

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Marcadores Bioquímicos para o Diagnóstico de Cancro do Pâncreas

Joana Trancoso Sebastião

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Maria João Monteiro dos Santos Ferreira da Silva e Relatório de Estágio orientado pela Dra. Maria Manuela Martins da Costa Azevedo

Mestrado em Análises Clínicas

2023

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Marcadores Bioquímicos para o Diagnóstico de Cancro do Pâncreas

Joana Trancoso Sebastião

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Maria João Monteiro dos Santos Ferreira da Silva e Relatório de Estágio orientado pela Dra. Maria Manuela Martins da Costa Azevedo

Mestrado em Análises Clínicas

2023

Resumo

O presente trabalho representa o documento final de avaliação do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Este é composto por duas partes. A primeira parte consiste no Relatório do estágio efetuado no Laboratório Central da Synlab, onde se descreve o trabalho realizado, nomeadamente os parâmetros analisados, metodologias mais comuns e sistema de avaliação da qualidade interno para cada uma das valências incluídas.

A segunda parte corresponde à monografia, “Marcadores Bioquímicos para o Diagnóstico do Cancro do Pâncreas”. Sendo o cancro do pâncreas uma condição fatal de incidência crescente com índices de mortalidade muito elevados é crucial, para a diminuição da sua letalidade, a deteção precoce desta patologia. Isto passa, em grande parte, pela melhoria dos seus métodos de diagnóstico, entre os quais se inclui o uso de marcadores tumorais. Estes são substâncias cuja presença em níveis elevados pode indicar a presença de um tumor, sendo que um bom marcador deverá ter tanto uma alta sensibilidade como uma elevada especificidade para a doença que se quer diagnosticar.

Assim, o tema proposto visa fazer uma revisão dos vários tipos de marcadores bioquímicos que podem ser utilizados no diagnóstico desta patologia, nomeadamente os marcadores CA19-9, CA50, CA242, CEA, DUPAN-2, a família de genes *RAS* e micro-RNAs, incluindo a especificidade e sensibilidade de cada um deles e a eventual utilidade no diagnóstico diferencial de outras doenças, explorando, sempre que possível, os mecanismos que levam à alteração dos seus valores no cancro do pâncreas. Irá, também, ser abordado o uso e as vantagens de painéis de marcadores com o mesmo objetivo.

Palavras-chave: bioquímica, microbiologia, imunologia, cancro pancreático, marcador tumoral

Abstract

The present work represents the final evaluation document for the Master's degree in Clinical Analysis at the Faculty of Pharmacy, University of Lisbon.

This is composed of two parts. The first part consists of the internship report carried out at Synlab's Central Laboratory, which describes the work carried out, namely the parameters analyzed, the most common methodologies and the internal quality assessment system for each of the valences included.

The second part corresponds to the monograph, "Biochemical Markers for the Diagnosis of Pancreatic Cancer". Since pancreatic cancer is a fatal condition with an increasing incidence and very high mortality rates, early detection of this pathology is crucial to reducing its lethality. This largely involves improving diagnostic methods, including the use of tumor markers. These are substances whose presence at high levels can indicate the presence of a tumor, and a good marker should have both high sensitivity and high specificity for the disease it is intended to diagnose.

Therefore, the proposed topic aims to review the various types of biochemical markers that can be used in the diagnosis of this pathology, namely the markers CA19-9, CA50, CA242, CEA, DUPAN-2, the RAS gene family and micro-RNAs, including the specificity and sensitivity of each of them and their possible usefulness in the differential diagnosis of other diseases, exploring, whenever possible, the mechanisms that lead to changes in their values in pancreatic cancer. The use and advantages of panels of markers for the same purpose will also be discussed.

Key-words: biochemistry, microbiology, immunology, pancreatic cancer, tumor marker

Índice Geral

Resumo	3
Abstract	4
Índice Geral	5
Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas	8
Lista de Abreviaturas	9
Parte I: Relatório de Estágio	15
Introdução	16
Bioquímica	17
Metodologia	17
Métodos colorimétricos	17
Métodos enzimáticos	17
Imunoturbidimetria	17
Imunoensaio tipo sanduiche	17
Imunoensaio competitivo.....	17
Parâmetros analisados	18
Marcadores da função hepática	18
Marcadores da função renal	19
Marcadores do metabolismo lipídico	21
Marcadores do metabolismo glicídico	22
Marcadores de Infeciologia	22
Marcadores de alergologia.....	27
Marcadores de anemia.....	27
Marcadores da função pancreática.....	28
Marcadores tumorais	30
Marcadores da função reprodutora	31
Marcadores da função tiroideia e paratiroideia	33
Marcadores do metabolismo de eletrólitos	34
Análise de urina tipo II.....	35
Controlo de Qualidade Interno	39
Microbiologia	41
Meios de cultura.....	41
Colorações	45
Identificação das estirpes e teste de sensibilidade a antibióticos	45
Testes Rápidos.....	49
Pesquisa de Carbapenemases.....	50
Pesquisa de Micobactérias	50
Validação de TSA	51
Imunologia	53
Capillarys	53
Hydrasys	54
Imunofixações	55
Imunofixação com detecção de proteína de Bence Jones	56
Eletroforese de Hemoglobinas.....	57
Serologia Manual.....	59
Ensaio Imunoenzimáticos	60
Teste de Imunofluorescência Indireta	61

Parte II: Monografia - Marcadores Bioquímicos para o Diagnóstico do Cancro do Pâncreas	64
Introdução	65
Marcadores mais comuns para o diagnóstico do cancro do pâncreas	68
CA19-9	68
CA50	71
CA242	73
Antigénio Carcinoembrionário (CEA)	74
DuPAN-2	75
Família de genes RAS.....	77
Micro-RNAs.....	80
Discussão	82
Conclusão.....	86
Bibliografia	87
Anexo.....	95

Índice de Figuras

Figura 1 - Células epiteliais pavimentosas na urina (retirado do equipamento Atellica 1500).....	38
Figura 2 - Alguns dos cristais observados durante o estágio; a) cristais amorfos; b) e c) cristais de ácido úrico; d) cristal de oxalato de cálcio; e) cristais de trifosfato (retiradas do equipamento Atellica 1500)..	39
Figura 3 - Esquema para a seleção de uma Carta de TSAs para o estudo do crescimento de microorganismos na urina	49
Figura 4 - Espectro obtido por eletroforese de 6 frações de proteínas e algumas das proteínas que migram em cada fração [119]	53
Figura 5 - (esquerda) representação esquemática de uma eletroforese de proteínas de 5 frações e as proteínas que migram nas respectivas frações[115]; (direita) fotografia de um gel de agarose após migração eletroforética onde foram aplicadas 54 amostras diferentes de soro e urina	54
Figura 6 - espectro obtido a partir de um perfil eletroforético de proteínas onde se pode observar um grande pico na fração gama.....	55
Figura 7 - imunofixações de 9 soros; observam-se duas amostras com picos monoclonais: BXB9458 com uma banda IgG kappa e BXC9401 com uma banda IgG lambda.....	56
Figura 8 - imunofixação para deteção de proteína de Bence-Jones em urina; a amostra PHBY163 apresenta proteína de Bence-Jonce indicada pela presença de uma banda lambda e uma banda leve livre lambda	57
Figura 9 - Perfis de eletroforese de hemoglobinas; a) perfil normal com uma maioria de HbA e uma fração reduzida de HbA2; B) Perfil com heterozigotia de HbA (rosa) e HbF (laranja) com uma fração muito reduzida de HbA2, comum em recém-nascidos; C) perfil com heterozigotia HbA (rosa) e HbS (cinzento); D) perfil com heterozigotia HbF (laranja) e HbS (cinzento)	58
Figura 10 - resultados de um teste TPHA; as amostras das linhas 2 e 3 são um resultado positivo >2560 ao passo que as amostras das linhas 1, 6 e 7 são negativos.....	59
Figura 11 - Representação esquemática do pâncreas e algumas das suas relações anatómicas; retirado de "Pancreas - it's functions, disorders and physiological impact on the mammals' organism" [144].....	65
Figura 12 - Síntese de antigénios Lewis a partir de cadeias precursoras tipo 1 e tipo 2; Figura retirada de "Lewis, I and P Blood Group Systems" [152].....	69
Figura 13 - Valores séricos de CA50 em 14 condições patológicas, comparadas com 2 grupos controlo; observa-se que certas doenças provocam um aumento dos níveis de CA50 quando comparados com os grupos controlos, mas os valores medianos em indivíduos com cancro pancreático estão muito acima do extremo máximo dos diagramas elaborados para outras patologias; retirado de "Serum CA50 levels in patients with cancers and other diseases" [154].....	72
Figura 14 - Taxa de positivos para cada marcador isolado (CA50, SPAN-1, sialilSSEA-1 ou DuPAN-2) ou combinado com CA19-9; retirado de "Elevated serum levels of DUPAN-2 in pancreatic cancer patients negative for Lewis blood group phenotype" [164]	77
Figura 15 - Modelo da proteína K-RAS, ilustrando os seus principais domínios: switch 1 e 2 e o GTP p-loop; os resíduos de aminoácidos destacados a verde, amarelo e vermelho representam o domínio G catalítico; retirado do artigo "Clinical relevance of KRAS in human cancers" [168]	78
Figura 16 - Esquema dos efetores de RAS e as vias de transdução que este desencadeia, resultando em alterações na tradução, transcrição, apoptose, progressão do ciclo celular ou remodelação do citosqueleto; retirado de "Ras Family Genes: An Interesting Link Between Cell Cycle and Cancer" [167].	79

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 - Significado clínico da detecção de IgM e IgGs em doenças infecciosas</i>	<i>26</i>
<i>Tabela 2 - Meios de cultura utilizados no laboratório [96].....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 3 - Meios de cultura usados para a sementeira de algumas das amostras analisadas</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 4 - Diferenciação e identificação de bactérias de espécies Shigella spp., Salmonella spp., Proteus e E. coli recorrendo a testes de bancada [96, 100, 101, 102].....</i>	<i>47</i>
<i>Tabela 5 - Valores de referência (%) de cada fração de proteínas [119].....</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 6 - Descrição e ilustração dos principais padrões de fluorescência visualizados durante o estágio</i>	<i>61</i>
<i>Tabela 7 - Sensibilidade e valor preditivo positivo de CA242, CA19-9 e CA50, bem como das combinações entre estes marcadores, para uma especificidade de 90%; retirado de “CA 242 is a new tumor marker for pancreatic cancer” [157].....</i>	<i>83</i>
<i>Tabela 8 – Percentagem de positividade na doença, negatividade em indivíduos saudáveis, exatidão, previsibilidade positiva e área abaixo da curva ROC de vários marcadores do painel CAMPAS-PX2 para o diagnóstico de cancro pancreático; retirado de “A Prospective Multicenter Trial Diagnostic Validity of Multivariate Analysis and Individual Serum Marker in Differential Diagnosis of Pancreatic Cancer from Benign Pancreatic Diseases” [172]</i>	<i>84</i>
<i>Tabela 9 - Desempenho diagnóstico do painel, comparado com CA 19-9, CEA e o conjunto de ambos; AUC – área abaixo da curva ROC; RF – Random Forests, método utilizado para análise de dados; retirado de “Biomarker panel for the diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma” [174]</i>	<i>85</i>
<i>Tabela 10 - parâmetros analisados no laboratório por cada equipamento na secção de bioquímica</i>	<i>95</i>

Lista de Abreviaturas

- ACE – Enzima conversora de angiotensina (*angiotensin converting enzyme*)
- ADH – Hormona anti-diurética (*anti-diuretic hormone*)
- AFP – α -fetoproteína
- aHBE – Antígeno E do vírus da hepatite B
- aHBS – Antígeno S do vírus da hepatite B
- AIH – Hepatite autoimune (*Autoimmune hepatitis*)
- AMP – Adenosina monofosfato
- ALP – Fosfatase alcalina (*Alkaline Phosphatase*)
- ALT – Alanina aminotransferase
- AMA – Anticorpos anti-mitocondriais
- ANA – Anticorpos anti-nucleares (*Antinuclear Antibodies*)
- ANCA – Anticorpos anti-neutrófilos citoplasmáticos (*Antineutrophil cytoplasmatic antibodies*)
- APO-A1 – Apolipoproteína A1
- APO-B – Apolipoproteína B
- ASCO – Sociedade americana de oncologia clínica (*American Society of Clinical Oncology*)
- AST – Aspartato aminotransferase
- ATP – Adenosina trifosfato
- BCG – Bacilo Calmette-Guérin
- BHI – Caldo coração-cérebro (*brain-heart broth*)
- BK - Bacilos de Koch
- CA – Antígeno cancerígeno (*Cancer antigen*)
- CAM – Molécula de adesão celular (*Cell adesion molecule*)
- CDK – cinase dependente de ciclina (*Cyclin dependente kinase*)

CEA – Antígeno Carcinoembrionário (*Carcinoembryonic antigen*)

Cfu – Unidades formadoras de colónias (*Colony forming units*)

CLED – Meio de cisteína, lactose, deficiente em eletrólitos (*Cystine, lactose, electrolyte deficiente*)

CMI – Concentração mínima inibitória

CMV – Citomegalovírus

CNA - Gelose Columbia e sangue de carneiro com a adição de antibióticos colistina e ácido nalidíxico (*Colistin and nalidixic acid*)

COS – Gelose de Columbia e sangue de carneiro (*Columbia agar and Sheep's blood*)

DPP – derivado de proteína purificada

dsDNA – DNA de dupla cadeia (*Double stranded DNA*)

DSF70 – *Dense fine speckled 70*

DuPAN-2 – *Duke pancreatic monoclonal antigen type 2*

EA – Antígeno precoce (*Early antigen*)

EBNA – Antígenos nucleares do vírus EBV

EBV – Vírus Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus*)

ELFA – Ensaio de fluorescência ligado a enzima (*Enzyme-linked fluorescence assay*)

ERC – Enterobactérias resistentes

EUCAST – Comité Europeu de testes de suscetibilidade antimicrobiana (*European Comitee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

FITC – Fluoresceína modificada com um grupo de isocianato (*Fluorescein isothyocianate*)

FSH – Hormona folículo-estimulante (*Follicle stimulating hormone*)

GDP – Guanosina difosfato

GGT – γ -glutamil transferase

GlcNAc – N-acetilglucasamina

GnRH – Hormona libertadora de gonadotrofinas (*Gonadotropin hormone releasing hormone*)

GTP – Guanosina trifosfato

HAV – Vírus da hepatite A (*Hepatitis A vírus*)

HAVM – Anticorpos IgM contra HAV

HAVT – Anticorpos totais contra HAV

Hb – Hemoglobina

HBV – Vírus da hepatite B (*Hepatitis B virus*)

hCG/ ThCG – Gonadotropina coriônica humana/ gonadotropina coriônica humana total (*Human Chorionic gonadotropin/ total human Chorionic gonadotropin*)

HCV – Vírus da hepatite C (*Hepatitis C virus*)

HDL – Lipoproteína de elevada densidade (*High density lipoprotein*)

Hekt – Hektoen

HEP – Células epiteliais humanas

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus*)

HLA – Antígeno leucocitário humano (*Human Leukocyte Antigen*)

HPAF – Linha celular de adenocarcinoma pancreático humana (*Human pancreatic Adenocarcinoma cell line*)

H-RAS – Harvey-RAS

HSV – Vírus de herpes simplex (*Herpes simplex virus*)

ICAP – Consenso internacional de padrões ANA (*International Consensus on ANA patterns*)

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IGRA – Ensaio de libertação de interferão gama (*Interferon gamma release assay*)

IMP - Imipenemase

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

ITU – Infecção do trato urinário

Kb – Kilobases

KDa – KiloDalton

KPC – Carbapenemase produzida por *Klebsiella pneumoniae* (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*)

K-RAS – Kristen-RAS

LCAT – Lecitina-colesterol acetiltransferase

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (*Low density lipoprotein*)

LES – Lúpus eritematoso sistémico

McK – MacConkey

MGIT – Tubo de crescimento de micobactérias (*Mycobacteria growth tube*)

MGUS – Gamapatia monoclonal de significado indeterminado (*Monoclonal gammopathy of unknown significance*)

mRNA – RNA mensageiro (*messenger RNA*)

miR/miRNA – micro-RNA

MM – Mieloma múltiplo

MNT – Micobactérias não-tuberculosas

MR – Ressonância magnética (*Magnetic resonance*)

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)

MTBC – Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis complex*)

NAD – Dinucleótido de nicotinamida e adenina (*Nicotinamide adenine dinucleotide*)

NDM – *New Delhi* metalo- β -lactamase

N-RAS – Neuroblastoma-RAS

OXA – Oxacilinasas

p-NP – p-nitrofenol

p-NPP – p-nitrofenolfosfato

PanIN – Neoplasia intraepitelial pancreática (*Pancreatic intraepithelial neoplasia*)

PBS – Síndrome de bexiga dolorosa (*Painful bladder syndrome*)

PDCD4 – Proteína de morte celular programada 4 (*programmed cell death protein 4*)

PEG – Polietilenoglicol

PI3-K – Cinase fosfatidilinositol 3 (*Phosphatidylinositol-3 kinase*)

POA – Antígeno pancreático oncofetal (*Pancreatic oncofetal antigen*)

PSA/ fPSA – Antígeno específico prostático/ antígeno específico prostático livre (*Prostate specific antigen/ Free prostate specific antigen*)

PTEN – Homólogo de fosfato e tensina (*phosphate and tensin homolog*)

PTH – Hormona paratiroideia (*Parathyroid hormone*)

PVX – Gelose de chocolate Polyvitex

PZA – Pirazinamida

RAF – Fibrosarcoma rapidamente acelerado (*Rapidly accelerated fibrossarcoma*)

RAL-GEF – Fator de permuta de nucleótidos de proteínas relacionadas com RAS (*RAS related protein nucleotide exchange factor*)

RNA – Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

SARS-CoV-2 – Coronavírus da síndrome de infecção respiratória aguda grave 2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)

SHBG – Globulina de ligação a hormonas sexuais (*sex hormone-binding globulin*)

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência adquirida

SIRE – Streptomicina, Isoniazida, rifampicina e etambutol

SjS – Síndrome de Sjogren (*Sjogren syndrome*)

SMAD – Homólogo humano de *Supressor of Mothers agaisnt Decapentaplegic*

T3/ fT3 – Triiodotironina / triiodotironina livre (*Triiodothyronine/ free triiodothyronine*)

T4/ fT4 – Tiroxina/ tiroxina livre (*Thyroxine/ free thyroxine*)

TBG – Globulina de ligação à tiroxina (*Thyroxine-binding globulin*)

TC – Tomografia computadorizada

TGF- β – fator de crescimento transformante β (*Transforming growth factor β*)

TIBC – Capacidade total de fixação do ferro (*Total iron binding capacity*)

TPA – Antígeno de polipéptido tecidual (*Tissue polypeptide antigen*)

TPS – Antígeno específico de polipéptido tecidual (*Tissue polypeptide specific antigen*)

TRH – Hormona libertadora de tireotrofina (*Thyrotropin-releasing hormone*)

TSA – Teste de sensibilidade a antibióticos

TSH – Hormona estimulante da tiroide (*Thyroid-stimulating hormone*)

TTR - Transtirretina

VCA - Gelose de chocolate PolyVitex com Vancomicina, Colimicina e Anfotericina

VCA – Antígenos da cápside viral (*Viral capsid antigen*)

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular (*Vascular endothelial growth factor*)

VIM – *Verona integron-encoded* metalo- β -lactamase

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

WGTC – Grupo de trabalho sobre critérios de marcadores tumorais (*Working Group on Tumor Marker Criteria*)

Parte I: Relatório de Estágio

Introdução

A primeira parte deste trabalho consiste no relatório de estágio onde se vai descrever o trabalho realizado em cada uma das valências efetuadas, bem como os parâmetros analisados e os controlos de qualidade internos realizados.

