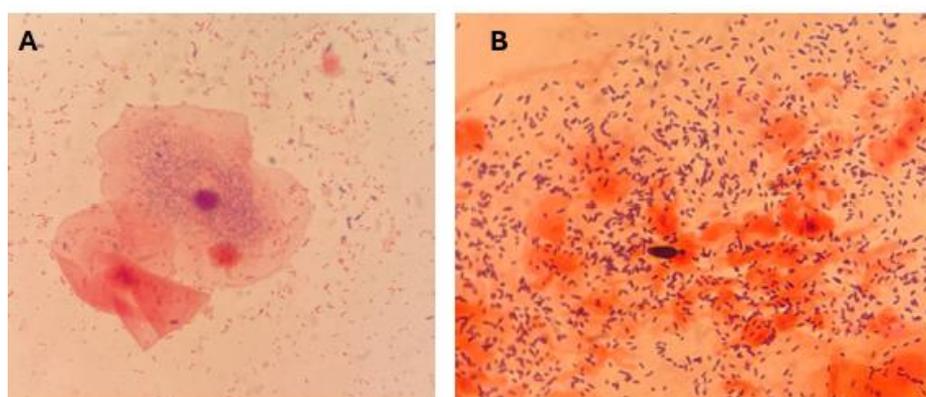


Figura 30. Esfregaço de exsudado vaginal com coloração de Gram (400X). **(A)** “Clue cells”, células epiteliais envolvidas por pequenos bacilos de Gram variável; **(B)** Levedura a gemular.

5.6.1. Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* (grupo B)

Streptococcus agalactiae são cocos Gram positivos que colonizam o trato gastrointestinal e urogenital. É a única bactéria pertencente ao grupo B de acordo com a classificação de Lancefield, e possui um padrão de hemólise completa, ou seja, β hemólise. A sua detecção é especialmente importante durante a gravidez, já que esta bactéria pode causar sepsis, pneumonias e meningites em recém-nascidos. A transmissão ocorre durante o parto se a gestante estiver colonizada no canal vaginal por *Streptococcus agalactiae*¹¹⁷. Deste modo, é recomendado pela Direção Geral da Saúde a todas as grávidas fazerem o Rastreamento do *Streptococcus* β hemolítico do grupo B entre as semanas 35 e 37 da gravidez¹¹⁸. São obtidas duas zaragoas uma do 1/3 externo da vagina e outra ano-retal, que são inoculadas em meio STRB pelo método de esgotamento. As placas são incubadas por um período de 24h a 35-37°C, 5%CO₂. O *Streptococcus agalactiae* origina colônias vermelhas neste meio, como se observa figura 31. Após 24h a gelose é observada e se não existir crescimento de microrganismos a incubação é prolongada por mais 24h. Face a um resultado positivo para *Streptococcus* β hemolítico do grupo B, procede-se à realização

do teste de sensibilidade aos antibióticos manual em meio COS com 3 antibióticos: penicilina, eritromicina e clindamicina.

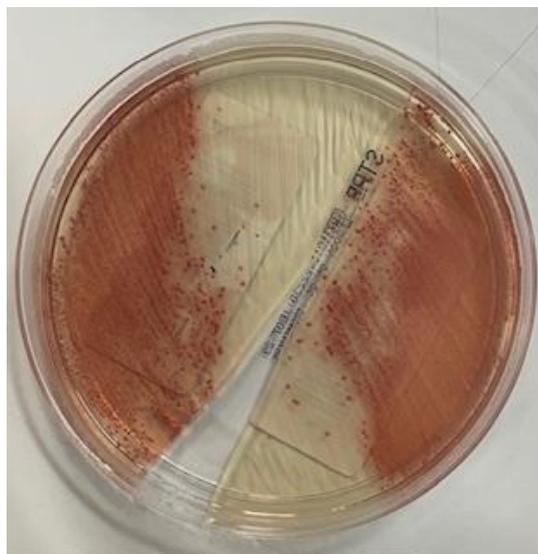


Figura 31. Colônias de *Streptococcus agalactiae* em meio STRB.

5.7. Exsudado uretral

Para a colheita das amostras de exsudado uretral deve ser usada uma zaragatoa fina e flexível para seja introduzida entre 2 a 4 cm na uretra, fazendo movimentos de rotação. A colheita deve ser feita antes da primeira micção da manhã, se não for possível, deve-se fazer a colheita 1 hora após a última micção. Igualmente ao que acontece no exsudado vaginal, são colhidas duas zaragatoas, uma seca para o esfregaço e outra para o exame cultural que deve vir em meio de transporte. Os meios a inocular são os mesmos usados para o exsudado vaginal. Caso seja pedido uma pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* é também inoculada a zaragatoa em meio VCA3, meio enriquecido e seletivo para *Neisseria gonorrhoeae*¹¹⁵.

As uretrites são causadas maioritariamente por patógenos sexualmente transmissíveis sendo os mais comuns a *Neisseria gonorrhoeae* e a *Chlamydia trachomatis*. As uretrites podem ser classificadas como gonocócica (se o agente etiológico for a *Neisseria gonorrhoeae*) ou não gonocócica. Outros agentes como *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* ou *Candida* spp.¹¹⁹ também podem causar uretrites. No caso da *Neisseria gonorrhoeae*, as colônias obtidas são acinzentadas de bordos irregulares. No exame microscópico observa-se diplococos de Gram negativo intracelulares.

5.8. Pesquisa de micoplasmas urogenitais

Os micoplasmas são os microrganismos mais pequenos auto-replicáveis independentes. Uma característica que os diferencia das demais bactérias é a ausência de parede de

celular, o que os torna naturalmente resistentes aos antibióticos da classe beta-lactâmicos. São pleomórficos, de crescimento lento e fastidiosos. Os micoplasmas urogenitais que são *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, e *Ureaplasma parvum* são transmitidos sexualmente e são agentes causadores de infecções do trato urogenital¹²⁰.

A pesquisa de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp. pode ser feita a partir de amostras de urina, exsudados vaginais ou exsudados uretrais. Para o diagnóstico dos micoplasmas urogenitais é usado o dispositivo Mycoplasma IST3, figura 32. Este permite, a cultura, identificação da espécie, contagem indicativa e a determinação da sensibilidade aos antibióticos. Este método associa um caldo de cultura seletivo a uma galeria que contém 25 testes. Existem substratos específicos como a ureia para *Ureaplasma* spp. e a arginina para *M. hominis*, que são metabolizados em amônia, alterando o pH do meio para alcalino. Esta alteração de pH é visualizada pela mudança de cor do caldo para um rosa, devido à presença e um indicador de pH (vermelho fenol), ou seja, em caso de cultura positiva ocorre esta alteração de cor. Quanto aos antibióticos, é testada a sensibilidade do *Ureaplasma* spp. para levofloxacina, moxifloxacina, tetraciclina, eritromicina e telitromicina; e para o *Mycoplasma hominis* é avaliada a sensibilidade para levofloxacina, moxifloxacina, tetraciclina e clindamicina.

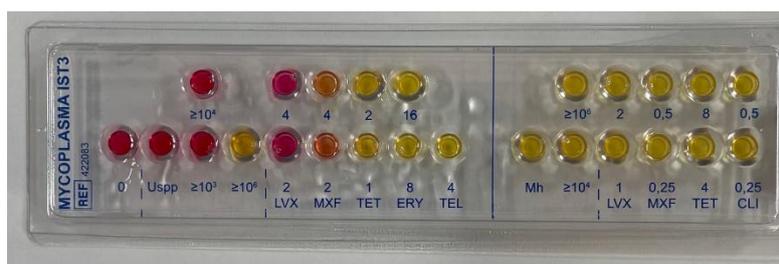


Figura 32. Galeria de identificação Mycoplasma IST3

5.9. Exsudado faríngeo

A colheita do exsudado faríngeo é realizada com uma zaragatoa estéril, baixando a língua com uma espátula colhendo na faringe posterior ou amígdalas na área inflamada ou ulcerada, evitando o contacto com a cavidade bucal e principalmente com a saliva. No caso do exsudado nasofaríngeo deve-se introduzir uma zaragatoa flexível através do nariz até à nasofaringe posterior e rodar. Ambas as zaragatoas devem ser transportadas em meio de transporte adequado¹¹⁵. As amostras são depois inoculadas em meio CNA e PVX (caso seja uma amostra pertencente a uma criança com menos 5 anos), pelo método de esgotamento, e são incubadas a 35-37°C em atmosfera 5% CO₂ durante 48h.

O trato respiratório superior, que engloba as áreas da nasofaringe e da orofaringe, é colonizado por uma microbiota saprófita que tem uma função protetora da colonização por outros microrganismos patogénicos. Deste modo, haverá sempre crescimento microbiano nas placas, pelo que é essencial realizar uma boa colheita que minimize contaminações, mas também valorizar apenas o crescimento de certos microrganismos, bem como avaliar a sua abundância nas placas. Os principais microrganismos a valorizar

são: *Streptococcus pyogenes* (grupo A), que em CNA origina colónias brancas pequenas com beta-hemólise; *Streptococcus pneumoniae*, que origina colónias caracteristicamente esverdeadas, mucoides com alfa-hemólise; *Staphylococcus aureus*, que origina colónias brancas grandes com beta-hemólise. Na figura 33 podem ser observadas estas colónias de *Staphylococcus aureus* em CNA.

Para auxiliar na identificação destes microrganismos podem ser feitos alguns testes rápidos e/ou confirmatórios, a partir colónias obtidas. Por exemplo, no caso de *Staphylococcus aureus* pode-se realizar um teste de identificação rápida com látex (Pastorex™ Staph-Plus da Bio-Rad). Este é basicamente um teste da coagulase no qual partículas de látex são revestidas por fibrinogénio, IgGs e anticorpos monoclonais anti-cápsula polissacarídica do *S. aureus*. Estas partículas de látex ao entram em contacto com *S. aureus* vão aglutinar, uma vez que a coagulase do *S. aureus* converte o fibrinogénio em fibrina. Ocorre também a ligação específica dos anticorpos monoclonais aos componentes capsulares e da proteína A (presente em *S. aureus*) à porção Fc das IgGs. Um resultado positivo para a *S. aureus* observa-se quando uma colónia isolada ao entrar em contacto com uma gota de reagente forma aglutinação, como se pode observar na figura 34¹²¹.

Outro teste que se pode realizar é o teste de sensibilidade à optoquinina, para identificação presuntiva de *Streptococcus pneumoniae*. Este teste tem por base a particularidade de que ao contrário das restantes espécies de estreptococos alfa-hemolíticos, o *Streptococcus pneumoniae* ser sensível à optoquinina. O procedimento a realizar começa pela inoculação de uma colónia bem isolada, do microrganismo em estudo, em meio COS. De seguida, é colocado um disco impregnado com optoquina no centro da placa. A cultura é depois incubada a 35-37°C em atmosfera 5% CO₂ por 24h. Findada a incubação, a presença de um halo de inibição de crescimento à volta do disco com diâmetro igual ou superior a 14 mm ou 16 mm indica a presença de *Streptococcus pneumoniae*¹²².

Em muitos casos, é requisitada a pesquisa direta de *Streptococcus pyogenes*, especialmente em crianças. No laboratório Affidea é usado um teste rápido de imunocromatografia para a deteção de antígenos de *Streptococcus* do grupo A, a partir de zaragatoas de exsudado faríngeo¹²³. O procedimento está ilustrado na figura 35A e a interpretação dos resultados estão ilustradas na figura 35B.



Figura 33. Colônias de *Staphylococcus aureus* em CNA



Figura 34. Teste de Identificação Rápida de *Staphylococcus aureus*. Na esquerda: resultado positivo, há aglutinação. Na direita: resultado negativo, ausência de aglutinação.

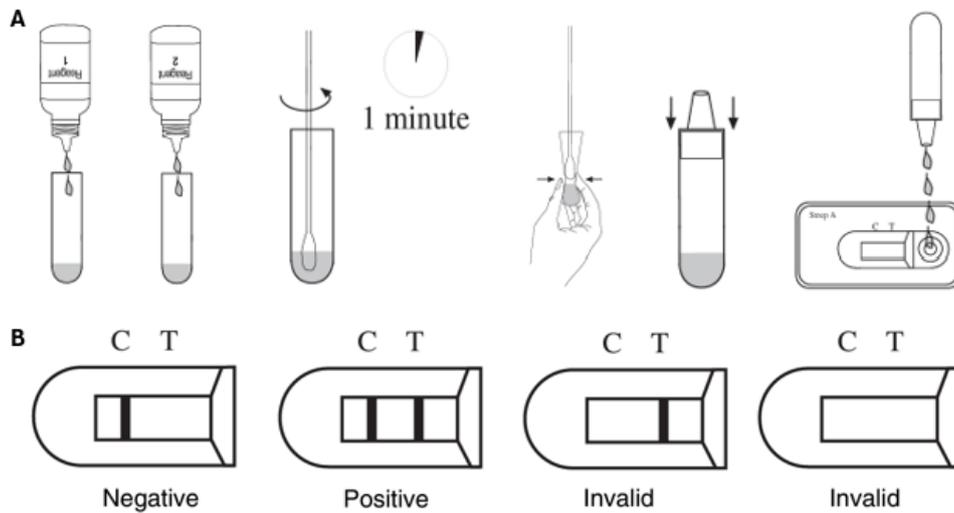


Figura 35. Teste Clearview Exact Strep A Cassette **(A)** Procedimento; **(B)** Interpretação dos resultados. Adaptado de: (121)

5.10. Exsudado nasal

Para proceder à colheita inserem-se duas zaragatoas estéril, uma em cada narina, rodando-as contra a mucosa nasal¹¹². Estas zaragatoas são depois inoculadas em meio CNA. Caso, se pedida a pesquisa de MRSA, as zaragatoas devem ser inoculadas em meio MRSM (meio cromogénico para MRSA). As placas são incubadas a 35-37°C durante 24 horas, sendo as de CNA incubadas em atmosfera 5% CO₂ e as de MRSM em aerobiose.

Quanto aos agentes etiológicos a valorizar são os mesmos do exsudado faríngeo, com especial interesse *Staphylococcus aureus*¹¹⁰.

5.11. Expetorações

A obtenção de amostras de expetoração deve ser feita logo pela manhã, para se obter a primeira amostra da manhã. Deve-se lavar a boca só com água antes da colheita. Para se obter a expetoração deve-se forçar a tosse profunda e desprezar amostras de saliva e rinorreia posteriores. A expetoração deve ser colhida para um recipiente estéril de boca larga e com tampa de rosca¹¹⁵.

O trato respiratório inferior é normalmente estéril, porém o diagnóstico das infeções respiratórias inferiores é muitas vezes dificultado pela contaminação das amostras por parte da microbiota comensal da orofaringe, durante a colheita. Este facto pode interferir com o isolamento de microrganismos patogénicos e tornar a interpretação difícil.

É primeiro realizado um esfregaço da amostra através da técnica de estiramento ou esmagamento entre duas lâminas, sendo usada os fragmentos mais purulentos da amostra. Uma lâmina é corada com a coloração de Gram e observada no microscópio com a objetiva 10x, para avaliação qualitativa da amostra tendo em conta a presença de células epiteliais e leucócitos na amostra. A outra lâmina é corada com a coloração de Ziehl-Neelsen, para a pesquisa de BAAR.

A expetoração é depois inoculada nos meios MCK, CNA ou COS, HAE e PVX, pela técnica dos quadrantes. Sendo incubados a 35-37°C com uma atmosfera de 5% CO₂, à exceção do MCK que fica em aerobiose durante 48h. Caso se isole colónias suspeitas procede-se à sua identificação pelo Vitek e realização do teste de sensibilidade aos antibióticos.

Alguns dos microrganismos a valorizar quando isolados das amostras de expetoração são: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Aspergillus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros¹¹⁰.

5.12. Exsudados purulentos de feridas

Ao laboratório Affidea costumam chegar amostras de exsudados purulentos de feridas em zaragatoas. Estas amostras são depois inoculadas em vários meios, para se poder determinar o agente etiológico. Os meios usados são COS, CNA, HAE2, PVX, MCK e

SGC. Nalguns casos pode vir pedido a pesquisa MRSA, geralmente de amostras hospitalares, e, portanto, semeia-se também em meio MRSM. As placas de COS, CNA, HAE2 são incubadas a 35-37°C em atmosfera de 5% CO₂ durante 48h. As placas de MCK, SGC e MRSM são incubadas à mesma temperatura só que em aerobiose durante 48h. As placas são observadas após 24h de incubação, caso não haja crescimento incubam-se mais 24h, caso haja pode-se partir logo para a identificação do microrganismo e realização de testes de sensibilidade aos antibióticos.

O microrganismo identificado à que depois ser valorizado consoante a origem do exsudado e se provém de uma ferida profunda ou superficial. Alguns dos microrganismos causadores de infeções na pele e tecidos são: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Candida* spp., entre outros¹¹⁰.

5.13. Hemocultura

A presença de bactérias viáveis no sangue denomina-se de bacteriemia. A hemocultura consiste no exame cultural das amostras de sangue para identificação de agentes causadores de bacterémias¹¹¹.

O sangue é um fluido biológico estéril pelo que o isolamento de um microrganismo a partir de uma hemocultura é de valorizar e investigar. Contudo, há que ter em atenção possíveis contaminações com a flora saprófita da pele aquando da colheita.

A colheita do sangue é feita para frascos específicos que contêm um meio líquido, os frascos de cultura BacT/ALERT®, figura 36, que após a triagem são colocados no equipamento BacT/ALERT® 3D. São recebidos frascos para a deteção de microrganismos aeróbios (tampa verde), de microrganismos anaeróbios (tampa laranja). A colheita de sangue é feita por venopunção e deve-se encher as garrafas todas até à marca indicada. São obtidas 3 amostras de hemoculturas, uma vez que, no caso de só se realizar uma amostra poder-se-ia não diagnosticar uma bacterémia intermitente, ou poderia ser mais difícil a interpretação do significado clínico do isolamento de certos microrganismos, em particular os pertencentes à flora saprófita da pele¹¹⁵.



Figura 36. Frascos de hemocultura. Adaptado de: (124)

O BacT/ALERT® 3D é um sistema automático de detecção microbiana, utilizado para determinar a presença de microrganismos em amostras de sangue. O princípio da sua detecção baseia-se na produção de CO₂ por parte dos microrganismos, que quando estão presentes metabolizam os substratos presentes no meio de cultura. O CO₂ produzido faz alterar o pH do meio, que é detetado por um sensor colorimétrico presente no fundo dos tubos que muda de cor de cinzento para amarelo (figura 37)¹²⁴. O equipamento monitoriza os frascos de cultura e faz a leitura da refletância de 10 em 10 minutos. Os frascos são recebidos e incubados no equipamento por 5 dias a 37°C. Caso seja detetado crescimento de microrganismos, o sistema emite um alarme sonoro e visual, para que o ou os frascos em questão sejam retirados do equipamento.



Figura 37. Sensor colorimétrico dos frascos de hemocultura. Adaptado de: (124)

Caso seja detetada uma hemocultura positiva procede-se a uma subcultura em meios sólidos, nomeadamente COS, PVX e CPS. A incubação das placas de COS e PVX é feita a 35-37°C em atmosfera 5% CO₂, enquanto o CPS é incubado à mesma temperatura em aerobiose. As placas são observadas após 24h de incubação, caso não haja crescimento incubam-se mais 24h, caso haja pode-se partir logo para a identificação do microrganismo e realização de testes de sensibilidade aos antibióticos.

5.14. Fezes

As infeções gastrointestinais são das doenças infecciosas que mais frequentemente ocorrem. A sua origem pode ser bacteriana, viral ou parasitária¹²⁵. Na análise microbiológica das fezes utilizam-se vários métodos de diagnóstico para determinar o agente causal destas infeções. Para se proceder à análise das fezes, devem ser colhidas 3 amostras em dias diferentes, para serem entregues ao laboratório em frascos de colheita estéreis¹¹². No laboratório Affidea são feitas análises como a coprocultura, o exame parasitológico das fezes e também podem ser realizados testes rápidos imunocromatográficos para deteção de antígenos específicos nas amostras de fezes.

5.14.1. Coprocultura

A coprocultura consiste na análise bacteriológica das fezes por via de meios de cultura para deteção e estudo de microrganismos que infetam o trato gastrointestinal. Na rotina do laboratório são feitas as pesquisas de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter*

spp. Para tal o procedimento e processamento das fezes no laboratório é feito do seguinte modo: as fezes devem ser inoculadas em meio líquido de selenito (meio de enriquecimento para *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) que deve ser incubado a 35-37°C em aerobiose durante 24h. Em paralelo, para a pesquisa de *Campylobacter* spp. as amostras devem ser inoculadas em meio Campyloesel (meio seletivo para isolamento de *Campylobacter* spp.) e em meio CASA (meio seletivo cromogénico para *Campylobacter* spp.). A incubação destas placas é feita numa estufa a 42°C em atmosfera de microaerofilia (5% de O₂, 10% de CO₂, e 85% de N₂), durante 48h. Findas as 24h de incubação no meio de selenito, são feitas subculturas para os meios CPS e HEKT, os quais são posteriormente incubados mais 24h a 35-37°C em atmosfera de aerobiose. Culturas positivas para *Campylobacter* apresentam colónias pequenas e acinzentadas em meio Campyloesel e colónias cor de tijolo no meio CASA. O passo seguinte consiste na identificação por via do equipamento Vitek e realizar o teste de sensibilidade de antibióticos. Culturas positivas para *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. originam colónias verdes ou verde-azuladas em HEKT, sendo que algumas colónias de *Salmonella* spp. podem apresentar um centro negro, e em CPS crescem colónias brancas. Normalmente, as culturas obtidas não são puras e portanto, são feitos re-isolamentos dessas colónias suspeitas como forma de confirmação do resultado, mas também para quando se realizar a identificação e o TSA não ocorra interferências com outras bactérias.

5.14.2. Exame parasitológico das fezes

Apesar de ocorrerem com muito menor frequência do que as infeções bacterianas, as infeções gastrointestinais podem muitas vezes serem causadas por parasitas. Os parasitas que são encontrados com mais frequência são *Giardia lamblia*, *Enterobius vermicularis*¹¹⁰.

O exame parasitológico das fezes consiste na observação ao microscópio de amostras de fezes para pesquisa de ovos e larva de helmintos, quistos de protozoários e ooquistos. Contudo, antes de se fazer o exame microscópico há que fazer uma análise macroscópica das fezes descrevendo algumas características como a consistência, a cor, a presença de muco e/ou sangue e a deteção de possíveis vermes adultos e proglótides de ténias.

Para ajudar na observação das estruturas parasitárias é usado um concentrador parasitário para amostras de fezes (MINI PARASEP®), que proporciona uma limpa recuperação das amostras e uma eficaz concentração das estruturas parasitárias. O procedimento de utilização encontra-se ilustrado na figura 38. A observação ao microscópio é feita através de uma preparação a fresco e visualizada com a objetiva de 40X.

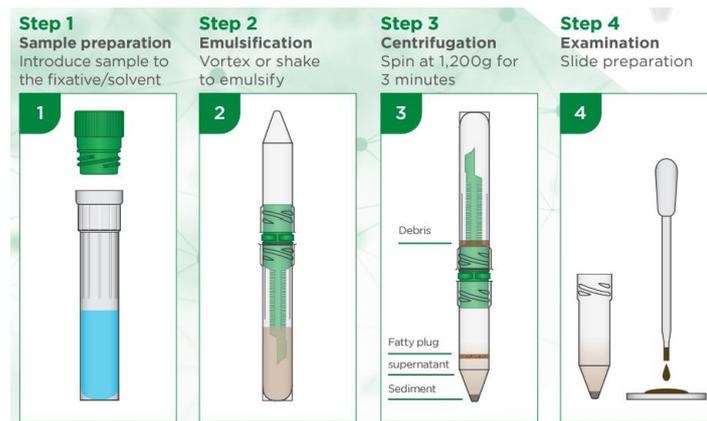


Figura 38. Procedimento de utilização do concentrador de parasitas MINI PARASEP®.
Adaptado de: (126)

5.14.3. Testes rápidos de imunocromatografia de fluxo lateral

a) Pesquisa de Rotavírus, Adenovírus e Norovírus

As infeções por rotavírus constituem a principal causa de diarreias e infeções gastrointestinais em crianças com menos de 5 anos. Nos adultos as infeções por rotavírus são mais ligeiras, sendo que indivíduos imunodeprimidos podem desenvolver sintomatologia mais severa. Os adenovírus são vírus que estão implicados em várias doenças, sendo os serotipos 40 e 41 os que mais frequentemente estão associados a infeções gastrointestinais. Os norovírus são a principal causa de gastroenterites de origem não bacteriana nos adultos, comumente associados a gastroenterites epidémicas¹²⁷.

No laboratório Affidea a deteção destes vírus é feita com recurso ao ensaio imunocromatográfico ROTA-ADENO MonlabTest® e NOROVIRUS MonlabTest®. Estes testes permitem detetar antígenos virais a partir de amostras de fezes. O princípio do funcionamento dos testes é idêntico para ambos. Basicamente, são usados anticorpos contra antígenos virais (anti-VP6 para rotavírus grupo A, anti-antígeno hexon do adenovírus e anti-antígenos do grupo genético I e II dos norovírus) marcados com partículas de latex coloridas. Durante o teste a amostra reage com os anticorpos formando um imunocomplexo que migram na membrana por ação capilar. Quando chega à linha de teste (T), liga-se ao anticorpo pré-revestido para formar um imunocomplexo, revelando uma linha colorida na zona T^{128,129}. Na figura 39 estão ilustradas as interpretações destes testes rápidos.

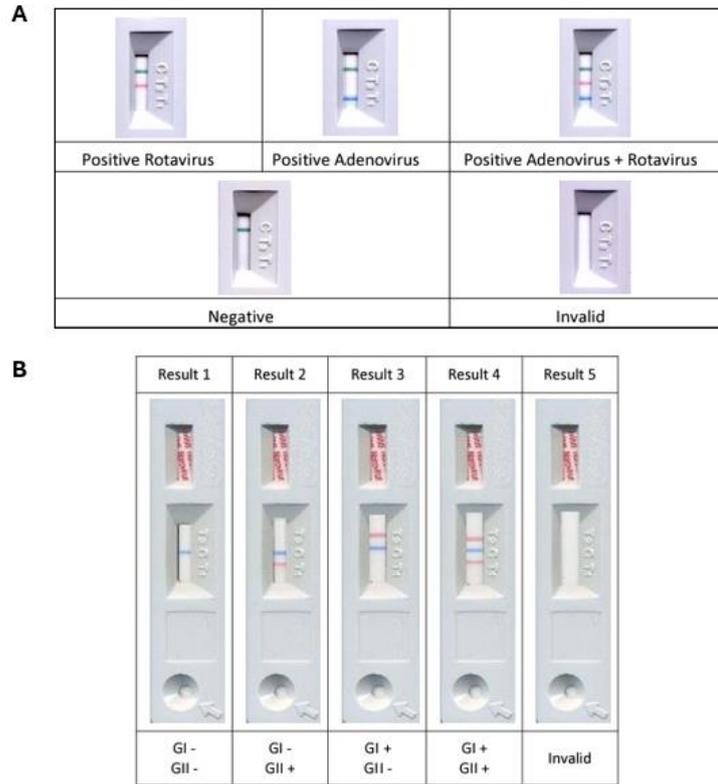


Figura 39. Testes rápidos de imunocromatografia de fluxo lateral. **(A)** Interpretação do teste ROTA-ADENO MonlabTest®; **(B)** Interpretação do teste NOROVIRUS MonlabTest®. Adaptado de: (128), (129).

b) Pesquisa de *Giardia*

A *Giardia* é o protozoário mais comumente identificado como causador de infeções do trato gastrointestinal. A sua transmissão é feita por ingestão de águas ou alimentos contaminados.

No laboratório Affidea a deteção deste parasita para além do exame microscópico pode ser feita através do teste rápido de imunocromatografia de fluxo lateral Giardia+ MonlabTest® (Figura 40). Neste teste pretende-se detetar o antígeno α 1-giardin em amostra de fezes¹³⁰. Segue o mesmo princípio de funcionamento que os testes anteriormente descritos.

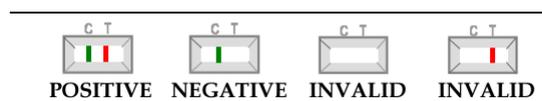


Figura 40. Interpretação dos resultados de Giardia+ MonlabTest®. Adaptado de: (128).

c) Pesquisa de *Escherichia coli* OH157:H7

Escherichia coli OH157:H7 é uma estirpe pertencente ao grupo de *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC) que se caracterizam pela produção da toxina *shiga*. Esta

toxina provoca sintomas como diarreia, dores abdominais, febre, náuseas e vômitos. A maioria dos pacientes recupera em dez dias, mas numa pequena percentagem de casos (especialmente crianças com menos 5 anos e idosos) a infeção pode levar a uma doença potencialmente fatal, como a Síndrome Hemolítico-Urémica (SHU)¹¹¹. Esta é caracterizada por falha renal aguda, anemia hemolítica e trombocitopenia¹¹¹.

Para detetar *Escherichia coli* O157:H7 é usado Biotical E. coli O157:H7 card, a partir de amostras de fezes. Utiliza anticorpos direcionados contra antígenos específicos de *Escherichia coli* O157:H7 (Figura 41).

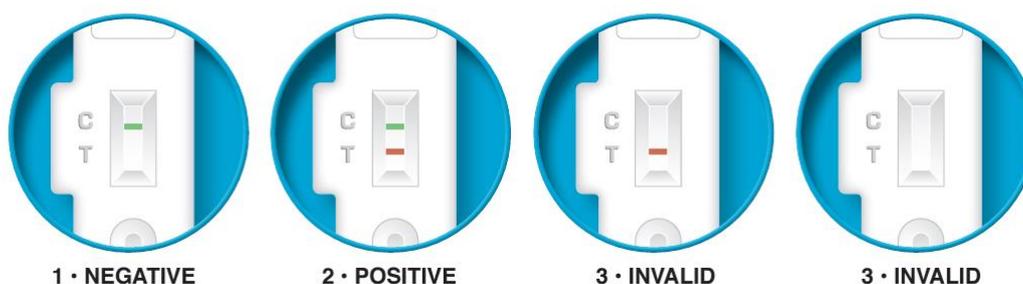


Figura 41. Interpretação dos resultados Biotical E. coli O157:H7 card. Adaptado de: (131)

d) Pesquisa de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori são bactérias que possuem a capacidade colonizarem células gástricas secretoras de muco do estômago. Foi estabelecida uma associação bastante forte da colonização de *Helicobacter pylori* com úlceras gástricas e duodenais, gastrite crónica e carcinoma gástrico¹³².

Para deteção do *Helicobacter pylori* é utilizado o teste respiratório com ureia marcada. O princípio deste teste baseia-se na capacidade do *Helicobacter pylori* conseguir metabolizar a ureia graças à sua enzima urease. Assim, os utentes engolem uma cápsula com ureia marcada com o isótopo ^{14}C , e o *Helicobacter pylori* ao metabolizar a ureia obtém-se CO_2 marcado com o ^{14}C , que difunde pelo sangue e chega aos pulmões onde é expirado na respiração. Através de cartões de captura da respiração (*BreathCard*) e do aparelho Heliprobe®Analyzer consegue-se medir os teores de ^{14}C radioativo¹³³ (Figura 42).



Figura 42. Heliprobe®Analyzer

6. Biologia Molecular

A biologia molecular como ferramenta de diagnóstico tem vindo a ser cada vez mais desenvolvida, começando a desempenhar um papel preponderante no diagnóstico de várias patologias¹³³. A biologia molecular é usada em várias áreas do laboratório, nomeadamente, na hematologia, imunologia e microbiologia.

O laboratório de biologia molecular é constituído por quatro salas: uma sala para a triagem das amostras, uma sala de extração, na qual se realiza a extração dos ácidos nucleicos a partir das amostras, uma sala de pré-amplificação, na qual se prepara a mix de amplificação e, por fim, uma sala de amplificação, na qual se adiciona a mix de amplificação às amostras e onde existem os termocicladores para a amplificação. Esta disposição sequencial das salas garante que sejam evitadas possíveis contaminações.

No laboratório Affidea são realizadas algumas análises por biologia molecular, em particular, a deteção do alelo HLA-B27 e o diagnóstico de doenças sexualmente transmissíveis com recurso a técnicas de amplificação do seu genoma.

6.1. Deteção do alelo HLA-B27

Os HLA (antígenos leucocitários humanos) são proteínas que se encontram nas membranas celulares e pertencem ao complexo major de histocompatibilidade (MHC) da classe I. As moléculas do MHC atuam como estruturas apresentadoras de antígenos aos linfócitos T, e o conjunto particular de moléculas MHC expressas por um indivíduo vai influenciar o repertório de antígenos aos quais os linfócitos T do indivíduo podem responder. Deste modo, o MHC determina parcialmente a resposta de um indivíduo a antígenos de organismos infecciosos e, portanto, tem sido implicado na suscetibilidade a doenças e no desenvolvimento da autoimunidade. Uma destas moléculas existentes à superfície das células é o HLA-B27, que existe em praticamente todas as células nucleadas. O HLA-B27 tem vindo a ser associado com o desenvolvimento da espondilite anquilosante, uma doença autoimune e inflamatória que afeta as vértebras da coluna e articulações. Cerca de 90% dos pacientes com esta patologia apresentam o alelo HLA-B27. Contudo, a presença deste alelo não é suficiente para que se desenvolva a patologia, estando outros fatores, ainda desconhecidos, envolvidos na fisiopatologia da doença. Deste modo, a deteção do alelo HLA-B27 tem um significado diagnóstico muito elevado para a probabilidade de desenvolver esta doença^{135,136}.

Para a deteção deste gene são usadas amostras de sangue total colhidas em EDTA, a partir das quais se procede à extração do DNA por meio do kit GXT NA Extraction Kit da Hain que é realizado no equipamento GenoXtract® da Hain (Figura 43). Este kit e equipamento permitem a extração de ácidos nucleicos a partir de vários tipos de amostra de forma automatizado diretamente da amostra original do paciente, sem necessidade de preparação extensa antes da extração. Antes de se realizar a extração deve-se apenas preparar uma mix de extração com proteinase K e PBS, de forma a lisar as células e inativar nucleases que degradem os ácidos nucleicos. O kit GXT NA Extraction Kit da Hain utiliza uma tecnologia de esferas magnéticas para a extração do DNA.



Figura 43. Equipamento automático de extração de ácidos nucleicos GenoXtract® da Hain

Após a extração, procede-se à preparação da mix de amplificação a partir dos reagentes do kit FluoroType®HLA-B27 da Hain. Esta mix é depois adicionada às amostras e a amplificação por PCR é feito no equipamento FluoroCycler® da Hain (Figura 44).



Figura 44. Termociclador FluoroCycler® 12 da Hain

Em conjunto com as amostras são corridas também um controlo negativo (que consiste em apenas a mix de amplificação e água) e um controlo positivo (que consiste na mix e num fragmento correspondente ao gene HLA-B27). De forma a averiguar se a extração e amplificação ocorram sem interferências, é amplificado o gene da mioglobina, presente em todas as células, como controlo interno. De modo a detetar o DNA amplificado são usadas sondas marcadas com moléculas fluorescentes que possuem complementaridade para regiões do gene a ser amplificado. Assim, os resultados obtidos das curvas de *melting* podem ser ilustrados na figura 45^{137,138}.

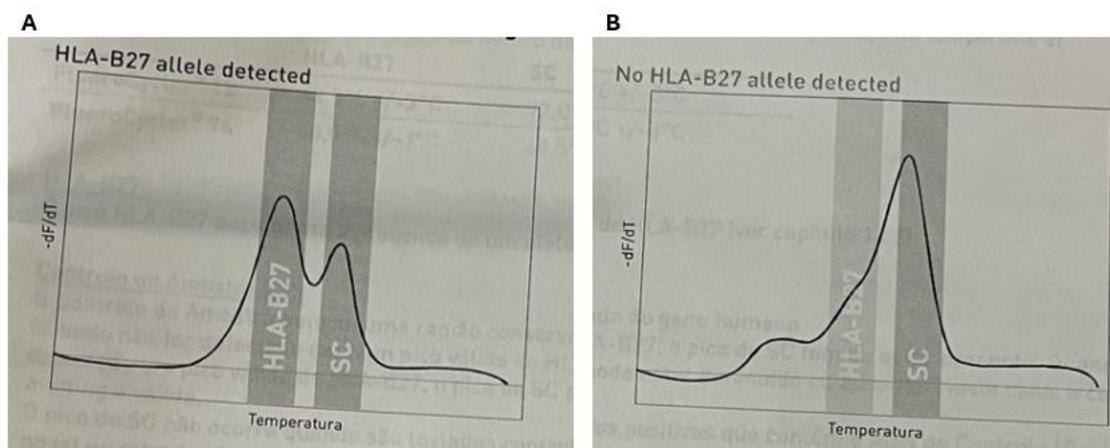


Figura 45. Interpretação dos resultados de PCR para detecção do alelo HLA-B27. (A) Resultado positivo; (B) resultado negativo.

6.2. Diagnóstico molecular de doenças sexualmente transmissíveis

Os métodos de amplificação de ácidos nucleicos têm vindo a ser amplamente usados em laboratórios clínicos para a detecção direta de agentes patogénicos em amostras clínicas. Uma das grandes vantagens destes métodos é a sua elevada sensibilidade e especificidade, permitindo que mesmo em quantidades pequenas seja possível detetar estes agentes.

No laboratório Affidea, aplica-se esta metodologia para a detecção de doenças sexualmente transmissíveis, nomeadamente infeções por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp. São usados três kits para a detecção destes microrganismos:

- o FluoroType® STI, que é um método de PCR multiplex que permite fazer a detecção simultânea de vários agentes causadores de doenças sexualmente transmissíveis (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalum*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum*), neste kit estão incluídos vários pares de *primers* específicos para cada microrganismo¹³⁹.
- o FluoroType® CT, que é um kit de detecção de *Chlamydia trachomatis* a partir de amostras de urina, exsudado cervical e uretral em zaragatoa e esperma. Este teste identifica duas sequências alvo, uma dentro do genoma de *Chlamydia trachomatis* e outra dentro do seu plasmídeo críptico¹⁴⁰.
- o FluoroType® NG, que é um kit de detecção de *Neisseria gonorrhoeae* a partir de amostras de urina e exsudado cervical e uretral em zaragatoa.¹⁴¹

Para a extração do DNA das amostras é usado o kit de extração GXT NA Extraction Kit da Hain e é realizado no equipamento GenoXtract® da Hain. Dependendo do tipo de mostra a preparação da mesma para a extração varia ligeiramente. No caso das amostras de urina estas devem ser agitadas para ficarem homogeneizadas, no caso das zaragatoas secas, estas devem ser lavadas com um tampão de lavagem de modo a

solubilizar o exsudado. Posteriormente, é preparado a mix de extração que consiste em proteinase K e um controlo interno. O controlo interno serve para avaliar se a extração ocorreu sem problemas, se ocorreu ou não inibição da amplificação, permitindo controlar o desempenho do teste e o funcionamento apropriado dos constituintes do kit. Uma vez concluída a extração do DNA procede-se à preparação da mix de amplificação. De igual modo ao que acontecia com o HLA-B27 são preparados dois controlos: um controlo positivo e um controlo negativo. O controlo positivo consiste numa amostra de polinucleótidos com uma sequência específica dos microrganismos a serem detetados, e o controlo negativo, serve para detetar possíveis eventos de contaminações^{139,140,141}.

As doenças sexualmente transmissíveis são um grupo diversificado de doenças infecciosas com uma ampla variedade de patógenos e manifestações clínicas abrangentes. Os testes de amplificação de ácidos nucleicos tornam-se extremamente vantajosos para o diagnóstico de infeções causadas por estes agentes, mas em particular para infeções causadas por *Chlamydia trachomatis*. A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria intracelular obrigatória, que apresenta dois tipos celulares principais: o corpo elementar, que é metabolicamente inativo, mas infeccioso, e o corpo reticular, que é metabolicamente ativo e capaz de se multiplicar. Tradicionalmente, o diagnóstico da *Chlamydia trachomatis* é feito por métodos culturais necessitando de linhas celulares para o seu crescimento. Este é um método muito complexo e necessita de que as amostras sejam mantidas em condições estáveis de modo a manter o microrganismo viável. A utilização de métodos de PCR veio permitir uma mais fácil deteção, não exigindo que os organismos se mantenham viáveis para a sua deteção^{110,111,142}.

7. Controlo da Qualidade

O controlo da qualidade é um processo que envolve a utilização de várias técnicas e atividades que visam o cumprimento dos requisitos de qualidade. Mais concretamente, é consiste numa análise estatística de ensaios com produtos de controlo de qualidade, com o intuito de monitorizar e avaliar os processos analíticos⁶. O controlo da qualidade na fase analítica engloba o Controlo da Qualidade Interno (CQI) e a Avaliação Externa da Qualidade (AEQ).

7.1. Controlo da Qualidade Interno (CQI)

O objetivo do controlo da qualidade interno é detetar problemas de precisão na rotina laboratorial e avaliar a variabilidade dos resultados analíticos⁶. A precisão corresponde à variabilidade dos resultados analíticos em torno do valor médio e a concordância entre as medidas repetidas. A precisão pode ser quantificada através de índices estatísticos, sendo estes o desvio padrão e o coeficiente de variação.

São utilizadas amostras de controlo com uma matriz biológica semelhante às amostras dos doentes e com concentrações conhecidas. Geralmente são utilizados 2 ou 3 níveis de controlo dependendo do analito em concreto. A sua determinação é realizada todos os dias, excetuando os casos de análises que não são realizadas todos os dias da semana. Nos controlos existe sempre um nível normal e um nível patológico ou, no caso de se usarem três níveis de controlo, um corresponde ao nível normal e dois correspondem a níveis patológicos, sendo um deles um nível alto patológico e outro um nível baixo patológico. Os controlos são testados nas mesmas condições das amostras dos doentes e os resultados obtidos são depois analisados estatisticamente. O programa Unity real time BioRad permite fazer a gestão estatística do controlo de qualidade em tempo real, permitindo a construção de cartas de controlo (gráficos de Levey-Jennings). Estes gráficos são construídos calculando a média dos resultados, o desvio padrão (DP) e os limites do CQ (limites de confiança, a média ± 2 DP e os limites de controlo, a media ± 3 DP). Assim, é possível obter uma representação visual dos resultados do controlo de qualidade obtidos dia a dia, permitindo detetar comportamentos tendenciais mais facilmente e atuar para os contrariar. Para auxiliar na avaliação da qualidade das corridas analíticas são usadas as regras de Westgard. Se os resultados dos controlos estiverem dentro dos limites de aceitação, pode-se proceder à análise das amostras. Caso os resultados dos controlos estejam fora dos limites definidos, significa que o desempenho do sistema analítico não é adequado e que os resultados obtidos não serão válidos, pelo que devem ser aplicadas medidas corretivas para eliminar a fonte do erro⁶. Por exemplo, por vezes os valores do controlo estão alterados devido à criação de depósitos nos reagentes, bastando proceder à homogeneização dos mesmos, ou nalguns casos é mesmo necessário proceder a uma calibração para normalizar os valores do controlo. Sempre que sejam feitas trocas de reagentes com novos lotes é necessário proceder à calibração e à realização do controlo de qualidade. Qualquer ação feita, como a repetição do controlo, uma calibração nova, deve ser devidamente registada tanto no programa Unity real time BioRad, assim como nos documentos em papel que se encontram junto dos equipamentos.

No laboratório de microbiologia, as amostras usadas para o CQI são estirpes bacterianas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC®, Virgínia, Estados Unidos da América). Estas estirpes possuem características fenotípicas conhecidas, o que permite que sejam usadas para testar os meios de cultura presentes no laboratório. São feitos isolamentos destas estirpes todas as semanas, sendo que as estirpes ATCC novas são semeadas pela primeira vez em COS e PVX, constituindo a cultura de trabalho. A partir da cultura de trabalho, as estirpes são depois semeadas nos restantes meios. No controlo interno que é realizado semanalmente é feita a identificação da estirpe e o teste de suscetibilidade aos antibióticos. Normalmente são testadas 2 estirpes um Gram negativa e uma Gram positiva em cada meio. O intuito deste controlo é verificar se em meios seletivos por exemplo, para Gram negativos, como o MCK, crescem apenas estirpes de Gram negativas e não de Gram positivas. O inverso deve acontecer para meios seletivos de Gram positivos. Assim, este controlo permite assegurar que os meios usados são de facto fiáveis e, portanto, os resultados que dão são confiáveis. No teste de suscetibilidade aos antibióticos o padrão de resistência e sensibilidade deverá ser concordante com o que é característico da estirpe.

Estirpes ATCC® usadas:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25783
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
- *Haemophilus influenza* ATCC 4868

7.2. Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

A avaliação externa da qualidade permite avaliar o desempenho do laboratório, através da participação em ensaios interlaboratoriais organizados por entidades externas⁶.

O laboratório recebe amostras liofilizadas enviadas, periodicamente, pelas entidades organizadoras das avaliações externas da qualidade. Estas amostras pertencem a programas diferentes e pretendem avaliar análises específicas. As amostras são processadas e testadas nas mesmas condições que as amostras dos doentes e os resultados são depois enviados à respetiva entidade, que os analisa e elabora um relatório de avaliação, no qual os resultados do laboratório são comparados aos resultados esperados e aos resultados obtidos pelos outros laboratórios participantes no programa de AEQ. O laboratório Affidea participa nos programas de AEQ organizados pelo RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*), pelo INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge) e LabQuality – EQAS.

Assim, a AEQ permite que se estabeleçam comparações dos resultados obtidos com os resultados de outros laboratórios que usam os mesmos métodos analíticos, permitindo detetar problemas de exatidão dos resultados⁶.

Parte II

1. Introdução

As doenças mitocondriais são um grupo importante de doenças genéticas hereditárias do metabolismo. Caracterizam-se por conduzirem a perturbações no funcionamento das mitocôndrias, resultando numa produção de energia deficiente, muitas vezes acompanhada de disfunção da cadeia respiratória. Estas patologias têm origem em mutações patogénicas presentes em genes que codificam para as proteínas constituintes da cadeia respiratória e para outras proteínas mitocondriais. As mutações afetam tanto genes presentes no genoma nuclear (nDNA) e que, portanto, são transmitidas de acordo com os padrões de hereditariedade mendeliana, como genes do genoma mitocondrial (mtDNA), sendo estas herdadas por via materna. Clinicamente, as doenças mitocondriais são amplamente heterogéneas, uma vez que podem surgir em qualquer idade e manifestarem-se em qualquer órgão ou órgãos, com um leque variado de sintomas e apresentações clínicas. Normalmente, os órgãos mais fortemente afetados são aqueles que possuem requisitos energéticos mais elevados, como é o caso do músculo esquelético e do cérebro¹⁴³.

Muitas vezes é possível agrupar os sintomas e sinais clínicos em síndromes específicas que reúnem uma constelação característica destes achados. É o caso da síndrome de Leigh, também designada por encefalopatia subaguda necrotizante, que é a mais frequente doença mitocondrial neurodegenerativa a manifestar-se na infância. Tal como as outras doenças mitocondriais, possui uma clínica variada, mas distingue-se devido ao aparecimento de lesões necróticas focais, simétricas e bilaterais, no sistema nervoso central. O surgimento da síndrome de Leigh está associado ao aparecimento de deficiências isoladas ou combinadas dos complexos da cadeia respiratória. Estas deficiências, por sua vez, são causadas por mutações patogénicas em genes mitocondriais e nucleares¹⁴⁴.

O objetivo principal deste trabalho é expor algumas das mutações genéticas subjacentes à síndrome de Leigh, em particular as mutações que afetam os complexos da cadeia respiratória e o complexo da piruvato desidrogenase, elaborando sobre as diferenças bioquímicas e clínicas que estas provocam. Por fim, neste trabalho falar-se-á sobre o diagnóstico da síndrome de Leigh, serão discutidas as principais metodologias usadas no diagnóstico, sendo dado especial destaque ao diagnóstico genético, através de técnicas de sequenciação de nova geração (NGS), como ferramenta indispensável para acelerar o diagnóstico e descobrir novas mutações.

1.1. Papel das mitocôndrias na célula - estrutura e função

As mitocôndrias são organelos constituintes de todas as células, com exceção dos eritrócitos¹⁴³. Estruturalmente, possuem uma forma oval e são constituídas por duas membranas, uma membrana interna e uma membrana externa. O espaço entre as duas membranas é denominado de espaço intermembranar. No interior da membrana interna encontra-se a matriz mitocondrial, na qual estão presentes as enzimas responsáveis pelas reações principais do metabolismo oxidativo, e o seu material genético^{145,146}. A membrana interna possui invaginações, denominadas cristas, nas quais se localizam as proteínas constituintes dos complexos da cadeia respiratória¹⁴⁵.

As mitocôndrias desempenham vários papéis fundamentais para o normal funcionamento da célula, incluindo o metabolismo energético, a biossíntese de moléculas, como o heme e os fosfolípidos, mas também na homeostase do cálcio e na regulação da apoptose¹⁴⁷. Uma das suas principais funções é a produção de adenosina trifosfato (ATP) através do processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS), que ocorre na cadeia respiratória (CR). Nos primeiros passos deste processo, macromoléculas como glúcidos e lípidos são convertidas em acetil-coenzima A, por meio de vias catabólicas, nomeadamente através da glicólise e oxidação do piruvato, no caso dos glúcidos, e através da beta-oxidação, no caso dos lípidos. O grupo acetil da molécula de acetil-CoA é posteriormente transferido para a molécula de oxaloacetato, originando a molécula de citrato. Este é o primeiro constituinte do ciclo de Krebs, que é seguido por mais sete reações enzimáticas, culminando na produção de duas moléculas de CO₂ e na obtenção dos cofatores NADH e FADH₂, os quais transportam os eletrões que se obtêm nas reações do ciclo. Estes transportadores de eletrões são depois encaminhados para a cadeia respiratória, fornecendo os eletrões necessários para iniciarem o processo de formação do gradiente de prótons, essencial para a síntese de ATP, na cadeia transportadora de eletrões (Figura 46).

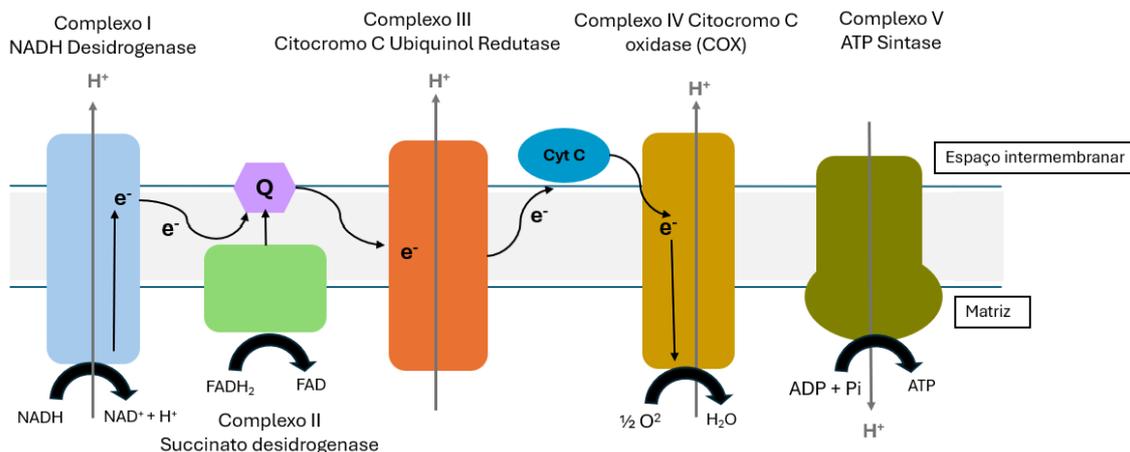


Figura 46. Representação esquemática da cadeia transportadora de eletrões.

A cadeia transportadora de eletrões é constituída por cinco complexos enzimáticos que se encontram na membrana interna mitocondrial. Quatro destes complexos (complexos I-IV) estão envolvidos no processo de transporte de eletrões por meio de reações de oxidação-redução acopladas, que culminam na redução da molécula de oxigênio em água, enquanto o complexo V é responsável pela síntese de ATP^{145,146,147,148}.