Este estágio teve como objetivos gerais a integração dos conhecimentos adquiridos ao longo da formação do mestrado, a aquisição de conhecimentos que permitam a compreensão e aplicação de princípios de controlo de qualidade, a aquisição de capacidade para desenvolver trabalho autónomo associado ao diagnóstico laboratorial e a demonstração de capacidade crítica e autocrítica para exercer a atividade em equipas multidisciplinares.

As valências obrigatórias feitas foram bioquímica e microbiologia, com número de horas mínimas 265h e 225h respetivamente. Para além destas, também foi realizada a valência de imunologia.

O estágio foi realizado no laboratório central da Synlab, na Praça de Espanha, Lisboa, sob a orientação da Dra. Manuela Azevedo.

A Synlab começou em 2004 e 1998 com a criação das empresas Labco e Synlab, que posteriormente se uniram para formar a Synlab em 2015, uma empresa líder no mercado de diagnóstico clínico. Atualmente esta empresa encontra-se em mais de 40 países e presta serviços nas áreas farmacêuticas, ambientais, veterinárias e de diagnóstico clínico humano, que vai ser o foco deste presente trabalho ^[1].

Bioquímica

Numa primeira etapa, vão ser explicadas as metodologias usadas por cada equipamento no laboratório. Posteriormente, vão ser discutidos os parâmetros por estes analisados.

Metodologia

Métodos colorimétricos

A deteção de muitos parâmetros químicos depende da sua reação com um determinado composto e a consequente formação de um composto colorimétrico, cuja absorvância pode ser medida a um determinado comprimento de onda.

Métodos enzimáticos

A deteção e quantificação de certos compostos como enzimas passa pela adição de um substrato sintético que é catalisado pela própria enzima. O produto final da reação pode ser detetado diretamente ou, via uma segunda reação, é convertido num composto que pode ser detetado espectrofotometricamente.

Imunoturbidimetria

A amostra é incubada com um soro específico que contém anticorpos contra o composto que se quer detetar. Da reação resulta um imunocomplexo insolúvel que pode ser detetado de forma turbidimétrica, isto é, medindo a dispersão da luz ao atravessar a solução.

O equipamento *BN ProSpec*® System utiliza este princípio na deteção dos parâmetros que analisa.

Imunoensaio tipo sanduiche

Um anticorpo monoclonal biotilado ligado a partículas paramagnéticas da fase sólida liga-se ao composto a detetar da amostra, permitindo a sua captura. Num segundo passo, ocorre a adição de um segundo anticorpo que se liga também ao composto a detetar. Este anticorpo secundário está marcado com um componente como éster de acridina que vai possibilitar a sua deteção a determinado comprimento de onda.

O equipamento *VIDAS*® da bioMérieux, o *Liaison*® XL da DiaSorin, *Architect*™ da Abbott e *Phadia*™ 250 e 1000 da ThermoFisher utilizam esta metodologia para a quantificação de parâmetros. No caso do equipamento *VIDAS*®, o anticorpo secundário está conjugado com fosfatase alcalina. A adição do substrato 4-metil-umbeliferil fosfato, que vai ser metabolizado pela enzima, permite a quantificação dos parâmetros ao medir a absorvância a 450nm. No caso do equipamento *Liaison*®, o anticorpo secundário está conjugado com isoluminol.

Imunoensaio competitivo

O composto da amostra e um reagente sintético marcado com, por exemplo, éster de acridina, competem pela ligação a um mesmo antigénio ou anticorpo. A concentração do composto a determinar será inversamente proporcional ao sinal detetado, isto é, quanto maior a concentração deste na amostra, menos reagente sintético se vai ligar à fase sólida, pelo que menor será o sinal detetado e vice-versa.

O equipamento *Atellica*® Solutions da Siemens tem uma componente que faz química que usa princípios como os colorimétricos ou enzimáticos para a deteção dos seus parâmetros

e uma outra componente de imunologia, que usa princípios como o imunoensaio tipo sanduiche ou imunoensaio competitivo para a detecção dos seus parâmetros.

Em anexo encontra-se a tabela 7 com todos os equipamentos existentes no laboratório durante o momento do estágio e os parâmetros que estes analisavam, alguns dos quais vão ser falados no tópico seguinte.

Parâmetros analisados

Marcadores da função hepática

Albumina

A albumina é uma proteína de síntese hepática. Num indivíduo adulto saudável, os seus níveis oscilam entre 3,2 e 4,8 g/dL. Como tal, é importante para o diagnóstico e tratamento de doenças inflamatórias crónicas, disfunções de colagénio e disfunções hepáticas e renais. O seu doseamento é feito por uma reação colorimétrica em que a albumina no soro liga-se ao verde de bromocresol, formando um complexo que pode ser medido a 596/694 nm^[2].

Alanina aminotransferase (ALT)

É a transaminase mais específica produzida no fígado. Os seus valores de referência oscilam entre 10-49 U/L em adultos. A sua medição serve como auxiliar no diagnóstico e monitorização do tratamento de doenças hepáticas e biliares. Uma elevação de ALT ou AST quando comparada com ALP denota um problema de origem hepatocelular. Uma predominância de ALT aponta para hepatites agudas ou virais, esteatohepatites, hepatites autoimunes, entre outras. O doseamento é feito por métodos enzimáticos em que a adição de alfa-cetoglutarato à amostra leva à formação de piruvato e L-glutamato pela ação da ALT. A lactato desidrogenase oxida o NADH na presença de piruvato, formando lactato e NAD⁺ que é medido a 340/410nm, sendo esta proporcional à concentração de ALT^[3].

Fosfatase alcalina (ALP)

É uma transaminase de síntese hepática. Os seus valores de referência oscilam entre 46-116 U/L. O doseamento deste parâmetro é importante para o diagnóstico e monitorização de tratamento de doenças hepáticas, ósseas, paratiroideias e intestinais. Uma elevação de ALP e bilirrubina quando em comparação com ALT ou AST denota problemas colestáticos, como obstrução de ductos biliares, cirrose biliar primária, colangite, etc..

A enzima catalisa a transfosforilação do p-nitrofenilfosfato (p-NPP) para p-nitrofenol (p-NP) na presença de adenosina monofosfato (AMP). Mede-se a variação na absorvância de p-NP a 410nm que é diretamente proporcional à atividade da enzima^[4].

Aspartato aminotransferase (AST)

É uma transaminase de síntese hepática. O intervalo de referência para este parâmetro é <34 U/L. O seu doseamento é importante para o auxílio do diagnóstico e monitorização da terapia de doenças hepáticas, biliares e cardíacas. Uma elevação de ALT ou AST quando comparada com ALP denota um problema de origem hepatocelular. Uma predominância de AST aponta mais para hepatites relacionadas com excesso de álcool mas também para esteatohepatites. É feito por métodos enzimáticos onde há a conversão de L-aspartato em L-glutamato e oxaloacetato na presença de alfa-cetoglutarato pela AST. O oxaloacetato formado é posteriormente convertido a malato pela enzima malato

desidrogenase, sendo que nesta reação há a oxidação de NADH a NAD⁺. A redução dos níveis de NADH é medida a 340/410nm^[5].

Gama-glutamil transferase (GGT)

É uma transaminase de síntese hepática. Os valores de referência para este parâmetro são <73 U/L em adultos do sexo masculino e < 38 U/L em mulheres adultas. É importante para o auxílio do diagnóstico e tratamento da doença hepatobiliar e na avaliação de indivíduos com problemas de alcoolismo. O seu doseamento é feito pela de transferência de um resíduo L-gama-glutamil de um substrato sintético (L-gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida) para a glicilglicina, catalisada pela GGT, formando 5-amino-2-nitrobenzoato, que pode ser detetado a 410/478nm^[6].

Bilirrubina direta

Utilizada no rastreio e diagnóstico de doenças hepáticas e no diagnóstico de icterícia. Os seus valores de referência são ≤ 0,3 mg/dL para adultos. A sua forma de detecção passa por uma metodologia colorimétrica em que a bilirrubina é oxidada a biliverdina pelo vanadato a pH 3. Esta oxidação provoca uma redução na densidade ótica da cor amarela, que é medida a 451/545 nm^[7].

Bilirrubina total

É utilizada para auxiliar no diagnóstico e tratamento de doenças hemolíticas, biliares e hepáticas (hepatite e cirrose). O seu intervalo de referência é de 0,3-1,2mg/dL. Tal como a direta, a sua forma de detecção passa por um método colorimétrico em que a bilirrubina é oxidada pelo vanadato na presença de um detergente a pH 2,9 para produzir biliverdina. Na presença de detergente e de vanadato, tanto a bilirrubina direta como a total são oxidadas. A reação provoca a diminuição na densidade da cor amarela que é medida a 451/545nm^[8].

Marcadores da função renal

β-2-microglobulina (B2M)

Esta está presente em todas as células nucleadas enquanto componente do complexo HLA, sendo constantemente libertada no sangue em pequenas quantidades. Esta é filtrada livremente nos rins, onde é reabsorvida e decomposta nos túbulos renais. Assim, num indivíduo saudável, os seus níveis no soro serão sempre baixos (1-2,4mg/L para adultos). Aumentos dos seus níveis podem dever-se a um aumento da atividade do sistema imunitário, infeções ou doenças reumáticas que aumentam a libertação desta proteína ou a lesões renais que diminuem a sua eliminação, sendo por isso um indicador da capacidade de filtração glomerular nos rins. Assim, é utilizada para o auxílio no diagnóstico de artrite reumatóide ativa e de doença renal. A sua detecção é feita recorrendo a tecnologia imunoturbidimétrica^[9].

Cálcio

É utilizado para auxiliar no diagnóstico e acompanhamento da terapêutica de doenças da paratiróide, doenças ósseas, tétano e insuficiência renal crónica, sendo que os seus valores, em indivíduos adultos saudáveis são 8,3mg/dL no soro e plasma e 100-300mg/dia na urina. A sua detecção é feita por métodos colorimétricos em que iões de cálcio formam um composto violeta na presença de o-cresolftaleína-complexona que é medida a 545/658nm^[10].

Creatinina

Utilizada para auxiliar o diagnóstico de doenças renais e na monitorização da diálise renal. Os seus valores de referência são 0,7-1,3mg/dL no soro de homens e 0,55-1,02mg/dL no soro e mulheres e 950-2490mg/dia na urina de homens e 600-1800mg/dia na urina de mulheres. Para a sua quantificação, a creatinina reage com ácido pícrico, produzindo um complexo de creatinina picrato avermelhado, que é medido a 505/571nm; taxa de branco é usada para minimizar a interferência^[11].

Fósforo inorgânico

Útil para o diagnóstico e tratamento de doenças renais, disfunções da glândula paratiroide e deficiência de vitamina D, sendo que os seus valores de referência oscilam entre 2,4-5,1mg/dL no soro/plasma de adultos e 0,4-1,3g/dia na urina de adultos. Para a sua medição, o fósforo inorgânico reage com o molibdato de amónio, formando fosfomolibdato que é medido numa reação a 340/658nm^[12].

Proteínas totais

Utilizada para o diagnóstico e tratamento de doenças do fígado, rins ou medula óssea, assim como distúrbios metabólicos e nutricionais. O intervalo de referência para este parâmetro é 5,7-8,2g/dL para adultos. Para o seu doseamento utiliza-se uma metodologia colorimétrica, onde as ligações peptídicas da proteína interagem com iões cúpricos para formar um complexo roxo que é medido a 545nm^[13].

Ácido úrico

Utilizada para o auxílio do diagnóstico de insuficiência renal, gota e eclâmpsia. Os seus valores em indivíduos saudáveis varia de 13,7-9,2mg/dL no soro de um homem adulto e 3,1-7,8mg/dL no soro de uma mulher adulta. Na urina é de 250-750mg/dL. Para o seu doseamento, o ácido úrico é convertido pela uricase em alantoína e H₂O₂. Pela reação de Trinder, o peróxido de hidrogénio reage com a 4-aminofenazona e TOOS mediante a ação da peroxidase e origina quinonodiimina, que absorve a 545/694nm^[14].

Ureia

Útil para o diagnóstico de doença renal, obstrução do trato urinário e insuficiência renal aguda ou crónica. Para tal, a ureia é hidrolisada na presença de água e urease para produzir amónia e dióxido de carbono. A amónia vai depois reagir com 2-oxoglutarato e NADH mediante a ação da enzima glutamato desidrogenase e originar glutamato e NAD⁺ cuja formação pode ser seguida a 340/410nm. O intervalo de referência é 9-23mg/dL no soro/plasma e 12-20g/dia na urina^[15].

μ-albuminúria

A albumina é uma proteína plasmática responsável por uma grande parte da força osmótica do sangue. A presença de albumina na urina indicam a ocorrência de danos na capacidade de filtração glomerular do rim. Por exemplo, uma das consequências de diabetes *mellitus* tipo I é nefropatia de estadio III que é caracterizada por níveis altos de albumina na urina. A presença de albumina na urina também está associada a hipertensão, algumas anomalias de lípidos e distúrbios imunológicos, ITU, desidratação, exercício físico intenso, fármacos, etc. Assim este parâmetro é utilizado principalmente para a deteção e tratamento de pacientes em risco de desenvolver doença renal.

O seu doseamento é feito por imunoturbidimetria reforçada com PEG (polietilenoglicol). Os valores na urina de um indivíduo adulto responsável é < 30 mg/dia^[16].

Marcadores do metabolismo lipídico

Apolipoproteína A1 (APO-A1)

É um componente estrutural necessário para a formação de HDL e funciona como um cofator para a enzima lecitina-colesterol acetiltransferase (LCAT) na esterificação do colesterol livre no plasma para formar ésteres de colesterol.

É importante para a avaliação de risco de arteriosclerose e doenças coronárias. A arteriosclerose caracteriza-se por um engrossamento da camada interior da parede arterial devido à acumulação de material celular e de outras substâncias como lípidos. Nestas situações, os níveis de APO-A1 estão aumentados. Os valores encontram-se diminuídos em dislipoproteinémias, diabetes e doenças hepáticas.

Os valores de referência são 79-169mg/dL no soro de homens adultos e 76-214mg/dL no soro de mulheres adultas. O seu doseamento é feito por imunoturbidimetria reforçado com PEG^[17].

Apolipoproteína B (APO-B)

É um componente essencial para a formação e libertação de lipoproteínas no plasma e interage com os recetores da lipoproteína de baixa densidade (LDL) das células periféricas, possibilitando assim o seu catabolismo.

Tal como a APO-A1, é importante para a avaliação de risco de arteriosclerose e doenças coronárias. A determinação de ambas as apolipoproteínas e a relação entre estas revelou ser mais importante para a determinação de risco de doenças coronárias do que a medição individual de cada.

Os valores de referência são 46-174mg/dL em homens adultos e 46-142mg/L em mulheres adultas. O seu doseamento é feito por imunoturbidimetria reforçado com PEG^[18].

Colesterol total

É útil para o diagnóstico de distúrbios do colesterol e de lípidos e lipoproteínas. Uma diminuição dos seus níveis no plasma reduz a incidência da doença cardíaca coronária. O princípio do seu doseamento passa pela hidrólise de ésteres de colesterol pela enzima colesterol esterase, originando colesterol e ácidos gordos livres. O colesterol, pela ação da colesterol oxidase, é convertido em colest-4-en-3-ona, formando também peróxido de hidrogénio. Segue-se uma reação de Trinder, em que o H₂O₂, juntamente com 4-aminoantipirina e fenol e pela influência da peroxidase, origina um composto colorido que pode ser medido a 505/694nm. Os valores de referência são <200mg/dL para um risco baixo de doenças coronárias e, para um risco moderado, 200-23mg/dL^[19].

Lipoproteína de alta densidade (D-HDL)

Útil para a avaliação do risco da doença coronária. O seu doseamento passa por uma reação com 2 passos. No primeiro, há a eliminação de quilomicras, colesterol em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e colesterol LDL, recorrendo à colesterol esterase que converte os ésteres de colesterol em colesterol e ácidos gordos, sendo que o colesterol é oxidado pela colesterol oxidase, formando colesteno e H₂O₂, que é eliminado pela catalase. Depois, procede-se à medição específica de colesterol HDL, onde surfactante permite a libertação de HDL. As reações deste passo são as mesmas que do passo anterior, mas como os outros tipos de colesterol foram eliminados, este mede só o colesterol HDL. A H₂O₂, em vez de ser degradado pela catalase, é utilizada numa reação de Trinder, em que a peroxidase usa este composto para formar um corante – quinoneimina – cuja intensidade pode ser medida a 596/694 nm. Os valores de referência são ≥ 60 mg/dL^[20].

Lipoproteína de baixa densidade (D-LDL)

Útil para a avaliação do risco da doença coronária. O seu doseamento passa por uma reação com 2 passos. No primeiro, há a eliminação de quilomicras, colesterol VLDL e colesterol HDL, recorrendo à colesterol esterase. Depois, procede-se à medição específica de colesterol LDL, sendo que ocorre a produção de H₂O₂, que é utilizada numa reação de Trinder, em que a peroxidase usa este composto para formar um corante – quinoneimina – cuja intensidade pode ser medida a 596/694 nm. Os valores de referência são: < 100 mg/dL (ótimo), 100-129 mg/dL (acima de ótimo), 130-159 mg/dL (limite de alto), 160-189 mg/dL (alto) e ≥ 190 mg/dL (muito alto)^[21].

Triglicéridos

É utilizado para auxiliar o diagnóstico e tratamento de pacientes com diabetes *mellitus*, nefrose, obstrução hepática ou outras doenças que envolvem o metabolismo de lípidos ou distúrbios endócrinos. Os triglicéridos são convertidos em colesterol e ácidos gordos pela lipase. O glicerol, por ação da colesterol cinase, converte-se em glicerol-3-fosfato que por sua vez origina dihidroxiacetona fosfato e H₂O₂. A reação de Trinder possibilita a formação de corante quinoneimina que é medido a 505/694 nm. Os intervalos de referência para este parâmetro são <150 mg/dL (normal), 150-199 mg/dL (limite de alto), 200-499 mg/dL (alto) e ≥ 500 mg/dL (muito alto)^[22].

Marcadores do metabolismo glicídico

Glucose

A medição deste parâmetro é importante para o diagnóstico e monitorização de distúrbios do metabolismo de hidratos de carbono como a diabetes *mellitus*, hipoglicémia neonatal, hipoglicémia idiopática ou sobredosagem de insulina.

O método usado para o seu doseamento é o método da hexocinase, um método enzimático em que a glucose é fosforilada pela hexocinase na presença de ATP. A glucose-6-fosfato formada é oxidada pela enzima glucose-6-fosfato desidrogenase, convertendo NAD em NADH, cuja absorvância é medida a 340/410nm. Os valores de referência para este parâmetro são 74 – 106 mg/dL para adultos no soro e 40 – 70 mg/dL na urina^[23].