O NADH e o FADH₂ são oxidados pelas enzimas NADH-ubiquinona oxirredutase (Complexo I) e succinato-Coenzima Q redutase (complexo II), respetivamente. Nestas reações, ocorre a transferência dos eletrões provenientes destes substratos para a molécula de coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀), que é deste modo reduzida. A coenzima Q₁₀ desloca-se livremente no interior da membrana mitocondrial interna, uma vez que é lipossolúvel. Esta desloca-se para o complexo III da cadeia respiratória (citocromo c ubiquinol redutase), que catalisa a transferência dos eletrões transportados pela coenzima Q₁₀ para a molécula citocromo c, levando à redução do citocromo c e à oxidação da coenzima Q₁₀. O citocromo C é uma molécula transportadora de eletrões móvel hidrofílica, que se encontra à superfície da membrana interna mitocondrial. Esta desloca-se para o complexo IV (citocromo c oxidase), no qual é catalisada a transferência dos eletrões provenientes

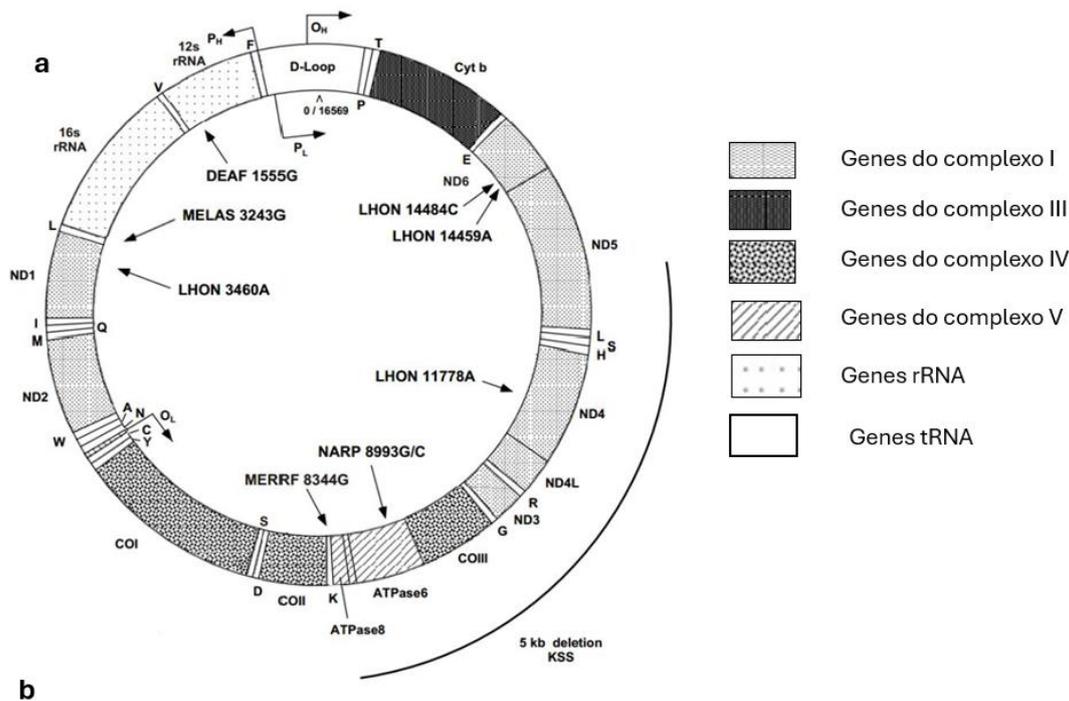
do citocromo c para a molécula de O₂, culminando na formação de H₂O. Concomitantemente ao transporte de elétrões, nos complexos I, III e IV ocorre a passagem de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, gerando um gradiente prótonico. Este gradiente é posteriormente usado pela ATP sintase (complexo V), como fonte de energia para a síntese de ATP a partir das moléculas de ADP e fosfato inorgânico^{145,146,147,148}. É através deste processo que as células conseguem obter a maior parte do ATP que é essencial para inúmeros processos, entre os quais a contração muscular¹⁴⁹ a transmissão dos impulsos nervosos, e a função de neurotransmissor¹⁵⁰.

1.2. Genoma mitocondrial e genoma nuclear diferenças e como interagem

De acordo com a teoria da endossimbiose, as mitocôndrias evoluíram a partir de uma proteobactéria que foi endocitada por uma célula eucariótica ancestral. O facto de as mitocôndrias possuírem o seu próprio genoma e pequenas diferenças no seu código genético, em relação ao do DNA nuclear, corroboram esta teoria. Com o decorrer da evolução, grande parte dos genes presentes no genoma mitocondrial ancestral foram perdidos, para serem integrados no DNA nuclear (nDNA)¹⁵¹. Este facto explica de certo modo a dependência do genoma mitocondrial para com o genoma nuclear, necessitando de vários fatores codificados pelo nDNA para a sua replicação e integridade¹⁵².

O DNA mitocondrial (mtDNA) é uma molécula circular em cadeia dupla, com cerca de 16,6 Kb, possuindo uma cadeia pesada (H – *heavy*) e uma cadeia leve (L – *light*). Os genes do genoma mitocondrial carecem de intrões, ao contrário do que acontece com a maioria dos genes nucleares, e possuem uma região regulatória de 1121pb designada de D loop, que é responsável pelo controlo da replicação e transcrição. O mtDNA é constituído por 37 genes, dos quais 13 codificam para subunidades dos complexos da cadeia respiratória, 22 genes codificam para tRNAs e 2 genes codificam para rRNA, sendo estes dois últimos grupos de genes necessários para a síntese de proteínas que ocorre dentro da mitocôndria¹⁵³ (Figura 47).

No entanto, os genes presentes no genoma mitocondrial constituem uma pequena fração de um conjunto de cerca de 1500 genes que são necessários para o normal funcionamento das mitocôndrias¹⁴³. Os restantes, são genes localizados no genoma nuclear e podem subdividir-se nos seguintes grupos: genes que codificam para subunidades estruturais da cadeia respiratória, genes que codificam para os fatores de montagem da cadeia respiratória, e genes cujos produtos estão envolvidos na manutenção do mtDNA e na biogénese das mitocôndrias¹⁵⁴. Alguns exemplos são o gene *POLG* que codifica para uma subunidade catalítica da DNA polimerase γ que é responsável pela replicação e reparação do mtDNA, ou o gene *SURF1* que é um fator de montagem do complexo IV da cadeia respiratória¹⁵⁵. Estes genes, presentes no núcleo, são primeiramente traduzidos no citosol sob a forma de proteínas precursoras que possuem sequências sinalizadoras cliváveis, que as permite serem translocadas para dentro das mitocôndrias. Este transporte é levado a cabo por translocases (TOM- Translocase of the Outer Membrane e TIM- Translocase of the Inner Membrane)¹⁵⁶. As mitocôndrias possuem, portanto, uma dupla regulação genética, já que dependem de ambos os genomas, nuclear e mitocondrial.



Subunidades	Complexo I	Complexo II	Complexo III	Complexo IV	Complexo V
mt-DNA	7	0	1	3	2
nDNA	~39	4	10	10	~14

Figura 47. Genoma Mitocondrial com as principais mutações que causam doenças mitocondriais (a), distribuição dos genes codificantes das subunidades dos complexos da cadeia respiratória (b). Adaptado de: (155), MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2023.

Ambos os genomas nuclear e mitocondrial apresentam diferenças que se encontram listadas na tabela 15. Contrariamente ao DNA nuclear (nDNA), o mtDNA não está associado a histonas; além disso, a existência de um sistema de reparação do DNA menos eficaz do que o nuclear, e ainda a exposição do mtDNA a quantidades elevadas de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pela cadeia respiratória, conseguem explicar a mais elevada taxa mutacional média do genoma mitocondrial, em comparação com o genoma nuclear¹⁵². Outro aspeto em que os genomas mitocondrial e nuclear diferem, é o padrão de hereditariedade. Enquanto os genes nucleares obedecem a um padrão de hereditariedade mendeliano, o mtDNA possui uma hereditariedade matrilinear, uma vez que as mitocôndrias do zigoto provêm do óvulo. Deste modo, uma mutação no mtDNA de uma mãe é transmitida a todos os filhos, mas apenas as filhas é que irão transmitir essa mutação à geração seguinte¹⁵².

Outra característica em que diferem o nDNA e o mtDNA tem que ver com o número de cópias de cada uma destas moléculas por célula. Enquanto no nDNA existem apenas 2 cópias de cada cromossoma no núcleo, numa mitocôndria existem entre 2-10 cópias do mtDNA, e dado que uma célula possui centenas de mitocôndrias, conclui-se que dentro de uma célula existem milhares de cópias do genoma mitocondrial, ou seja, o genoma mitocondrial é poliploide¹⁵⁷. Quando todas as cópias de mtDNA são idênticas dizemos que estamos numa situação de homoplasmia, tal é o que acontece num indivíduo saudável.

Fala-se em heteroplasmia, quando dentro de uma célula ou tecido coexistem duas ou mais populações de mtDNA, sendo uma parte das cópias de mtDNA normal e outra parte mutada.

Tabela 17. Principais diferenças entre o genoma mitocondrial e o genoma nuclear. Adaptado de: (157)

mtDNA	nDNA
Molécula circular em cadeia dupla na matriz mitocondrial	Molécula linear em cadeia dupla presente no núcleo das células
Um cromossoma	23 cromossomas diferentes nas células XX ou 24 nas XY
Tamanho de 16.569 pares de base DNA	Tamanho de 3.3 mil milhões de pares de base DNA
Contém 37 genes, 13 codificam proteínas, 22 tRNAs e 2 rRNAs	Contém entre 20 000 a 25 000 genes codificando proteínas e RNAs
Não possui intrões, sendo apenas 3% do DNA não codificante	Possui intrões, sendo 93% do nDNA não codificante
Não se encontra associado a histonas	Está associado a histonas
Maior taxa mutacional com sistema de reparação do DNA menos eficaz do que o nuclear	Menor taxa mutacional com um sistema de reparação do DNA mais rigoroso
Padrão de hereditariedade matrilinear	Hereditariedade por ambos os progenitores
Replicação independente do ciclo celular	Replicação ocorre apenas na fase S do ciclo celular
Uma mitocôndria contém várias dezenas de cópias do mtDNA e cada célula contém várias mitocôndrias	Cada célula possui apenas duas cópias de cada cromossoma

Outro aspeto a ter em conta em relação ao mtDNA é que a sua replicação e divisão são independentes da replicação do genoma nuclear e, portanto, do ciclo celular. Durante a divisão celular não há uma distribuição igualitária das mitocôndrias entre as células-filhas, a isto designa-se de segregação mitótica¹⁵³. Isto é, a partir de uma célula com 2 populações de mtDNA podem obter-se células-filhas com proporções diferentes das cópias de mtDNA. Este fenómeno pode levar a que haja uma maior concentração de mtDNA mutado em certas células, e menos quantidade de mtDNA mutado noutras células. Tal facto explica a existência de variabilidade na proporção de DNA mutado entre diferentes órgãos e tecidos nas doenças mitocondriais. Este fenómeno, aliado à replicação autónoma do mtDNA, pode conduzir a que se atinja um nível de mtDNA mutado na célula

a partir do qual o funcionamento da cadeia respiratória fique comprometido. Este nível designa-se por efeito limiar. Este limiar vai ser diferente consoante o tipo de mutação e consoante o tecido afetado, sendo que órgãos com elevada dependência energética, como o cérebro, músculo esquelético, retina e coração terão um limiar mais baixo¹⁵².

2. Doenças mitocondriais

As doenças mitocondriais consistem num grupo de patologias bastantes heterogéneas que se caracterizam por originarem alterações no metabolismo energético mitocondrial. Estas alterações são causadas por mutações em genes que codificam para as subunidades estruturais dos complexos da cadeia respiratória, em genes envolvidos na manutenção do mtDNA, na biogénese das mitocôndrias e na montagem dos complexos¹⁵⁸. Dado que a regulação genética das mitocôndrias é dupla, estas mutações tanto podem ocorrer no mtDNA como no nDNA. Podemos classificar as doenças mitocondriais em dois grupos principais: as doenças mitocondriais primárias (PMD – *primary mitochondrial diseases*) e as doenças mitocondriais secundárias (SMD – *secondary mitochondrial diseases*). As PMD caracterizam-se por serem um grupo de doenças que são originadas por mutações em genes que codificam as subunidades estruturais da cadeia respiratória, mas também em genes que codificam produtos que desempenham funções auxiliares na fosforilação oxidativa¹⁵⁸. Por outro lado, as SMD são causadas por mutações patogénicas em genes envolvidos na biogénese de proteínas, de lípidos e no ciclo de Krebs, ou seja, genes que não estão diretamente implicados na fosforilação oxidativa, mas que podem comprometer o normal funcionamento da cadeia respiratória¹⁵⁹. Adicionalmente, em oposição às PMD, as SMD podem também ser adquiridas por patologias que façam, por exemplo, elevar o *stress* oxidativo, podendo conduzir a alterações no mtDNA^{158,160}. Neste trabalho, o foco vai estar sobre as PMD, uma vez que a síndrome de Leigh faz parte deste grupo.

É de notar que as doenças mitocondriais são clinicamente muito heterogéneas. O início dos sintomas pode dar-se logo nos primeiros anos de vida, ou apenas manifestarem-se só já em idade adulta¹⁶¹. Estes sintomas podem ser altamente variados, podendo limitarem-se a um órgão, ou pelo contrário afetarem vários¹⁶². A apresentação clínica é muito diversa, podendo afetar o sistema nervoso central e periférico, neuromuscular, cardiovascular, gastrointestinal, endócrino e renal. É possível agrupar certas características clínicas, que costumam ocorrer em simultâneo, em síndromes clínicas distintas¹⁴³. Porém, nem sempre se consegue encaixar um doente numa síndrome específica, pois muitas vezes a sintomatologia sobrepõe várias síndromes. Algumas justificações dadas para explicar esta heterogeneidade clínica são a presença das mitocôndrias em quase todos os tecidos no organismo e a própria genética mitocondrial, nomeadamente a heteroplasmia do mtDNA¹⁶³.

Para além da heterogeneidade clínica, as doenças mitocondriais são também geneticamente heterogéneas. Este facto torna difícil poderem ser estabelecidas associações entre o genótipo e o fenótipo apresentado pelos doentes¹⁶³. Muitas vezes, diferentes mutações causam o mesmo fenótipo, como é o caso da Síndrome de Leigh que está associada a mutações em mais de 75 genes diferentes¹⁶⁴. Há também casos de diferentes variantes no mesmo gene poderem originar fenótipos distintos. As mutações

no gene *POLG* produzem um leque variado de apresentações clínicas, impossibilitando que se consiga estabelecer uma correlação consistente entre o fenótipo e genótipo¹⁶⁵.

Em termos epidemiológicos, as doenças mitocondriais são bastante raras quando observadas caso a caso, mas, no seu conjunto, estima-se que a prevalência mínima seja de 1 em cada 5.000 indivíduos^{164,166}, fazendo delas um dos grupos mais frequentes das doenças hereditárias do metabolismo. É de realçar que, dependendo da região geográfica, os valores de prevalência variam. Fenómenos como a frequência de casamentos consanguíneos e mutações de efeito fundador são algumas causas para esta discrepância. Um exemplo deste fenómeno acontece exatamente na síndrome de Leigh que apresenta uma prevalência de aproximadamente 2,5 casos por 100.000 nascimentos, mas na região de Saguenay-Lac-Saint-Jean, no Canadá, devido a uma mutação com efeito fundador no gene *LRPPRC*, possui uma prevalência de 1 caso em cada 2.000 nascimentos¹⁶⁴.

Como já foi referido anteriormente, as doenças mitocondriais podem ser causadas por mutações patogénicas que ocorrem tanto no mtDNA, como no nDNA, pelo que podemos classificá-las de acordo com a sua origem.

2.1. Doenças causadas por mutações no mtDNA

As mutações no mtDNA podem afetar dois grandes grupos de genes: os que codificam para as subunidades da cadeia respiratória, e os que codificam para rRNA e tRNA, e que, portanto, interferem na síntese proteica dentro da mitocôndria¹⁶⁷. Relativamente ao tipo de mutações, podem ocorrer deleções simples ou mutações pontuais¹⁶⁸.

Começando pelas deleções simples (tamanhos entre 1,3 – 10 Kb), estas são tipicamente esporádicas, raramente são transmitidas hereditariamente. Podem também estar associadas a duplicações que podem ser transmitidas por via materna¹⁶⁷. Pensa-se que estas deleções, que dão origem a doenças mitocondriais primárias, ocorrem durante a embriogénese, apesar de as deleções no genoma mitocondrial poderem ocorrer em qualquer altura da vida¹⁶⁹. Este tipo de mutação é subjacente a síndromes específicas, como a síndrome de Pearson, a síndrome de Kearns-Sayre (KSS), a oftalmoplegia externa progressiva (POE), e deleções simples que originam sintomas não específicos de nenhuma síndrome¹⁷⁰. A síndrome de Pearson manifesta-se por uma franca anemia sideroblástica associada a uma disfunção pancreática, que na infância pode ser mortal. A síndrome de Kearns-Sayre caracteriza-se por ser uma patologia de apresentação multi-sistémica com oftalmoplegia externa progressiva e retinite pigmentar, tendo início antes dos 20 anos de idade. Os doentes afetados por esta síndrome podem ainda ter ataxia, ou bloqueio cardíaco, ou proteínas no LCR numa concentração superior a 100 mg/dl. Por fim, a POE é uma síndrome mais benigna que afeta o músculo esquelético e evidencia ptose, oftalmoplegia e fraqueza muscular proximal.¹⁷¹ Ainda não há evidências suficientes que permitam explicar os diferentes fenótipos, mas pressupõem-se que poderá ser devido a modificações na carga mutacional (*mutation load*) do mtDNA em diferentes tecidos, do tipo de mutação e quais são os genes deletados^{169,172}.

O segundo grupo de mutações a afetar o mtDNA são as mutações pontuais, na sua maioria do tipo *missense*, que afetam tanto genes que codificam proteínas, como genes que codificam para tRNAs e rRNA. Até à data, mais de 200 mutações foram documentadas como causadoras de doenças mitocondriais (MITOMAP Database,

<http://www.mitomap.org>). Estas mutações são na sua maioria herdadas por via materna e têm apresentação multi-sistémica, embora também possam ser esporádicas e apenas estarem presentes num tecido específico¹⁶⁷. Grande parte destas mutações origina fenótipos de encefalomiopatias, e dentro deste grupo de patologias destacam-se quatro síndromes principais. Começando pela neuropatia ótica de Leber ou LHON (*Leber hereditary optic neuropathy*). Esta doença caracteriza-se por uma atrofia ótica bilateral, conduzindo a um condicionamento da visão elevado que pode evoluir para cegueira¹⁷³. Afeta mais frequentemente pessoas do sexo masculino e tem início durante a adolescência. As mutações nos genes MT-ND1, MT-ND4, MT-ND4L, e MT-ND6, estão associadas a esta doença, sendo que as três mutações mais comuns são m.11778 G>A no gene MT-ND4, m.3460 G>A no gene MT-ND1 e m.14484 T>C no gene MT-ND6¹⁷⁴. Em seguida, a síndrome de MELAS (*Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes*), que tem como principais sintomas, episódios semelhantes a AVC, elevação dos teores de lactato como o próprio nome indica, mas também apresenta sintomas como, demência, epilepsia, miopatia, cefaleias recorrentes, surdez, diabetes e baixa estatura¹⁷⁵. A mutação mais frequentemente associada à síndrome de MELAS é a m.3243A>G no gene MT-TL1 que codifica para o tRNA^{Leu} mitocondrial. Mutações noutros genes como MT-ND1, MD-ND5, MT-TH e MT-TV também estão associadas a síndrome de MELAS¹⁷⁵. Adicionalmente, a síndrome de MERRF (*Myoclonic Epilepsy Ragged Red Fibres*) caracteriza-se pela presença de mioclonias, convulsões e ataxia. É originada por várias mutações pontuais no mtDNA sendo que a mais comumente encontrada é mutação no gene MT-TK m.8344A>G que codifica para o tRNA de lisina¹⁷⁶. Por fim, dentro deste grupo de patologias, destaca-se a síndrome de Leigh (encefalopatia necrosante subaguda), e a síndrome NARP (Neuropatia, Ataxia e Retinite Pigmentosa) nas quais debruçar-se-á este trabalho.

2.2. Doenças causadas por mutações no nDNA

As mutações no nDNA são tão significativas como as no mtDNA. Apesar de à primeira vista se poder pensar que uma mutação no mtDNA terá muito mais implicações para com o funcionamento das mitocôndrias, é importante ter em mente que o proteoma mitocondrial humano compreende um total aproximado de 1500 proteínas, em que apenas 13 são codificadas pelo mtDNA¹⁷⁷. Assim, a maior parte das proteínas necessárias ao normal funcionamento das mitocôndrias são, de facto, codificados pelo genoma nuclear. Estes genes codificam para proteínas estruturais das subunidades da cadeia respiratória, proteínas auxiliares com funções na montagem dos complexos da cadeia respiratória, proteínas envolvidas na sinalização intergenómica, na importação de proteínas do citoplasma e em proteínas envolvidas na motilidade do organelo e a sua estrutura^{167,170,178}. Ao contrário do que acontece com as mutações no mtDNA, as mutações no nDNA são herdadas de acordo com os padrões de hereditariedade mendeliana, autossómico recessivo, autossómico dominante ou ligado ao cromossoma X.

Um dos grupos mais significativos de mutações no nDNA são aquelas que vão interferir com a sinalização intergenómica, nomeadamente mutações em genes envolvidos na replicação do mtDNA e genes envolvidos na manutenção da *pool* de desoxiribonucleótidos. Estas mutações vão interferir com a normal síntese e manutenção do mtDNA, conduzindo a alterações quantitativas e qualitativas do mtDNA¹⁷⁹.

As alterações quantitativas consistem em depleções acentuadas do conteúdo de mtDNA (Figura 48) nos tecidos e órgãos afetados¹⁸⁰. Alguns exemplos de alterações quantitativas são as mutações nos genes *TK2* e *POLG*, que codificam para a timidina cinase 2 mitocondrial e para a subunidade catalítica da DNA polimerase gama. No primeiro caso a proteína codificada pelo gene *TK2* desempenha um papel fundamental na via de recuperação de nucleósidos de pirimidina e, por conseguinte, uma mutação neste gene causa um comprometimento da síntese de dNTPs mitocondriais, essenciais para a síntese de mtDNA^{179,180}. No segundo caso, a DNA polimerase gama é essencial para a replicação do mtDNA, e portanto, mutações no gene *POLG* conduzem a uma diminuição da atividade da polimerase, ou seja uma síntese de mtDNA insuficiente face às necessidades da célula e de *turn-over* dos organelos^{179,180}. Em ambos os casos verifica-se uma redução do conteúdo de mtDNA, isto é, há uma depleção de mtDNA. Em relação às manifestações clínicas, as alterações quantitativas do mtDNA podem ser agrupadas em quatro formas: miopática, encefalomiopática, hepatocerebral e neurogastrointestinal. A cada forma clínica estão associadas mutações em genes específicos. Usando os genes discutidos anteriormente como exemplos, as mutações no gene *TK2* estão relacionadas com formas miopáticas, enquanto as mutações no gene *POLG* estão frequentemente associadas a formas hepatocerebrais¹⁸¹. No entanto, é de realçar que, dependendo da mutação subjacente, o mesmo gene pode originar diferentes fenótipos¹⁸², sendo isto especialmente relevante para o gene *POLG*.

As alterações qualitativas resultam de múltiplas deleções do mtDNA (Figura 48), causadas por mutações em genes com funções na manutenção, replicação e integridade do mtDNA⁴¹. Os fenótipos mais comumente observados são a oftalmoplegia externa progressiva (PEO) e a síndrome de encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE). No caso da PEO, esta tem como etiologia mutações nos genes *ANT1*, *PEO1* e *POLG*, que apresentam um padrão de hereditariedade autossómico dominante e/ou recessivo. O gene *ANT1* ou *SLC25A4* codifica para uma proteína translocadora do nucleótido de adenina (ANT1) a qual se encontra na membrana interna mitocondrial e tem como função fazer o transporte de ATP para o citosol e de ADP para a matriz mitocondrial. O gene *PEO1* codifica para uma helicase, também denominada de Twinkle, que intervém na replicação do mtDNA^{37,41}. Em relação à MNGIE, esta é devida a mutações no gene *TYMP*, que codifica para a timidina fosforilase que é responsável pela conversão de desoxitimidina em timina, afetando o equilíbrio necessário para manter uma *pool* de nucleótidos mitocondriais estáveis.^{183,185}

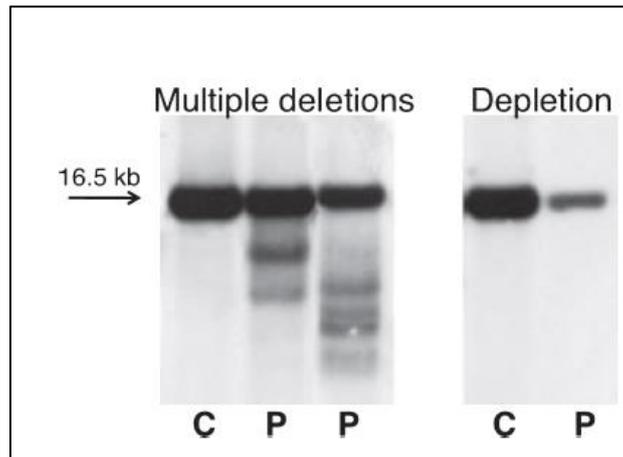


Figura 48. Southern blot de mtDNA linearizado demonstrando no lado esquerdo múltiplas deleções do mtDNA, e no lado direito uma depleção do mtDNA. (C, controlo; P, doente). Adaptado de: (183).

Outro grupo de mutações no nDNA bastante significativas são aquelas que ocorrem em genes que codificam para proteínas auxiliares ou constituintes da cadeia respiratória. De acordo com o gene que afetam, este grupo de mutações pode ainda ser subdividido em *direct hits* ou *indirect hits*¹⁶³. Os *direct hits* incluem as mutações que ocorrem em genes nucleares que codificam para subunidades constituintes da cadeia transportadora de elétrons. Os *indirect hits* são o grupo de mutações que afetam genes que codificam para proteínas que desempenham papéis na montagem dos complexos da cadeia respiratória, que não são partes estruturais da cadeia transportadora de elétrons, mas são essenciais para o seu funcionamento. Começando pelos *direct hits*, em todos os complexos da cadeia respiratória existem tais mutações, sendo que são muito mais frequentes no complexo I. Em termos clínicos, estas mutações, na sua maioria, podem manifestar-se na forma de síndrome de Leigh, e ao contrário do que acontecia nas mutações do mtDNA, estas aparecem durante os primeiros anos de vida e são muitas vezes letais^{178,143}. Passando agora aos *indirect hits*, existem variadas proteínas que ajudam na montagem e maturação dos complexos da cadeia respiratória, um exemplo é a proteína BCS1L. A BCS1L é uma chaperone que intervém na montagem do complexo III. Conhecem-se cerca de 30 mutações diferentes no gene *BCS1L*, que originam fenótipos como a síndrome de GRACILE (atraso no crescimento, aminoacidúria, colestase, excesso de ferro, acidose láctica e morte prematura), ou síndrome de Björnstad, que se caracteriza por uma perda auditiva neurossensorial e *pilli torti*¹⁸⁵.

3 - Síndrome de Leigh

Foi em 1951 que a síndrome de Leigh (OMIM #256000) foi pela primeira vez descrita pelo médico Denis Archibald Leigh, que reportou um caso de um bebé de 7 meses de idade que morreu num período de 6 semanas¹⁸⁶. Leigh descreveu as características neuropatológicas e histológicas descrevendo as lesões como sendo bilaterais, simétricas, de espongirose, proliferação vascular e astrocitose, afetando os gânglios da base, tronco cerebral e medula espinal. O primeiro nome dado por Leigh a esta apresentação foi de encefalomielopatia necrosante subaguda, daí também ser conhecida como tal. Esta síndrome caracteriza-se por ser uma doença neurodegenerativa progressiva que surge em

crianças durante os primeiros anos de vida, e que pode resultar em morte. Estima-se que a sua prevalência seja por volta de 1 a cada 40.000 nascimentos¹⁸⁷. Em populações específicas a incidência é maior devido a mutações resultantes de um efeito fundador, por exemplo no caso da população da região de Saguenay Lac-Saint-Jean do Québec, no Canadá, em que a incidência é de 1:2.000¹⁸⁸, ou em populações das ilhas Faroé com uma incidência reportada de 1:1.700¹⁸⁹. Algumas das características principais desta síndrome são: a presença de um atraso motor e intelectual, níveis de lactato elevados tanto no sangue como no líquido cefalorraquidiano, disfunção do tronco cerebral e gânglios da base e a evidência de uma alteração do metabolismo energético¹⁶⁴.

3.1 - Apresentação clínica

Antes de listar as variadas características clínicas associadas à síndrome de Leigh, é importante ter em conta que esta é uma doença rara, o que dificulta encontrar populações suficientemente grandes para se identificarem os sintomas predominantes. No entanto, a realização de vários estudos com populações afetadas pela síndrome de Leigh em diferentes regiões do globo, permitiu reunir informações clínicas, bioquímicas, moleculares e radiológicas que a caracterizam¹⁹⁰⁻¹⁹³. As apresentações clínicas são muito heterogêneas com um variado leque de órgãos afetados. Esta heterogeneidade nas apresentações clínicas pode ser explicada, em parte, por fatores como a heteroplasmia nas mutações no genoma mitocondrial, mas talvez a razão principal, que ainda não é totalmente compreendida, seja a própria complexidade da cadeia respiratória mitocondrial. Como já foi dito anteriormente, para o seu funcionamento, a cadeia respiratória necessita mais de 1.500 proteínas codificadas no genoma nuclear e mitocondrial. Uma mutação em qualquer uma destas proteínas vai afetar o seu funcionamento, e por consequência comprometer a produção de ATP. Isto vai causar nas células uma maior propensão à produção de ROS. Dessa forma, iniciam-se processos inflamatórios e de aumento do *stress* oxidativo que, se mantidos de forma crônica, culminam na morte celular, o que origina as diferentes apresentações clínicas¹⁴⁴. A síndrome de Leigh pode estar associada a uma qualquer deficiência nos cinco complexos que constituem a cadeia respiratória, sendo que estas deficiências podem ser isoladas ou combinadas, isto é, envolvendo mais do que um complexo. Outras proteínas que não constituem os complexos da cadeia respiratória, mas estão também associadas ao surgimento da síndrome de Leigh, são as deficiências no complexo piruvato desidrogenase ou na coenzima Q₁₀¹⁶⁴. A ubiquidade das mitocôndrias em todas as células nucleadas ajuda a compreender o porquê de praticamente todos os órgãos poderem ser afetados. Contudo, são os órgãos com maiores requisitos energéticos, como seja o cérebro, o músculo esquelético e os olhos que são mais fortemente afetados e, portanto, as apresentações clínicas mais frequentes são as que afetam esses mesmos órgãos.

Na síndrome de Leigh, a idade de surgimento dos sintomas é por norma antes dos 2 anos de idade; no entanto, existem casos que relatam o surgimento dos sintomas em idades superiores^{194,195}. Isto é relevante, pois os sintomas diferem de um grupo em relação ao outro. Sendo que, crianças que desenvolvam sintomas antes dos 2 anos de idade, por norma, têm sintomatologia mais grave e com pior prognóstico, do que as crianças que desenvolvem sintomas em idades mais avançadas¹⁹⁶. O surgimento dos sintomas acontece frequentemente após um episódio de uma infeção viral aguda ou doença que cause um *stress* metabólico¹⁹⁷.

Os sintomas que caracterizam a síndrome de Leigh podem ser subdivididos em dois grupos principais: sintomas neurológicos e sintomas multissistêmicos¹⁴⁴ (Figura 49). Começando pelos sintomas neurológicos, estes são os mais comumente encontrados e que estão mais associados a esta síndrome. São caracterizados por anomalias motoras, como ataxia, hipotonia, distonia, regressão psicomotora, mas também por anomalias oculares, tais como ptose, atrofia ótica, nistagmo, oftalmoplegia e estrabismo. São também reportados casos de convulsões, atraso mental, episódios de apneia e problemas de deglutição por causa de alterações no tronco cerebral. No outro grupo de sintomas multissistêmicos, podem surgir anomalias cardíacas, tais como arritmias e cardiomiopatia hipertrófica, anomalias gastrointestinais, que incluem obstipação, diarreia, megacólon, disfagia, vômitos e paralisia intestinal, disfunção renal, disfunção hepática com níveis elevados das transaminases e hepatomegalia e anomalias hematológicas, em particular anemia^{144,197,198}. Contudo, existem muitos casos documentados na literatura que não se enquadram perfeitamente nos critérios de diagnóstico para a síndrome de Leigh, sendo designados de síndrome *Leigh-like*, uma vez que apresentam achados neuropatológicos e neurorradiológicos atípicos, mas que são sugestivos de síndrome de Leigh mesmo assim¹⁹⁹. O padrão neurorradiológico que é característico da síndrome de Leigh são as hiperdensidades focais, bilaterais e simétricas observadas em imagens T2 na ressonância magnética. Estas hiperdensidades estão normalmente localizadas nos gânglios da base e/ou no tronco cerebral, no tálamo, medula espinal, substância nigra, núcleo rubro e substância branca cerebral^{198,199}.

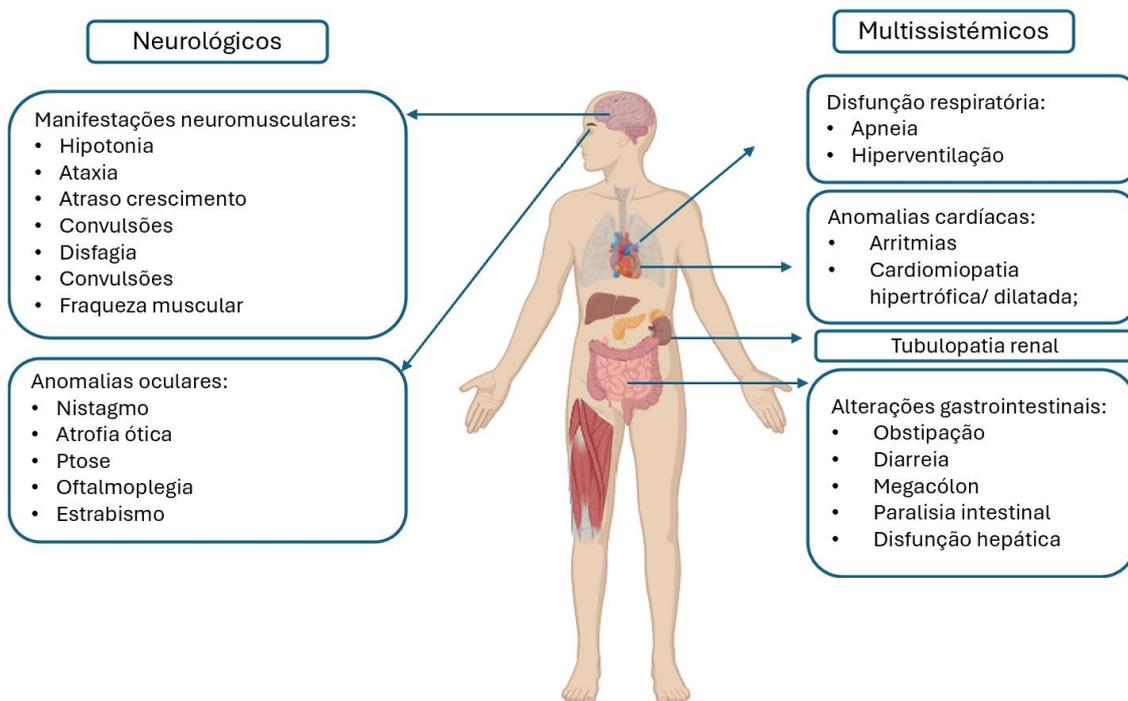


Figura 49. Manifestações clínicas da Síndrome de Leigh. Adaptado de: (143),(144)

~

3.2 - Genética da Síndrome de Leigh

A síndrome de Leigh, para além de ser clinicamente muito heterogénea, é igualmente heterogénea a nível genético. Até à data existem mais de 75 genes com mutações que causam esta patologia e o seu número continua em expansão graças às técnicas de sequenciação de nova geração, que vieram facilitar e acelerar a identificação de novos genes candidatos¹⁶⁴. De igual modo ao que acontece nas outras doenças mitocondriais, as mutações ocorrem principalmente em genes que codificam para proteínas estruturais da cadeia respiratória, ou em genes que codificam proteínas envolvidas na montagem e estabilidade dos complexos constituintes da cadeia respiratória. Contudo, mais recentemente, têm sido descobertas mutações em genes que codificam proteínas com funções na manutenção do mtDNA, na biossíntese de cofatores, na tradução do mtDNA e em funções da dinâmica das mitocôndrias²⁰⁰ (Tabela 16). Tanto genes do genoma nuclear como do genoma mitocondrial apresentam mutações causadoras da síndrome de Leigh e, portanto, os padrões de hereditariedade podem ser autossómico recessivo e ligado ao cromossoma X materno no caso das mutações no mtDNA, e mutações *de novo*. Na parte final deste trabalho ir-se-á falar e analisar algumas das mutações causadoras desta síndrome, nomeadamente mutações que ocorrem nas proteínas constituintes da cadeia transportadora de eletrões, discutindo-se os seus efeitos bioquímicos e clínicos.

3.2.1 – Mutações no complexo I

O complexo I (nicotinamina adenina dinucleótido: ubiquinona oxidoredutase) é a primeira e maior enzima multimérica da cadeia transportadora de eletrões, constituída por 45 subunidades, sendo que 38 são codificadas pelo genoma nuclear, e 7 (MTDN1-MTDN6, MTDN4L) pelo genoma mitocondrial. Adicionalmente, para além das proteínas estruturais deste complexo, são ainda necessárias mais 11 proteínas auxiliares para a sua montagem. O complexo I oxida o NADH, ao mesmo tempo que reduz a coenzima Q10 ou ubiquinona (CoQ₁₀), gerando energia que permite a translocação de prótons para o espaço intermembranar, contribuindo para a manutenção de um gradiente eletroquímico por toda a membrana mitocondrial interna²⁰¹.

Uma deficiência no complexo I da cadeia respiratória tem sido a causa mais frequentemente de doenças mitocondriais com surgimento na infância²⁰². A sintomatologia é muito heterogénea podendo ir de acidose láctica neonatal fatal até casos de cardiomiopatia hipertrófica isolada ou até a síndrome de MELAS ou síndrome de LHON. Contudo, é a síndrome de Leigh que é mais frequentemente observada como resultado de mutações que causam deficiência no complexo I²⁰³. Dos 38 genes nucleares que codificam para proteínas estruturais do complexo I, apenas em 14 destes foram identificadas mutações associadas a síndrome de Leigh. Dos genes que codificam para proteínas auxiliares na montagem do complexo I, foram documentadas mutações em 7 genes. Por fim, nas 7 subunidades codificadas no genoma mitocondrial, já forma documentados casos de mutações nos genes *MTDN1*, *MTDN2*, *MTDN3*, *MTDN4*, *MTDN5* e *MTDN6*, sendo que as mutações nos genes *MTDN3* e *MTDN5* são as mais prevalentes²⁰⁴.

Tabela 18. Genes nos quais mutações causam síndrome de Leigh. Legenda: XL – ligada ao cromossoma X; AR – autossômica recessiva. Adaptado de: (144), (200)

Disfunção mitocondrial	Genes envolvidos (padrão de hereditariedade)
Deficiência do complexo I	<i>NDUFA1</i> (XL); <i>NDUFA2</i> , <i>NDUFA9</i> , <i>NDUFA10</i> , <i>NDUFA12</i> , <i>NDUFS1</i> , <i>NDUFS2</i> , <i>NDUFS3</i> , <i>NDUFS4</i> , <i>NDUFS7</i> , <i>NDUFS8</i> , <i>NDUFV1</i> , <i>NDUFV2</i> (AR); <i>MT-ND1</i> , <i>MT-ND2</i> , <i>MT-ND3</i> , <i>MT-ND4</i> , <i>MT-ND5</i> , <i>MT-MD6</i> (maternal); <i>NDUFAF2</i> , <i>NDUFAF4</i> , <i>NDUFAF5</i> , <i>NDUFAF6</i> , <i>C17ORF89</i> , <i>FOXRED1</i> , <i>NUBPL</i> (AR)
Deficiência do complexo II	<i>SDHA</i> , <i>SDHAF1</i> (AR)
Deficiência do complexo III	<i>UQCRCQ</i> , <i>BCS1L</i> , <i>TTC19</i> (AR)
Deficiência do complexo IV	<i>NDUFA4</i> , <i>SURF1</i> , <i>COX8A</i> , <i>COX10</i> , <i>COX15</i> , <i>SCO2</i> , <i>PET100</i> , <i>LRPPRC</i> , <i>TACO1</i> , <i>ETHE1</i> (AR); <i>MT-CO3</i> (maternal)
Deficiência do complexo V	<i>MT-ATP6</i> (maternal)
Deficiência do complexo Piruvato Desidrogenase (PDHc)	<i>PDHA1</i> (XL); <i>PDHX</i> , <i>PDHB</i> , <i>DLAT</i> , <i>DLD</i> (AR)
Deficiência do CoQ ₁₀	<i>COQ9</i> , <i>PDSS2</i> (AR)
Deficiência da Biotinidase	<i>BTD</i> (AR)
Metabolismo Tiamina	<i>SLC19A3</i> , <i>TPK1</i> (AR)
Metabolismo de aminoácidos	<i>HIBCH</i> , <i>ECHS1</i> (AR)
Manutenção do mtDNA	<i>POLG</i> , <i>SUCLA2</i> , <i>SUCLG1</i> , <i>FBXL4</i> (AR)
Tradução do mtDNA	<i>GFM1</i> , <i>GFM2</i> , <i>TSFM</i> , <i>TRMU</i> , <i>MTFMT</i> , <i>GTPBP3</i> , <i>TACO1</i> , <i>C12ORF65</i> , <i>LRPPRC</i> , <i>EARS2</i> , <i>FARS2</i> , <i>IARS2</i> , <i>NARS2</i> (AR); <i>MT-TI</i> , <i>MT-TK</i> , <i>MT-TL1</i> , <i>MT-TL2</i> , <i>MT-TV</i> , <i>MT-TW</i> (maternal)
Dinâmica mitocondrial	<i>SLC25A46</i> (AR), <i>DNM1L</i> (AD)

O gene *NDUFS4* foi dos primeiros genes no qual foi identificada uma mutação em homozigotia que conduz à síndrome de Leigh com deficiência no complexo I²⁰⁵. O gene *NDUFS4* codifica para a subunidade acessória estrutural de 18 kDa, pertencente à NADH desidrogenase (complexo I). Este gene localiza-se no cromossoma 5q11.2 e estrutura-se em 5 exões. A proteína *NDUFS4* possui um péptido sinal mitocondrial de 42 aminoácidos que é clivado após o transporte para a mitocôndria. Adicionalmente, possui uma região

consenso de fosforilação na posição 171 – 173 (RVS), que é fosforilada pela proteína cinase A cAMP dependente (PKA). Pensa-se que a sua função esteja relacionada com a montagem e estabilização do complexo I²⁰⁶. A primeira mutação descrita neste gene foi uma duplicação de 5 pb nas posições 466-470 (c.466-470 dup). Esta duplicação causa um *frameshift* (alteração da grelha de leitura) no codão Lys158, conduzindo à produção de uma proteína com mais 14 aminoácidos que a proteína selvagem, e leva também à destruição do local consenso de fosforilação presente na região c-terminal da proteína (aminoácidos 171-173)²⁰⁵. Como consequência, a ausência da subunidade NDUFS4 “normal” parece conduzir a uma perda do complexo I completamente montado (aproximadamente 1 MDa), mas verifica-se uma acumulação de um complexo I intermediário com cerca de 830 kDa em análise de BN-PAGE²⁰⁷. Outras mutações neste gene também estão associadas a síndrome de Leigh, tais como a mutação pontual c.44G>A, que leva à introdução de um codão stop prematuro na posição 15 na região do péptido sinal mitocondrial, conduzindo a uma completa ausência do complexo I²⁰⁸. Outro tipo de mutações, tais como mutações missense²⁰⁹, deleções²¹⁰, e mutações que alteram o padrão de *splicing*²¹¹, também estão associadas à síndrome de Leigh. Os sintomas associados a estas mutações mais frequentes são hipotonia, anomalias oculares e atraso psicomotor. Por norma, o prognóstico de mutações neste gene é bastante reservado, levando à morte antes dos 3 anos de idade²¹².

O gene *NDUFVI* localiza-se no cromossoma 11q13.2 e é composto por 10 exões. Codifica para uma subunidade core da NADH desidrogenase (complexo I) de 51 KDa, e na sua estrutura possui um local de ligação ao NADH e um local de ligação ao cofator mononucleótido de flavina (FMN) e ao cofator ferro-enxofre [Fe-S]²¹³.

Foi documentado o caso de um indivíduo heterozigótico composto com uma mutação no exão 5 deste gene em que a mutação c.616 T>G provinha da mãe e a mutação c.611 A>G provinha do pai. A primeira mutação causa uma troca de um resíduo de cisteína por um de glicina na posição 206 (p.Cys206Gly), enquanto que a segunda causa uma alteração do aminoácido tirosina por uma cisteína na posição 204 (p.Tyr204Cys). Este doente apresentava ptosis, estrabismo, ataxia, hipotonia e oftalmoplegia. Os níveis de lactato eram elevados e apresentava uma deficiência enzimática no complexo I²¹⁴. Estudos feitos em *Yarrowia lipolytica* com estas mesmas mutações revelaram a total ausência de expressão do complexo I, por análise de BN-PAGE, no caso da variante p.Tyr204Cys. Na variante p.Cys206Gly, o complexo I estava intacto mas incapaz de oxidar o NADH. Ambas as mutações afetam o local de ligação à FMN, que é um importante cofator para o funcionamento do complexo I²¹³.

Não só mutações em genes nucleares causam deficiência no complexo I. Estão também documentadas mutações em 6 dos 7 genes mitocondriais que codificam para subunidades do complexo I, sendo que as mutações com maior prevalência são as que afetam os genes *MT-DN3* e *MT-DN5*²⁰⁴. O gene *MT-DN3* codifica para a subunidade ND3 da NADH desidrogenase (complexo I) com um peso molecular aproximado de 13,2 KDa. Duas das mutações *missense* que são mais frequentemente associadas à síndrome de Leigh são m.10191 T>C e m.10197 G>A. Na primeira, esta troca de um nucleótido de timina por citosina, conduz à substituição de uma serina, que é hidrofílica, por uma prolina, que é hidrofóbica, na posição 45 numa região conservada da proteína ND3 (p.Ser45Pro)²¹⁵. Na segunda mutação, a troca de uma guanina por uma adenina, leva à troca de uma alanina hidrofóbica por uma treonina hidrofílica, na posição 47 (p.Ala47Thr) da mesma região conservada do loop transmembranar da proteína ND3²¹⁶.

Na mutação m.1091 T>C, o doente tinha 42 anos quando foi descoberta a mutação. Durante a infância foi normal sem qualquer apresentação clínica sugestiva, mas a partir dos 24 anos começou a apresentar episódios progressivos de epilepsia, atrofia bilateral ótica e um declínio cognitivo. Na análise feita por PCR-RFLP, demonstrou-se níveis de 77% de heteroplasmia no músculo esquelético e 14% no sangue. A mesma mutação foi detetada na mãe com uma heteroplasmia de 3%. O efeito patogénico desta mutação traduz-se numa redução de cerca de 60% da atividade enzimática do complexo I²¹⁵.

Na mutação m.10197 G>A, três famílias de diferentes haplogrupos apresentam esta mutação. Ao analisar-se a carga mutacional em diferentes tecidos dos doentes (leucócitos, fibroblastos e músculo esquelético), verificou-se que esta era homoplásmica nos doentes com a clínica neurológica mais grave, enquanto nos doentes com clínica mais discreta, e até mesmo sem sintomatologia, era heteroplásmica. Em concreto, as mães destas famílias apresentavam níveis de heteroplasmia de 74%, 64% e 50% em leucócitos, ao passo que os seus filhos apresentavam taxas de 100% de mtDNA mutado, ou seja, homoplasmia. A mãe com 50% de homoplasmia não apresentava qualquer sintomatologia clínica. As mães com 64% e 74% de heteroplasmia começaram a desenvolver sintomas de hipotonia e atraso mental a partir dos 14 anos, e partir dos 6 anos de distonia generalizada com lesões bilaterais nos gânglios basais, respetivamente. Os doentes com níveis de 100% mtDNA mutado apresentavam hipotonia, síndrome piramidal, níveis de lactato elevados no plasma e/ou no líquido cefalorraquidiano, e lesões observadas na ressonância magnética características da síndrome de Leigh. Em todos os doentes estudados observou-se uma redução substancial da atividade do complexo I²¹⁶.

O gene *MT-ND5* codifica para a subunidade 5 da NADH desidrogenase (complexo I) com um peso molecular aproximado de 66,6 kDa. Diferentes mutações neste gene podem causar várias doenças mitocondriais como a atrofia ótica de Leber, a síndrome de MELAS e a síndrome de Leigh. Uma das mutações que causa a síndrome de Leigh é m.12706 T>C. Nesta mutação *missense*, a troca de uma timina por uma citosina, leva à substituição de uma fenilalanina por uma alanina na posição 124 (p.Phe124Ala), que é uma posição altamente conservada envolvida na formação de uma das 18 hélices transmembranares estruturais da proteína ND5²¹⁷. O doente começou por desenvolver aos 6 anos uma atrofia ótica do lado esquerdo, que evoluiu para bilateral por volta dos 20 anos, acompanhada de ataxia, fraqueza dos músculos faciais, perda auditiva, oftalmoplegia e enfraquecimento dos músculos da mastigação, do palato e da laringe, com níveis elevados de lactato. O doente acabou por falecer aos 24 anos. Na determinação dos níveis de heteroplasmia verificou-se que 43% era mtDNA mutado no músculo esquelético e 30% em fibroblastos. Ao nível bioquímico, verificou-se uma redução significativa da atividade do complexo I⁷⁵. Esta mutação apresenta um baixo limiar (*threshold*) para originar sintomatologia clínica, ou seja, é patogénica a níveis de heteroplasmia baixos²¹⁷, ao contrário do que acontecia nas mutações anteriormente descritas.

3.2.2 – Mutações do complexo II

O complexo II (succinato desidrogenase) é constituído por 4 subunidades estruturais (SDHA, SDHB, SDHC e SDHD) e por 2 fatores auxiliares de montagem (SDHAF1 e SDHF2), todas codificadas pelo genoma nuclear. Este complexo tem como função oxidar o FADH₂ em FAD, e ao mesmo tempo, transferir os eletrões libertados pela reação anterior para a Coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀). Este complexo tem a particularidade de participar

em ambos os processos da cadeia transportadora de elétrons e no ciclo do ácido cítrico^{201,218}.

As mutações no complexo II, que originam deficiências na fosforilação oxidativa, são mais raras que as mutações no complexo I e, portanto, originam menos casos de síndrome de Leigh²¹⁹. De todos os genes constituintes do complexo II, apenas as mutações nos genes *SDHA* e *SDHAF1* estão associadas a deficiências neste complexo.

O gene *SDHA* localiza-se no cromossoma 5p15.33, existindo também um pseudogene no cromossoma 3q29. O *SDHA* codifica para uma das duas subunidades catalíticas do complexo II. Esta subunidade é uma flavoproteína contendo na sua estrutura um local de ligação ao seu cofator, o FAD. Exemplos de mutações no gene *SDHA* que originam a síndrome de Leigh são as mutações c.356 G>A e c.248 C>T. Estas mutações foram descritas num doente com 9 anos de idade heterozigótico composto. A mutação c.356 G>A no exão 4 provinha do pai, enquanto que a mutação c.248 C>T no exão 3 provinha da mãe. Ambos os pais eram heterozigóticos para as respetivas mutações. Na mutação vinda do pai, a alteração de uma guanina por uma adenina conduz à introdução de um codão stop na posição 119 (p.Trp 119 X), conduzindo a uma destruição do mRNA por *nonsense mediated mRNA decay*. No caso da mutação herdada da mãe, a substituição de uma citosina por timina leva à introdução de um novo local dador de *splicing*, o que resulta na deleção *in-frame* dos últimos 66 nucleótidos do exão 3 o que origina uma proteína mutada com um padrão de *splicing* alterado (p.Ala83_Gln104del). Contudo, esta proteína proveniente do mRNA com o *splicing* alterado não foi detetada, o que sugere que deve ser instável. Clinicamente, os primeiros sintomas surgiram aos 5 meses com evolução para uma doença neurodegenerativa progressiva grave que causou episódios de epilepsia, atraso psicomotor e perda visual total. Bioquimicamente, as biópsias musculares feitas revelaram um decréscimo acentuado da atividade do complexo II^{220,221}.

O gene *SDHAF1* encontra-se no cromossoma 19q13.22 e codifica para um fator auxiliar que é essencial para a montagem do complexo II. Este gene possui apenas um exão. Num estudo, as mutações *missense* c.169G>C e c.164G>C no gene *SDHAF1* foram analisadas e concluiu-se que esta proteína auxiliar é essencial para a montagem do complexo II, uma vez que os doentes que possuíam estas mutações apresentavam diminuições substanciais da atividade do complexo II²²². Clinicamente, apresentavam regressão psicomotora com evolução para quadriparésia e distonia. Os padrões das ressonâncias magnéticas feitas ao cérebro eram compatíveis com os observados na síndrome de Leigh, apresentando também leucodistrofia^{222,223}.

3.2.3 – Mutações do complexo III

O complexo III da cadeia respiratória (citocromo c ubiquinol redutase) é constituído por 11 subunidades, sendo que dez destas são codificadas pelo genoma nuclear e apenas uma subunidade (citocromo b) é codificada pelo mtDNA. Para além das subunidades estruturais, o complexo III possui dois fatores auxiliares essenciais para a sua montagem, que são o BCS1L e o TTC19. O complexo III catalisa a transferência dos elétrons provenientes da succinato desidrogenase ou da NADH desidrogenase para a molécula de citocromo c, ao mesmo tempo a energia obtida por esta reação de oxidação-redução permite a translocação de prótons para a membrana interna mitocondrial^{201,224}.

À semelhança das mutações no complexo II, as mutações nos genes constituintes do complexo III são responsáveis por uma pequena percentagem de casos de doenças mitocondriais¹⁴⁴, estando descritas mutações em apenas 3 genes com associação direta à síndrome de Leigh, o gene *BCSIL*, o gene *TTC19* e o gene *UQCRB*¹⁴⁴.

Começando pelo gene *UQCRB*, este codifica para a subunidade do complexo III ubiquinol citocromo c oxirredutase com 9,5 KDa e localiza-se no cromossoma 5q31.1. A mutação *missense* c.208C>T está associada à síndrome de Leigh e conduz à substituição de um resíduo de serina por um de fenilalanina na posição 45 (p.Ser45Phe)²²⁵. Esta troca de aminoácido acontece numa posição crítica da estrutura da molécula, que determina a orientação de um domínio extramembranar. A serina possui uma cadeia lateral polar, ao contrário da fenilalanina que possui um anel aromático que é apolar. Ora, isto altera significativamente a estrutura tridimensional da molécula. Esta mutação foi descoberta num grupo de israelitas Bedouib com relações de parentesco e casamentos consanguíneos. Os doentes apresentavam atraso psicomotor, síndrome extrapiramidal, distonia, ataxia e incapacidade de comunicação verbal, com níveis de lactato sanguíneo ligeiramente elevados²²⁵. As biópsias musculares revelaram uma diminuição na atividade do complexo III, assim como uma diminuição na atividade do complexo I. Tal é comum, pois para o normal funcionamento e estabilidade do complexo I é necessário que o complexo III esteja operacional. Quanto ao padrão de hereditariedade, esta mutação é autossômica recessiva²²⁵.