Frutosamina

A frutosamina é uma proteína glicada que é representativa dos níveis de glucose no sangue durante as 2-3 semanas anteriores. No doente diabético, a concentração de frutosamina também aumenta, sendo por isso um marcador útil para monitorizar os doentes diabéticos a médio-longo prazo. O doseamento faz-se por métodos enzimáticos onde uma proteinase K digere a proteína glicada para produzir fragmentos de proteína glicada. Uma frutosaminase vai oxidar a ligação destes fragmentos, libertando aminoácidos e peróxido de hidrogénio, que é medido numa reação de Trinder a 596/694nm. O intervalo de referência para este parâmetro é 122-236micromol/L para adultos^[24].

Marcadores de Infeciologia

Vírus da Hepatite A (HAV)

HAV é um vírus de cadeia simples, sem invólucro, classificado como picornavírus. O vírus da hepatite A tem transmissão via fecal-oral que ocorre sobretudo devido a alimentos contaminados ou más condições sanitárias. A sua replicação ocorre no fígado, sendo posteriormente excretado na bÍlis e transportado nas fezes. Raramente há infeções crónicas após infeção por HAV. A sua pesquisa justifica-se para a monitorização de

populações de risco como viajantes para zonas endémicas, encarregados de limpezas de esgotos, toxicodependentes e praticantes de sexo anal e para a monitorização da progressão de infeções.

Os sintomas de uma infeção por este vírus incluem hepatomegália, icterícia, urina escura, fadiga, perturbações gastrointestinais como anorexia, náuseas, vómitos e dores abdominais. Estes sintomas semelhantes a infeção por hepatite Be C, sendo o doseamento de parâmetros como aHAVM (IgM contra HAV) e aHAVT (determinação de anticorpos totais contra o vírus) importante para distinguir destes casos.

O anticorpo IgM é detetável 3-6 meses após o início da doença, sendo importante para o diagnóstico de uma infeção aguda (menos de 6 meses) pelo vírus da hepatite A. O seu doseamento é feito por imunoensaio quimioluminométrico competitivo pelo equipamento *Atellica® solutions*^[25] e por um imunoensaio tipo sanduiche após imunocaptura, recorrendo a um passo final de deteção por fluorescência^[26] no equipamento VIDAS®.

A determinação de anticorpos totais do vírus da hepatite A serve como auxílio no diagnóstico de infeções virais anteriores ou atuais e para a deteção de anticorpos após vacinação. É doseada via imunoensaio quimioluminométrico competitivo pelo equipamento *Atellica® solutions*^[27] e por um imunoensaio competitivo com uma deteção final por métodos fluorescentes (ELFA)^[28] no equipamento VIDAS®.

Vírus da Hepatite B (HBV)

O HBV é um vírus endémico em todo o mundo e constitui a principal causa de doenças hepáticas. A sua transmissão por contacto direto via sangue e fluidos corporais, tais como transfusões sanguíneas, punções com agulhas, contacto com feridas abertas, sexual e vertical (de mãe para filho). Tem um período de incubação: 6-8 semanas (1-6 meses) e os seus sintomas incluem indisposição, febre, gastroenterite e icterícia. Pode provocar uma hepatite icterica típica, hepatite anictérica subclínica, hepatite fulminante ou hepatite crónica; infeção crónica está associada ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. 90 a 95% dos adultos infetados recuperam totalmente da infeção aguda de HBV e eliminam o vírus. Contudo, 5-10% tornam-se portadores crónicos.

O vírus possui vários antígenos, como o antígeno “E” (aHBe) ou o “S” (aHBS). O antígeno “E” é um marcador da replicação viral e de infeção ativa, pelo que o seu desaparecimento em conjunto com o aparecimento do anticorpo anti-HBe é indicativo de recuperação da infeção. Num caso de hepatite crónica, este antígeno não desaparece, tendendo a persistir durante meses ou anos^[29]. O antígeno “S” é um antígeno de superfície do vírus, sendo utilizado para diagnosticar casos de suspeita por HBV e para monitorizar os indivíduos afetados^[30].

Ambos estes anticorpos são doseados no equipamento *Atellica® solutions* por um imunoensaio tipo sanduiche^{[29][30]}. A realização de um teste confirmatório é feito no equipamento VIDAS®, onde é possível dosear o antígeno e o anticorpo e antígeno HBe por um ensaio imunoenzimático com deteção por fluorescência (ELFA)^[31].

Vírus da Hepatite C (HCV)

O HCV é o principal agente etiológico da hepatite crónica não A e B. A infeção por este é muitas vezes assintomática, embora mais de 80% destes casos a doença se torna crónica. Em 20% dos casos de cronicidade, a doença evolui para cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular ou colangiocarcinoma. A transmissão de HCV dá-se por transfusão sanguínea, consumo de drogas por via intravenosa, piercings ou tatuagens, exposição nosocomial, sexual, contacto doméstico casual, técnicas de reprodução assistida e vertical (mãe para filho).

Para a sua deteção doseiam-se os anticorpos IgG contra o vírus da hepatite C no soro por um imunoensaio tipo sanduiche em 2 passos com tecnologia quimioluminescente^[32] no equipamento *Atellica*[®] *solutions*. Pode também ser doseado no equipamento VIDAS[®] pelo método ELFA^[33].

Vírus da Imunodeficiência humana (HIV)

O HIV é o patogene responsável pela SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida), tendo uma transmissão por via sexual, exposição a sangue ou produtos hemáticos infetados e transmissão vertical.

O ensaio em questão utiliza antigénios recombinantes de proteínas virais do envelope – gp120 (HIV1) e gp36 (HIV2) – para detetar anticorpos contra HIV1 e HIV2, mas também vai permitir a deteção do antigénio p24. O HIV1 é a principal causa de síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). O HIV2 foi isolado na África Ocidental, partilhando epítomos das proteínas nucleares mas pouca reatividade cruzada com as glicoproteínas do envelope. Tem uma progressão mais lenta da doença porque a taxa de replicação do vírus é mais baixa. O doseamento destes parâmetros faz-se por um imunoensaio tipo sanduiche em 2 passos no equipamento *Atellica*[®] *solutions*. Pode também ser doseado no equipamento VIDAS[®] pelo método ELFA^[33].

Rubéola

Infeções por este vírus dão origem a infeções primárias moderadas, tendo como sintomas erupções cutâneas ligeiras, febre baixa, linfadenopatia, etc. Contudo, durante a gravidez podem ser transmitidas para o feto por via placentária e causar a sua morte ou síndrome de rubéola congénita (baixo peso, surdez, doença oftalmológica, atraso mental e malformações cardíacas). A medição de IgG e IgM permite avaliar o estatuto imunitário e diagnosticar se se trata de uma primoinfeção ou de uma segunda infeção. Caso haja dúvidas, deve-se realizar uma segunda colheita 3 semanas mais tarde para ver se houve um aumento de IgGs, o que seria indicativo de uma infeção em evolução.

O doseamento de tanto dos anticorpos IgM como dos IgG contra este vírus é feito por imunoensaio tipo sanduiche em 2 passos com tecnologia quimioluminescente no equipamento *Atellica*[®] *solutions*^{[36][37]}. Pode também ser doseado no equipamento VIDAS[®] pelo método ELFA^{[38][39]}.

Sífilis

A sífilis é causada pelo agente *Treponema pallidum*, sendo por isso a sua deteção importante para o diagnóstico da doença. A transmissão da sífilis dá-se maioritariamente por via sexual, mas pode também ser transmitida durante a gestação da mãe para o feto. Quando não tratada, pode causar danos no coração, aorta, cérebro, olhos e ossos, podendo até mesmo ser fatal.

O doseamento deste é feito por imunoensaio tipo sanduiche em 2 passos com tecnologia quimioluminescente no equipamento *Atellica*[®] *solutions*^[40].

Toxoplasma

A deteção de anticorpos IgG e IgM contra *Toxoplasma gondii* é usada para a monitorização e avaliação da resposta de um indivíduo infetado e é particularmente útil em mulheres grávidas, para avaliar o risco de transmissão ao feto.

A infeção propaga-se, geralmente, por ingestão de carne crua ou mal cozinhada com quistos do agente ou por contacto com fezes de gato contaminados com oócitos. Em indivíduos imunocompetentes e saudáveis, a infeção é geralmente assintomática, mas em mulheres grávidas, a infeção pode ter um grande risco associado para o feto, podendo

apresentar sintomas como linfadenopatia, coriorretinite, microcefalia e calcificações cerebrais. É também um importante agente patogénico oportunista em pacientes imunocomprometidos ou com cancro, levando a uma infeção latente com sintomas como cefaleias, confusão, febre e défices neurológicos focais.

O doseamento deste é feito por imunoensaio tipo sanduiche em 2 passos com tecnologia quimioluminescente no equipamento *Atellica® solutions*^{[41][42]}. Pode também ser doseado no equipamento VIDAS® pelo método ELFA^{[43][44]}. O equipamento VIDAS®, para além da determinação do níveis de IgM e IgG, permite também determinar a avidéz das IgG, permitindo assim diferenciar infeções recentes (menos de 4 meses) de infeções mais antigas. O princípio deste ensaio é o mesmo do ensaio de IgG com a adição de um pré-tratamento da amostra com ureia que quebra a ligação entre antigénios e anticorpos de baixa afinidade^[45].

Citamegalovírus (CMV)

Calcula-se que 60-85% da população está infetada por este vírus, mas é assintomática. O CMV pode persistir no organismo e causar infeções recorrentes. Em apenas 5% dos casos, principalmente em imunodeprimidos e grávidas, a infeção pode ter consequências mais graves como hepatosplenomegália, hidrocefalia, microcefalia e nascimento prematuro, sendo a morte do feto frequente. Outros sintomas incluem surdez e cegueira parcial.

O doseamento destes parâmetros (IgM e IgG) pode ser feita no equipamento *Atellica® solutions* recorrendo a uma imunoensaio tipo sanduíche em 2 passos que recorre a tecnologia quimioluminescente^{[46][47]}. O equipamento VIDAS® permite fazer, como já foi referido, um teste confirmatório recorrendo a um ensaio que tem por base um imunoensaio tipo sanduiche com deteção final por fluorescência^{[48][49]}.

A deteção de IgM é útil no diagnóstico de infeções recentes, mas não permite distinguir uma infeção primária, de reativação ou estimulação policlonal. A quantificação de IgGs permite verificar a seroconversão para confirmar ou excluir infeções primárias.

Para tal, pode ainda ser estudada a avidéz dos anticorpos IgG contra o CMV, o que permite também elucidar melhor se uma infeção é recente (menos de 3 meses) ou antiga (mais de 3 meses). É particularmente importante em grávidas ou imunocomprometidos em que é crucial saber quando é que a infeção ocorreu ou se esta é recente ou uma antiga, permitindo excluir infeções primárias. Tal como no caso da deteção de toxoplasma, previamente faz-se uma incubação com ureia que vai romper a ligações fracas entre antigénio e anticorpo. Assim, ligações com baixa avidéz são eliminadas, ao passo que ligações com elevada avidéz permanecem intactas. Uma baixa avidéz indica uma infeção com menos de 3 meses e uma alta avidéz indica uma infeção com mais de 3 meses^[50].

No caso das infeções por *Toxoplasma gondii*, CMV e pelo vírus da rubéola, é sempre importante o doseamento de IgM e IgGs em simultâneo para se calcular a fase da infeção e assim melhor se diagnosticar o indivíduo. IgMs são marcaodres de infeção aguda, recente ou reativada, ao passo que as IgGs são indicativas de uma infeção mais antiga. A tabela abaixo explora as diferentes combinações de resultados e o significado clínico que estes podem ter.

Tabela 1 - Significado clínico da detecção de IgM e IgGs em doenças infecciosas

Resultado IgM	Resultado IgG	Significado clínico
negativo	negativo	Doente não foi infetado pelo agente
negativo	positivo	Não é possível determinar se o doente sofre de infeção no momento, mas provavelmente foi infetado anteriormente por este agente
positivo	negativo	O doente poderá ou não estar a sofrer de uma infeção aguda. Deve-se voltar a testar a pessoa com nova amostra recolhida algumas semanas depois da primeira para ver se são detetados anticorpos IgG (indicativo de seroconversão). Se o resultado permanecer igual, a amostra deve ser enviada para um laboratório de referência com experiência no diagnóstico destas infeções
positivo	positivo	Possível infeção aguda por <i>T. gondii</i> estando já a ocorrer seroconversão

Vírus Epstein-Barr (EBV)

O vírus EBV é o causador da mononucleose infecciosa. A transmissão dá-se pela saliva, sendo que a replicação do vírus ocorre no epitélio orofaríngeo e os viriões são libertados na saliva pelos linfócitos B. O diagnóstico desta doença é maioritariamente clínico, sendo que a serologia é apenas usada para despistar outras doenças com manifestações clínicas semelhantes.

O vírus EBV produz 3 tipos de antígenos distintos: EA (early antigens), seguidos de VCA (antígenos viriais da cápside) e por fim os EBNA (antígenos nucleares), sendo que podem ser detetados anticorpos contra estes antígenos para auxiliar no diagnóstico da doença e despiste de outras com sintomas semelhantes. O seu doseamento é feito por imunoensaio tipo sanduiche com detecção final por fluorescência^{[51][52]}.

Interferon gamma release assay (IGRA)

O teste IGRA consiste na colheita de 4 tubos para a detecção de vários péptidos antigénicos associados à infeção por o agente *Mycobacterium tuberculosis*. O objetivo do teste é identificar pessoas com a infeção ainda no período assintomático (infeção latente) para serem tratados^[53].

Este ensaio mede a libertação de interferão gama pelas células T após estimulação por antígenos específicos para o complexo *M. tuberculosis*. Estes antígenos são mais específicos que DPP (usado no teste da tuberculina ou teste de Mantoux) porque não são codificados pelas estirpes presentes na vacina BCG ou da maioria das espécies MNT (micobactérias não-tuberculosas), não havendo reações cruzadas.

O seu doseamento é feito no equipamento *Liaison® XL* recorrendo a tecnologia quimioluminescente conjugada com um imunoensaio tipo sanduíche (CLIA)^[54].

Coronavírus da síndrome de infeção respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2)

O RNA do vírus SARS-CoV-2 codifica para 4 proteínas estruturais: S (spike), M (membrana), E (envelope) e N (nucleocápside). A proteína spike é composta por duas subunidades, S1 e S2, sendo que o domínio de ligação ao recetor celular está na S1.

A detecção deste vírus e assim o diagnóstico de uma infecção por este pode ser feito detetando anticorpos IgM ou IgG contra este ou detetando anticorpos contra a proteína spike. Anticorpos contra o spike inativam a proteína da espícula, neutralizando o vírus, motivo pelo qual muitas vacinas para o SARS-CoV-2 geram respostas contra esta proteína. A identificação de anticorpos IgM identificação implica uma infecção recente e permite avaliar o decurso da doença^[55]. Resultados negativos não excluem infecção e resultados positivos podem dever-se a reações cruzadas com fator reumatóide, anticorpos heterófilos, anticorpos humanos anti-rato^[55, 56].

O doseamento destas proteínas pode ser feito tanto no equipamento *Liaison*® XL^[54] ou *Architect*™^{[55][56]} por um imunoensaio quimioluminescente em 2 passos.

Marcadores de alergologia

IgE total

A IgE é uma proteína que existe em quantidades vestigiais no soro, representando apenas 0,001% das imunoglobulinas totais no soro. É um mediador da reação alérgica, pelo que a sua medição (em conjunto com outros fatores clínicos) pode auxiliar na distinção entre doenças atópicas e não atópicas, onde por norma se observam valores de IgEs mais elevados em doenças atópicas como a asma de carácter alérgico, rinite alérgica e dermatite atópica. Podem também aparecer valores de IgEs elevados em condições não alérgicas como infeções por parasitas, estados de imunodeficiências, doenças autoimunes, mieloma IgE, síndrome de Sézary, doença de Hodgkin e aspergilose broncopulmonar.

O seu doseamento é feito por um imunoensaio tipo sanduiche^[57].

O equipamento *Phadia 1000* permite depois fazer o doseamento de IgEs específicas de alérgenos comuns, que é importante para o diagnóstico de distúrbios alérgenos mediados por IgEs, asma extrínseca, febre dos fenos ou eczema atópico^[58].

Marcadores de anemia

Ferro (Fe)

O seu doseamento é útil para diagnóstico e monitorização de tratamento de anemias por deficiência de ferro e hemocromatoses. Em condições ácidas, o ferro é libertado pela transferrina e reduzido ao estado ferroso. No estado ferroso, este combina-se com ferrozina, formando um composto cromogéneo que pode ser medido numa reação colorimétrica a 571/658nm. Os seus valores de referência oscilam entre 50-170 microg/dL em mulheres e 65-175 µg/dL em homens^[59].

Capacidade total de fixação do ferro (TIBC)

A capacidade total de fixação de ferro representa a quantidade de ferro que consegue circular no sangue ligado à transferrina. Serve para avaliar casos de anemia por falta de ferro ou casos de excesso de ferro já que na falta deste metal, os valores de TIBC tendem a aumentar, mas em casos de hemocromatose ou envenenamento por este metal, os valores diminuem. Os seus valores de referência são 250-435 µg/dL para adultos.

Para o seu doseamento, a amostra é primeiramente adicionada a um reagente ácido que contém ferro e um corante fixador desse ferro. O pH ácido promove a libertação de ferro da transferrina que é fixado, formando um composto colorimétrico. Num segundo passo, a adição de um tampão neutro aumenta a afinidade da transferrina para o ferro, dissociando este íão do composto colorimétrico. A redução da absorvância do ferro entre o primeiro e o segundo passo é proporcional à TIBC da amostra^[60].

Transferrina

A transferrina é a proteína de transporte de ferro no sangue. Os seus valores normais no soro são 215-365 mg/dL para homens e 250-380 mg/dL para mulheres. Este ensaio é usado como auxiliar no diagnóstico de doenças como anemia por deficiência de ferro, anemia perniciosa, policitemia, hepatite aguda, infecção crônica, entre outros.

O seu doseamento é feito por um ensaio imunoturbidimétrico reforçado por polietilenoglicol (PEG)^[61].

Ferritina

É uma proteína de armazenamento de ferro, contendo cerca de 25% do ferro total no corpo. É encontrada principalmente em células do fígado, baço, medula e células reticuloendoteliais. Quando necessário para a eritropoiese, a ferritina liberta as moléculas de ferro que se ligam à transferrina e são transportadas para a medula óssea. Os seus valores em indivíduos saudáveis oscilam no intervalo de 22-322 ng/mL para homens e 10-291 ng/mL para mulheres.

O seu doseamento serve como auxiliar no diagnóstico de anemia ferropénia e sobrecarga de ferro como talassemia e hemocromatose. Este é feito através de um ensaio imunoenzimático tipo sanduiche que recorre à tecnologia de quimioluminescência direta^[62].

Folatos

Os folatos são cofatores em reações metabólicas que envolvem a transferência de unidades de carbono simples. Juntamente com a vitamina B12, é essencial para a síntese de DNA. São maioritariamente adquiridos via alimentação e a baixa ingestão deste composto, má absorção devido a doenças intestinais, gravidez ou fármacos leva a uma deficiência de folatos que vai afetar a síntese de DNA, causando anemias macrocíticas devido à maturação anormal de eritrócitos.

Pode-se determinar os folatos no soro ou os folatos eritrocitários, sendo para este último necessário proceder primeiro à lise dos eritrócitos com ácido fólico e ácido ascórbico. O seu doseamento é feito por um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimioluminescente direta^[63]. Os valores esperados são > 5,38 ng/mL no soro e 280-791 ng/mL nos eritrócitos.