O gene *BCSIL* codifica para uma chaperone do complexo ubiquinol citocromo c redutase com função auxiliar na montagem do complexo III. Este gene encontra-se no cromossoma 2q35 e possui 7 exões e 6 intrões. Existem documentadas várias mutações neste gene com fenótipos que vão desde a síndrome de Bjornstad²²⁶, síndrome GRACILE²²⁷ e síndrome de Leigh/ síndrome Leigh-like. Num estudo realizado em 2001, foram reportadas várias mutações neste gene que conduziam a uma apresentação clínica, em todos os 6 doentes estudados, bastante característica de acidose metabólica, tubulopatia neonatal, comprometimento da função hepática (citólise hepática até mesmo insuficiência hepática) e encefalopatia²²⁸. Dois dos doentes apresentavam nos exames por ressonância magnética lesões no tronco cerebral compatíveis com as que tipicamente surgem na síndrome de Leigh. A mutação *missense* subjacente, c.296 C>T, origina a troca de uma prolina por uma lisina na posição 99 da proteína (p.Pro99Lys), que é uma região bastante conservada em várias espécies. A atividade do complexo III medida em biópsias de fígado e fibroblastos encontrava-se bastante reduzida²²⁸.

Por último, foram também associadas mutações no gene *TTC19* à síndrome de Leigh. Este gene localiza-se no cromossoma 17p12 e codifica para uma proteína que contém vários domínios com repetições tetratricopeptídicas. Esta proteína encontra-se inserida na membrana mitocondrial interna e desempenha um papel na formação e montagem do complexo III²²⁹. Num caso foi descrito um doente com 4 anos de idade que apresentava atraso no desenvolvimento, regressão da fala e um padrão de ressonância magnética cerebral típico de síndrome de Leigh²²⁹. Foram feitas análises moleculares que revelaram que este doente era heterozigótico composto para duas mutações no gene *TTC19*, a mutação c.557 G>A e a mutação c.964_967delGGT. A mutação c.557 G>A conduz à introdução de um codão stop prematuro na posição 186 (p.Trp186Stop). A mutação c.964_967delGGCT é uma deleção de quatro pares de base que origina a um *frameshift* na posição 322 de uma glicina, trocando-a por uma metionina, o que leva à introdução de um codão stop prematuro na posição 8 da nova grelha de leitura. Ambas as mutações têm como efeito a perda de função da proteína, já que esta fica truncada ou ocorre a destruição

do seu mRNA por um mecanismo de mRNA *nosnsense mediated decay*²²⁹.

3.2.4. Mutações do complexo IV

O complexo IV (citocromo c oxidase - COX) é uma enzima multimérica constituída por 13 subunidades, três das quais formam o core catalítico do complexo e são codificadas pelo genoma mitocondrial (*MT-COX 1-3*). As restantes subunidades são codificadas pelo genoma nuclear e desempenham funções relacionadas com a estabilidade estrutural do complexo e a modulação da atividade enzimática. Adicionalmente, são necessários pelo menos mais 18 fatores auxiliares para a montagem do complexo^{201,230}. Este complexo catalisa a transferência de 2 eletrões do citocromo c para a molécula de oxigénio, culminado na formação de água. Ao mesmo tempo, dá-se a translocação de 4 protões da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, contribuindo para a formação do gradiente de protões²³¹.

Uma deficiência isolada do complexo IV é uma das principais causas subjacentes à síndrome de Leigh, representando cerca de 15% de todos os casos da síndrome de Leigh¹⁶⁴. Vários genes são alvos de mutações que podem originar uma deficiência do complexo IV com síndrome de Leigh. Contudo, são as mutações no gene *SURF1* que mais frequentemente causam esta patologia²³². O gene *SURF1* contém 4696 pb e localiza-se no cromossoma 9q34.2 num cluster de genes denominados de *surfeit*, que são altamente conservados. Este gene codifica para um polipéptido com cerca de 300 aminoácidos, que se encontra inserido na membrana interna mitocondrial, e tem como função auxiliar na montagem e manutenção do complexo IV. Atualmente, existem mais de 40 mutações documentadas neste gene com associação à síndrome de Leigh. As mutações descritas neste gene podem ser *missense*, *nonsense* ou deleções e inserções que alteram a grelha de leitura ou o padrão de *splicing*. Cerca de 80% das mutações encontradas são mutações *nonsense*, ou *frameshift*, que conduzem à produção de proteínas truncadas e, portanto, à ausência da proteína SURF1 funcional. Relativamente ao fenótipo que estas mutações originam, os doentes revelam uma apresentação clínica e bioquímica bastante homogénea com características típicas da síndrome de Leigh^{233,234}. Nalguns doentes é também documentado a presença de hipertricose. Foi observado que os doentes com mutações *frameshift* que resultam em proteínas truncadas na região C-terminal da proteína SURF1 apresentam um melhor prognóstico na progressão da doença^{233,234}.

As mutações no gene *LRPPRC* são também uma das principais causas de deficiência do complexo IV, resultando numa deficiência da atividade no citocromo c oxidase (COX) em tecidos como o fígado, cérebro e músculo²³⁵. Este gene localiza-se no cromossoma 2q21 e codifica para uma proteína rica em leucina com um motivo de repetição pentatricopeptídico (PPR). Esta proteína possui várias funções na célula, em particular, intervém no metabolismo energético através da regulação da transcrição, do *splicing* e da tradução de genes mitocondriais²³⁶. As mutações no gene *LRPPRC* foram primeiramente descritas nas comunidades da região Saguenay-Lac St-Jean no Québec, Canadá, sendo esta uma região onde existe uma elevada incidência de síndrome de Leigh. Num estudo de coorte realizado em 2015, em que foram analisados 56 doentes com a variante franco-canadense da síndrome de Leigh, 55 eram homocigóticos para a mutação *missense* p.Ala354Val²³⁵. A posição 354 na proteína LRPPRC é uma das posições conservadas da

proteína, e a alteração de um aminoácido nesta posição conduz a uma diminuição dos níveis de expressão da proteína LRPPRC na mitocôndria, conduzindo a uma diminuição dos níveis de transcrição do mRNA da COX I e COX III^{237,238}. Quanto às apresentações clínicas na síndrome de Leigh Franco-Canadense, os doentes possuem atrasos no desenvolvimento, dismorfia facial característica e principalmente crises agudas metabólicas, com acidose láctica e episódios semelhantes a acidente vascular cerebral²³⁵. Quando comparada com a sintomatologia causada por mutações no gene *SURF1*, por exemplo, os doentes com mutações no gene *LRPPRC* possuem sintomatologia mais grave. Verifica-se também que as taxas de mortalidade são mais elevadas e em idades mais precoces, muito devido à ocorrência de crises metabólicas agudas²³⁹.

O gene *NDUFA4*, que anteriormente tinha sido classificado como codificante para uma proteína constituinte do complexo I, foi recentemente comprovado codificar para uma subunidade do complexo IV, por meio de estudos em linhas celulares²⁴⁰. Este gene encontra-se localizado no cromossoma 7p21.3 possuindo um tamanho de 8211 pbpb. Num estudo realizado em 2013²⁴¹ a uma família paquistanesa consanguínea, 4 dos seus membros apresentavam síndrome de Leigh, causada por uma deficiência isolada do complexo IV. Os doentes apresentavam acidose láctica, atraso no crescimento, dificuldades de aprendizagem, distonia e ataxia, mas com sobrevivência até à idade adulta. As ressonâncias magnéticas apresentavam um padrão característico da síndrome de Leigh com hiperdensidades nas regiões do tronco cerebral, tálamo e substância branca cerebral²⁴¹. Através de sequenciação total do genoma e por mapeamento de homozigotia, foi identificada em todos os membros afetados desta família uma mutação no gene *NDUFA4*. A mutação c.42+1G>C origina a ativação de um sítio críptico dador de *splicing* 4 pb a jusante do local da mutação no intrão 1, fazendo com que sejam adicionados mais 4 pb ao exão 1. Adicionalmente, esta mutação causa uma alteração na grelha de leitura, introduzindo um codão stop prematuro no exão 3. Na análise do transcrito, verificou-se uma redução significativa do mRNA de *NDUFA4 wild-type* e o aparecimento de um transcrito aberrante que se fosse traduzido produziria uma proteína com 14 aminoácidos *in-frame* e os restantes 35 *out-of-frame*. Nas análises de Western blot e imunoquímica, verificou-se que os níveis *steady-state* da proteína *NDUFA4* eram indetetáveis, o que significa que a mutação conduz a um efeito de perda de função²⁴¹.

3.2.5. Mutações do complexo V

O complexo V da cadeia respiratória, mais comumente designado por ATP sintase, é a enzima terminal da cadeia transportadora de eletrões. Este complexo é constituído por 19 subunidades, das quais 17 são codificadas pelo genoma nuclear e 2 pelo genoma mitocondrial (MT-ATP6 e MT-ATP8). Adicionalmente, são necessárias mais 4 proteínas auxiliares para a sua montagem que são codificadas pelo genoma nuclear. Estruturalmente, a ATP sintase é composta por dois domínios funcionais, F₀ e F₁ ligados um ao outro. O domínio F₀ é hidrofóbico e encontra-se na membrana interna mitocondrial contendo um canal por onde os protões passam. O domínio F₁ encontra-se na matriz mitocondrial sendo, portanto, hidrofílico. Este domínio possui o centro catalítico para a síntese de ATP, catalisando a reação de fosforilação do ADP em ATP na matriz mitocondrial, sendo utilizada como fonte de energia, o gradiente eletroquímico de protões produzido pelos anteriores complexos da cadeia respiratória^{201,242}.

A causa mais frequente de deficiência do complexo V deve-se a mutações no gene mitocondrial *MT-ATP6*¹⁴⁴ sendo as mutações herdadas por via materna. O gene *MT-ATP6* codifica para a subunidade “a” do domínio F₀ da ATP sintase, que é uma componente fundamental do canal de prótons. Este canal conduz os prótons da membrana mitocondrial interna para a matriz mitocondrial, sendo que o seu fluxo leva à rotação do anel “c” que por sua vez vai induzir alterações conformacionais no domínio F₁, mais especificamente ao nível dos locais catalíticos nos quais se sintetiza ATP^{242,243}. Uma das primeiras mutações a ser documentada no gene *MT-ATP6* foi a mutação pontual m.8993T>G, que origina a substituição de uma leucina por uma arginina numa posição bastante conservada na estrutura da proteína (p.Leu156Arg)²⁴⁴. Mais tarde, foi também documentada uma mutação pontual no mesmo nucleótido da mutação anterior, mas neste caso o nucleótido de timina é substituído por um de citosina (m.8993T>C), conduzindo à substituição da leucina por uma prolina (p.Leu156Pro)²⁴⁵. Ambas as mutações estão associadas às apresentações clínicas de MILS (Síndrome de Leigh de Hereditariedade Matrilínea) e a síndrome de NARP (Neuropatia, Ataxia e Retinite Pigmentosa). É de realçar que a síndrome de Leigh possui um fenótipo mais grave e o seu surgimento acontece em idades mais precoces, contrariamente ao que acontece na síndrome de NARP que se manifesta mais tardiamente e é menos grave²⁴⁶. O fenótipo desenvolvido pelos doentes vai depender do nível de heteroplasmia da mutação presente. Por exemplo, no caso da m.8993T>G indivíduos com níveis inferiores a 60% de heteroplasmia são normalmente assintomáticos, enquanto os indivíduos com valores de heteroplasmia entre 70% e 90% apresentam o fenótipo da síndrome de NARP e apenas com valores superiores a 90% é que se desenvolve MILS. Relativamente à mutação m.8993T>C apenas se verifica sintomatologia a níveis de heteroplasmia superior a 90%²⁴⁶. Além disso, esta última mutação origina fenótipos mais suaves e que surgem mais tarde, resultando num tempo de vida superior, comparativamente à mutação m.8993T>G²⁴⁷. A diferença na gravidade clínica destas duas mutações pressupõe que cada mutação deva desencadear diferentes mecanismos patofisiológicos. E neste sentido foi realizado um estudo em que se compararam as alterações bioquímicas causadas por cada uma destas mutações. Pode-se concluir que nos mutantes com m.8993T>G verificava-se um aumento no potencial de membrana mitocondrial, ou seja existia um impedimento do fluxo de prótons, e no caso da m.8993T>C a diferença de potencial na membrana mitocondrial rondava os valores próximos dos normais. Contudo nos mutantes com a m.8993T>C verificou-se um aumento da produção de ROS, que na m.8993T>G era bastante inferior^{248,249}. Uma possível explicação para este facto, pode ser devido à troca de aminoácidos na posição conservada da proteína *MT-ATP6*. No caso da m.8993T>C é mantido um aminoácido apolar, enquanto na m.8993T>G há a substituição de um aminoácido apolar por um carregado positivamente, o que pode causar uma desestabilização na região catalítica da ATP sintase¹⁴⁴.

Outras mutações neste gene, como m.9176T>G e m.9185T>C, estão também associadas ao surgimento da síndrome de Leigh. Na primeira mutação, m.9176T>G, ocorre a troca de um resíduo de leucina por um resíduo de arginina na posição 217 (p.Leu217Arg)²⁵⁰, enquanto a segunda mutação, m.9185T>C, origina a troca de uma leucina na posição 220 por uma prolina (p.Leu220Pro)²⁵¹. Em ambas as mutações os casos reportados com sintomatologia clínica apresentavam níveis de heteroplasmia no sangue e músculos acima dos 90% com familiares da linhagem materna com percentagens de heteroplasmia inferiores^{250,251}. Estas mutações estão associadas ao desenvolvimento de síndrome de Leigh em idades adultas²⁵².

3.2.6. Mutações do complexo piruvato desidrogenase (PDHc)

O complexo piruvato desidrogenase (PDHc) é um complexo multienzimático de elevada importância para o metabolismo energético, uma vez que é responsável por fazer a conexão entre a glicólise e o ciclo de Krebs e, conseqüentemente, com a fosforilação oxidativa. Especificamente, este complexo catalisa a descarboxilação do piruvato, molécula final da glicólise, em acetil-CoA que depois é incorporada no ciclo de Krebs. O PDHc é composto por 3 enzimas distintas designadas por piruvato desidrogenase (E1), dihidrolipoil transacetilase (E2) e dihidrolipoil desidrogenase (E3) e por uma proteína estrutural, a proteína de ligação à E3. Para além destas enzimas estruturais o PDHc é possui 5 coenzimas e grupos prostéticos, sendo eles a tiamina pirofosfato, ácido lipoico, coenzima A, FAD e NAD^+ ^{253,254}. Todas as proteínas que compõem o PDHc são codificadas por genes localizados em autossomas, com a exceção do gene *PDHA1* que se localiza no cromossoma Xp22²⁵⁵.

A deficiência primária do complexo piruvato desidrogenase caracteriza-se por um conjunto amplo de sintomatologia englobando manifestações neurológicas, como hipotonia e epilepsia, bem como alterações metabólicas como acidose láctica e níveis elevados de piruvato. A sua associação com a síndrome de Leigh encontra-se bastante bem documentada. Num estudo realizado em 2012 com 59 doentes com deficiência primária do complexo piruvato desidrogenase, 35% apresentavam síndrome de Leigh²⁵⁵, e noutro estudo de revisão, realizado no mesmo ano, 50 doentes num grupo de 371 com deficiência do PDHc apresentavam síndrome de Leigh²⁵⁶. A maioria dos casos de deficiência do PDHc resultam de mutações no gene *PDHA1*. Este gene codifica para a subunidade α da enzima E1 (a enzima E1 é um heterotetrâmero constituído por 2 subunidades α e 2 subunidades β , que são respetivamente codificadas pelos genes *PDHA1* e *PDHB*). O gene *PDHA1* possui 11 exões, sendo que a maior parte das mutações encontram-se nos últimos 6 exões, especialmente nos exões 10 e 11. Ao todo existem documentadas mais de 100 mutações diferentes neste gene²⁵⁷. Sendo o padrão de hereditariedade destas mutações ligado ao cromossoma X, verifica-se que os doentes do sexo masculino são hemizogóticos, ou seja, em todas as células é expressa a mutação. Isto faz com que o fenótipo apresentado dependa apenas da atividade residual da PDHc e deste modo, constata-se que os doentes do sexo masculino apresentam mais frequentemente mutações *missense*, que na sua maioria são menos graves e permitem ainda que enzima mutada seja parcialmente funcional^{257,258}. Mutações muito graves, que resultem em nenhuma ou quase nenhuma atividade do PDHc, são muitas vezes incompatíveis com a vida, podendo conduzir à morte do feto²⁵⁷. No caso das mulheres, a inativação do cromossoma X permite que existam mutações mais graves observando-se uma maior frequência de mutações *frameshift* em mulheres²⁵⁸. Isto não quer dizer que as mulheres apenas apresentem mutações do tipo *frameshift*, as mutações *missense* também existem em mulheres. Contudo, estas mutações menos graves passam mais despercebidas, uma vez que originam fenótipos mais suaves ou até mesmo assintomáticos, não levando a uma suspeição de uma deficiência do PDHc²⁵⁷. O padrão de inativação do cromossoma X pode, no entanto, conduzir a que a expressão fenotípica de uma mesma mutação seja diferente. Por exemplo, num caso relatado de gémeas monozigóticas que apresentavam uma mutação *missense* no exão 11 do gene *PDHA1* (c.1100A>T), constatou-se que a gémea com a clínica mais grave apresentava um padrão de inativação do cromossoma X enviesado de 75:25, favorecendo a expressão da enzima

mutada, Enquanto a gémea com sintomatologia menos severa apresentava uma proporção de inativação de cerca de 50:50²⁵⁹.

4. Diagnóstico da Síndrome de Leigh

4.1. Perspetiva geral do diagnóstico das doenças mitocondriais

As doenças mitocondriais são caracterizadas por terem na sua generalidade uma significativa heterogeneidade clínica e genética, bem como a ausência de uma boa correlação entre o fenótipo e genótipo. Estas características tornam a obtenção de um diagnóstico, um processo complexo e moroso. Na maioria dos casos, o diagnóstico das doenças mitocondriais engloba várias áreas de estudo, nomeadamente a avaliação de achados clínicos, a investigação de parâmetros bioquímicos e a realização de testes genéticos. De um modo geral, para se iniciar o diagnóstico destas patologias deve-se partir de uma suspeição clínica de doença mitocondrial²⁶⁰. Normalmente, esta consiste no aparecimento de uma doença progressiva que afeta múltiplos órgãos sem aparente relação, acompanhada de acidose metabólica e outros sintomas como episódios mimetizadores de AVC, ataxia, epilepsia, ou atraso no crescimento^{260,261}. De seguida, devem ser realizados testes laboratoriais para a medição de vários metabolitos no sangue, urina e LCR, bem como outros exames complementares que avaliem os aspetos neurológicos, oftalmológicos, gastroenterológicos, endócrinos, cardíacos entre outros^{260,261}. Após a determinação de um quadro completo da sintomatologia e dos achados laboratoriais e imagiológicos, averigua-se se o doente se enquadra nalguma das formas sindrómicas das doenças mitocondriais, como a síndrome de Leigh, ou se pelo contrário não satisfaz todos os critérios existentes para as formas sindrómicas e é categorizado como sendo uma doença mitocondrial não sindrómica²⁶¹. Caso pertença a uma síndrome específica pode-se partir logo para a pesquisa das mutações que são mais frequentemente encontradas. Caso não pertença, deve proceder-se a outras análises, nomeadamente estudos bioquímicos e análises genéticas mais abrangentes^{261,262}. O processo descrito acima consiste na abordagem tradicional do diagnóstico das doenças mitocondriais, no qual se prioriza o estudo fenotípico e só depois são realizadas análises genéticas. Contudo, atualmente a abordagem está a modificar-se, dando um papel mais preponderante às metodologias genéticas, como primeiro passo no diagnóstico das doenças mitocondriais²⁶³.

No restante deste trabalho ir-se-á falar sobre as diferentes vertentes do diagnóstico da síndrome de Leigh, sendo elas o exame clínico e história familiar, as investigações bioquímicas laboratoriais e em biópsias musculares, o diagnóstico radiológico e o diagnóstico genético²⁶⁴. Na figura 50 está esquematizado um possível algoritmo para o diagnóstico da síndrome de Leigh.

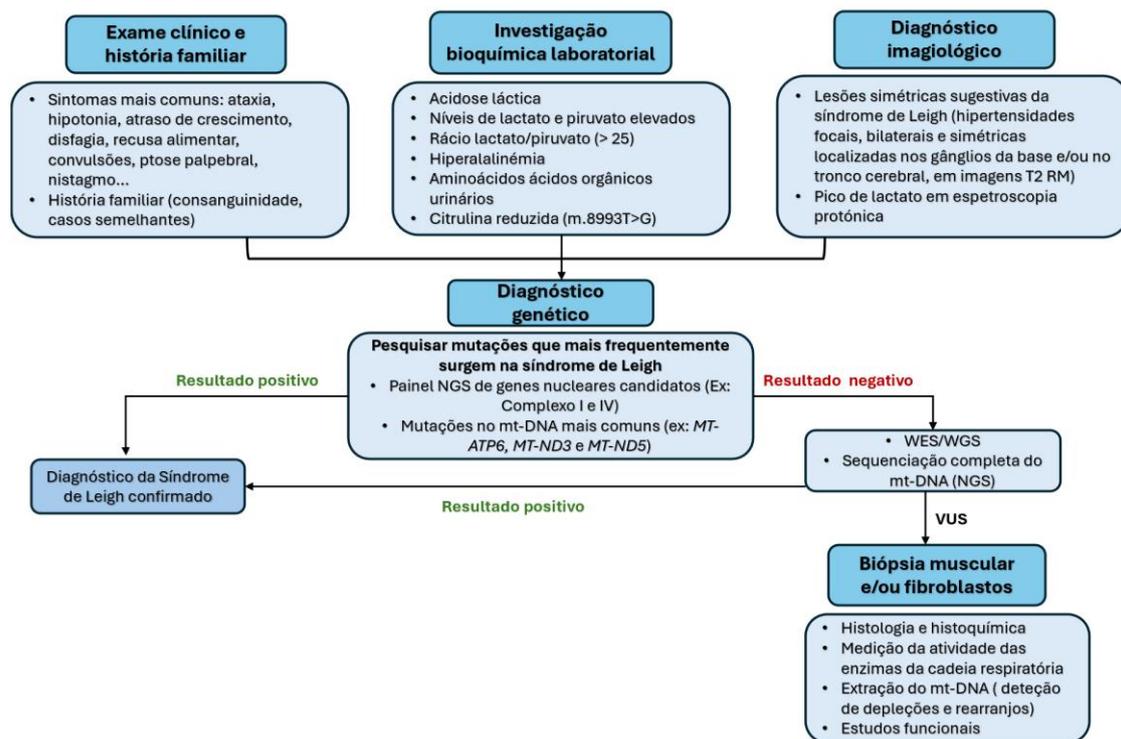


Figura 50. Algoritmo de diagnóstico para a síndrome de Leigh. Adaptado de: (264).

4.2. Exame clínico e história familiar

A primeira abordagem no diagnóstico é a realização de um estudo abrangente da sintomatologia clínica apresentada. No caso da síndrome de Leigh, os sintomas são altamente heterogêneos sendo que existem manifestações clínicas em quase todos os órgãos. Contudo, as apresentações clínicas mais frequentemente observadas são aquelas que afetam o sistema nervoso, os músculos e os olhos^{144,197,198}. Os sintomas que são habitualmente encontrados são a ataxia, hipotonia, atraso de crescimento, disfagia, recusa alimentar, convulsões, ptose palpebral e nistagmo. Outras apresentações clínicas menos comuns são tubulopatia renal, diabetes, cardiomiopatia hipertrófica e hepatomegalia^{144,197,198}. Deste modo, devem ser realizados os mais diversos tipos de exames, que avaliem os aspectos neurológicos, oftalmológicos, gastroenterológicos, endócrinos, cardíacos, entre outros. Adicionalmente, há que evidenciar quando é que se deu o início da doença e qual foi o *stress* metabólico que espoletou o surgimento dos sintomas²⁶⁴.

Sempre que possível é essencial realizar-se uma história familiar detalhada com pelo menos três gerações, devendo os membros ser interrogados sobre a existência de consanguinidade e de casos semelhantes na família²⁶⁴. Caso tal se verifique, a construção de heredogramas pode elucidar sobre qual será o padrão de hereditariedade genética que está subjacente. Esta avaliação da história familiar permite também avaliar a penetrância da doença, a heterogeneidade fenotípica ao longo das gerações e elucidar uma possível evolução da doença¹⁶⁷. Na eventualidade de se conseguir estabelecer um padrão de hereditariedade evidente, é possível direcionar a subsequente procura de mutações. Por exemplo, face a um padrão de hereditariedade matrilinear, o caminho a seguir será

sequenciar o DNA mitocondrial, de modo a encontrar a mutação presente. Pelo contrário, numa situação em que apenas uma geração é afetada pela doença, pode-se assumir que esta será causada por uma mutação autossômica recessiva ou *de novo*, levando a que o foco dos estudos genéticos se direcione para o genoma nuclear¹⁶⁷.

4.3. Investigação bioquímica

Uma das primeiras abordagens no diagnóstico das doenças mitocondriais é a análise de metabolitos no sangue e urina. Os metabolitos que classicamente são medidos são o piruvato e o lactato²⁶⁵. De facto, deficiências na fosforilação oxidativa conduzem a alterações no equilíbrio redox nas células, levando a uma redução do rácio NAD^+/NADH , o que vai influenciar a atividade de várias enzimas envolvidas em processos metabólicos²⁶⁶. Uma destas enzimas afetadas é o complexo piruvato desidrogenase (PDHc), que está encarregue de converter o piruvato em acetil-CoA, ao mesmo tempo que reduz o NAD^+ em NADH . Uma redução do rácio NAD^+/NADH inibe o PDHc, o que conduz a um aumento dos níveis de piruvato. O piruvato acumulado é depois metabolizado em lactato pela enzima lactato desidrogenase, ou pode sofrer uma reação de transaminação catalisada pela alanina aminotransferase levando à formação de alanina. Assim, ambos os metabolitos (lactato e alanina) ficam aumentados no sangue, urina e LCR^{265,266}. Um aumento do lactato provoca acidose láctica, que é um dos achados clínicos que muitas vezes surge nas doenças mitocondriais. Adicionalmente, uma forma de averiguar se o potencial redox está afetado por um defeito primário na cadeia respiratória, é através da determinação do rácio lactato/piruvato. Este rácio encontra-se aumentado (>25) quando há uma alteração do potencial redox celular. Contudo, no caso de uma deficiência no PDHc este rácio encontra-se normal ou reduzido, apesar de ambos os metabolitos se encontrarem elevados²⁶². Na síndrome de Leigh, em particular nos casos de deficiências do complexo I, um estudo verificou que os níveis de lactato se encontravam elevados no sangue e LCR, porém esta elevação não permitia distinguir as diferentes mutações subjacentes, servindo apenas como indicador de uma alteração na fosforilação oxidativa²⁰¹. Além disso, as determinações destes metabolitos não são específicas das doenças mitocondriais, podendo estar elevados noutras condições^{262,265}. No caso de os valores de lactato serem normais, mas houver uma suspeição clínica de uma deficiência na fosforilação oxidativa, deve realizar-se uma prova de sobrecarga com glucose com doseamento no sangue do lactato, de modo a revelar uma alteração no metabolismo energético mitocondrial²⁶².