Vitamina B12

A vitamina B12 ou cianocobalamina é exclusivamente obtida em dietas de origem animal que incluem carne, ovos e leite. Esta requer um fator intrínseco para ser absorvida ao nível do intestivo, sendo depois armazenado no fígado, medula espinal e noutros tecidos. Juntamente com os folatos, a vitamina B12 é essencial para a síntese de DNA, afetando assim a maturação de eritrócitos. É também necessária para a formação de mielina. Deficiências desta vitamina estão ligadas a anemias macrocíticas, como a anemia perniciosa que é causada por deficiência de B12 devido à falta de fator intrínseco.

É também doseada por um imunoensaio competitivo que recorre a tecnologia quimioluminescente direta^[64]. Os seus valores de referência oscilam entre 211 e 911 pg/mL.

Marcadores da função pancreática

Amilase

O doseamento deste parâmetro serve para auxiliar o diagnóstico de patologias pancreáticas como a pancreatite aguda (inflamação do pâncreas). Os valores de referência

da amilase são 30-118 U/L no soro e ≤ 650 U/L na urina. O seu doseamento é feito recorrendo a uma metodologia enzimática onde o P-nitrofenil-maltoheptósido bloqueado por etilideno é metabolizado pela enzima alfa-amilase e alfa-glucosidase, libertando o p-nitrofenol que é medido a 410/694nm^[65].

Lipase

É um parâmetro útil para o diagnóstico e monitorização de tratamento de doenças do pâncreas como a pancreatite aguda e obstrução do ducto pancreático.

O princípio deste doseamento passa pela clivagem de um substrato cromogénico pela lipase, formando um intermediário instável que se decompõe espontaneamente numa solução alcalina, formando ácido glutárico e metilresorufina, que é quantificada espectrofotometricamente a 571/694nm^[66]. Os valores de referência são 12-53U/L para adultos saudáveis.

Amilase pancreática

O doseamento da amilase pancreática serve como auxílio para o diagnóstico e tratamento de distúrbios pancreáticos.

Para o seu doseamento, numa primeira fase são necessários dois anticorpos monoclonais para inibir a amilase salivar sem afetar a isoforma pancreática. Depois, esta última enzima vai dividir um substrato em 3 oligossacarídeos. A adição de glucosidase vai permitir a libertação de nitrofenol (p-NP), que é detetado a 410/694nm^[67]. Os valores de referência para este parâmetro são 13-53 U/L.

Péptido C

Nas células beta do pâncreas, a proinsulina é dividida para formar insulina e o péptido C, ambos libertados para a corrente sanguínea em quantidades equimolares. Este garante a estrutura correta da insulina através do alinhamento correto das cadeias A e B da molécula de insulina para que se formem as corretas pontes de dissulfeto. Como a sua libertação para a corrente sanguínea está associada com a de insulina, o seu doseamento permite auxiliar o tratamento e diagnóstico de doenças relacionadas com uma secreção anormal de insulina como a diabetes *mellitus*. Por exemplo, a determinação de insulina em diabéticos levanta um problema: a interferência da insulina exógena e de anticorpos anti-insulina circulantes. Os ensaios de péptido C não sofrem interferência destes anticorpos, sendo por isso usado preferencialmente para estes casos ao permitir uma avaliação mais fidedigna das reservas endógenas de insulina.

É também utilizado como auxiliar no diagnóstico diferencial de hipoglicémia e do tratamento excessivamente zeloso com insulina, já que o péptido C não existe em preparações endógenas e para diferenciar diabetes insulino-dependentes e não dependentes. Aumentos dos seus valores são indicativos de insulinomas e tumores de células beta.

Os seus valores biológicos de referência oscilam entre 0,81-3,85ng/mL no soro e $< 156,46$ pg em 24h na urina. O seu doseamento é feito com base num imunoensaio tipo sanduiche^[68].

Insulina

A insulina é uma proteína sintetizada, armazenada e segregada pelas células beta dos ilhéus de Langerhans do pâncreas em resposta à presença de glicose no sangue (pós-prandial). É responsável pela regulação da concentração de glucose no sangue ao estimular a entrada desta nas células e promover a glicogenólise no fígado e a síntese de triglicéridos e proteínas no tecido adiposo e muscular, respetivamente. A ausência de

insulina leva a hiperglicémia em jejum, que funciona como auxiliar no diagnóstico de diabetes *mellitus*. Esta pode ser de dois tipos. No tipo 1 (insulinodependente) não há insulina no sangue por destruição autoimune das células beta. No tipo 2 (não insulinodependente), há um enfraquecimento da resposta biológica à insulina em circulação.

Tal como para o péptido C, a insulina é doseada por um imunoensaio tipo sanduiche, sendo os seus valores de referência no soro 3,0-25,0 mU/L^[69].

Marcadores tumorais

Antes de se proceder a uma explicação mais detalhada de cada um dos marcadores tumorais analisados na Synlab, deve-se referir que o doseamento destes não serve para o diagnóstico de doenças oncológicas, ou seja, a presença destes no soro não é suficiente para o diagnóstico destas doenças. O diagnóstico deve sempre ser feito em conjunto com o historial clínico e outros exames para se identificar a doença em questão.

O doseamento de todos estes parâmetros é feito por imunoensaio tipo sanduiche que recorre a tecnologia quimioluminescente direta.

Alfa-fetoproteína (AFP)

A AFP é uma glicoproteína de síntese hepática, mas também pode ser sintetizada no saco vitelino e trato gastrointestinal. É produzida pelo feto e secretada para o soro fetal, atingindo um pico nas 13 semanas de gestação. Aparece aumentado durante a gravidez, doenças hepáticas benignas (hepatite ou cirrose), no carcinoma hepatocelular e em certos tumores de células germinativas. É também muito usado como procedimento clínico na monitorização de pacientes com cancro testicular, sendo indicador da eficácia clínica. 98,4% dos indivíduos aparentemente saudáveis apresentam valores < 8,1 ng/mL^[70].

CA-125

O CA-125 é uma glicoproteína de superfície associado ao cancro epitelial não mucinoso dos ovários. Nesta doença, a proteína é expelida para o soro, tornando-se um marcador tumoral útil. Serve como auxiliar na monitorização da terapêutica de doentes com cancro de ovários e é também útil na monitorização da progressão desta doença, já que estudos reportam que valores superiores a 35 U/mL no período pós-operatório têm risco mais elevado de recorrência clínica. Doentes com determinadas condições benignas como cirrose hepática, pancreatite aguda, endometriose, doença inflamatória pélvica ou no primeiro trimestre da gravidez podem também apresentar níveis elevados de CA-125. 97,5% das mulheres testadas apresentam valores até 30,2 U/mL^[71].

CA-15.3

O CA-15.3 é uma glicoproteína polimórfica associada ao cancro da mama metastático. O cancro da mama é uma doença prevalente e espera-se que 1 em cada 10 mulheres seja diagnosticada com cancro da mama em qualquer momento da sua vida. A grande maioria das mortes por cancro da mama devem-se a estados de elevada disseminação da doença, pelo que a deteção precoce é extremamente importante. Assim, a monitorização dos valores de CA15-3 que é indicador do estado da doença, é crucial. Tem também um importante valor preditivo positivo para a doença recorrente em pacientes diagnosticados com estádios II e III da doença. Os valores de referência para este marcador são < 32,4 U/mL^[72].

CA-19.9

O CA-19.9 serve como auxiliar na monitorização do tratamento de cancro gastrointestinal. É também utilizado para a deteção de recorrências e na gestão e estadiamento da doença. Também é usado na gestão de pacientes com neoplasia pancreática, porque embora níveis elevados de CA19-9 não sejam exclusivos da cancro pancreático, este é o exame serológico mais útil para a diferenciação de doenças benignas de malignas. O valor de referência para este marcador tumoral em indivíduos saudáveis é $< 37 \text{ U/mL}$ ^[73].

Antigénio Carcinoembrionário (CEA)

É uma glicoproteína que é encontrada por norma no epitélio embrionário, mas também já foi detetado em pacientes com cancro colorretal primário, cancro do trato gastrointestinal, da mama, do pulmão, ovário, próstata, fígado e do pâncreas. Fornece informações importantes sobre o prognóstico dos doentes, a recorrência dos tumores após remoção e a eficácia terapêutica. É muito utilizado para a monitorização de pacientes com cancro. Os valores de referência deste marcador são $< 2,5 \text{ ng/mL}$ ^[74].

Marcadores da função reprodutora

Estradiol

Em mulheres não grávidas, o estradiol é maioritariamente secretado por células do folículo durante o desenvolvimento do corpo lúteo. Durante a gravidez, a placenta secreta estradiol, onde cerca de 40% circula ligado a SHBG, 1-3% circula livremente e o restante circula ligado à albumina. O estradiol desempenha uma função importante no ciclo menstrual da mulher, estando envolvido na regressão do corpo lúteo e assinalando um novo ciclo. Assim, o seu doseamento serve para a avaliação da função dos ovários e monitorização do desenvolvimento folicular para protocolos de reprodução assistida.

É feito por um imunoensaio competitivo.

Os valores de referência para este parâmetro são $< 39,8 \text{ pg/mL}$ em homens e nas mulheres varia de acordo com a fase do ciclo menstrual, podendo variar de $19,5 \text{ pg/mL}$ na fase folicular, a $356,7 \text{ pg/mL}$ a meio do ciclo^[75].

Hormona folículo-estimulante (FSH)

Esta hormona é secretada pela adeno-hipófise em resposta à libertação de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo. Tem um papel fundamental na manutenção e regulação do funcionamento dos sistemas reprodutores masculino e feminino. Nas mulheres, estimula o desenvolvimento do folículo e a produção de estradiol e outros estrogénios. No homem, estimula a espermatogénese. O seu doseamento é feito por um imunoensaio tipo sanduiche que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta. Tal como no caso anterior, os valores de referência variam bastante. Nos homens é de $1,4-18,1 \text{ U/L}$, mas nas mulheres pode variar de $1,5 \text{ U/L}$ na fase lútea a $33,4 \text{ U/L}$ a meio do ciclo, chegando a atingir valores de $116,3 \text{ U/L}$ após a menopausa^[76].

Antigénio prostático (PSA) e fantigénio prostático livre (fPSA)

O PSA é uma glicoproteína encontrada no citoplasma das células que revestem os ácinos e as condutas da próstata. É detetado no soro de homens com a próstata normal, hipertrófico benigno e maligno, mas não é detetado em homens sem tecido prostático nem no soro da maioria das mulheres. O facto de ser exclusivo da próstata torna-o um marcador adequado para a monitorização de homens com cancro da próstata, mas como também é observado PSA em pacientes com condições benignas, não é aconselhado o uso deste exame para diagnóstico de cancro da próstata. É também útil na deteção de

recorrências após prostatectomia. Assim, este ensaio, em conjunto com o exame retal digital, auxilia na detecção de cancro da próstata nos homens^[77].

No caso de fPSA, este é usado em homens que apresentem valores de PSA entre 4 e 10 ng/mL. A determinação de fPSA é usada como auxiliar na distinção entre o cancro da próstata e a doença prostática benigna – a proporção de PSA livre no soro é significativamente mais elevada nos homens com hiperplasia benigna da próstata do que nos homens com cancro da próstata^[78].

Ambos os doseamentos são feitos por imunoensaio do tipo sanduiche que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta^{[77][78]}. O valor de referência de PSA para indivíduos saudáveis é de < 4,0ng/mL. No caso de fPSA, doenças benignas apresentam em média valores de 1,18 ng/mL, ao passo que é de 0,98 ng/mL em doenças malignas.

Prolactina

A prolactina é uma hormona secretada pela adeno-hipófise sob o controlo de fatores inibidores e libertadores de prolactina libertados pelo hipotálamo. É também secretada pela placenta, podendo aparecer no líquido amniótico. Inicia e mantém a lactação nas mulheres, mas também tem um papel importante na função gonadal das mulheres e de homens. O seu valor basal circulante em adultos é de < 30 ng/mL, mas durante a gravidez e lactação pode aumentar 10 a 20 vezes (9,7-208,5 ng/mL). Níveis séricos constantemente elevados fora da gravidez são indicadores de hiperprolactinemia, uma disfunção hipotalâmica-hipofisária, que resulta em galactorreia, amenorreia e infertilidade em mulheres e impotência e hipogonadismo em homens.

O seu doseamento é feito por um imunoensaio tipo sanduiche em 2 locais que recorre à tecnologia quimioluminescente direta^[79].

A adição de PEG a uma pequena quantidade de amostra vai permitir estudar a presença de anticorpos anti-prolactina, porque este composto vai levar à precipitação de imunocomplexos anticorpo-prolactina. Assim, caso existam anticorpos na amostra, a percentagem de recuperação de prolactina será inferior do que face a uma amostra sem anticorpos.

Progesterona

Em conjunto com os estrogénios, a progesterona regula as funções do trato reprodutor durante o ciclo menstrual. É essencial na preparação do endométrio para o implante do blastocisto e a continuação da gravidez. As principais fontes de progesterona são o corpo lúteo e a placenta, mas também é produzido, ainda que em menor quantidade, no córtex adrenal e nos testículos. A avaliação clínica dos níveis de progesterona confirma a ovulação e a função lútea em mulheres não grávidas e a inadequada produção desta hormona pode indicar deficiência na fase lútea que está associada a infertilidade e aborto precoce.

O seu doseamento é feito por um imunoensaio competitivo que recorre a tecnologia quimioluminescente direta e os valores de referência para este parâmetro variam de homens para mulheres e dependem da fase do ciclo menstrual destas últimas. Em homens, os valores oscilam entre 0,28-1,22 ng/mL. Nas mulheres, estes podem ser < 1,40 ng/mL na fase folicular e 3,34 – 28,03 ng/mL na fase lútea nas mulheres, diminuindo para <0,73 ng/mL depois da menopausa. Em mulheres grávidas os valores podem atingir os 422 ng/mL no terceiro trimestre^[80].

Globulina de ligação a hormonas sexuais (SHBG)

A SHBG é uma proteína de síntese hepática que se liga à testosterona e estradiol. Existe em maior concentração sérica nas mulheres devido ao rácio mais elevado de estrogénios

quando comparado com androgénios. Como variações nos níveis destas globulinas podem afetar os níveis circulantes das hormonas que transportam, a medição destes é sempre recomendada como exame complementar à medição de testosterona ou estradiol. Níveis baixos estão associados a hirsutismo, acne vulgar e síndrome de ovários poliquísticos. Podem também estar reduzidos em casos de hipotireoidismo, acromegália, doença de Cushing, hiperprolactinemia, obesidade e administração de androgénios. Encontram-se aumentados em casos de hipertireoidismo e na cirrose hepática, na gravidez ou após administração de estrogénios.

O seu doseamento é feito por um imunoensaio que recorre à tecnologia quimioluminescente direta. Os valores esperados nos homens são 1,38-8,99 µg/mL para homens com menos de 50 anos e 2,05-10,75 µg/mL para mais de 50 anos. No caso de mulheres, antes da menopausa, os valores são de 1,03 a 17,10 µg/mL e após a menopausa diminuem para 2,20-15,11 µg/mL^[81].

Gonadotropina coriónica humana (ThCG)

A gonadotropina serve como auxiliar na avaliação do estado da gravidez. Esta é sintetizada pelas células da placenta e está envolvida na conservação do corpo lúteo durante a gravidez. Na gravidez, os níveis de hCG aumentam durante 8-10 semanas após o último ciclo menstrual e vai diminuindo gradualmente à medida que a placenta produz esteroides. Valores elevados de hCG podem dever-se também a gravidezes ectópicas, ameaça de aborto ou fim recente de gravidez. Assim, os valores esperados para este parâmetro são <2 mIU/mL para homens e mulheres saudáveis não grávidas. Nas 8-10 semanas de gravidez atinge um pico podendo ir de 18700 a 244467 mIU/mL.

O seu doseamento é feito por imunoensaio tipo sanduiche que usa tecnologia quimioluminométrica direta^[82].

Testosterona

A testosterona é o principal androgénio em homens de síntese testicular, ocorrendo em muito menor quantidade nas glândulas suprarrenais. Leva à maturação dos órgãos sexuais masculinos mas também tem um efeito anabolizante levando a um aumento do crescimento e desenvolvimento muscular. Valores baixos em homens poder ter como causa hipogonadismo, falha testicular, hiperprolactinemia, hipopituitarismo, certos tipos de doenças hepáticas e renais e outras doenças graves. Níveis elevados em mulheres são indicadores de ovários poliquísticos, hiperplasia adrenal, entre outros e têm como sintomas amenorreia e obesidade.

O seu doseamento é feito por um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimioluminescência direta. Os valores esperados são 164,94-753,38 ng/dL em homens adultos com menos de 50 anos e 86,49-788,22 ng/dL em homens adultos com mais de 50 anos. Mulheres antes da menopausa têm valores entre 12,09-59,46 ng/dL e após a menopausa estes diminuem para <7,00 a 48,93 ng/dL^[83].

Marcadores da função tiroideia e paratiroideia

T3, T4, FT3 e FT4

A triiodotironina (T3) e a tiroxina (T4) são hormonas sintetizada e secretadas pela tiroide. A T3 e T4 entram em circulação em resposta à libertação de TSH e desempenham um papel importante na regulação do metabolismo^{[84][85]}. 99,7% da T3 encontra-se ligada a proteínas de transporte como a globulina de ligação à tiroxina (TBG) e à albumina e pré-albumina. A restante circula livremente e designa-se por isso de T3 livre (FT3). A T3 livre, ao contrário da T3, é metabolicamente ativa^[86]. Os níveis de FT3 refletem, na maioria das patologias, os níveis de T3, contudo a sua medição é particularmente útil

quando há níveis alterados de T3 devido a alterações de proteínas de transporte, especialmente da TBG^[86]. O mau funcionamento da tiróide pode resultar na liberação excessiva (hipertiroidismo) ou abaixo (hipotiroidismo) do normal de T3 e T4, o que torna estas hormonas bons indicadores da sua função^[84, 85]. Da mesma forma, o mau funcionamento do complexo hipotálamo-hipófise vai afetar a liberação de TSH que por sua vez influencia a liberação das hormonas tiroideias, alterando os seus valores no sangue.

O seu doseamento é feito por imunoensaio competitivo com tecnologia quimioluminescente direta. Os valores esperados são 2,3-4,2 pg/mL para a fT3^[86], 0,89-1,76 ng/dL para a fT4^[87], 0,60-1,81 ng/mL para a T3^[85] e 4,5-10,9 µg/dL para a T4^[84].

Hormona estimulante da tiróide (TSH)

Esta hormona é secretada pela hipófise anterior como resposta a mecanismos de *feedback* negativos que envolvem as hormonas tiroideias. A liberação de TRH pelo hipotálamo vai também estimular a liberação de TSH. Tem duas principais funções: estimular o crescimento e hipertrofia das células alvo e estimular a liberação de T3 e T4 pela tiróide. O doseamento deste parâmetro é útil no diagnóstico diferencial de hipotiroidismo primário (causa na tiroide) onde os níveis de TSH são elevados do hipotiroidismo secundário (hipofisário) e terciário (hipotalâmico), onde os níveis de TSH são baixos.

O seu doseamento é feito por imunoensaio que recorre à tecnologia de quimioluminescência direta, sendo que os seus valores de referência oscilam entre 0,55 e 4,78 mIU/L^[88].