Para além destes metabolitos podem ainda ser determinados os valores de creatina cinase, carnitina total e livre, e acilcarnitinas no plasma e urina, bem como aminoácidos e ácidos orgânicos urinários. Estes metabolitos não são suficientemente específicos para apontarem para uma mutação em concreto, mas podem direcionar a pesquisa de certas mutações e complementar a avaliação clínica²⁶⁷. Outro metabolito que pode ser doseado no plasma é a citrulina cujo teor se encontra reduzido em doentes com a mutação m.8993T>G, sendo um possível marcador para esta mutação²⁶⁸. Mais recentemente, foram identificados dois novos biomarcadores que apresentam maior sensibilidade e especificidade para as doenças mitocondriais. São eles o fator de crescimento de fibroblastos-21 (FGF-21) e fator de crescimento e diferenciação-15 (GDF-15). O primeiro marcador foi demonstrado como estando elevado em doentes com manifestações musculares de deficiências da fosforilação oxidativa, e o segundo foi apontado como um

bom marcador na previsão da gravidade da doença²⁶⁷. Contudo, ambos também podem estar elevados noutras doenças não mitocondriais, como cancro, diabetes ou doença hepática²⁶⁸. Mais estudos deverão ser feitos para poderem ser implementados na prática clínica.

4.4. Diagnóstico imagiológico

Um dos aspetos basilares no diagnóstico da síndrome de Leigh é a realização de exames imagiológicos do cérebro. O exame em que melhor se observa as lesões no cérebro é a ressonância magnética. Tipicamente, na síndrome de Leigh, os achados mais comuns, na imagem em T2, são as hiperdensidades focais, bilaterais e simétricas localizadas nos gânglios da base e/ou no tronco cerebral, como se pode observar na figura 51. Estas lesões podem também surgir noutras regiões do cérebro, como cerebelo, tálamo, medula espinal, substância nigra, núcleo rubro e substância branca cerebral^{198,265,269}. De facto, estas lesões observadas na ressonância magnética são exatamente as lesões espongiiformes focais, necrotizantes e simétricas descritas por Denis Leigh em biópsias cerebrais¹⁸⁵. Outro exame que se pode realizar é a espectroscopia protónica, que fornece dados sobre as concentrações dos metabolitos ao nível do LCR e do parênquima cerebral, sendo que no caso das doenças mitocondriais é comum haver uma elevação da concentração de lactato¹⁹⁸. Contudo, nem sempre os níveis de lactato se encontram elevados neste exame²⁶⁴.

Através de diferentes achados na ressonância magnética é possível tirar algumas ilações das mutações que podem estar subjacentes. Por exemplo, em doentes com mutações no gene *SURF1* é comum o aparecimento de degenerescência olivar hipertrófica²⁷⁰. Foi também estabelecido um padrão característico na ressonância magnética em doentes com deficiências no complexo I, nos quais a presença de lesões bilaterais e simétricas no tronco cerebral em conjunto com pelo menos uma anomalia no corpo estriado e elevação dos teores de lactato é mais frequentemente observável neste grupo de doentes do que noutros doentes com deficiências na fosforilação oxidativa²⁷¹.

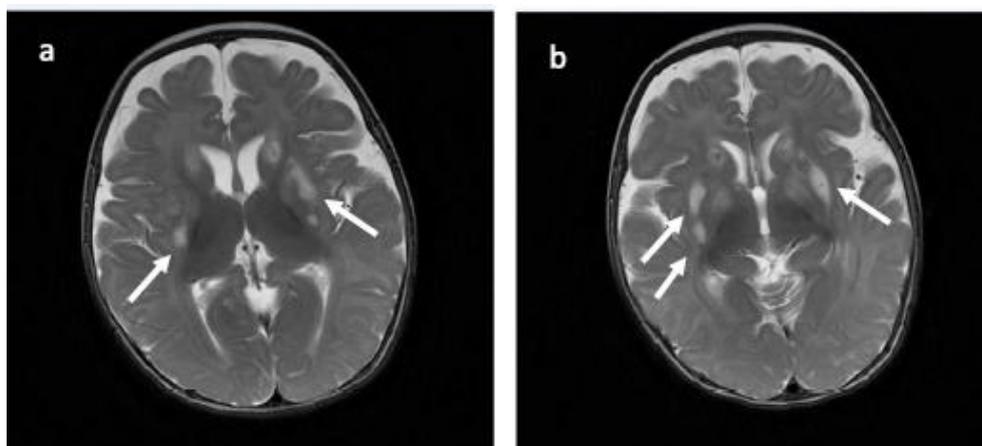


Figura 51. Imagens de ressonância magnética T2, em que as setas demonstram hiperdensidades focais, bilaterais e simétricas localizadas nos gânglios da base, que são comumente encontrados na síndrome de Leigh.. Adaptado de: (272).

4.5. Histoquímica do músculo e medição da atividade das enzimas da cadeia respiratória

Caso não se consiga chegar a nenhuma conclusão sobre quais os genes que poderão estar envolvidos na origem da doença, ter-se-á de partir para outras avaliações bioquímicas, nomeadamente, a realização de biópsias de tecido muscular e/ou de outros tecidos, de modo a poderem ser realizados exames histológicos e de doseamento da atividade dos complexos da cadeia respiratória. Os exames histológicos são uma ferramenta auxiliar de diagnóstico, que tradicionalmente englobam a preparação de cortes histológicos de músculo esquelético para a deteção de alterações morfológicas e estruturais. Na figura 52 encontram-se cortes histológicos de músculo esquelético com diferentes colorações, demonstrando alterações patológicas características das doenças mitocondriais. Como primeira coloração para observação destes achados é usada a hematoxilina e a eosina. Uma das observações ultra-estruturais mais frequentemente analisada nas doenças mitocondriais são as fibras vermelhas rasgadas (RRF)²⁶⁰. A sua observação é feita com a coloração de tricrómio Gomorri modificada, e estas consistem em fibras musculares com uma acumulação subsarcolémica de mitocôndrias anómalas, que é um achado comum nas doenças mitocondriais^{260,273,274,275}. No entanto, as RRFs podem aparecer noutras condições para além das doenças mitocondriais como distrofia muscular, polimiosite e até no músculo de atletas saudáveis²⁶⁰. Além disso, no caso da síndrome de Leigh causado por mutações no gene *MT-ATP6*, a presença destes achados é incomum²⁷³. Além desta, são utilizadas outras técnicas de histoquímica para a caracterização de enzimas oxidativas como a citocromo c oxidase (COX) e succinato desidrogenase (SDH). A coloração da succinato desidrogenase é usada para avaliar a atividade do complexo II^{273,276,277}. No caso da coloração da COX, a ausência de fibras com coloração COX positiva é indicativa de uma deficiência da atividade do complexo IV^{273,276}. É comum nos doentes com deficiências da COX, a existência de mosaicismo nos cortes histológicos, isto revela que a mutação subjacente é heteroplasmática, havendo, portanto, diferentes percentagens de mtDNA mutado nas células^{273,276,277}. Nos doentes com síndrome de Leigh pode observar-se a presença de fibras musculares COX negativas com deficiência em succinato desidrogenase, porém há também o relato de casos em que as biópsias musculares são normais¹⁹⁸. Embora estas técnicas ainda sejam utilizadas, estes padrões histológicos também são observados nas doenças mitocondriais secundárias, o que torna difícil de distingui-las das doenças mitocondriais primárias. Adicionalmente, existem casos de doenças mitocondriais primárias sem alterações histológicas, o que não permite fazer um diagnóstico definitivo a partir destes achados^{260,261,262}.

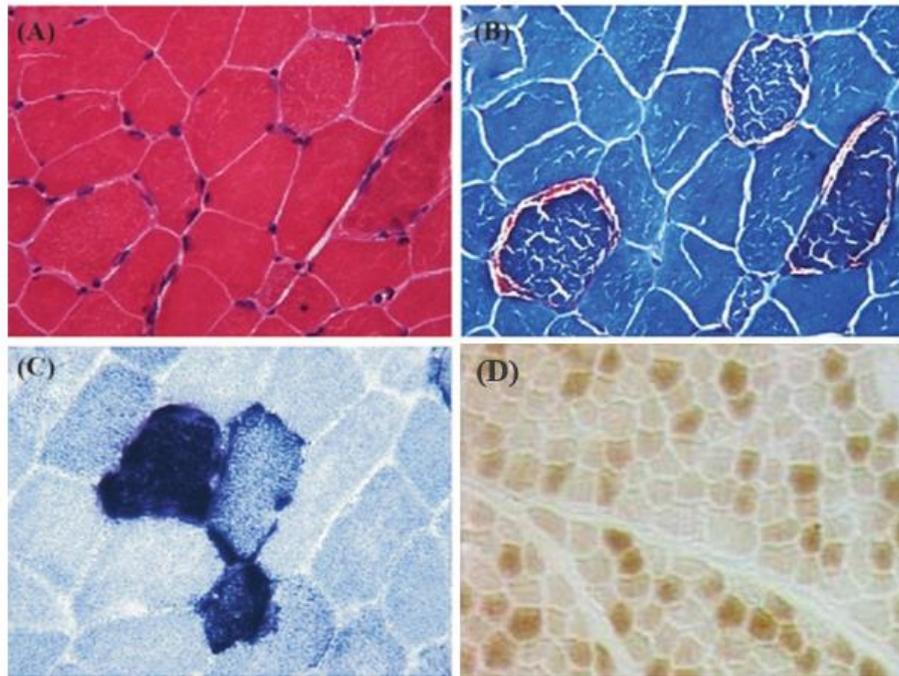


Figura 52. Cortes histológicos de músculo esquelético com alterações patológicas características das doenças mitocondriais. (A) Hematoxilina e eosina; (B) Fibras vermelhas rasgadas (RRF) com coloração de tricrómio Gomori modificada; (C) Coloração para succinato desidrogenase com proliferação mitocondrial (SDH); (D) Coloração para COX de um doente com LS devido a mutações no gene *SURF1*. Adaptado de: (273), (274)

A medição da atividade enzimática dos complexos e das enzimas individuais da cadeia respiratória tem sido o *gold standard* do diagnóstico das doenças mitocondriais²⁷⁵. A realização destas medições permite obter informações sobre o estado global da fosforilação oxidativa, assim como da atividade enzimática de cada um dos componentes da cadeia respiratória²⁶⁵. Relativamente ao tipo de amostra que é usada para a realização destas determinações, devem ser utilizadas preferencialmente biópsias de músculo esquelético fresco ou então, se não for possível a análise imediata, estas deverão ser prontamente congeladas a -70°C ^{265,278}. A preferência do músculo esquelético deve-se ao facto de este ser um tecido rico em mitocôndrias e possuir uma elevada exigência energética, bem como o facto de na maioria das doenças mitocondriais o tecido muscular ser afetado²⁶⁵. Podem também ser utilizados fibroblastos através de biópsia de pele, com a vantagem que este tecido poder ser armazenado e utilizado para testes futuros. As medições das atividades das enzimas da cadeia respiratória são feitas através de métodos espectrofotométricos, que detetam alterações nos valores de absorvências face à formação ou consumo de certos compostos, a comprimentos de onda específicos^{265,278}. Por exemplo, para a medição da atividade do complexo I (a sua deficiência é uma das principais causas da síndrome de Leigh) é medido o decréscimo da absorvência devido à oxidação do NADH a 340nm, na presença de ubiquinona²⁷⁸. É recomendado que sejam usados controlos internos dentro do ensaio aquando da interpretação dos resultados, de forma a poderem ser estabelecidas comparações entre os valores dos controlos e dos doentes²⁶⁵. Adicionalmente, devem ser medidas as atividades de enzimas mitocondriais de referência, como a citrato sintase e a succinato desidrogenase, para se poder normalizar a atividade dos complexos face à atividade destas enzimas, garantindo resultados mais fidedignos^{265,278}.

Para determinar a capacidade global de geração de energia pelas mitocôndrias, são

usados métodos de determinam a taxa de produção de $^{14}\text{CO}_2$. Para tal são administrados substratos (piruvato, malato ou succinato) marcados com ^{14}C às células, sendo depois avaliada a taxa de conversão destes substratos através da medição de $^{14}\text{CO}_2$ que é libertado²⁶⁵. Outro método utilizado é a medição da taxa de consumo de oxigénio na presença de diferentes substratos em mitocôndrias isoladas por respirometria^{262,264,265}.

4.6. Diagnóstico genético

Tradicionalmente, o diagnóstico de doenças mitocondriais segue a abordagem *function to gene* centrada na realização de uma biópsia muscular. Isto significa que se começa por avaliar o fenótipo, as características bioquímicas e enzimáticas, e só depois é que se parte para a sequenciação de genes candidatos individuais^{279,280}. Contudo, esta abordagem possui algumas desvantagens, em particular o facto destas medições apresentarem baixa especificidade e sensibilidade para as doenças mitocondriais²⁷⁹, e a obtenção de uma biópsia muscular ser um processo invasivo que exige anestesia, algo que inibe a função mitocondrial, podendo levar a complicações nestes doentes²⁸¹. De facto, ao longo dos anos vários autores criaram critérios de diagnóstico para as doenças mitocondriais, com o intuito de standardizar o diagnóstico destas doenças e auxiliar os clínicos aquando da observação destes doentes^{282,283}. Estes critérios têm por base a conjugação das observações clínicas, com os achados bioquímicos, enzimáticos e funcionais, de forma a criar critérios *major* e *minor*. Assim, dependendo do cumprimento dos critérios pode-se obter um diagnóstico de doença mitocondrial “definitiva”, “possível”, “provável” ou “improvável”^{282,283}. Contudo, apesar de serem sensíveis, estes critérios não são específicos, uma vez que indivíduos com doenças mitocondriais podem apresentar análises laboratoriais normais ou histologia muscular normal. Até mesmo outras doenças podem enquadrar-se dentro destes critérios²⁶¹. Com o desenvolvimento e maior facilidade de utilização de técnicas de sequenciação de nova geração (NGS), tem havido necessidade de se repensar a abordagem do diagnóstico das doenças mitocondriais, dando prioridade aos testes genéticos, seguidos de testes funcionais para validação^{279,280,284}. Além disso, para se obter um diagnóstico definitivo, é necessário saber-se qual é a causa subjacente, isto é, saber qual ou quais são as mutações subjacentes, sendo necessário recorrer a métodos de NGS²⁸⁴. Os métodos de NGS englobam várias metodologias, entre as quais a sequenciação total do mtDNA, o uso de painéis de sequenciação de genes, a sequenciação completa do exoma (WES) e a sequenciação completa do genoma (WGS). Na figura 53 estão esquematizadas as abordagens de diagnóstico das doenças mitocondriais (a abordagem tradicional e as novas abordagens centradas na genética).

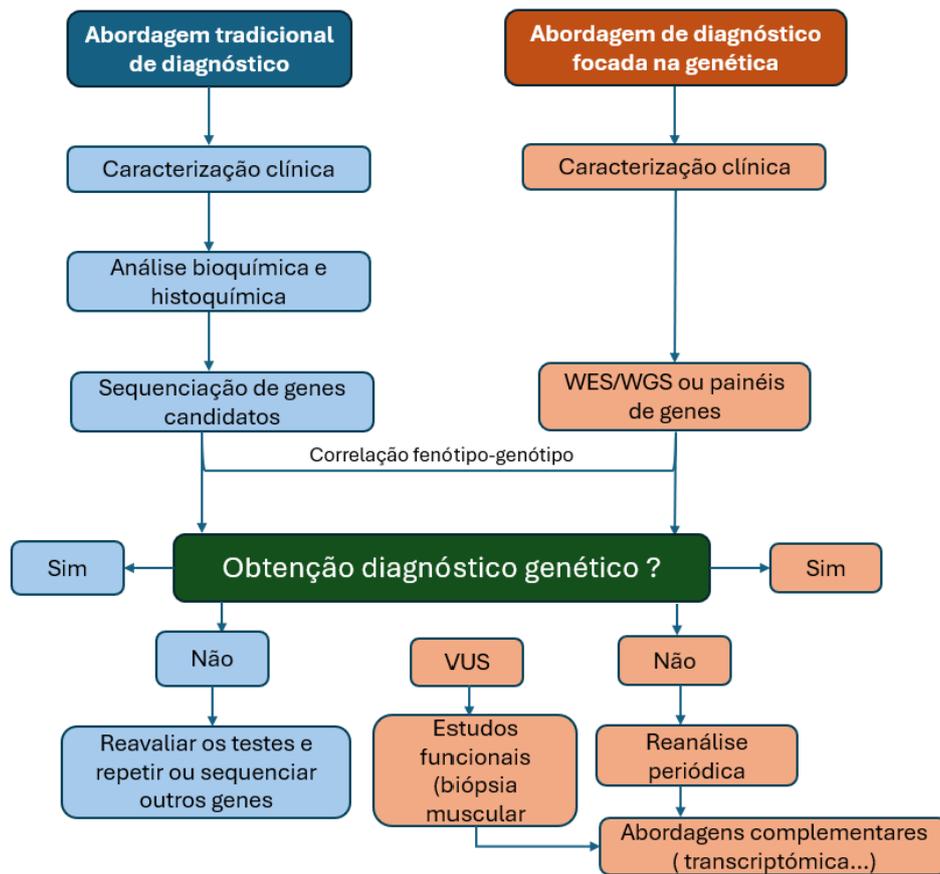


Figura 53. Comparação entre a abordagem tradicional de diagnóstico das doenças mitocondriais e as novas abordagens focadas na genética. Adaptado de: (279)

Nalguns casos, uma primeira abordagem no diagnóstico genético começa por partir logo para o *screening* de mutações específicas. Estes casos são possíveis quando a clínica apresentada é bastante definida e sabe-se que é causada por um número limitado de mutações. O exemplo mais clássico é a síndrome de MELAS que é causada na maioria dos casos pela mutação m.3243A>G²⁸⁵. Contudo, no caso da síndrome de Leigh isto não acontece, pois para além da clínica ser variada, esta é geneticamente heterogénea, com cerca de 90 genes nucleares e mitocondriais associados ao surgimento dos sintomas²⁰⁰. Deste modo, o diagnóstico genético deverá ser mais abrangente avaliando ambos os genomas, mitocondrial e nuclear. Como primeira abordagem deve analisar-se o mtDNA. Devem ser realizados três tipos de análises: *long range* PCR para a deteção de rearranjos de grande escala, sequenciação do mtDNA, idealmente por métodos de NGS, ou através da sequenciação de Sanger para a deteção de *single nucleotide variants* (SNVs) e quantificação dos níveis de heteroplasmia e, por fim, real time PCR para quantificar o número de cópias do mtDNA²⁸⁶. Podem ser usadas amostras de sangue ou urina, porém para analisar o número de cópias, a replicação e a heteroplasmia do mtDNA é melhor utilizar-se a biópsia muscular, pois algumas mutações, deleções e depleções do mtDNA são apenas detetáveis em tecidos com elevadas necessidades energética, e onde o fenótipo é expresso²⁸⁴. Caso não seja detetada nenhuma mutação no mtDNA, deve então proceder-se à investigação do genoma nuclear.

Para a testagem de mutações nos genes nucleares podem ser usadas duas estratégias

principais: a sequenciação específica de genes (já explicada anteriormente) ou a utilização de painéis de genes por NGS, WES ou WGS²⁸⁷. Quanto aos painéis de genes, estes podem ser expansivos englobando regiões exónicas de até 1000 genes, todos envolvidos em doenças mitocondriais de hereditariedade mendeliana, ou então podem ser usados painéis direcionados a genes específicos²⁸⁴. Por exemplo, no caso de se constatar que existe uma deficiência no complexo I, pode requisitar-se um painel para todos os genes que constituem o complexo I, bem como para os genes que codifiquem para os fatores de montagem e proteínas auxiliares deste complexo^{284,287}. As vantagens são a elevada cobertura e a facilidade de interpretação dos dados. A grande desvantagem é que estes painéis podem rapidamente ficar desatualizados devido à contínua descoberta de novos genes com mutações²⁸⁴. Na eventualidade de não se conseguir determinar uma mutação com recurso a painéis de genes, deve então partir-se para WES e WGS. No WES faz-se a sequenciação dos exões, que correspondem à região codificante do genoma, enquanto no WGS faz-se a sequenciação de todo o genoma. A grande vantagem destas técnicas é que são métodos imparciais de deteção de variantes, ou seja, são ideais para a pesquisa de novos genes com mutações. Na globalidade, a utilização de WES e WGS permite obter uma capacidade de diagnóstico de cerca de 60%^{288,289}. Num estudo de coorte realizado a um grupo de doentes com síndrome de Leigh, foi possível detetar por métodos NGS 49 novas variantes, sendo que duas delas foram detetadas por WGS localizadas em regiões intrónicas do gene *NARS2*²⁹⁰. Noutro artigo é descrito o caso de um doente diagnosticado com síndrome de Leigh aos 3 anos de idade, mas que apenas aos 19 anos foi possível identificar a mutação subjacente. Neste caso, a doença era causada por uma mutação *missense* no gene *ECHS1* que foi descoberta através de análise por WES e uma deleção de um gene inteiro que foi detetada por análise de microarray²⁹¹. Idealmente, as análises de WES e WGS devem ser feitas em trio, isto é, devem ser analisadas as amostras do doente e dos seus progenitores, o que permite estudar a segregação familiar e ainda identificar mutações *de novo*, aumentando a capacidade de diagnóstico²⁸⁴.

Numa análise de WES/WGS podem ser obtidos vários resultados: 1) pode ser identificada uma variante conhecida num gene conhecido associado à doença; 2) pode ser identificada uma variante nova num gene conhecido que causa a doença; 3) pode ser identificada uma variante num gene conhecido, mas que até então não se tinha associado à doença; 4) pode ser identificada uma variante num gene que codifica para uma proteína com função desconhecida; 5) ou então pode não se conseguir identificar nenhuma variante que consiga explicar o fenótipo do doente²⁹². Apenas no primeiro caso é que se consegue chegar a um diagnóstico genético concreto e com certezas²⁹³. Nos restantes resultados em que são descobertas novas variantes há que classificá-las como patogénicas ou não. Para tal podem ser empregues os critérios do *American College of Medical Genetics* (ACMG) para classificar as mutações como patogénicas, provavelmente patogénicas, variantes de significado clínico indeterminado (VUS), provavelmente benignas e benignas²⁹⁴. Os principais critérios de patogénicidade são: se a variante resulta numa perda de função (causada por uma mutação *frameshift*, alteração do padrão de *splicing* ou mutação *nonsense*); se a variante resulta na mesma troca de aminoácidos que uma outra variante patogénica nesse local; se é uma mutação *de novo*; se forem realizados estudos funcionais que demonstrem os efeitos patogénicos da mutação; e por fim se a prevalência da variante for mais elevada em indivíduos afetados do que nos controlos²⁹⁴. No caso de serem descobertas novas variantes no mtDNA, a sua patogénicidade pode ser avaliada usando os mesmos critérios, mas deve ter-se em atenção às características únicas do mtDNA, nomeadamente, à existência de haplogrupos que podem ter mutações em frequências variáveis, e à heteroplasmia do mtDNA, que varia de tecido para tecido, e o seu nível num

tecido específico deve correlacionar-se com a apresentação clínica^{287,295}. Como primeira abordagem para a avaliação da patogenicidade das mutações *missense* podem ser utilizadas ferramentas computacionais (ex.: Polyphen-2, SIFT, MutationTaster) que prevejam o efeito que as variantes encontradas poderão causar na função da proteína²⁹⁴. De facto, num estudo realizado em Portugal a um grupo de 40 doentes com síndrome de Leigh, foram descobertas duas novas mutações no gene *NDUFS1*, as quais foram testadas por meio de ferramentas computacionais aliadas a estudos de segregação, de modo a comprovar a sua possível patogenicidade¹⁹². Contudo, estes métodos não devem ser considerados como provas definitivas de patogenicidade, sendo necessário por vezes recorrer a métodos mais robustos, particularmente quando são obtidas variantes de significado clínico indeterminado (VUS). Efetivamente, a melhor estratégia para averiguar a patogenicidade de uma VUS é a realização de estudos funcionais²⁹³. Na realização destes estudos podem ser usadas diferentes abordagens, não existindo um método que seja transversal para a validação de todas as mutações. Deste modo, o método a utilizar vai depender de caso para caso²⁹². Um dos métodos usados, é o estudo da expressão das proteínas da cadeia respiratória. Classicamente, a técnica utilizada para averiguar se a variante genética resulta numa diminuição da expressão da proteína correspondente é o Western Blot. Outras técnicas, como SDS-PAGE e blue-native PAGE, são usadas para detetar alterações nos níveis de *steady-state*, e avaliar a integridade das proteínas constituintes dos complexos^{284,292,293}. Nestes estudos são usadas como amostras biópsias de músculo ou fibroblastos dos doentes. Nos estudos de validação funcional, o tipo de ensaios que são mais frequentemente aplicados são os *rescue experiments*. Estes basicamente consistem na reintrodução do gene *wild type* (sem a mutação) em células com a mutação em estudo, e na observação de uma normalização do fenótipo após a sua reintrodução. Para estes ensaios serem realizados é essencial que o fenótipo bioquímico ou celular que se vai tentar restabelecer seja dependente do gene em estudo²⁹³. Caso contrário, não é possível demonstrar a patogenicidade da mutação. Como sistema para a realização destes ensaios podem ser usadas células do doente, linhas celulares, organismos modelo e células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs)^{292,293}.

Uma abordagem que ainda está no início da sua utilização para o diagnóstico das doenças mitocondriais é a transcritómica. Na análise do transcritoma é utilizado o RNA-seq, que consiste na utilização de técnicas NGS para avaliar a quantidade e a sequência das moléculas de mRNA presentes nas células. No contexto do diagnóstico, a utilização de RNA-seq fornece informações sobre o efeito que certas mutações podem ter na expressão do mRNA. Em concreto, permite detetar eventos de *splicing* alternativo aberrante, alterações nos níveis dos transcritos e consegue detetar a expressão mono-alélica^{284,296}. Como já foi dito anteriormente, muitas vezes após a análise de WES e WGS podem ser obtidas variantes que dependem da comprovação da sua patogenicidade, assim como podem não ser encontradas variantes candidatas. Uma das vantagens na utilização de RNA-seq é poder ser conjugado com WES e WGS para a validação funcional de certas variantes e ajudar na descoberta de novas variantes^{284,292,296}. Foi efetuado um estudo em que se realizou RNA-seq em fibroblastos de 48 doentes com doenças mitocondriais, nos quais não se tinha conseguido esclarecer a causa genética por WES. A utilização de RNA-seq permitiu diagnosticar cinco doentes dos 48, e identificar variantes candidatas nos restantes doentes, contribuindo para aumentar em 10% a capacidade de diagnóstico WES quando acoplado a RNA-seq²⁹⁷. Noutro estudo feito a um grupo de 22 doentes com fenótipos neurológicos complexos (com início na idade pediátrica), nos quais o diagnóstico por WES tinha sido inconclusivo ou negativo, realizou-se uma análise conjunta de WGS e RNA-seq. Um diagnóstico concreto foi obtido em 25% dos casos,

demonstrando o potencial da utilização de RNA-seq em conjunto com técnicas de sequenciação genómica, para o diagnóstico destas doenças²⁹⁸.