Hormona paratiroideia (PTH)

É uma hormona secretada pelas células das glândulas paratiroideias como resposta a baixas concentrações de cálcio e é excretada pelos rins, tendo uma meia vida de cerca de 4 minutos. É o principal regulador endócrino do cálcio e das concentrações de fósforo em circulação ao afetar os ossos, rins e intestinos. A hormona estimula a reabsorção do osso e do cálcio pelos rins, bem como a absorção do cálcio no intestino. Auxilia no diagnóstico diferencial de hipercalcémia e hipocalcemia, juntamente com a medição de cálcio ionizado e na avaliação e gestão de doenças ósseas como osteoporose e osteodistrofia renal. É também utilizada para o diagnóstico diferencial de hiperparatiroidismo e hipoparatiroidismo. O seu doseamento é feito por imunoensaio tipo sanduiche que recorre à tecnologia quimioluminométrica direta e os seus valores de referência estão no intervalo de 18,5-88,0 pg/mL no soro^[89].

Marcadores do metabolismo de eletrólitos

Sódio

O doseamento do sódio é útil para auxiliar o diagnóstico de doenças como aldosteronismo, diabetes *insipidus*, hipertensão de causa suprarrenal, doença de Addison (causada pela destruição de células suprarrenais), desidratação, secreção inadequada de hormonas antidiuréticas ou doenças que envolvam um desequilíbrio de eletrólitos. Os seus valores de referência são 136-145 mmol/L no soro e 40-220 mmol/24h na urina^[90].

Cloro

O doseamento do cloro é útil para auxiliar o diagnóstico e monitorização de tratamento de distúrbios de eletrólitos e metabólicos tais como a fibrose quística e cetoacidose diabética. Os seus valores de referência são 98-107 mmol/L no soro e 110-250 mmol/24h na urina^[90].

Potássio

O doseamento do potássio é útil para auxiliar o diagnóstico e monitorização de tratamento de desequilíbrio de eletrólitos e de doenças que envolvam hipo ou hipercaliémia. Os seus valores de referência são 3,5-5,1 mmol/L no soro e 25-125 mmol/24h na urina^[90].

O equipamento tem um multisensor com eléctrodos específicos para cada um destes iões mais um eléctrodo de referência. A amostra é posicionada no sensor e os iões estabelecem um equilíbrio com a superfície do eléctrodo. Gera-se um potencial proporcional ao logaritmo da atividade do analito que é depois comparado ao potencial eléctrico gerado com uma solução padrão. A concentração dos iões é calculada usando a equação de Nernst^[90].

Sistema renina-angiotensina-aldosterona

A renina é uma proteína de síntese renal que é libertada em situações de diminuição do volume sanguíneo, de tensão arterial ou perda de sódio. Esta vai catalisar a formação de angiotensina I, que por sua vez é convertida pela ACE em angiotensina II. A angiotensina II estimula a secreção de aldosterona que diminui a excreção de sódio a nível renal, aumenta a reabsorção de potássio e estimula a reabsorção de fluidos. Os níveis de renina estão aumentados em casos de aldosteronismo secundário, doença de Addison, dietas pobres em sódio, doenças gastrointestinais que levem a perdas de sódio, tumores que sintetizam renina, hipertensão essencial, hipocaliemia, etc. Encontra-se diminuída em aldosteronismo primário, em doenças de retenção de sais ou em terapias com ADH^[91]. A sua medição é aconselhada, portanto, quando a pressão arterial está constantemente acima dos 90mmHg, em casos de hipocaliemia injustificada, estenose da artéria renal ou em casos de resposta insuficiente a anti-hipertensores.

O doseamento de aldosterona permite também diferenciar melhor casos de aldosteronismo primário de secundário^[92].

Análise de urina tipo II

A análise de urina passa pela análise bioquímica da amostra e pela análise do seu sedimento.

No laboratório central da Synlab, a análise bioquímica é automatizada, sendo esta realizada por um equipamento denominado *Clinitek Novus* da Siemens. A análise do sedimento é também automatizada, sendo realizada pelo *Atellica UAS 800* da Siemens. Em conjunto, estes dois equipamentos denominam-se de *Atellica 1500*.

Apesar de automatizada, a análise bioquímica da urina consiste numa análise de urina tipo II via tiras testes. Estas tiras permitem registar, de uma forma semi-quantitativa, o pH, a densidade, nitritos, proteínas, glucoses, corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina, esterase leucocitária e hemoglobina na urina^[93]. A deteção destes parâmetros é feita por um método colorimétrico, isto é, o contacto da urina na tira teste vai promover várias reações que levam à alteração da cor dos vários campos desta, sendo esta alteração proporcional ao composto a ser medido.

O pH normal da urina varia de 4,5 a 8. Contudo, o pH normal de uma 1ª urina da manhã oscila apenas entre os 5 e 6. Um pH mais básico (superior a 8) é indicativo de infeção do trato urinário, mas também se pode dever a contaminação bacteriana devido a má conservação, sendo por isso essencial o uso de outros parâmetros para se diagnosticar tal. Um pH mais ácido (inferior a 4,5) pode ser sinal de diabetes descompensado (cetoacidose diabética), jejum prolongado ou desidratação.

A tira teste tem 2 indicadores – verde de bromocresol e azul de bromoxilenol – que se ligam a iões H⁺ e alteram a sua cor, o que permite estimar valores de pH entre 4,5 e 9^[93].

A densidade da urina depende da ingestão e perda de líquidos, pelo que vai ser afetada por suores intensos e agentes diuréticos ou estimulantes como o café ou drogas. O intervalo de referência varia entre 1,010 e 1,025. Valores inferiores a 1,010 podem ser um sinal de diabetes *insipidus*, doença renal ou ingestão excessiva de líquidos, enquanto que valores superiores a 1,025 são sinais de diabetes *mellitus* ou desidratação^[93].

A presença de nitritos na urina é sinal de infeção por bactérias, já que são estes microorganismos que convertem os nitratos em nitritos. Assim, é sempre importante relacionar este resultado com a presença e o número de leucócitos, uma vez que este parâmetro é também indicativo de infeção urinária.

O fundamento deste método passa pela formação do ião diazo quando os nitritos reagem com sulfanamida. O ião diazo, por sua vez, reage com dicloridrato de naftiletilediamina, originando um composto de coloração vermelha^[93].

Relativamente a proteínas, por norma não se encontram proteínas na urina. Proteínas de baixo peso molecular são filtradas a nível glomerular, mas posteriormente reabsorvidas nos túbulos renais. Os nefrónios podem secretar proteínas Tamm-Horsfall, que podem ser encontradas na urina normal. Assim, a pesquisa de proteínas na urina é importante para o despiste de nefropatias. Outros fatores que podem levar ao aumento de proteínas na urina são a presença de cilindros hialinos, espermatozóides ou hematúria.

A tira tem um indicador – o azul de tetrabromofenol tamponado que liberta iões H⁺ na presença de proteínas, alterando a sua cor de amarelo para verde^[93].

Os resultados são dados em termos semi-quantitativos, desde não revelou, vestígios ténues, +, ++ e +++ ou ++++. Caso a quantidade de proteínas seja muito elevada (+++ ou ++++), estas são posteriormente doseadas no equipamento *Atellica Solutions* da Siemens.

A medição de glucose na urina é importante para a monitorização e despiste de diabetes *mellitus*. Os valores de referência para este parâmetro na urina são <20mg/dL em jejum e <30mg/dL numa urina aleatória.

Para o seu doseamento, na presença de glucose oxidase e oxigénio, a glucose origina peróxido de hidrogénio e gluconolactona. O peróxido de hidrogénio, por sua vez, na presença de peroxidase e tetrametilbenzina, origina um composto de cor azul. Ácido ascórbico, corpos cetónicos e densidade elevada são alguns dos interferentes nesta reação^[93].

Os corpos cetónicos, como a acetona e o ácido cetoacético são detetáveis em casos de stress fisiológico como jejum, gravidez e exercício físico, mas também em casos de fome e metabolismo anormal de lípidos ou de açúcares. Por norma, os valores deste parâmetro na urina são <5mg/dL. Valores elevados são sinais de vómitos, cetoacidose diabética, vómitos e estados de hipoglicémia.

A cetona reage com nitroprussiato de sódio, originando um composto de coloração violeta^[93].

O urobilinogénio é formado pela redução de bilirrubina por bactérias do intestino. Este é reabsorvido na circulação, degradado no fígado e eliminado, em parte, na urina. Valores elevados indicam aumento da sua formação no intestino ou sistema biliar, aumento da degradação de hemoglobina ou danos no parênquima hepático (hepatites ou cirrose).

Estes dois últimos levam a um aumento da bilirrubina em circulação, que por sua vez leva a um aumento de urobilinogénio.

O urobilinogénio reage com tetrafluoroborato de diazónio, originando um composto de coloração vermelha^[93].

A bilirrubina conjugada por norma não é detetada na urina, apesar desta ser solúvel no sangue e excretada pelos rins. Esta só é detetada na urina quando a bilirrubina total no soro é superior a 2mg/mL. Problemas hepáticos como cirrose ou hepatite e obstruções do trato biliar podem levar ao aparecimento de bilirrubina na urina.

O princípio da deteção deste composto na tira teste consiste numa reação colorimétrica onde a bilirrubina reage com 2-metil-5-nitroanilina e nitrato de sódio resultando numa coloração vermelho-violeta. Interferentes nesta reação incluem nitritos e ácido ascórbico^[93].

Os leucócitos por norma não surgem na urina. Assim, um resultado positivo é clinicamente significativo porque indica uma maior probabilidade do utente ter uma infeção bacteriana^[93].

A tira teste deteta a presença de hemoglobina e mioglobina no sangue. Assim, um teste positivo pode ser indicativo de doenças renais ou hemorragias. Contudo, infeções urinárias podem resultar em falsos positivos.

Na presença de mioglobina ou hemoglobina, a tetrametilbenzina reage com hidroperóxido de cumeno, resultando num composto de coloração azul^[93].

Na análise do sedimento urinário, realiza-se uma contagem de células (leucócitos e eritrócitos) por campo.

Por norma, não devem surgir hemácias na urina, mas valores de até 5 por campo ainda se encontram dentro dos valores de referência. A hematúria (presença de um número anormal de glóbulos vermelhos na urina) pode dever-se a danos glomerulares, tumores do trato urinário, trauma renal como litíase, necrose tubular aguda, infeções urinárias, nefrotoxia ou até a stress físico. Pode haver contaminações em casos de mulheres menstruadas ou em indivíduos que tenham sofrido trauma produzido por cateterismo na bexiga, gerando falsos positivos^[94].

Deve-se ter ainda atenção à morfologia dos eritrócitos observados. Para além da forma discóide normal, podem aparecer glóbulos vermelhos dismórficos, o que sugere a presença de uma doença glomerular como a glomerulonefrite, que distorce a forma destas células ao forçá-las a passar por uma estrutura glomerular anormal^[94].

A presença de glóbulos brancos na urina é indicativo de infeção renal, do trato urinário ou dos órgãos genitais. Por norma também não se devem encontrar leucócitos na urina, sendo que os valores de referência indicam como normais valores até 8 leucócitos por campo.

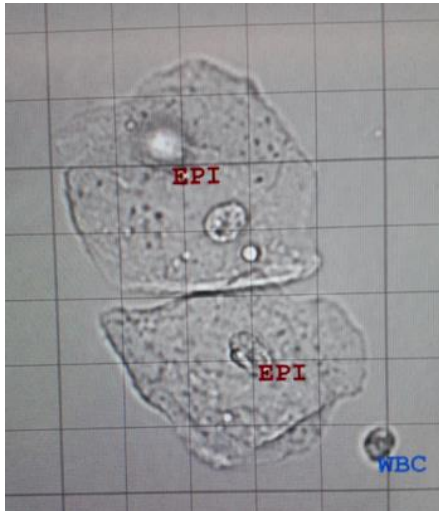


Figura 1 - Células epiteliais pavimentosas na urina (retirado do equipamento Atellica 1500)

Na análise do sedimento, é também comum observarem-se células epiteliais de descamação. A grande maioria das que se observam são células pavimentosas que têm origem no trato urinário, nos órgãos genitais externos ou na uretra. Estas células são grandes apresentam uma proporção núcleo/citoplasma muito reduzida. Células de transição da pélvis renal, da uretra ou da bexiga são mais pequenas que células pavimentosas e o núcleo ocupa uma maior percentagem da célula^[94]. A presença de células renais é a única com significado clínico. São células tubulares, com um núcleo grande e redondo que ocupa a célula quase toda, sendo indicativos de danos renais^[94].

Para além de células, na análise do sedimento são também observadas e registadas a presença de

cilindros e cristais.

Há 2 tipos de cilindros: os celulares e os não celulares. Os celulares incluem cilindros compostos por células epiteliais, leucócitos e eritrócitos. Os não celulares incluem os cilindros hialinos, granulares, cerosos, entre outros. A formação de cilindros é favorecida por baixos fluxos urinários, níveis elevados de sais e pH baixo. Estas situações favorecem a desnaturação e precipitação de proteínas, especialmente da proteína de Tamm-Horsfall, ao longo do túbulo renal^[94].

Cilindros hialinos são claros e ténues, compostos maioritariamente por proteína de Tamm-Horsfall, podendo ser encontrados em urinas de indivíduos saudáveis. Indicam um baixo fluxo urinário e podem ter várias causas como exercício físico intenso, medicação diurética, vômitos, febre, etc. não apresentando grande relevância clínica^[94].

Cilindros de glóbulos vermelhos são indicativos de glomerulonefrite com perda de eritrócitos pelos glomérulos ou danos a nível tubular. A presença destes cilindros prova que a hematúria é de origem renal^[94].

Cilindros de glóbulos brancos são típicos de pielonefrite aguda, mas também podem indicar glomerulonefrites ou infeções renais^[94].

Se estes cilindros celulares permanecerem nos túbulos durante um período prolongado de tempo, as células podem degradar-se e gerar um cilindro granular, que depois se transforma, com o prolongar do tempo nos rins, num cilindro ceroso. Assim, a identificação destes tipos de cilindros na urina indica que o indivíduo está no estadio final da doença renal crónica^[94].

A presença de cristais pode ou não ter significado clínico. Cristais como oxalato de cálcio, fosfatos triplos ou fosfatos amorfos podem aparecer na urina de indivíduos saudáveis, mas a presença de cristais de aminoácidos como os de cistina, tirosina ou leucina, são indicativos de patologias mais graves, pelo que a sua presença deve ser prontamente reportada.

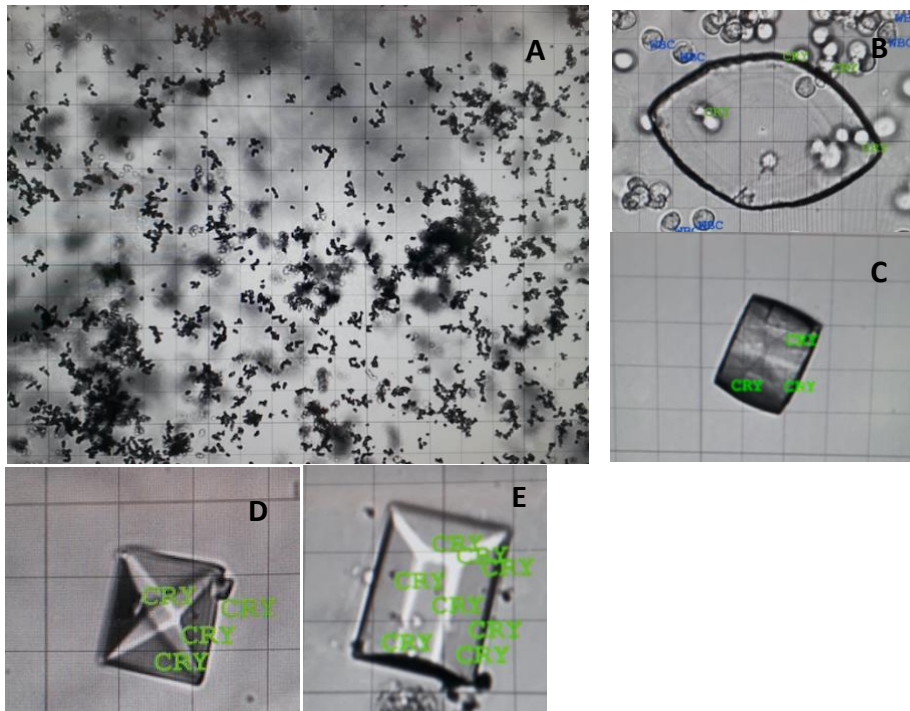


Figura 2 - Alguns dos cristais observados durante o estágio; a) cristais amorfos; b) e c) cristais de ácido úrico; d) cristal de oxalato de cálcio; e) cristais de trifosfato (retiradas do equipamento Atellica 1500)

De referir ainda o papel do pH na formação e identificação de cristais. pH ácido está associado à presença de cristais de ácido úrico ou a um sedimento rosado de uratos amorfos. Cristais de oxalato de cálcio também estão associados a urinas ácidas. Estes tipicamente têm uma forma piramidal de base quadrada ou, quando vistas de cima, um quadrado com linhas diagonais cruzadas. Urinas alcalinas estão associadas a cristais de fosfatos amorfos ou fosfato triplo (com uma forma que remanescente de um caixão) ou fosfato de cálcio.

Cristais de cistina têm uma forma típica hexagonal. Os cristais de tirosina têm uma forma de agulha. Ambos são sugestivos de doenças hepáticas graves ou cistinúria ou tirosinose congénita, respetivamente.

Controlo de Qualidade Interno

O controlo de qualidade interno serve para monitorizar a precisão do equipamento. Este passa pela análise de controlos dos parâmetros fornecidos pelo próprio *kit* de reagentes. Dependendo da frequência de análise e do volume de trabalho, os controlos podem ser passados diariamente (como é o caso do *Atellica solutions* da Siemens) ou semanalmente. Para cada parâmetro devem ser passados pelo menos 2 controlos distintos (alto e baixo), sendo que alguns podem ter ainda um terceiro controlo (intermédio). Para que um resultado seja válido os controlos devem ser também validados, isto é, os valores obtidos aquando do teste de controlo devem estar dentro de um intervalo pré-estabelecido pelo fabricante. Para além disto, o controlo, quando inserido no gráfico de Levy-Jennings, deve cumprir um conjunto de regras estabelecidas pelo laboratório para ser considerado válido e aceite. Estas regras, chamadas regras de Westgard, são as seguintes^[95]:

- 1:2S – a regra é quebrada quando um controlo ultrapassa o intervalo de média \pm 2 desvios padrão

- 1:3S - a regra é quebrada quando um controlo ultrapassa o intervalo de média ± 3 desvios padrão
- 2:2S - a regra é quebrada quando dois controlos consecutivos ultrapassam o intervalo de média ± 2 desvios padrão do mesmo lado da média
- R:4S – a regra é quebrada quando a diferença entre duas amostras de controlo ultrapassa 4 desvios padrão
- 4:1S – a regra é quebrada quando quatro controlos consecutivos ultrapassam o intervalo média ± 1 desvio padrão do mesmo lado da média
- 10:X – a regra é quebrada quando 10 controlos consecutivos se situam no mesmo lado da média

Para além das regras de Westgaard, o sistema operativo que elabora estes gráficos (*Unity*) tem também em conta parâmetros do controlo externo de qualidade como o coeficiente de variação e a performance do próprio ensaio para determinar se um certo valor de controlo é aceite ou rejeitado.

Quando o controlo é rejeitado, a primeira ação a tomar é a repetição do mesmo. Se, mesmo assim, o controlo continuar a ser rejeitado, deve-se verificar se o controlo se encontra em condições (se tem volume suficiente ou se está dentro do prazo de validade) e, se necessário, repetir com novo controlo. Caso esta linha de ação não resulte, deve-se calibrar o parâmetro, seguido de um novo controlo. Por fim, e caso as ações anteriores não resultem num controlo válido, deve-se mudar de reagente e repetir o controlo.

O calibrador (ou padrão) é um reagente que contém uma quantidade conhecida do parâmetro a analisar e vai permitir que o equipamento calcule a quantidade desse mesmo parâmetro na amostra através de curvas de calibração.

No laboratório realizavam-se 2 tipos de calibração: calibração de *pack* e calibração de lote. A calibração de *pack* só é necessária se um mesmo *pack* de reagente estiver abordo do equipamento por um período de tempo superior ao intervalo de calibração de *pack*, não sendo por isso necessário calibrar quando se insere um novo *pack* do mesmo lote no equipamento se a calibração de lote ainda estiver válida. A calibração de lote deve ser realizada, portanto, quando se muda de lote de reagente de forma que o equipamento construa uma nova curva de calibração.

Assim, deve-se realizar uma nova calibração sempre que^[2]:

- Se altera o lote de reagentes
- Termina o intervalo de calibração de lote, para um lote de reagentes calibrados no sistema
- Termina o intervalo de calibração de *pack*, para um *pack* de reagentes calibrados no sistema
- O controlo interno do parâmetro indica
- Após procedimento de manutenção ou assistência técnica do equipamento.

Microbiologia

Esta secção do laboratório é responsável pela deteção e identificação de bactérias, parasitas ou leveduras nas amostras recebidas e pela realização de testes de sensibilidade a antibióticos para melhor aconselhar o médico na escolha da terapêutica mais adequada para a infeção. Ao longo desta secção vão ser explicadas as metodologias utilizadas para alcançar este objetivo.

Meios de cultura

Primeiramente, após a receção e triagem de uma amostra, esta vai ser semeada no meio mais apropriado para o crescimento de eventuais microorganismos que possam estar presentes nesta. A tabela em baixo é um resumo dos meios utilizados para a sementeira destas amostras.

Tabela 2 - Meios de cultura utilizados no laboratório [96]

Meio	Seletividade/ Diferencial	Observações	Uso
CLED (Cisteína, lactose, deficiente em eletrólitos)	Meio de cultura de bactérias em amostras de urina	Fermentador de lactose → colónia amarela Não fermentador de lactose → colónia azul/ verde/ incolor	Isolamento de microorganismos do trato urinário
COS (Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro)	Meio enriquecido com sangue que permite a identificação dos vários tipos de hemólise.	Microorganismos α -hemolíticos (hemólise parcial) → geram um halo cinza-esverdeado em torno da colónia Microorganismos β -hemolíticos (hemólise total) → geram um halo incolor/amarelado em redor da colónia	Meio de crescimento geral
CNA (Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro com a adição de antibióticos Colistina e Ácido Nalidíxico)*	Seletivo para bactérias exigentes Gram positivos Diferencial para microorganismos que fazem hemólise	Microorganismos α -hemolíticos (hemólise parcial) → geram um halo cinza-esverdeado em torno da colónia Microorganismos β -hemolíticos (hemólise total) → geram um halo incolor/amarelado em redor da colónia	Isolamento de bactérias Gram positivas *
MacConkey	Seletivo para bactérias Gram negativas Diferencial para fermentadores de lactose	Microorganismos fermentadores de lactose → colónias rosa/vermelho Microorganismos não fermentadores de lactose → colónias incolores/ bege	Isolamento de bactérias Gram -

Tabela 2 – Meios de cultura usados no laboratório [96] (Cont.)

Meio	Seletividade/ Diferencial	Observações	Uso
Hektoen	Seletivo para espécies de <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> Diferencial para <i>Salmonella</i> e para microorganismos fermentadores de açúcares do meio	Microorganismos fermentadores de açúcares → colônias rosas ou amarelas Microorganismos não fermentadores de açúcares → colônias azuis ou verdes Microorganismos produtores de H ₂ S (<i>Salmonella</i>) → colônia com centro preto	<i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> em amostras de fezes
PVX (Gelose de chocolate PolyVitex)	Meio enriquecido		Isolamento de bactérias exigentes
VCA (Gelose de chocolate PolyVitex com antibióticos e antifúngicos (Vancomicina, Colimicina, Anfotericina)**)	Seletivo devido à ação de antibióticos		Isolamento de microorganismos do género <i>Neisseria</i>
Granada	Seletivo	<i>Streptococcus agalatae</i> → colônias vermelho-alaranjadas Outras bactérias → crescimento inibido ou as colônias têm outra cor	Isolamento de <i>Streptococcus agalatae</i> em amostras vaginais ou anais
Sabouraud	Seletivo para leveduras		Isolamento de leveduras e fungos filamentosos
Selenito	Meio de enriquecimento para <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i>		Isolamento de <i>Salmonella</i> em amostras de fezes
BHI (Caldo coração-cérebro)	Meio de enriquecimento		Isolamento de bactérias exigentes aeróbias
Todd (Caldo Todd-Hewitt)	Meio de enriquecimento		Isolamento de bactérias Gram positivas, como <i>Streptococcus</i> de grupo B
Haemophilus	Seletivo para <i>Haemophilus</i>		Isolamento de <i>Haemophilus</i>

*O crescimento de bactérias Gram negativas e do género *Bacillus* é inibido por antibióticos do meio

** Antibióticos e antifúngicos inibem o crescimento da maioria das outras bactérias e de fungos

A deficiência em eletrólitos de CLED visa evitar o *swarming* de colónias de certas bactérias como *Proteus*^[96].

Geloses de chocolate como PVX, VCA e Haemophilus são geloses de sangue cozidas em que ficam disponíveis os fatores X e V, hemina e NAD, respetivamente, que são essenciais para o crescimento de bactérias exigentes. Fenómeno satelitismo: na periferia de uma colónia beta-hemolítica, ocorre a lise de eritrócitos, havendo a libertação para o meio dos fatores X e V o que possibilita o crescimento de bactérias exigentes na periferia destas outras colónias^[96].

A identificação da presença de microrganismos valorizáveis nos produtos a analisar é efetuada através da sementeira em meios de cultura seletivos e não seletivos e na observação e identificação das colónias isoladas. A tabela abaixo ilustra quais os meios usados para semear cada amostra no laboratório, bem como alguns dos microrganismos pesquisados com estes.

Tabela 3 - Meios de cultura usados para a sementeira de algumas das amostras analisadas

Amostra	Meios para semear	Para a pesquisa de...
Urina	CLED	Gram –, Gram + e leveduras
Exsudado vaginal	COS	<i>Garnerella vaginalis</i> , <i>Streptococcus beta</i> hemolíticos, <i>Staphylococcus aureus</i>
	PVX/VCA	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	Sabouraud	<i>Candida</i> spp.
Exsudado vaginal/anal	Todd (24h a 37°C) → sementeira em meio Granada	<i>Streptococcus</i> do grupo B
Fezes	MacCkonkey	<i>E. coli</i> enteropatogénicas
	Hektoen	<i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i>
	Selenito (24h a 37°C) → sementeira em Hektoen	<i>Salmonella</i>
	Campyloset*	<i>Campylobacter</i>
	CNA (crianças até 2 anos)	<i>Staphylococcus aureus</i>

Tabela 3 – Meios de cultura usados para a sementeira de algumas das amostras analisadas (Cont.)

Amostra	Meios para semear	Para a pesquisa de...
Exsudado nasal	COS	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Moraxela catarrhalis</i>
	Haemophilus	<i>Haemophilus influenza</i>
	Todd (24h a 37°C) → sementeira em meio COS	Meio de enriquecimento
Exsudado faríngeo	COS	<i>Streptococcus pyogenes</i>
	Todd (24h a 37°C) → sementeira em meio COS	Meio de enriquecimento
Exsudado uretral	COS	<i>Streptococcus</i> β-hemolíticos, <i>Staphylococcus aureus</i>
	Sabouraud	Leveduras
	PVX/VCA	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	Haemophilus (Apenas em homens)	<i>Haemophilus influenza</i> e <i>parainfluenza</i>
Exsudado purulento (colhido com zaragatoa)	COS	Bactérias Gram + e Gram -
	CNA	Bactérias Gram +
	MacConkey	Bactérias Gram -
	BHI (48h a 37°C) → semear em CNA e CLED	Meio de enriquecimento
Expectoração	COS	<i>Klebsiela spp.</i> , <i>Moraxela catarrhalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
	Haemophilus	<i>Haemophilus influenza</i>
	McK	<i>Klebsiela pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i>
Hemoculturas	COS (anaerobiose e aerobiose)	Bactérias Gram + e Gram – aeróbias e anaeróbias
	PVX (anaerobiose)	<i>Neisseria spp.</i> , <i>Haemophilus spp.</i>
	Sabouraud	Leveduras

* A análise microbiológica de uma amostra de fezes implica, para além da sementeira nos meios mencionados, um teste rápido para deteção de antígenos de *Campylobacter*. Só se este teste der positivo é que se procede à sementeira em meio Campylosel.

Para além da sementeira nos meios referidos acima, para os exsudados vaginais e uretrais, faz-se ainda um exame a fresco para a visualização de *Trichomonas vaginalis*, leveduras, leucócitos e eritrócitos, bem como ovos de parasitas como *Enterobius vermicularis*. Faz-se também uma lâmina que vai ser corada com coloração de Gram e posteriormente visualizada para se observar o predomínio da flora vaginal e bacilos de Doderlein.

Os meios são incubados durante pelo menos 24h à temperatura adequada. A grande maioria dos meios, tais como COS, CLED, MacConkey ou Hektoen são incubados a 37°C

durante 48h. O meio Sabouraud é incubado a uma temperatura inferior - 30°C – durante 48h. O meio PVX requer uma atmosfera de CO₂ durante a incubação para que haja crescimento, sendo este incubado por 72h. O meio de Granada requer uma atmosfera de anaerobiose.

Colorações

No laboratório são realizados 2 tipos de colorações de lâminas: Gram e Kinyoun.

A coloração de Gram permite fazer a distinção entre bactérias Gram positivas (como *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Enterococcus*) e Gram negativas (como *Neisseria*, *Haemophylus*, *Salmonella*, *Shigella* ou *E. coli*). Este tem 4 passos. Numa primeira fase, utiliza-se cristal violeta para corar a lâmina, seguida de uma solução iodada que vai conferir uma coloração violeta a todas as bactérias. Segue-se uma lavagem com etanol que vai descorar bactérias Gram negativas. Por fim, usa-se safranina que cora as bactérias Gram negativas, ficando estas com um tom rosado. As Gram positivas, por não terem sido descoradas pelo etanol, ficam coradas de violeta^[97].

A coloração de Kinyoun consiste numa coloração de Ziehl-Neelsen modificada, onde não é necessário submeter as lâminas a uma fonte de calor. Esta é uma coloração que permite distinguir bactérias álcool-ácido resistentes, como é o caso de micobactérias como a *Mycobacterium tuberculosis*. Tal como na de Ziehl-Neelsen, o processo tem 3 passos. No primeiro, a fucsina cora todas as bactérias de cor de rosa. Segue-se uma lavagem com álcool-ácido, onde as bactérias álcool-ácido resistentes retêm a coloração rosada, ao passo que as outras bactérias e o fundo descoram. O último passo é a adição de azul de metileno que cora as bactérias não álcool-ácido resistentes e o fundo de azul^[98].

Identificação das estirpes e teste de sensibilidade a antibióticos

Após incubação procede-se à identificação da estirpe e à realização de um teste de sensibilidade a antibióticos. As placas são visualizadas após 24h e 48h de incubação. Os vaginais são visualizados após 24, 48 e 72h.

Cada produto tem uma marcha geral específica para a identificação de microorganismos patogénicos. Neste trabalho vai ser dado especial foco ao processamento das urinas assépticas, sendo apresentada a forma como estas amostras são processadas no laboratório.

Primeiramente, deve-se olhar para a placa e registar a presença ou ausência de crescimento. Um resultado é dado como negativo quando não há crescimento de colónias (estéril) ou quando o crescimento é inferior a 10 000 (10⁴) cfu/mL. Entre 10⁴ e 10⁵ cfu/mL, trata-se de uma infeção provável, devendo-se avaliar de acordo com a situação clínica. Um resultado positivo corresponde a um crescimento superior a 10⁵ cfu/mL. Por outras palavras, valores de cfu/mL superiores a 10⁵ são indicativos de uma infeção.

Deve-se também ter atenção ao aspeto da colónia, porque este pode ser sugestivo de uma determinada bactéria, permitindo assim selecionar a carta mais adequado para a realização do TSA. Bactérias Gram positivas tendem a formar colónias pequenas, baças e de bordos regulares, ao passo que bactérias Gram negativas tendem a originar colónias grandes, de aspecto mucóide ou brilhante e de bordos irregulares.

No caso de urinas, é frequente observar-se o crescimento de bactérias Gram negativas devido a contaminações fecais, principalmente em mulheres onde a uretra é mais curta, facilitando assim estas contaminações.

Nos exames culturais de urina, deve-se ter sempre em conta a informação dada pela análise ao sedimento urinário. É considerado um sedimento patológico quando são detetados mais de 10 leucócitos por campo. Um sedimento patológico, como já se viu na secção das urinas deste trabalho, é indicativo de infeção por bactérias, pelo que estas duas informações (sedimento e crescimento bacteriano) devem ser concordantes. Podem acontecer casos onde foi registado um sedimento elevado, mas não se observou crescimento em placa. Nestes casos, deve-se preparar uma lâmina para coloração Ziehl-Neelsen e Gram, porque pode-se tratar de uma infeção por bactérias exigentes. Por exemplo, a coloração de Ziehl-Neelsen pode permitir a observação de *Mycobacterium tuberculosis* que podem existir em sedimentos patogénicos mas que, por serem exigentes, não crescem em meios como o COS. Caso se observe a presença de bactérias na lâmina corada, a amostra deve ser semeada num meio que permita o crescimento destas bactérias exigentes para se poder, posteriormente, identificar as mesmas.

Caso se observe o crescimento de 2 tipos de colónias diferentes, deve-se reisolar a que se encontra em predomínio, ou aquela que mais provavelmente poderá estar a causar infeção. Para tal, deve-se estar sempre consciente dos saprófitos naturais de cada amostra ou localização anatómica e dos principais agentes patogénicos dos mesmos.

Um crescimento elevado de 2 ou mais colónias deve-se a contaminação devido a colheita incorreta da amostra. No caso de uroculturas, a amostra utilizada é urina asséptica que deve ser colhida após uma limpeza da região genital, precisamente para evitar contaminações com a flora da pele (predominantemente Gram +). Assim, uma cultura polimicrobiana é um motivo para se pedir repetição de colheita.

No caso de amostras nasais ou nasofaríngeas, os principais microorganismos a valorizar são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ou *Haemophilus influenza*, *Klebsiella spp.* ou *Moraxella catarrhalis*.

Haemophilus influenza cresce nos meios PVX e VCA que contêm hemina e NAD devido à lise dos eritrócitos. *Streptococcus pyogenes* e algumas estirpes de *S. aureus* são beta-hemolíticos que crescem em COS. *S. aureus* é um comensal da mucosa nasal, pelo que se deve ter atenção ao nível de crescimento. Para diferenciar entre *Staphylococcus aureus* e outras espécies de *Staphylococcus* pode-se fazer um teste da coagulase^[99]. Este teste consiste na mistura de uma gota de um reagente de látex que contém anticorpos e uma colónia de bactéria previamente isolada. Caso se trate de *Staphylococcus aureus* vai-se observar aglutinação (é coagulase positivo) ao passo que outras espécies do mesmo género são coagulase negativa (não se observa aglutinação)^[99].

Nas fezes, os principais microorganismos a valorizar são *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus* e algumas estirpes de *Escherichia coli* como a *E. coli* enterotoxinogénica (causa a diarreia do viajante), enteroinvasiva (disenteria) ou a enterohemorrágica (causa diarreia sanguinolenta).

As amostras de fezes são semeadas em McK e Hekt, ambos meios que permitem diferenciar entre fermentadores e não fermentadores de lactose. Os não fermentadores como *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* formam colónias azuis ou verdes em Hektoen^{[96][100]} e incolores ou bege em MacConkey. Em Hektoen, colónias de *Salmonella spp.* e *Proteus* têm um centro preto porque são produtores de sulfitos^{[96][100]}. As colónias de *E. coli* têm

uma depressão central, facilitando a sua identificação fenotipicamente. O quadro abaixo esquematiza algumas destas características fenotípicas de algumas bactérias que podem crescer nestes meios.

Tabela 4 - Diferenciação e identificação de bactérias de espécies *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Proteus* e *E. coli* recorrendo a testes de bancada [96, 100, 101, 102]

	Lactose	Urease	H2S
<i>Shigella spp.</i>	-	-	-
<i>Salmonella spp.</i>	-	-	+
<i>Proteus</i>	-	+	+
<i>E. coli</i>	+/-	-	-

Como muitos dos patógenos que se encontram nas fezes são lactose negativos, qualquer colónia lactose negativa é destacada para identificação.

É de destacar que nem todos os tipos de *E. coli* são patogénicos é necessário fazer uma serotipagem, para determinar, caso se identifique uma *E. coli* se esta é patogénica ou não. Para tal, faz-se uma passagem da colónia de McK para um meio de Mueller Hinton simples. Não se usa o meio de McK para serotipagem porque este tem pigmentos que podem interferir com a identificação.

Os principais agentes infecciosos de amostras vaginais são *Candida albicans*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Garnerella vaginalis* e *Trichomonas vaginalis*, mas também *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalatae* e *Streptococcus* β -hemolíticos.

Candida albicans é um fungo, pelo que é isolada em meio Sabouraud. *Trichomonas vaginalis* é pesquisada pelo exame direto. *Neisseria gonorrhoeae* cresce em meio PVX, mas a sua pesquisa deve ser feita em meio VCA em CO₂ que contém antifúngicos e antibióticos que inibem o crescimento de fungos e da maioria das bactérias com excepção de *N. gonorrhoeae*. *N. gonorrhoeae* é oxidase positiva, pelo que se algo crescer no meio PVX, pode-se usar este teste de bancada para distinguir entre esta bactéria e outras que possam crescer no meio^[103].

Bactérias Gram negativas são muitas vezes contaminações fecais. *Staphylococcus aureus* são muitas vezes contaminações da pele. *Streptococcus agalatae* pode crescer em COS, formando colónias de aspecto leitoso com um halo translúcido de hemólise (beta-hemolíticos).

A pesquisa para *Streptococcus agalatae* é feita com amostras vaginais-anaís que são semeadas em meio Todd e depois passadas para meio Granada, que é diferencial para esta bactéria. Colónias de *Streptococcus agalatae* ficam com uma tonalidade laranja^[96]. Por vezes, colónias de *Enterococcus* podem adquirir também uma tonalidade laranja. Por este motivo, vai-se reisolar as colónias laranjas em meio CNA, que é seletivo para bactérias Gram positivas.

No caso de hemoculturas, não é normal haver crescimento, pelo que colónias que cresçam, principalmente se crescerem em vários tempos de determinação distintos, devem ser valorizados. Faz-se ID de todas as colónias distintas que cresçam, mas se forem todas a mesma, faz-se TSA só de uma delas.

O laboratório realiza também testes de colonização para investigar se a bactéria que se encontra a colonizar uma determinada região anatómica apresenta resistências a

antibióticos. Realizam a pesquisa de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina) e ERC (enterobactérias resistentes)^[96].

O passo seguinte do processo é a identificação das colónias por MS MALDI-TOF, no equipamento Vitek MS da Biomérieux. Este equipamento permite a identificação de bactérias, fungos leveduriformes e micobactérias.