5. Conclusão

As doenças mitocondriais são um grupo importante de patologias que pertencem às doenças hereditárias do metabolismo. A sua fisiopatologia advém do facto de provocarem disfunções no metabolismo energético mitocondrial. Estas disfunções são causadas por mutações patogénicas em genes nucleares e mitocondriais que codificam para proteínas, não só envolvidas no metabolismo energético mitocondrial, como também em proteínas envolvidas na manutenção do mtDNA e na biogénese das mitocôndrias. Dentro das doenças mitocondriais podem ser distinguidas diferentes síndromes, que reúnem conjuntos de sinais e sintomas característicos. Uma dessas síndromes é a síndrome de Leigh.

A síndrome de Leigh ou encefalomielopatia subaguda necrotizante, é uma das doenças neurodegenerativas mitocondriais mais frequentemente observada em crianças. Possui uma ampla variedade fenotípica, sendo os sintomas mais proeminentes as manifestações neuromusculares. Uma das principais características da síndrome de Leigh é o surgimento de lesões simétricas necrotizantes no tronco cerebral e nos gânglios da base. Geneticamente, a síndrome de Leigh é igualmente heterogénea, podendo ser causada por mutações em vários genes nucleares e mitocondriais. As principais disfunções mitocondriais a cursarem com esta síndrome são as deficiências no complexo I, no complexo IV (causadas por mutações no gene *SURF1* principalmente) e no complexo V da cadeia respiratória (afetando o gene *MT-ATP6*).

O diagnóstico da síndrome de Leigh requer uma abordagem multidisciplinar. Esta abordagem engloba a realização de exames laboratoriais para a deteção de metabolitos (principalmente piruvato e lactato), um exame clínico detalhado, exames imagiológicos (para deteção das lesões cerebrais características) e exames histopatológicos e de medição da atividade dos complexos da cadeia respiratória. Contudo, o foco do diagnóstico, atualmente, tem sido a utilização de técnicas NGS como primeira abordagem. As análises de WES e WGS vieram revolucionar o diagnóstico, permitindo uma maior rapidez na obtenção de resultados e uma expansão do conhecimento das mutações que originam a síndrome de Leigh. No entanto, estes métodos possuem alguns desafios, nomeadamente a validação de VUS. É necessário, portanto, realizar outras análises e estudos funcionais que permitam comprovar a patogenicidade das novas mutações descobertas. Podem ser usados técnicas mais tradicionais como a determinação da atividade enzimática dos complexos da CR ou ensaios de recuperação do fenótipo; no entanto, novas metodologias como a transcritómica têm vindo a provar ser um instrumento útil na validação deste tipo de variantes.

6. Bibliografia

1. Química Analítica [Internet]. Affidea Portugal. [citado 24 de junho de 2024]. Disponível em: <https://affidea.pt/servico/quimica-analitica/>
2. Endocrinologia [Internet]. Affidea Portugal. [citado 24 de junho de 2024]. Disponível em: <https://affidea.pt/servico/endocrinologia/>
3. Imunologia [Internet]. Affidea Portugal. [citado 24 de junho de 2024]. Disponível em: <https://affidea.pt/servico/imunologia/>
4. Aptio Automation [Internet]. [citado 24 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.siemens-healthineers.com/pt/laboratory-automation/systems/aptio-automation>
5. Siemens Healthcare Diagnostics. Atellica® Solution - Guia do operador. 2018.
6. Burtis CA, Bruns DE, Sawyer BG. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 7ª edição. Saunders; 2015. 1075 p.
7. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. Clinical chemistry: techniques, principles, correlations. 6ª edição. Williams & Wilkins; 2010. 706 p.
8. Siemens Healthcare Diagnostics. Proteína Total II (TP). 2017.
9. Siemens Healthcare Diagnostics. Proteína na Urina/no Líquido Cefalorraquidiano (UCFP). 2020.
10. Siemens Healthcare Diagnostics. Albumina (Alb). 2019.
11. Direção-Geral da Saúde. Prevenção e Avaliação da Nefropatia Diabética. Revista Portuguesa de Diabetes. 2011;6(1):39–41.
12. Siemens Healthcare Diagnostics. Microalbumina₂ (μALB₂). 2017.
13. Siemens Healthcare Diagnostics. Alfa-1-antitripsina (AAT). 2019.
14. Siemens Healthcare Diagnostics. Imunoglobulina G₂ (IgG₂). 2017
15. Siemens Healthcare Diagnostics. Imunoglobulina A₂ (IgA₂). 2017
16. Siemens Healthcare Diagnostics. Imunoglobulina M₂ (IgM₂). 2017
17. Siemens Healthcare Diagnostics. IgE Total (tIgE). 2017
18. Siemens Healthcare Diagnostics. Proteína C Reativa de Intervalo Alargado (wrCRP). 2019
19. Siemens Healthcare Diagnostics. Proteína C reativa de alta sensibilidade (hsCRP). 2017
20. Ramanathan S, Srinivas CN, Ramanathan S, Srinivas CN. Serum Protein Electrophoresis and Its Clinical Applications. Em: Biochemical Testing - Clinical Correlation and Diagnosis [Internet]. IntechOpen; 2019 [citado 13 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/69537>.
21. Arco SE, Baquio MI, Bovone NS, Crispiani IA, Marco BD, Desimone IV, et al. Recomendaciones del laboratorio clínico en el estudio de las proteínas séricas a partir del proteinograma electroforético. Revista Bioquímica y Patología Clínica. 11 de agosto de 2023;87(3):60–70.
22. Siemens Healthcare Diagnostics. Glicose hexoquinase₃ (GluH₃). 2017.
23. Sapra A, Bhandari P. Diabetes. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 13 de junho de 2024]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551501/>
24. Direção-Geral da Saúde (DGS). Norma DGS - Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. 2011.

25. Siemens Healthcare Diagnostics. Insulina (IRI).2017.
26. Direção Geral da Saúde (DGS). Norma DGS - Prescrição de Exames Laboratoriais para Avaliação de Dislipidemias no Adulto. 2015.
27. Siemens Healthcare Diagnostics .Colesterol_2 (Chol_2). 2017.
28. Siemens Healthcare Diagnostics .Triglycerides_2 (Trig_2).2022.
29. Siemens Healthcare Diagnostics .Colesterol HDL Direto (D-HDL).2017.
30. Siemens Healthcare Diagnostics .Apolipoproteína A-1 (APO A1).2019
31. Siemens Healthcare Diagnostics .Apolipoproteína B (APO B).2019
32. Siemens Healthcare Diagnostics .Creatinina_2 (Crea_2). 2017.
33. Siemens Healthcare Diagnostics. Azoto Ureico (UN_c).2017.
34. Siemens Healthcare Diagnostics. Ácido Úrico (UA). 2019.
35. Central Laboratortory ARUP laboratories. Critical values list. 2019.
36. Multissensor Integrado A-LYTE (IMT Na K Cl). 2022.
37. Centor RM. Serum Total Carbon Dioxide. Em: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editores. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations [Internet]. 3rd ed. Boston: Butterworths; 1990 [citado 14 de junho de 2024]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK308/>
38. Siemens Healthcare Diagnostics. Dióxido de carbono concentrado (CO2_c). 2017
39. Siemens Healthcare Diagnostics. Amylase_2 (AMY_2). 2019.
40. Labandera, Nadia Rosa Enzimología clínica : principio del análisis en enzimas : guía de estudio práctico / Nadia Rosa Labandera ; Elba Cristina Malarczuk. - 1a ed . - Posadas : Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, 2019. Libro digital, PDF - (Cuadernos de cátedra).
41. Siemens Healthcare Diagnostics. Lipase (Lip).2017.
42. Siemens Healthcare Diagnostics. Alanina Aminotransferase (ALT). 2020.
43. Siemens Healthcare Diagnostics. Aspartato Aminotransferase (AST). 2020.
44. Siemens Healthcare Diagnostics. Gama-glutamil transferase (GGT). 2017.
45. Siemens Healthcare Diagnostics. Fosfatase alcalina, concentrada (ALP_2c). 2017.
46. Siemens Healthcare Diagnostics. Bilirrubina total_2 (TBil_2). 2017.
47. Siemens Healthcare Diagnostics. Bilirrubina direta 2 (DBil_2). 2017.
48. Jacob R, Khan M. Cardiac Biomarkers: What Is and What Can Be. Indian J Cardiovasc Dis Women WINCARS. dezembro de 2018;3(4):240–4.
49. Randox Laboratories Ltd. Bula CK-MB UV-Method RX SERIES.
50. Siemens Healthcare Diagnostics. Mioglobina (MYO). 2017.
51. Siemens Healthcare Diagnostics. Troponina I de Alta Sensibilidade (TnIH). 2017.
52. Siemens Healthcare Diagnostics. Hormona Estimulante da Tiroide 3-Ultra (TSH3-UL).2017.
53. Giovanella L, D’Aurizio F, Ovčariček PP. Biochemical Diagnosis of Thyroid Dysfunctions. Em: Giovanella L, editor. Integrated Diagnostics and Theranostics of Thyroid Diseases [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2023. p. 13–24. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-031-35213-3_3.
54. Siemens Healthcare Diagnostics. Tiroxina Livre (FT4). 2017.

55. Siemens Healthcare Diagnostics. Triiodotironina Livre (FT3). 2017.
56. Siemens Healthcare Diagnostics. Cálcio₂ (CA₂). 2020.
57. Siemens Healthcare Diagnostics. Fósforo Inorgânico (IP). 2017.
58. Siemens Healthcare Diagnostics. Hormona paratiroideia intacta (PTH). 2017.
59. Siemens Healthcare Diagnostics. Vitamina D Total (VitD). 2017.
60. Keohane EM, Walenga JM, Smith LJ. Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications. 5ª edição. Saunders; 2016. 898 p.
61. Siemens Healthcare Diagnostics. Ferro₂ (Iron₂). 2017.
62. Siemens Healthcare Diagnostics. Ferritina (Fer). 2017.
63. Siemens Healthcare Diagnostics. Transferrina (Trf). 2017.
64. Siemens Healthcare Diagnostics. Capacidade Total de Ligação do Ferro (TIBC). 2017.
65. Hoffbrand AV, Moss PAH. Hoffbrand's essential haematology. 7ª edição. Wiley-Blackwell; 2016. 369 p.
66. Siemens Healthcare Diagnostics. Vitamina B12 (VB12). 2017.
67. Siemens Healthcare Diagnostics. Folato (Fol). 2017.
68. Nagpal M, Singh S, Singh P, Chauhan P, Zaidi MA. Tumor markers: A diagnostic tool. Natl J Maxillofac Surg. 2016;7(1):17–20.
69. Siemens Healthcare Diagnostics. Antígeno Específico da Próstata (PSA). 2017
70. Siemens Healthcare Diagnostics. Antígeno Livre Específico da Próstata (fPSA). 2017.
71. Burrell CJ, Howard CR, Murphy FA. Fenner and White's Medical Virology. 5ª edição. Academic Press; 2017. 583 p.
72. Siemens Healthcare Diagnostics. HIV Ag/Ab Combo (CHIV). 2023.
73. BioRad. Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay (REF:72460). 2016.
74. Jaan A, Rajnik M. TORCH Complex. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 20 de junho de 2024]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560528/>
75. Henao-Martínez AF, Johnson SC. Diagnostic tests for syphilis. Neurol Clin Pract. abril de 2014;4(2):114–22. + medical microbiology
76. Siemens Healthcare Diagnostics. Sífilis (Syph). 2017.
77. DIAsource ImmunoAssays. Renin-IRMA (KIP1531). 2023.
78. DIAsource ImmunoAssays. Aldosterone RIA (R-CW-100). 2023.
79. DIAsource ImmunoAssays. Free TESTO-RIA-CT. (KIPI1900). 2023.
80. DIAsource ImmunoAssays. 17- α -Hidroxiprogesterone (17-OHP)-RIA-CT (KIP1409). 2023.
81. DIAsource ImmunoAssays. Androstenodione-RIA-CT. (KIP0451). 2023.
82. Betz D, Fane K. Human Chorionic Gonadotropin. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 23 de junho de 2024]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532950/>
83. nal von minden Drug-Screnn® Single/Multi Test (Urine). 2020.
84. Mascia Brunelli S.p.A.. Mononucleosi Latex. 2022.
85. Tiwari V, Jandu JS, Bergman MJ. Rheumatoid Factor. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 23 de junho de 2024]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532898/>
86. Mascia Brunelli S.p.A.. Waller-Rose Test. 2019.

87. Mascia Brunelli S.p.A. Fever Slide Test Salmonella Typhi H, Fever Slide Test Salmonella Typhi O, Fever Slide Test Salmonella Paratyphi AO, Fever Slide Test Salmonella Paratyphi BO. 2019.
88. Mascia Brunelli S.p.A. Fever Slide Test Proteus OX19, Fever Slide Test Proteus OXK, Fever Slide Test Proteus OX2. 2019.
89. McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management By Laboratory Methods. 23rd ed. ELSEVIER; 2017. 1823 p.
90. Atellica 1500 Automated Urinalysis System [Internet]. [citado 10 de outubro de 2024]. Disponível em: <https://www.siemens-healthineers.com/pt/urinalysis/systems/atellica-1500-automated-urinalysis-system>
91. Bain BJ, Bates I, Laffan MA, Lewis SM. Dacie and Lewis practical haematology. 11ª edição. Churchill Livingstone; 2011. 653 p.
92. Yumizen H2500/H1500 [Internet]. [citado 27 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.horiba.com/bra/medical/products/detail/action/show/Product/yumizen-h2500-h1500-1856/>
93. Evaluation of Yumizen H2500/1500 and Sysmex XN1000 leukocyte diff count for leukemias detection [Internet]. [citado 27 de junho de 2024]. Disponível em: <https://www.horiba.com/sgp/medical/academy/posters/evaluation-of-the-ability-of-the-differential-count-on-two-hematology-analyzers-to-detect-leukemias-verified-by-bone-marrow-and-peripheral-blood-smears/>
94. Horiba Medical. Manual do usuário Yumizen H2500 Yumizen SPS. 2018.
95. Double Hydrodynamic Sequential System (DHSS) [Internet]. [citado 1 de julho de 2024]. Disponível em: <https://www.horiba.com/bra/medical/academy/technology/double-hydrodynamic-sequential-system-dhss/>
96. 10 Part Diff [Internet]. [citado 1 de julho de 2024]. Disponível em: <https://www.horiba.com/int/medical/academy/technology/10-part-diff/>
97. Thelml H, Diem H, Haferlach T. Color Atlas of Hematology. 2a edição. Stuttgart - New York: Thieme; 2004. 198 p.
98. Bizzaro N. Chapter 48 - Pseudothrombocytopenia. Em: Michelson AD, editor. Platelets (Third Edition) [Internet]. Academic Press; 2013 [citado 2 de julho de 2024]. p. 989–97. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123878373000481>
99. Tishkowski K, Gupta V. Erythrocyte Sedimentation Rate. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 2 de julho de 2024]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557485/>
100. DIESSE - Cube 30 Touch [Internet]. [citado 2 de julho de 2024]. Disponível em: <https://www.menarinidiag.pt/pt-pt/home/diagn%C3%B3stico-profissional/hematologia/velocidade-de-sedimenta%C3%A7%C3%A3o-globular/diesse-cube-30-touch#CHARACTER-STICAS>
101. TOSOH Bioscience. Tosoh Automated Glycohemoglobin Analyzer HLC-723G8 (β-Thalassaemia Analysis Mode). 2013.
102. Sherwani SI, Khan HA, Ekhzaimy A, Masood A, Sakharkar MK. Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. Biomark Insights. 3 de julho de 2016;11:95–104.

103. Direção Geral da Saúde (DGS). Norma DGS - Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c. 2011.
104. BCS XP System [Internet]. [citado 3 de julho de 2024]. Disponível em: <https://www.siemens-healthineers.com/pt/hemostasis/systems/bcs-xp-system>
105. Biomerieux SA. VIDAS® D-Dimer Exclusion II™. 2021.
106. Antunes EM, Nascimento F, Rodrigues F, Duran JA, Figueiredo M, Amil M, et al. *Imunohematologia*. 2008.
107. Diagnostic Grifols, S.A. DG gel Confirm. 2010.
108. Jaime-Pérez JC, Almaguer-Gaona C. Rediscovering the Coombs test. *Medicina Universitaria*. 2016;18(72):185–6.
109. Direção-Geral da Saúde (DGS). Norma DGS – Exames Laboratoriais de Gravidez de baixo risco. 2011.
110. Murray, PR, Rosenthal, KS, Pfaller, MA. *Medical Microbiology*. 9ª edição. Saunders,; 2021. 855 p.
111. R., M Connie, C., L Donald. *Textbook of diagnostic microbiology*. 6.a edição. Saunders,; 2019. 1044 p.
112. Pincus D. Microbial identification using the bioMérieux VITEK® 2 system. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. 14 de março de 2014;2.
113. bioMérieux Portugal [Internet]. [citado 11 de junho de 2024]. VITEK® 2 ID Cards. Disponível em: <https://www.biomerieux.pt/produto/vitekr-2-id-cards>.
114. bioMérieux Portugal [Internet]. [citado 11 de junho de 2024]. VITEK 2 AST Cards. Disponível em: <https://www.biomerieux.pt/produto/vitek-2-ast-cards>.
115. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) - Programa Nacional de Controlo da Infecção (PNCI). *Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia*. 2004.
116. Silva A, Costa E, Freitas A, Almeida A. Revisiting the Frequency and Antimicrobial Resistance Patterns of Bacteria Implicated in Community Urinary Tract Infections. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(6):768. Published 2022 Jun 3.
117. Morgan JA, Zafar N, Cooper DB. Group B Streptococcus and Pregnancy. Em: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 8 de junho de 2024]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482443/>
118. Direção Geral da Saúde (DGS). Norma DGS- Exames Laboratoriais da Gravidez de Baixo Risco. 2011.
119. Young A, Toncar A, Leslie SW, Wray AA. Urethritis. Em: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 8 de junho de 2024]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537282/>
120. Lanao AE, Chakraborty RK, Pearson-Shaver AL. Mycoplasma Infections. Em: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 9 de junho de 2024]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536927/>
121. Bio-Rad Laboratories Diagnostics Group. PASTOREXTM STAPH-PLUS. 2015.
122. Bio-Rad Laboratories Diagnostics Group. OPTOCHIN. 2010.
123. Applied Biotech, Inc. Clearview Exact Strep A Cassette. 2005.

124. bioMérieux [Internet]. [citado 11 de junho de 2024]. BacT/ALERT® Culture Media. Disponível em: <https://www.biomerieux-usa.com/bact-alert/culture-media>
125. Vila J, Álvarez-Martínez MJ, Buesa J, Castillo J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(7):406–11.
126. Mini Parasep® | Apacor [Internet]. [citado 11 de junho de 2024]. Disponível em: <https://apacor.com/product/mini-parasep/>
127. Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*. abril de 2003;9(4):247–62.
Monlab SL Cobalto. NOROVIRUS MonlabTest® Ref: MO-076004. 2023.
Monlab SL Cobalto. ROTA-ADENO MonlabTest® Ref: MO-076010. 2023.
128. Monlab SL Cobalto. Giardia+ MonlabTest® Ref: MO-804008. 2023.
129. Biotical health S.L.U.. Biotical E. coli O157:H7 card. Ref: RTB25E. 2020.
130. Makola D, Peura DA, Crowe SE. Helicobacter pylori infection and related gastrointestinal diseases. *J Clin Gastroenterol*. julho de 2007;41(6):548–58.
131. Kibion GmbH. Heliprobe® System / Sistema Heliprobe® - Instruções de utilização. Ref: HPU-011. 2024.
132. Beilby J. Diagnostic Molecular Biology. *Clin Biochem Rev*. fevereiro de 2006;27(1):3–4.
133. Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP. *Kuby immunology*. 8ª edição. New York: W.H. Freeman, Macmillan Learning; 2018.
134. HLA-B27 | General information on our HLA-B27 product series [Internet]. [citado 6 de julho de 2024]. Disponível em: <https://www.hain-lifescience.de/en/products/human-genetics/hla-b27/hla-b27-product-overview.html>
135. FluoroType® technology [Internet]. [citado 6 de julho de 2024]. Disponível em: <https://www.hain-lifescience.de/en/technologies/fluorotype.html>.
136. Hain Lifesciences. FluoroType®HLA-B27 – Teste de genética Molecular para a detecção automatizada do gene humano HLA-B27. 2023.
137. Hain Lifesciences. FluoroType®STI – Teste de genética molecular para a detecção automatizada de patógenos sexualmente transmissíveis a partir de espécimes de pacientes. 2023.
138. Hain Lifesciences. FluoroType®CT – Teste de genética molecular para a detecção automatizada de estripes de Chlamydia trachomatis a partir de espécimes de pacientes. 2023.
139. Hain Lifesciences. FluoroType®NG - Teste de genética molecular para a detecção de estripes de Neisseria gonorrhoeae a partir de espécimes de pacientes. 2023.
140. Unemo Magnus, Ballard Ronald, Ison Catherine, Lewis David, Ndowa Francis, Peeling, Rosanna & World Health Organization (WHO). Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. 2013. 244
141. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 20 de outubro de 2016;2:16080.
142. Bakare AB, Lesnefsky EJ, Iyer S. Leigh Syndrome: A Tale of Two Genomes. *Front Physiol*. 11 de agosto de 2021;12:693734.

143. Aberts, Bruce, Johnson, Alexander, Lewis, Julian, Morgan, David, Raff, Martin, Roberts, Keith, et al. *Molecular Biology of the Cell*. Sixth. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2015. 1465 p.
144. Cooper GM. Mitochondria. Em: *The Cell: A Molecular Approach* 2nd edition [Internet]. Sinauer Associates; 2000 [citado 6 de fevereiro de 2024]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9896/>
145. Osellame LD, Blacker TS, Duchen MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. dezembro de 2012;26(6):711–23.
146. Cooper GM. The Mechanism of Oxidative Phosphorylation. Em: *The Cell: A Molecular Approach* 2nd edition [Internet]. Sinauer Associates; 2000 [citado 7 de fevereiro de 2024]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9885/>
147. Hultman E, Greenhaff PL. Skeletal muscle energy metabolism and fatigue during intense exercise in man. *Sci Prog*. 1991;75(298 Pt 3-4):361–70.
148. Verkhatsky A, Krishtal O. Adenosine Triphosphate (ATP) as a Neurotransmitter. Em: Squire LR, editor. *Encyclopedia of Neuroscience* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2009 [citado 8 de fevereiro de 2024]. p. 115–23. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080450469012456>
149. Archibald JM. Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Curr Biol*. 5 de outubro de 2015;25(19):R911–921.
150. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. *N Engl J Med*. 26 de junho de 2003;348(26):2656–68.
151. Habbane M, Montoya J, Rhouda T, Sbaoui Y, Radallah D, Emperador S. Human Mitochondrial DNA: Particularities and Diseases. *Biomedicines*. 1 de outubro de 2021;9(10):1364.
152. Zeviani M, Spinazzola A, Carelli V. Nuclear genes in mitochondrial disorders. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1 de junho de 2003;13(3):262–70.
153. Kanungo S, Morton J, Neelakantan M, Ching K, Saeedian J, Goldstein A. Mitochondrial disorders. *Ann Transl Med*. dezembro de 2018;6(24):475.
154. Chacinska A, Rehling P. Moving proteins from the cytosol into mitochondria. *Biochem Soc Trans*. novembro de 2004;32(Pt 5):774–6.
155. Chial H, Criag J. mtDNA and Mitochondrial Diseases | Learn Science at Scitable [Internet]. Scitable by Nature Education. 2008 [citado 2024 Feb 14]. Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/mtdna-and-mitochondrial-diseases-903/>
156. Valenti D, Vacca RA. Primary and Secondary Mitochondrial Diseases: Etiologies and Therapeutic Strategies. *J Clin Med*. 20 de julho de 2022;11(14):4209.
157. Baker MJ, Cramer JJ, Thorburn DR, Frazier AE, Stojanovski D. Mitochondrial biology and dysfunction in secondary mitochondrial disease. *Open Biology*. 7 de dezembro de 2022;12(12):220274.
158. Niyazov DM, Kahler SG, Frye RE. Primary Mitochondrial Disease and Secondary Mitochondrial Dysfunction: Importance of Distinction for Diagnosis and Treatment. *Mol Syndromol*. julho de 2016;7(3):122–37

159. Andre Mattman, Sandra Sirrs, Michelle M. Mezei, Ramona Salvarinova-Zivkovic, Majid Alfadhel, Yolanda Lillquist. Mitochondrial disease clinical manifestations: An overview. *BCMJ*. maio de 2011;53(4):183–7.
160. Munnich A, Rustin P. Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet*. 2001;106(1):4–17.
161. DiMauro S, Schon EA, Carelli V, Hirano M. The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nat Rev Neurol*. agosto de 2013;9(8):429–44.
162. Lake NJ, Compton AG, Rahman S, Thorburn DR. Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. *Ann Neurol*. fevereiro de 2016;79(2):190–203.
163. Milone M, Massie R. Polymerase gamma 1 mutations: clinical correlations. *Neurologist*. março de 2010;16(2):84–91.
164. Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders—past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 6 de dezembro de 2004;1659(2):115–20
165. DiMauro S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*. 23 de julho de 2004;1658(1–2):80–8.
166. Davis RL, Liang C, Sue CM. Mitochondrial diseases. *Handb Clin Neurol*. 2018;147:125–41.
167. Jeppesen TD, Duno M, Vissing J. Mutation Load of Single, Large-Scale Deletions of mtDNA in Mitotic and Postmitotic Tissues. *Front Genet*. 2 de outubro de 2020;11:547638
168. Kanungo S, Morton J, Neelakantan M, Ching K, Saeedian J, Goldstein A. Mitochondrial disorders. *Ann Transl Med*. dezembro de 2018;6(24):475.
169. Broomfield A, Sweeney MG, Woodward CE, Fratter C, Morris AM, Leonard JV, et al. Paediatric single mitochondrial DNA deletion disorders: an overlapping spectrum of disease. *J Inher Metab Dis*. 2015;38(3):445–57.
170. Rocha MC, Rosa HS, Grady JP, Blakely EL, He L, Romain N, et al. Pathological mechanisms underlying single large-scale mitochondrial DNA deletions. *Ann Neurol*. janeiro de 2018;83(1):115–30.
171. Kirches E. LHON: Mitochondrial Mutations and More. *Curr Genomics*. março de 2011;12(1):44–54.
172. Savontaus ML. mtDNA mutations in Leber’s hereditary optic neuropathy. *Biochim Biophys Acta*. 24 de maio de 1995;1271(1):261–3.
173. El-Hattab AW, Adesina AM, Jones J, Scaglia F. MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Mol Genet Metab*. 2015;116(1–2):4–12
174. Velez-Bartolomei F, Lee C, Enns G. MERRF. Em: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, et al., editores. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [citado 26 de fevereiro de 2024]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1520/>
175. Calvo SE, Mootha VK. The Mitochondrial Proteome and Human Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010;11:25–44.
176. Saneto RP. Genetics of Mitochondrial Disease. *Adv Genet*. 2017;98:63–116.