A identificação das bactérias e leveduras é feita por espectrometria de massa, onde as proteínas são separadas em função da sua massa e carga, formando espectros que são característicos da bactéria em questão. A um equipamento de espectrometria de massa tem que estar sempre acoplado um sistema que permita a separação destas proteínas. Neste caso, a separação é feita por MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization – time of flight)^[104].

A amostra é colocada num poço de uma placa própria, juntamente com uma pequena quantidade fixa de matriz, cuja função é permitir a ionização de proteínas ribossomais. A amostras leveduriformes, antes da adição da matriz é ainda adicionado ácido fórmico para secar a colónia. O equipamento tem um laser que, ao incidir na amostra vai sublimá-la, libertando as proteínas para o sistema em vácuo. Estas proteínas migram cromatograficamente, sendo que as de menor tamanho migram mais rapidamente e as de maior tamanho migram no fim. Eventualmente, estas proteínas, agora separadas, são detetadas por um detetor que elabora um espectro de carga em função da massa das proteínas^[104].

É essencial passar, em conjunto com as amostras, uma colónia de uma estirpe padrão. No caso deste laboratório, utiliza-se a estirpe padrão ATCC *E. coli*. Esta estirpe vai ser analisada antes e depois de se passarem as amostras e deve ser identificada corretamente pelo equipamento para que os resultados sejam validados e transmitidos para o sistema operativo. Caso uma das identificações falhe, é necessário voltar a passar as amostras e as estirpes padrão de novo.

O equipamento está acoplado a um sistema informático que vai comparar o espectro obtido com todos os espectros contidos numa base de dados para dar o resultado. Nunca se consegue ter uma correspondência de 100% entre o espectro por nós obtido e o espectro da base de dados devido a mutações na colónia. Contudo, considera-se uma identificação correta quando há uma correspondência de 99,9%. Menos do que isso deve-se repetir a identificação^[104].

Deve-se ainda destacar que há certos casos em que o equipamento não é capaz de realizar uma identificação correta. É também incapaz de distinguir com grande certeza algumas bactérias de géneros diferentes como é o caso de *E. coli* e *Shigella*, algo que é importante fazer porque, como já se verificou, a primeira é saprófita e a sua identificação nas fezes não é de valorizar, ao passo que a última é um microorganismo patogénico. Nestes casos, a identificação deve ser feita por um método diferente, recorrendo ao uso de cartas de Vitek e serotipagem com antibióticos específicos.

Tanto os testes de sensibilidade a antibióticos (TSA) como estas identificações em casos de dúvida ou de confirmação do resultado dado pelo Vitek MS podem ser realizadas pelo Vitek II, também da Biomérieux.

Neste equipamento, as identificações são feitas por colorimetria^[105] e os TSAs são feitos por turbidimetria^[106].

A identificação de estirpes neste equipamento tem um princípio em tudo semelhante à identificação por galerias API. Na galeria há diferentes poços, cada um com um composto diferente para ser testado (por exemplo, ureia, lactose, sacarose, etc.). A suspensão da

colónia a identificar migra ao longo da placa para cada um desses poços. Caso a bactéria utilize esse substrato no seu metabolismo, vai ocorrer a alteração da cor desse poço, que o equipamento é capaz de detetar. Isto vai permitir gerar um padrão de “positivos” e “negativos” que pode ser comparado com outros padrões na base de dados associado ao equipamento para obter uma identificação final^[105].

No caso de TSAs, a galeria tem também uma série de poços com diferentes antibióticos de acordo com a carta escolhido. Se a bactéria for susceptível ao antibiótico, não há crescimento desta no poço. Se for resistente, há crescimento no poço, que leva a um aumento da turvação deste que é detetado pelo equipamento^[106].

Para os TSAs é necessário selecionar a carta com a galeria mais indicada para cada bactéria, pelo que o laboratório estabeleceu algoritmos para a escolha correta de kits de TSAs. Por exemplo, no caso das urinas, para se selecionar a carta mais adequado utiliza-se o seguinte esquema.

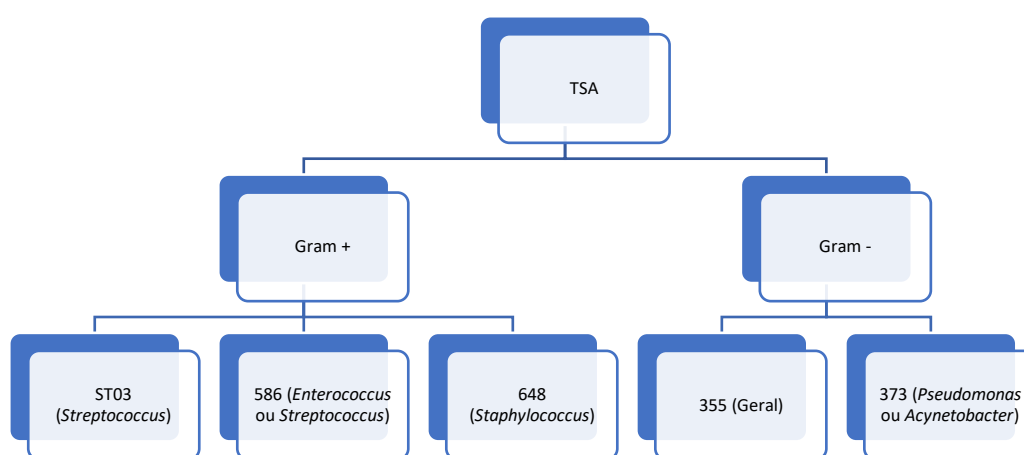


Figura 3 - Esquema para a seleção de uma Carta de TSAs para o estudo do crescimento de microorganismos na urina

Testes Rápidos

Os testes rápidos permitem detetar antígenos de bactérias^[107].

O teste utiliza 2 tipos de antígenos. Na linha teste, há uma combinação de anticorpos, entre os quais se encontra o anticorpo monoclonal contra o antígeno que se está a pesquisar. Na linha controlo, há anticorpos policlonais. O ensaio realiza-se adicionando a amostra previamente manipulada (via adição de tampões ou de soluções do próprio *kit*) ao dispositivo. Esta migra por capilaridade e, ao fim de um intervalo de tempo definido pelo *kit*, procede-se à visualização de linhas coloridas que aparecem neste^{[107][108]}.

Um teste positivo terá linhas coloridas tanto para a linha controlo como para a linha teste. O não aparecimento da linha colorida no controlo invalida a viabilidade do teste. Um teste negativo terá apenas uma linha colorida na linha controlo.

Testes rápidos realizados no laboratório:

- Rotavírus e Adenovírus
- *Helicobacter pylori*
- *Clostridium* spp. - para a deteção de *Clostridium* spp. utilizam-se 2 kits. Primeiramente, testa-se para a presença de antígenos. Se o primeiro teste der positivo, faz-se um segundo teste rápido para deteção de toxinas (A e B)

- *Campylobacter* - caso o teste rápido revele ser positivo, deve semear-se a amostra em meio Campyloset
- *Chlamidia trachomatis*
- *Legionella*

Pesquisa de Carbapenemases

Carbapenemos são antibióticos de última geração muito eficazes no tratamento de infecções patogénicas.

Organismos que produzem carbapenemases são resistentes a estes antibióticos. Carbapenemases são um tipo de beta-lactamase que hidrolisam esta classe de antibióticos. O aparecimento e disseminação destas estirpes tem-se tornado um problema de saúde pública porque estes são resistentes a uma larga variedade de antibióticos, limitando assim as opções de tratamento para os pacientes^[109].

Há 3 classes de carbapenemases: A, B e D. A classe B inclui metalo-beta-lactamases (MBLs), como a IMP, VIM e NDM. As classes A e D são serinases. A classe A tem carbapenemases do tipo KPC e a classe D tem carbapenemases do tipo OXA.

Neste laboratório o teste de deteção, é um ensaio imunocromatográfico, cujo princípio é em tudo semelhante ao descrito anteriormente para os testes rápidos. O teste tem anticorpos contra carbapenemases do tipo KPC, NDM, IMP, VIM e OXA-48, permitindo detetar a presença destas na amostra pela formação do complexo antígeno anticorpo que se traduz no aparecimento de uma tira corada^[109].

No laboratório central da Synlab, este teste é realizado sempre que o antibiograma ilustra um fenótipo de resistência para carbapenemos.

Um resultado positivo deve ser reportado ao INSA. É realizado também, após resultado positivo, um E-teste para o Meropenem para se verificar a CMI (concentração mínima inibitória) usando para tal o meio de Mueller Hinton^[96].

Pesquisa de Micobactérias

As micobactérias, ou Bacilos de Koch (BK), são bactérias álcool-ácido resistentes não encapsuladas e que não esporulam. Entre estas, inclui-se *Mycobacterium tuberculosis*, uma micobactéria não pigmentada de crescimento lento causadora de tuberculose^[110]. Esta faz parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) que contém as bactérias que causam tuberculose não só em humanos mas também em animais e que partilham um conjunto de genes que as permite distinguir de outras micobactérias. Um destes genes codifica para a proteína p64, cuja deteção é a base de um teste rápido que vai ser discutido mais adiante. Outras bactérias deste complexo são *M. africanum*, *M. orygis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae* e *M. mungi*^[110]. Micobactérias que não fazem parte deste complexo são chamadas de micobactérias não-tuberculosas.

Para a deteção destas bactérias, as amostras são semeadas em 2 meios: Lowenstein-Jensen e em tubo MGIT (*mycobacteria growth tube*).

A sementeira em meio Lowenstein-Jensen é considerado o padrão de referência para a deteção de micobactérias^[111]. Este é um meio sólido que permite o crescimento de BK e a visualização das suas colónias que exibem um aspecto típico em forma de couve-flor.

O tubo MGIT contém meio líquido de Middlebrook com um composto fluorescente no fundo sensível à presença de oxigênio no meio^[112]. Como as bactérias são aeróbias estritas, o crescimento de micobactérias neste meio leva a uma diminuição do conteúdo de oxigênio no tubo, levando a uma diminuição de fluorescência^[112].

Antes de serem semeadas, as amostras devem ser descontaminadas, caso tal se justifique. Amostras como expectorações, lavados brônquicos ou urinas devem ser descontaminadas porque podem conter microbiota dos locais anatómicos de onde foram retiradas. Amostras como LCR, por serem líquidos nobres, não precisam de ser descontaminados. A descontaminação é feita com uma solução de hidróxido de sódio, que fica a atuar durante 25 minutos antes da reação ser parada com tampão fosfatos, uma base fraca^[111]. Após este processo de descontaminação, a amostra é semeada nos meios MGIT e Lowenstein-Jensen, para além de ser utilizada para fazer uma alíquota e uma lâmina.

O meio Lowenstein-Jensen é posto a incubar em estufa e vai ser observado ao fim de 30 e de 60 dias para se verificar se houve crescimento de micobactérias ou não.

O tubo MGIT é posto num equipamento chamado BACTEC MGIT 960 que permite a leitura da fluorescência dos tubos^[112]. Uma diminuição da fluorescência destes é indicativo de crescimento bacteriano. Um tubo positivo é passado para meio COS que fica a incubar durante 24h.

Se houver crescimento ao fim de 24h, como estas micobactérias são de crescimento lento, deve-se tratar de uma provável contaminação. Para confirmar se é uma contaminação faz-se uma lâmina com coloração Gram e outra com coloração Zhiel-Neelsen.

Se não houver crescimento ao fim de 24h no meio COS, pode-se tratar de uma eventual micobactéria de crescimento lento, pelo que se vai fazer um teste rápido MCT para a deteção de p64, um antígeno presente em micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*^[113]. Um resultado negativo indica que a bactéria não pertence a este complexo, pelo que a amostra vai ser enviada para o laboratório da Synlab de Barcelona que é capaz de identificar estas bactérias. Um resultado positivo no teste rápido indica que a bactéria faz parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

Para as bactérias do complexo, realizam-se 2 TSAs: PZA e SIRE. O PZA testa a resistência ao antibiótico pirazinamida^[114]. O teste SIRE teste resistência aos antibióticos streptomina, isoniazida, rifampicina e etambutol^[115].

Validação de TSA

Antes da emissão do resultado dos TSAs, é importante proceder à sua validação para garantir que o relatório emitido contém informação útil para o médico e para o utente. Neste relatório, devem ser reportadas todas as resistências.

O laboratório da Synlab desenvolveu tabelas que permitem auxiliar na tomada de decisão relativamente aos antibióticos que devem ser recomendados para cada tipo de amostra diferente e tendo sempre em conta a informação clínica do utente. Deve-se dar preferencialmente antibióticos de 1ª geração. Informação sobre antibióticos de 2ª ou 3ª geração só é disponibilizada no relatório caso se detete resistência a antibióticos de gerações anteriores. Há também uma preferência por antibióticos orais ao invés dos injetáveis.

Não é recomendado um antibiótico se houver uma elevada probabilidade de insucesso terapêutico. Por exemplo, relativamente a infeções urinárias, os antibióticos fosfomicina^[116] e nitrofurantoína^[117] são recomendados para infeções da bexiga por E.

coli em mulheres. Nos homens, as infecções mais comuns são da próstata e epidídimo, infecções mais profundas onde os antibióticos previamente mencionados não são eficazes. Assim, a fosfomicina e nitrofurantoína não são disponibilizadas no relatório final de homens devido à elevada probabilidade de insucesso terapêutico^[118].

Para além do sexo do utente, fatores como a idade devem ser também considerados. A fosfomicina só deve ser recomendada para indivíduos com idade superior a 14 anos^[116] e a nitrofurantoína para idades superiores a 6 meses^[117]. Antibióticos do grupo das quinolonas como a ciprofloxacina não devem ser dados a pessoas com menos de 18 anos por afetar o desenvolvimento do indivíduo. Por este mesmo motivo, não se deve recomendar quinolonas a mulheres grávidas^[118].

É extremamente importante ser seletivo com os antibióticos que se coloca no relatório, não só para garantir a eficácia terapêutica, mas também para evitar o uso excessivo de certos antibióticos e o conseqüente desenvolvimento de resistências. Ao mesmo tempo, devem ser recomendados sempre mais do que um antibiótico e de vários grupos caso o utente possa ter alergia a algum, ou um dos antibióticos seja incompatível com outras terapêuticas que o utente possa estar a realizar.

Imunologia

Por fim, nesta última secção do relatório de estágio, vão ser explicadas algumas das metodologias imunológicas que o laboratório da Synlab tem disponível para auxiliar no diagnóstico e monitorização de patologias.

Capillarys

Este equipamento foi concebido para a separação de proteínas do soro e da urina em 6 frações através de eletroforese capilar em solução livre^[119]. Nesta técnica, as moléculas carregadas são separadas de acordo com a sua mobilidade eletroforética, num tampão alcalino com pH 8,9+/-0,5. A mobilidade eletroforética corresponde ao movimento das partículas carregadas quando sujeitas a um campo elétrico exterior. O campo elétrico permite a migração das proteínas do ânodo para o cátodo, sendo que migram a maior velocidade espécies de menor tamanho ou mais carregadas e migram menos as espécies

com maior tamanho ou menos carregadas. Este tipo de eletroforese tem um fluxo constante, o que se traduz em picos mais estreitos e numa resolução mais elevada.

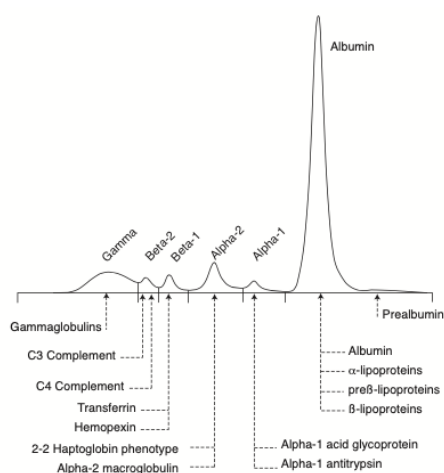


Figura 4 - Espectro obtido por eletroforese de 6 frações de proteínas e algumas das proteínas que migram em cada fração [119]

A amostra é diluída com tampão e injetada na extremidade anódica do capilar. A aplicação de corrente elétrica permite a separação das proteínas em 6 frações que são medidas a 200nm. As frações que esta técnica permite visualizar são: albumina, alfa-1-globulinas, alfa-2-globulinas, beta-1-globulinas, beta-2-globulinas e gama-globulinas^[119].

Deve-se evitar amostras de soro hemolisadas que induzem uma alteração (duplicação) da zona alfa-2, ou amostras de soro muito antigas ou indevidamente conservadas, já que nestas pode ocorrer uma modificação da fração beta-2. Deve-se também evitar amostras de plasma, porque estas contêm fibrinogénio, uma proteína que migra na fração beta-2, podendo aumentar esta fração e dificultar a interpretação do resultado^[119].

No final da corrida eletroforética e da leitura a 200nm das frações de proteínas, os resultados são transmitidos para o sistema operativo em uso, permitindo a visualização do perfil eletroforético. A deteção direta no capilar permite determinar as concentrações relativas (percentagens) de cada proteína individual^[119]. Sabendo a concentração de proteínas no sangue, que pode ser calculada no equipamento *Atellica® Solutions*, é possível saber a concentração das proteínas de cada fração.

É de referir ainda que há imunoglobulinas, como a IgM, que migram fora da zona das imunoglobulinas, pelo que um aumento das outras frações pode dever-se a um aumento de imunoglobulinas.

Tabela 5 - Valores de referência (%) de cada fração de proteínas [119]

Proteína	Valores de referência (%)
Albumina	55,8-66,1
Alfa-1-globulinas	2,9-4,9
Alfa-2-globulinas	7,1-11,8
Beta-1-globulinas	4,7-7,2
Beta-2-globulinas	3,2-6,5
gama-globulinas	11,1-18,8

Hydrasys

Este equipamento é capaz de realizar eletroforeses de 5 frações e imunofixações, tanto de soro como de urina.

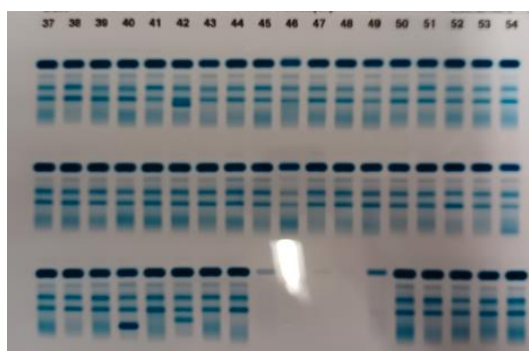
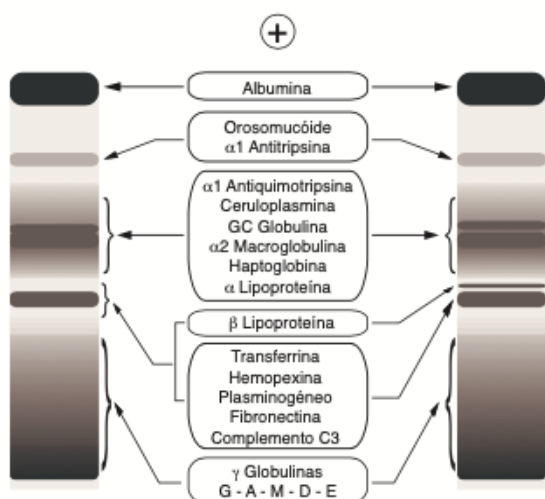


Figura 5 - (esquerda) representação esquemática de uma eletroforese de proteínas de 5 frações e as proteínas que migram nas respectivas frações[115]; (direita) fotografia de um gel de agarose após migração eletroforética onde foram aplicadas 54 amostras diferentes de soro e urina

A eletroforese de 5 frações, como o nome sugere, destina-se à separação de proteínas humanas a um pH alcalino (9,1 +/- 0,5) em 5 frações por eletroforese em gel de agarose^[120]. O gel de agarose é uma matriz tridimensional porosa que vai permitir separar as proteínas com base no seu tamanho e carga quando é aplicado ao sistema uma corrente elétrica que promove a migração destas moléculas em direção ao ânodo. Esta técnica, tal como a eletroforese de 6 frações, é útil para a deteção de anomalias no perfil proteico. As frações que se obtêm são albumina, alfa-1-globulinas, alfa-2-globulinas, beta-globulinas e gama-globulinas^[120].