177. El-Hattab AW, Craigen WJ, Scaglia F. Mitochondrial DNA maintenance defects. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* junho de 2017;1863(6):1539–55.
178. El-Hattab AW, Scaglia F. Mitochondrial DNA depletion syndromes: review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options. *Neurotherapeutics.* abril de 2013;10(2):186–98.
179. Nogueira C, Almeida LS, Nesti C, Pezzini I, Videira A, Vilarinho L, et al. Syndromes associated with mitochondrial DNA depletion. *Ital J Pediatr.* 3 de abril de 2014;40:34.
180. Rusecka J, Kaliszewska M, Bartnik E, Tońska K. Nuclear genes involved in mitochondrial diseases caused by instability of mitochondrial DNA. *J Appl Genet.* 2018;59(1):43–57.
181. Spinazzola A, Zeviani M. Disorders from perturbations of nuclear-mitochondrial intergenomic cross-talk. *J Intern Med.* fevereiro de 2009;265(2):174–92.
182. Limongelli A, Tiranti V. Inherited Mendelian defects of nuclear-mitochondrial communication affecting the stability of mitochondrial DNA. *Mitochondrion.* novembro de 2002;2(1–2):39–46.
183. Fernandez-Vizarra E, Zeviani M. Mitochondrial disorders of the OXPHOS system. *FEBS Lett.* abril de 2021;595(8):1062–106.
184. Leigh D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* agosto de 1951;14(3):216–21.
185. Rahman S, Blok RB, Dahl HH, Danks DM, Kirby DM, Chow CW, et al. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol.* março de 1996;39(3):343–51.
186. Morin C, Mitchell G, Laroche J, Lambert M, Ogier H, Robinson BH, et al. Clinical, metabolic, and genetic aspects of cytochrome C oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *Am J Hum Genet.* agosto de 1993;53(2):488–96.
187. Ostergaard E, Hansen FJ, Sorensen N, Duno M, Vissing J, Larsen PL, et al. Mitochondrial encephalomyopathy with elevated methylmalonic acid is caused by SUCLA2 mutations. *Brain.* março de 2007;130(Pt 3):853–61.
188. Ogawa E, Fushimi T, Ogawa-Tominaga M, Shimura M, Tajika M, Ichimoto K, et al. Mortality of Japanese patients with Leigh syndrome: Effects of age at onset and genetic diagnosis. *J Inherit Metab Dis.* julho de 2020;43(4):819–26.
189. Ardisson A, Bruno C, Diodato D, Donati A, Ghezzi D, Lamantea E, et al. Clinical, imaging, biochemical and molecular features in Leigh syndrome: a study from the Italian network of mitochondrial diseases. *Orphanet J Rare Dis.* 9 de outubro de 2021;16(1):413
190. Baldo MS, Nogueira C, Pereira C, Janeiro P, Ferreira S, Lourenço CM, et al. Leigh Syndrome Spectrum: A Portuguese Population Cohort in an Evolutionary Genetic Era. *Genes (Basel).* 27 de julho de 2023;14(8):1536.
191. Hong CM, Na JH, Park S, Lee YM. Clinical Characteristics of Early-Onset and Late-Onset Leigh Syndrome. *Front Neurol.* 2020;11:267.
192. Nagashima T, Mori M, Katayama K, Nunomura M, Nishihara H, Hiraga H, et al. Adult Leigh syndrome with mitochondrial DNA mutation at 8993. *Acta Neuropathol.* abril de 1999;97(4):416–22.

193. Chalmers RM, Lamont PJ, Nelson I, Ellison DW, Thomas NH, Harding AE, et al. A mitochondrial DNA tRNA(Val) point mutation associated with adult-onset Leigh syndrome. *Neurology*. agosto de 1997;49(2):589–92.
194. Jabeen SA, Sandeep G, Mridula KR, Meena AK, Borgohain R, Sundaram C. Adult-onset Leigh's disease: A rare entity. *Ann Indian Acad Neurol*. 2016;19(1):140–2.
195. Sofou K, De Coo IFM, Isohanni P, Ostergaard E, Naess K, De Meirleir L, et al. A multicenter study on Leigh syndrome: disease course and predictors of survival. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 15 de abril de 2014;9(1):52.
196. Gerards M, Sallevelt SCEH, Smeets HJM. Leigh syndrome: Resolving the clinical and genetic heterogeneity paves the way for treatment options. *Mol Genet Metab*. março de 2016;117(3):300–12.
197. Finsterer J. Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatr Neurol*. outubro de 2008;39(4):223–35.
198. Rahman J, Noronha A, Thiele I, Rahman S. Leigh map: A novel computational diagnostic resource for mitochondrial disease. *Ann Neurol*. janeiro de 2017;81(1):9–16.
199. Koopman WJH, Distelmaier F, Smeitink JA, Willems PH. OXPHOS mutations and neurodegeneration. *EMBO J*. 9 de janeiro de 2013;32(1):9–29.
200. Fassone E, Rahman S. Complex I deficiency: clinical features, biochemistry and molecular genetics. *J Med Genet*. setembro de 2012;49(9):578–90.
201. Kirby DM, Crawford M, Cleary MA, Dahl HH, Dennett X, Thorburn DR. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology*. 12 de abril de 1999;52(6):1255–64.
202. Rodenburg RJ. Mitochondrial complex I-linked disease. *Biochim Biophys Acta*. julho de 2016;1857(7):938–45.
203. van den Heuvel L, Ruitenbeek W, Smeets R, Gelman-Kohan Z, Elpeleg O, Loeffen J, et al. Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex I deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-kD (AQDQ) subunit. *Am J Hum Genet*. fevereiro de 1998;62(2):262–8.
204. van de Wal MAE, Adjobo-Hermans MJW, Keijer J, Schirris TJJ, Homberg JR, Wieckowski MR, et al. Ndufs4 knockout mouse models of Leigh syndrome: pathophysiology and intervention. *Brain*. 29 de novembro de 2021;145(1):45–63.
205. Assouline Z, Jambou M, Rio M, Bole-Feysot C, de Lonlay P, Barnerias C, et al. A constant and similar assembly defect of mitochondrial respiratory chain complex I allows rapid identification of NDUFS4 mutations in patients with Leigh syndrome. *Biochim Biophys Acta*. junho de 2012;1822(6):1062–9.
206. Petruzzella V, Vergari R, Puzziferri I, Boffoli D, Lamantea E, Zeviani M, et al. A nonsense mutation in the NDUFS4 gene encoding the 18 kDa (AQDQ) subunit of complex I abolishes assembly and activity of the complex in a patient with Leigh-like syndrome. *Hum Mol Genet*. 1 de março de 2001;10(5):529–35.
207. Leshinsky-Silver E, Lebre AS, Minai L, Saada A, Steffann J, Cohen S, et al. NDUFS4 mutations cause Leigh syndrome with predominant brainstem involvement. *Mol Genet Metab*. julho de 2009;97(3):185–9.

208. Anderson SL, Chung WK, Frezzo J, Papp JC, Ekstein J, DiMauro S, et al. A novel mutation in NDUFS4 causes Leigh syndrome in an Ashkenazi Jewish family. *J Inherit Metab Dis.* dezembro de 2008;31 Suppl 2:S461-467.
209. Bénit P, Steffann J, Lebon S, Chretien D, Kadhom N, de Lonlay P, et al. Genotyping microsatellite DNA markers at putative disease loci in inbred/multiplex families with respiratory chain complex I deficiency allows rapid identification of a novel nonsense mutation (IVS1nt -1) in the NDUFS4 gene in Leigh syndrome. *Hum Genet.* maio de 2003;112(5-6):563-6.
210. Ortigoza-Escobar JD, Oyarzabal A, Montero R, Artuch R, Jou C, Jiménez C, et al. Ndufs4 related Leigh syndrome: A case report and review of the literature. *Mitochondrion.* maio de 2016;28:73-8.
211. Varghese F, Atcheson E, Bridges HR, Hirst J. Characterization of clinically identified mutations in NDUFV1, the flavin-binding subunit of respiratory complex I, using a yeast model system. *Hum Mol Genet.* 15 de novembro de 2015;24(22):6350-60.
212. Bénit P, Chretien D, Kadhom N, de Lonlay-Debeney P, Cormier-Daire V, Cabral A, et al. Large-scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUFS1 genes in mitochondrial complex I deficiency. *Am J Hum Genet.* junho de 2001;68(6):1344-52.
213. Taylor RW, Singh-Kler R, Hayes CM, Smith PE, Turnbull DM. Progressive mitochondrial disease resulting from a novel missense mutation in the mitochondrial DNA ND3 gene. *Ann Neurol.* julho de 2001;50(1):104-7.
214. Sarzi E, Brown MD, Lebon S, Chretien D, Munnich A, Rotig A, et al. A novel recurrent mitochondrial DNA mutation in ND3 gene is associated with isolated complex I deficiency causing Leigh syndrome and dystonia. *Am J Med Genet A.* 1 de janeiro de 2007;143A(1):33-41.
215. Taylor RW, Morris AAM, Hutchinson M, Turnbull DM. Leigh disease associated with a novel mitochondrial DNA ND5 mutation. *Eur J Hum Genet.* fevereiro de 2002;10(2):141-4.
216. Rutter J, Winge DR, Schiffman JD. Succinate Dehydrogenase—Assembly, Regulation and Role in Human Disease. *Mitochondrion.* junho de 2010;10(4):393-401.
217. Jain-Ghai S, Cameron JM, Al Maawali A, Blaser S, MacKay N, Robinson B, et al. Complex II deficiency--a case report and review of the literature. *Am J Med Genet A.* fevereiro de 2013;161A(2):285-94.
218. Horváth R, Abicht A, Holinski-Feder E, Laner A, Gempel K, Prokisch H, et al. Leigh syndrome caused by mutations in the flavoprotein (Fp) subunit of succinate dehydrogenase (SDHA). *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* janeiro de 2006;77(1):74-6.
219. Renkema GH, Wortmann SB, Smeets RJ, Venselaar H, Antoine M, Visser G, et al. SDHA mutations causing a multisystem mitochondrial disease: novel mutations and genetic overlap with hereditary tumors. *Eur J Hum Genet.* fevereiro de 2015;23(2):202-9.
220. Ghezzi D, Goffrini P, Uziel G, Horvath R, Klopstock T, Lochmüller H, et al. SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nat Genet.* junho de 2009;41(6):654-6.

221. Ohlenbusch A, Edvardson S, Skorpen J, Bjornstad A, Saada A, Elpeleg O, et al. Leukoencephalopathy with accumulated succinate is indicative of SDHAF1 related complex II deficiency. *Orphanet J Rare Dis.* 20 de setembro de 2012;7:69.
222. Bénit P, Lebon S, Rustin P. Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency. *Biochim Biophys Acta.* janeiro de 2009;1793(1):181–5.
223. Barel O, Shorer Z, Flusser H, Ofir R, Narkis G, Finer G, et al. Mitochondrial Complex III Deficiency Associated with a Homozygous Mutation in UQCRCQ. *Am J Hum Genet.* 9 de maio de 2008;82(5):1211–6.
224. Siddiqi S, Siddiq S, Mansoor A, Oostrik J, Ahmad N, Kazmi SAR, et al. Novel mutation in AAA domain of BCS1L causing Bjornstad syndrome. *J Hum Genet.* dezembro de 2013;58(12):819–21.
225. Visapää I, Fellman V, Vesa J, Dasvarma A, Hutton JL, Kumar V, et al. GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *Am J Hum Genet.* outubro de 2002;71(4):863–76.
226. de Lonlay P, Valnot I, Barrientos A, Gorbatyuk M, Tzagoloff A, Taanman JW, et al. A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet.* setembro de 2001;29(1):57–60.
227. Atwal PS. Mutations in the Complex III Assembly Factor Tetratricopeptide 19 Gene TTC19 Are a Rare Cause of Leigh Syndrome. *JIMD Rep.* 25 de dezembro de 2013;14:43–5.
228. Antonicka H, Leary SC, Guercin GH, Agar JN, Horvath R, Kennaway NG, et al. Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency. *Hum Mol Genet.* 15 de outubro de 2003;12(20):2693–702.
229. Böhm M, Pronicka E, Karczmarewicz E, Pronicki M, Piekutowska-Abramczuk D, Sykut-Cegielska J, et al. Retrospective, multicentric study of 180 children with cytochrome C oxidase deficiency. *Pediatr Res.* janeiro de 2006;59(1):21–6.
230. Li Y, Wen S, Li D, Xie J, Wei X, Li X, et al. SURF1 mutations in Chinese patients with Leigh syndrome: Novel mutations, mutation spectrum, and the functional consequences. *Gene.* 20 de outubro de 2018;674:15–24.
231. Lee IC, Chiang KL. Clinical Diagnosis and Treatment of Leigh Syndrome Based on SURF1: Genotype and Phenotype. *Antioxidants (Basel).* 5 de dezembro de 2021;10(12):1950.
232. Wedatilake Y, Brown RM, McFarland R, Yaplito-Lee J, Morris AAM, Champion M, et al. SURF1 deficiency: a multi-centre natural history study. *Orphanet J Rare Dis.* 5 de julho de 2013;8:96.
233. Debray FG, Morin C, Janvier A, Villeneuve J, Maranda B, Laframboise R, et al. LRPPRC mutations cause a phenotypically distinct form of Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *J Med Genet.* março de 2011;48(3):183–9.

234. Cui J, Wang L, Ren X, Zhang Y, Zhang H. LRPPRC: A Multifunctional Protein Involved in Energy Metabolism and Human Disease. *Front Physiol.* 24 de maio de 2019;10:595.
235. Mootha VK, Lepage P, Miller K, Bunkenborg J, Reich M, Hjerrild M, et al. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 de janeiro de 2003;100(2):605–10.
236. Xu F, Morin C, Mitchell G, Ackerley C, Robinson BH. The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome c oxidase) I and COX III mRNA. *Biochem J.* 15 de agosto de 2004;382(Pt 1):331–6.
237. Mourier A, Ruzzenente B, Brandt T, Kühlbrandt W, Larsson NG. Loss of LRPPRC causes ATP synthase deficiency. *Hum Mol Genet.* 15 de maio de 2014;23(10):2580–92
238. Balsa E, Marco R, Perales-Clemente E, Szklarczyk R, Calvo E, Landázuri MO, et al. NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metab.* 5 de setembro de 2012;16(3):378–86.
239. Pitceathly RDS, Rahman S, Wedatilake Y, Polke JM, Cirak S, Foley AR, et al. NDUFA4 Mutations Underlie Dysfunction of a Cytochrome c Oxidase Subunit Linked to Human Neurological Disease. *Cell Rep.* 27 de junho de 2013;3(6):1795–805.
240. Jonckheere AI, Smeitink JAM, Rodenburg RJT. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis.* 2012;35(2):211–25.
241. Xu T, Pagadala V, Mueller DM. Understanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase. *Microb Cell.* 2(4):105–25.
242. Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet.* março de 1990;46(3):428–33.
243. de Vries DD, van Engelen BG, Gabreëls FJ, Ruitenbeek W, van Oost BA. A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh's syndrome. *Ann Neurol.* setembro de 1993;34(3):410–2.
244. Ball M, Thorburn DR, Rahman S. Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome Spectrum. Em: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, et al., editores. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [citado 4 de setembro de 2024]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1173/>
245. Sofou K, de Coo IFM, Ostergaard E, Isohanni P, Naess K, De Meirleir L, et al. Phenotype-genotype correlations in Leigh syndrome: new insights from a multicentre study of 96 patients. *J Med Genet.* janeiro de 2018;55(1):21–7.
246. Baracca A, Sgarbi G, Mattiazzi M, Casalena G, Pagnotta E, Valentino ML, et al. Biochemical phenotypes associated with the mitochondrial ATP6 gene mutations at nt8993. *Biochim Biophys Acta.* julho de 2007;1767(7):913–9.
247. Ganetzky RD, Stendel C, McCormick EM, Zolkipli-Cunningham Z, Goldstein AC, Klopstock T, et al. MT-ATP6 Mitochondrial Disease Variants: Phenotypic and biochemical features analysis in 218 published cases and cohort of 14 new cases. *Hum Mutat.* maio de 2019;40(5):499–515.

248. Campos Y, Martín MA, Rubio JC, Solana LG, García-Benayas C, Terradas JL, et al. Leigh syndrome associated with the T9176C mutation in the ATPase 6 gene of mitochondrial DNA. *Neurology*. agosto de 1997;49(2):595–7.
249. Moslemi AR, Darin N, Tulinius M, Oldfors A, Holme E. Two new mutations in the MTATP6 gene associated with Leigh syndrome. *Neuropediatrics*. outubro de 2005;36(5):314–8.
250. Wei Y, Cui L, Peng B. Mitochondrial DNA mutations in late-onset Leigh syndrome. *J Neurol*. outubro de 2018;265(10):2388–95.
251. Castro ÂS, Oliveira RS, Rodrigues ES, Ribas JLL. Ação do complexo enzimático da piruvato desidrogenase em células neoplásicas sob efeito do ácido Dicloroacético: uma revisão. *cmbio*. 7 de dezembro de 2011;10(2):170–8.
252. Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentals of biochemistry: Life at the molecular level*. 5ª ed. Nashville, TN: John Wiley & Sons; 2016.
253. DeBrosse SD, Okajima K, Zhang S, Nakouzi G, Schmotzer CL, Lusk-Kopp M, et al. Spectrum of neurological and survival outcomes in pyruvate dehydrogenase complex (PDC) deficiency: lack of correlation with genotype. *Mol Genet Metab*. novembro de 2012;107(3):394–402.
254. Patel KP, O'Brien TW, Subramony SH, Shuster J, Stacpoole PW. The Spectrum of Pyruvate Dehydrogenase Complex Deficiency: Clinical, Biochemical and Genetic Features in 371 Patients. *Mol Genet Metab*. janeiro de 2012;105(1):34–43.
255. Dahl HH. Pyruvate dehydrogenase E1 alpha deficiency: males and females differ yet again. *Am J Hum Genet*. março de 1995;56(3):553–7.
256. Lissens W, De Meirleir L, Seneca S, Liebaers I, Brown GK, Brown RM, et al. Mutations in the X-linked pyruvate dehydrogenase (E1) alpha subunit gene (PDHA1) in patients with a pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Hum Mutat*. 2000;15(3):209–19.
257. Horga A, Woodward CE, Mills A, Pareés I, Hargreaves IP, Brown RM, et al. Differential phenotypic expression of a novel PDHA1 mutation in a female monozygotic twin pair. *Hum Genet*. dezembro de 2019;138(11–12):1313–22.
258. Amaral JMV. Doenças Mitocondriais. Em: *Tratado de Clínica Pediátrica [Internet]*. 3a edição. Lisboa: Currículo Médico; 2022 [citado 9 de setembro de 2024]. Disponível em: <https://tratadoclinicapediatica.pt/iii-volume/partexxxii-doencas-hereditarias-do-metabolismo/doencas-mitocondriais/>
259. Paiva Coelho M, Martins E, Vilarinho L. Diagnosis, management, and follow-up of mitochondrial disorders in childhood: a personalized medicine in the new era of genome sequence. *Eur J Pediatr*. janeiro de 2019;178(1):21–32.
260. Chi CS. Diagnostic approach in infants and children with mitochondrial diseases. *Pediatr Neonatol*. fevereiro de 2015;56(1):7–18.
261. Liang C, Ahmad K, Sue CM. The broadening spectrum of mitochondrial disease: Shifts in the diagnostic paradigm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1 de abril de 2014;1840(4):1360–7.
262. Baertling F, Rodenburg RJ, Schaper J, Smeitink JA, Koopman WJH, Mayatepek E, et al. A guide to diagnosis and treatment of Leigh syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. março de 2014;85(3):257–65.

263. Rodenburg RJT. Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. *J Inherit Metab Dis.* abril de 2011;34(2):283–92.
264. Esterhuizen K, van der Westhuizen FH, Louw R. Metabolomics of mitochondrial disease. *Mitochondrion.* julho de 2017;35:97–110.
265. Boenzi S, Diodato D. Biomarkers for mitochondrial energy metabolism diseases. *Essays Biochem.* 20 de julho de 2018;62(3):443–54.
266. Debray FG, Lambert M, Allard P, Mitchell GA. Low citrulline in Leigh disease: still a biomarker of maternally inherited Leigh syndrome. *J Child Neurol.* agosto de 2010;25(8):1000–2.
267. Saneto RP, Friedman SD, Shaw DWW. Neuroimaging of Mitochondrial Disease. *Mitochondrion.* dezembro de 2008;8(5–6):396–413.
268. Sonam K, Khan NA, Bindu PS, Taly AB, Gayathri N, Bharath MMS, et al. Clinical and magnetic resonance imaging findings in patients with Leigh syndrome and SURF1 mutations. *Brain Dev.* outubro de 2014;36(9):807–12.
269. Lebre AS, Rio M, Faivre d’Arcier L, Vernerey D, Landrieu P, Slama A, et al. A common pattern of brain MRI imaging in mitochondrial diseases with complex I deficiency. *J Med Genet.* janeiro de 2011;48(1):16–23.
270. Schubert Baldo M, Vilarinho L. Molecular basis of Leigh syndrome: a current look. *Orphanet J Rare Dis.* 29 de janeiro de 2020;15(1):31.
271. Khan NA, Govindaraj P, Meena AK, Thangaraj K. Mitochondrial disorders: Challenges in diagnosis & treatment. *Indian J Med Res.* janeiro de 2015;141(1):13–26.
272. DiMauro S, Hirano M. Pathogenesis and treatment of mitochondrial disorders. *Adv Exp Med Biol.* 2009;652:139–70.
273. Parikh S, Goldstein A, Koenig MK, Scaglia F, Enns GM, Saneto R, et al. Diagnosis and management of mitochondrial disease: a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. *Genet Med.* setembro de 2015;17(9):689–701.
274. McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial disease--its impact, etiology, and pathology. *Curr Top Dev Biol.* 2007;77:113–55.
275. De Paepe B, De Bleecker JL, Van Coster R. Histochemical methods for the diagnosis of mitochondrial diseases. *Curr Protoc Hum Genet.* outubro de 2009;Chapter 19:Unit19.2.
276. Frazier AE, Vincent AE, Turnbull DM, Thorburn DR, Taylor RW. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymes in cells and tissues. *Methods Cell Biol.* 2020;155:121–56.
277. Gusic M, Prokisch H. Genetic basis of mitochondrial diseases. *FEBS Lett.* abril de 2021;595(8):1132–58.
278. Eloise Watson, Ryan Davis, Carolyn M. Sue. New diagnostic pathways for mitochondrial disease. *Journal of Translational Genetics and Genomics.* 2020;4(3):188–202.
279. Niezgodna J, Morgan PG. Anesthetic Considerations in Patients with Mitochondrial Defects. *Paediatric anaesthesia.* setembro de 2013;23(9):785.
280. Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology.* 12 de novembro de 2002;59(9):1406–11.

281. Wolf NI, Smeitink JAM. Mitochondrial disorders: a proposal for consensus diagnostic criteria in infants and children. *Neurology*. 12 de novembro de 2002;59(9):1402–5.
282. Stenton SL, Prokisch H. Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *eBioMedicine*. 23 de maio de 2020;56:102784.
283. El-Hattab AW, Almannai M, Scaglia F. MELAS. Em: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, et al., editores. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [citado 18 de setembro de 2024]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1233/>
284. Rahman S, Wolf N. Diagnostic Workup of Patients with Mitochondrial Diseases. Em: *Inherited Metabolic Diseases: A Clinical Approach*. 2017. p. 521–35.
285. Mavraki E, Labrum R, Sergeant K, Alston CL, Woodward C, Smith C, et al. Genetic testing for mitochondrial disease: the United Kingdom best practice guidelines. *Eur J Hum Genet*. fevereiro de 2023;31(2):148–63.
286. Theunissen TEJ, Nguyen M, Kamps R, Hendrickx AT, Sallevelt SCEH, Gottschalk RWH, et al. Whole Exome Sequencing Is the Preferred Strategy to Identify the Genetic Defect in Patients With a Probable or Possible Mitochondrial Cause. *Front Genet*. 12 de outubro de 2018;9:400.
287. Davis RL, Kumar KR, Puttick C, Liang C, Ahmad KE, Edema-Hildebrand F, et al. Use of Whole-Genome Sequencing for Mitochondrial Disease Diagnosis. *Neurology*. 16 de agosto de 2022;99(7):e730–42.
288. Kistol D, Tsygankova P, Krylova T, Bychkov I, Itkis Y, Nikolaeva E, Mikhailova S, Sumina M, Pechatnikova N, Kurbatov S, Bostanova F, Migiaev O, Zakharova E. Leigh Syndrome: Spectrum of Molecular Defects and Clinical Features in Russia. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 13;24(2):1597.
289. Aretini P, Mazzanti CM, La Ferla M, Franceschi S, Lessi F, De Gregorio V, Nesti C, Valetto A, Bertini V, Toschi B, Battini R, Caligo MA. Next generation sequencing technologies for a successful diagnosis in a cold case of Leigh syndrome. *BMC Neurol*. 2018 Jul 20;18(1):99.
290. Thompson K, Collier JJ, Glasgow RIC, Robertson FM, Pyle A, Blakely EL, et al. Recent advances in understanding the molecular genetic basis of mitochondrial disease. *J Inherit Metab Dis*. janeiro de 2020;43(1):36–50.
291. Rodenburg RJ. The functional genomics laboratory: functional validation of genetic variants. *J Inherit Metab Dis*. 2018;41(3):297–307.
292. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. maio de 2015;17(5):405–24.
293. McCormick EM, Lott MT, Dulik MC, Shen L, Attimonelli M, Vitale O, et al. Specifications of the ACMG/AMP standards and guidelines for mitochondrial DNA variant interpretation. *Hum Mutat*. dezembro de 2020;41(12):2028–57.
294. Macken WL, Vandrovцова J, Hanna MG, Pitceathly RDS. Applying genomic and transcriptomic advances to mitochondrial medicine. *Nat Rev Neurol*. abril de 2021;17(4):215–30.

295. Kremer LS, Bader DM, Mertes C, Kopajtich R, Pichler G, Iuso A, et al. Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing. *Nat Commun.* 12 de junho de 2017;8:15824.
296. Blake B, Brady LI, Rouse NA, Nagy P, Tarnopolsky MA. The Efficacy of Whole Genome Sequencing and RNA-Seq in the Diagnosis of Whole Exome Sequencing Negative Patients with Complex Neurological Phenotypes. *J Pediatr Genet.* 9 de novembro de 2021;12(3):206–12.