No final, o gel é corado com negro de amido e lida num scanner, sendo depois a densidade de cada banda traduzida num espectro^[120].

Tal como na eletroforese de 6 frações, devem ser evitadas amostras de soro hemolisado ou amostras de plasma. Devem também ser evitadas amostras de urina antigas ou mal armazenadas porque pode haver degradação da fração proteica nestes^[120].

A análise do perfil eletroforético é importante porque variações neste são indicativos de patologias. Por exemplo, inflamações ou infeções levam a um aumento das frações alfa 1

(deteção IgM), k (deteção de cadeia leve Kappa) e L (deteção de cadeia leve Lambda). Caso dados do utente sugiram ou se for detetada uma cadeia leve sem uma cadeia pesada correspondente, pode-se pesquisar IgE ou IgD, sendo para tal necessários os antisoros apropriados^[121].

Interpretação dos resultados

Considera-se como um resultado positivo o aparecimento de uma banda estreita com limites bem definidos, mais corada que o gel circundante^[121]. Um soro de um indivíduo saudável não deve apresentar nenhuma banda monoclonal, apenas zonas coradas e difusas de proteínas (resultado negativo)^[121].

Uma gamapatia monoclonal é caracterizada pela deteção de uma banda estreita detetada numa das pistas de migração de cadeias pesadas (G, A ou M) e numa das pistas de cadeias leves (kappa ou lambda) ao mesmo nível^[121]. Esta banda deve também aparecer na pista ELP. Como já foi referido acima, o aparecimento de uma banda monoclonal numa das pistas de cadeias leves

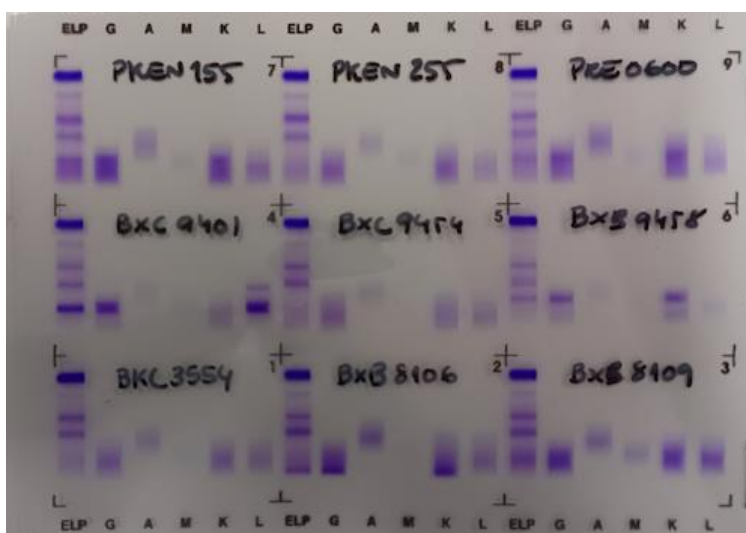


Figura 7 - imunofixações de 9 soros; observam-se duas amostras com picos monoclonais: BXB9458 com uma banda IgG kappa e BXC9401 com uma banda IgG lambda

sem a correspondente cadeia pesada pode indicar que se trata de uma gamapatia com uma das cadeias pesadas que não estão a ser detetadas na imunofixação: IgE ou IgD^[121].

O aparecimento de uma banda em todas as pistas ao mesmo nível na zona do ponto de aplicação pode ser devido à presença de uma crioglobulina ou de uma IgM polimerizada. Nestes casos, deve-se usar um agente redutor como o mercaptoetanol para quebrar estas ligações e repetir a técnica^[121].

Imunofixação com deteção de proteína de Bence Jones

A proteína de Bence Jones corresponde a uma cadeia leve livre de imunoglobulina produzida por células neoplásicas. A sua presença na urina é indicativo de uma diminuição da capacidade de filtração renal, apontando para lesões renais. A deteção desta numa imunofixação é útil para o diagnóstico de mieloma múltiplo^[122].

Esta técnica consiste numa imunofixação, tal como foi descrita previamente, para a deteção de proteína de Bence Jones ou cadeias leves livres na urina^[123].

As proteínas são separadas por eletroforese em gel de agarose em tampão alcalino e depois imunoprecipitadas com antisoros de diferentes especificidades, sendo coradas no fim com violeta ácido^[123].

As amostras são testadas em 6 pistas diferentes: ELP (pista com proteinograma para referência), GAM (permite a deteção de IgG, IgM e IgA simultaneamente com um antisoro trivalente), cadeia leve Kappa, cadeia leve Lambda, cadeia leve livre Kappa e cadeia leve livre Lambda^[123].

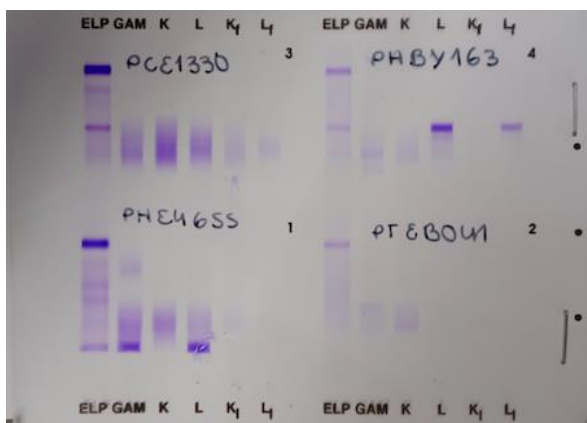


Figura 8 - imunofixação para detecção de proteína de Bence-Jones em urina; a amostra PHBY163 apresenta proteína de Bence-Jones indicada pela presença de uma banda lambda e uma banda leve livre lambda

Esta análise deve ser realizada com urina previamente concentrada para o aumento da sensibilidade do teste. Urinas proteolizadas ou degradadas podem originar uma reação positiva com o antisoro anti-cadeias leves livres^[123].

A presença de proteína de Bence Jones é indicada por uma banda monoclonal detetada nas pistas de migração de cadeias leves livres, onde foi colocado antisoro específico para estes em conjunto com uma banda, ao mesmo nível, na pista de migração de cadeias leves e ELP mas não na pista de migração

e detecção de cadeias pesadas GAM^[123]. Uma paraproteína do soro eliminada pela urina é caracterizada por uma banda monoclonal detetada com o antisoro trivalente e uma banda ao mesmo nível numa das faixas de cadeias leves, mas não na faixa correspondente a cadeias leves livres^[123].

Eletrforese de Hemoglobinas

Este kit foi concebido para a separação de hemoglobinas normais (A, A2 e F) das amostras de sangue e para a detecção das principais hemoglobinas variantes, como a S, C, D e E. Esta separação é feita por eletrforese capilar a pH alcalino (9,4). O equipamento vai permitir a elaboração de um perfil de hemoglobina^[124].

A hemoglobina é uma molécula composta por 2 pares de cadeias polipeptídicas, sendo que a cada uma está associada um grupo heme. O grupo heme é comum a todos, sendo que o tipo de hemoglobina é determinado pelo tipo de globina. As globinas normais são a alfa, beta, delta e gama, permitindo a formação da hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$), hemoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$) e hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$)^[124].

Cada uma destas cadeias ter cargas superficiais diferentes, o que lhes confere mobilidades eletroforéticas diferentes, permitindo a sua separação por eletrforese capilar. Os valores para uma população saudável de adultos são 96,7% a 97,8% de HbA, 2,2 a 3,2% de HbA2 e <0,5% de HbF^[124]. Em recém-nascidos, os valores de HbF encontram-se muito mais elevados, sendo que, com a idade, vão sendo progressivamente substituídos por HbA2.

Utilizando um pH alcalino, são detetadas, do cátodo ao ânodo, as seguintes hemoglobinas: deltaA2, C, A2/O-Arab, E, S, D, G-Filadélfia, F, A, Hope, Bart, J, N-Baltimore e H^[124]. Existem mais variantes que podem migrar na mesma zona que as hemoglobinas atrás mencionadas, mas estas são mais raras e o sistema assume que é a hemoglobina mais comum da zona em que esta migra.

A amostra ideal para análise são amostras de sangue fresco anticoagulado, recolhido em tubos de EDTA. Deve-se evitar amostras armazenadas a uma temperatura incorreta ou durante mais de 7 dias porque as hemoglobinas degradam-se progressivamente, podendo levar a uma análise incorreta. Para um armazenamento mais prolongado, as amostras devem ser congeladas, mantendo-se estáveis até 3 meses a -70/80°C^[124].

Anomalias qualitativas, ou hemoglobinas, devem-se muitas vezes à substituição ou mutação de um único aminoácido, levando ao aparecimento de uma globina diferente. As principais hemoglobinas anormais com interesse clínico são a S, E, D, C e O-Arab.

- HbS – principal variante de hemoglobina associada à anemia falciforme, levando à formação de drepanócitos, ou em casos de β -talassémia^[124]
- HbC – leva a graus variados de anemia hemolítica com aumento moderado do tamanho do baço^[125]
- HbE – homozigóticos apresentam uma anemia suave, microcitose e esplenomegália^[126]
- HbD – em heterozigóticos não tem importância clínica, adquirindo relevância quando em combinação com HbS ou β -talassémia^[127]

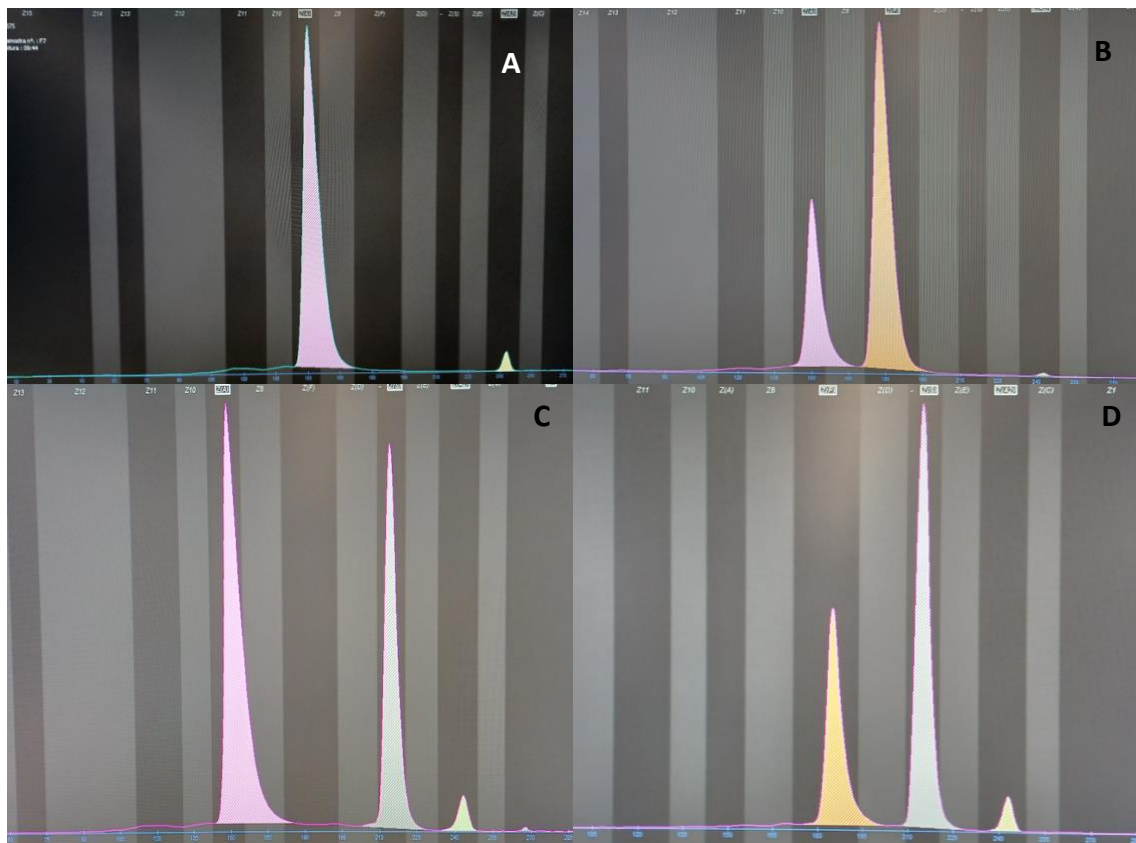


Figura 9 - Perfis de eletroforese de hemoglobinas; a) perfil normal com uma maioria de HbA e uma fração reduzida de HbA2; B) Perfil com heterozigotia de HbA (rosa) e HbF (laranja) com uma fração muito reduzida de HbA2, comum em recém-nascidos; C) perfil com heterozigotia HbA (rosa) e HbS (cinzento); D) perfil com heterozigotia HbF (laranja) e HbS (cinzento)

Anomalias quantitativas ou talassémias, constituem um grupo muito heterogéneo de doenças caracterizado pela diminuição de síntese de um tipo das globinas. Existem 2 tipos de talassémias: alfa-talassémias e beta-talassémias^[124].

As alfa-talassémias são caracterizadas pela diminuição da síntese de cadeias alfa, o que afeta a síntese de todas as cadeias normais. Cadeias beta e gama ficam, assim, em excesso, levando ao aparecimento de hemoglobinas sem a cadeia alfa, como Hb Bart (γ_4) ou HbH (β_4). As beta-talassémias caracterizam-se pela diminuição da síntese das cadeias beta, presentes na HbA. Como tal, observa-se um aumento de HbF, mas principalmente de HbA2^[124].

Serologia Manual

Os testes de serologia manual são testes confirmatórios, realizados para confirmar resultados positivos saídos da análise bioquímica no equipamento *Atellica Solutions* ou para confirmar resultados duvidosos destes.

Waller-Rose

É um teste de detecção de fator reumatóide, um anticorpo dirigido contra a porção Fc da imunoglobulina G.

Este só é realizado se a análise bioquímica der um valor superior a 10 UI/mL, caso contrário, o resultado será sempre negativo. O teste corresponde a uma hemaglutinação com eritrócitos sensibilizados com IgGs contra o fator reumatóide. São realizadas diluições sucessivas da amostra e, ao fim de um período de incubação com agitação é observada a aglutinação, comparando sempre com um controlo positivo e um negativo. O resultado vai corresponder ao último título positivo, isto é, ao último título onde se observa hemaglutinação devido à ligação dos eritrócitos sensibilizados com anticorpos ao fator reumatóide da amostra^[128].

Paul-Bunnel

É um teste para o diagnóstico de mononucleose infecciosa, correspondendo a uma imunocromatografia rápida onde se detetam anticorpos IgM heterófilos contra EBV^[129]. Estes resultados são sempre cruzados com os resultados revelados pelo equipamento VIDAS da bioMérieux, para um resultado mais correto.

HIV

É um teste rápido de imunocromatografia para diagnóstico por infeções de HIV, permitindo diferenciar entre infeções por HIV1 e HIV2. Para a detecção de HIV-1, o teste utiliza os antígenos gp41 e gp120 e para a detecção de anticorpos anti-HIV2, utiliza-se o antígeno gp36^[130].

TPHA

Este teste é usado para a detecção de anticorpos IgG contra o agente causadores da sífilis (*Treponema pallidum*).

É realizada uma série de diluições da amostra à qual se adiciona eritrócitos cobertos com antígeno de *Treponema pallidum*. Se a amostra tiver anticorpos contra este agente, irá ocorrer a aglutinação da amostra, formando uma rede difusa no topo do poço. Um resultado negativo corresponde a um precipitado de eritrócitos não aglutinados no fundo do poço. O título da amostra vai corresponder ao maior valor de diluição onde ocorreu aglutinação^[131].

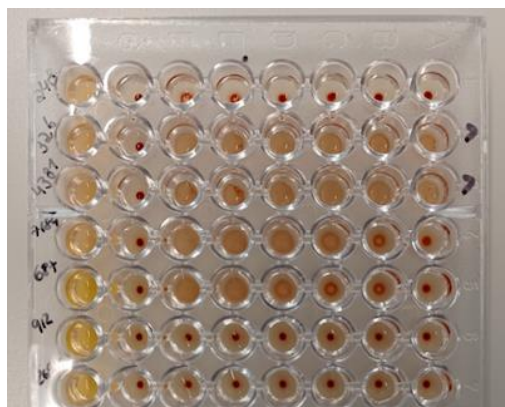


Figura 10 - resultados de um teste TPHA; as amostras das linhas 2 e 3 são um resultado positivo >2560 ao passo que as amostras das linhas 1, 6 e 7 são negativas

VDRL

Usado para a detecção de anticorpos contra o agente causadores da sífilis (*Treponema pallidum*). Corresponde a um teste não treponémico de aglutinação com antígenos de cardiolipina, que se ligam a reaginas da amostra (anticorpo contra um componente de *T. pallidum*), formando flocos que são evidenciados com carvão^[132].

Widal

Este teste é utilizado para o diagnóstico de salmoneloses, permitindo distinguir entre as estirpes O e H de *Salmonella typhi* e as estirpes A e B de *Salmonella paratyphi*. Tal como o teste acima descrito, corresponde a um teste de aglutinação em placa^[133].

Weil-Félix

Corresponde a um teste de aglutinação em placa para detecção de *Proteus*, agente causador da febre da carraça, via detecção de anticorpos contra OX2 e OX19^[134].

Bengal Rose

Este teste serve para o diagnóstico de bruceloses, permitindo a detecção de IgM e IgG via aglutinação em placa^[135].

Ensaio Imunoenzimáticos

Os ensaios imunoenzimáticos e imunofluorimétricos realizados no laboratório têm como objetivo o auxílio no diagnóstico e acompanhamento de doenças autoimunes, como LES (lupus eritematoso sistémico), Síndrome de Sjogren, esclerose sistémica, artrite reumatóide, colangite biliar primária, entre outras.

ELISA é um ensaio in vitro semiquantitativo ou quantitativo de, no caso do presente laboratório, IgG anti-dsDNA e *Chlamidia* e anticorpos IgM e IgG de fosfolípidos, HSV1 e 2. e *H. pylori*. Estes ensaios são realizados no equipamento EUROIMMUN Analyzer I-2P.

O kit usado contém microplacas com poços de reação revestidos com o o antígeno específico para os anticorpos que se quer detetar (por exemplo, dsDNA). Amostras de soro do utente são incubadas nestas placas e, caso sejam positivas e contenham anticorpos, estes ligam-se aos antígenos da microplaca. Numa segunda fase da reação, ocorre a incubação com anticorpos contra IgG humanas marcados com a enzima peroxidase. Se as amostras forem positivas, este anticorpo secundário liga-se ao primário e a adição de peróxido de hidrogénio permite iniciar uma reação que possibilita a quantificação dos anticorpos^[136].

A detecção de autoanticorpos contra dsDNA é importante para o diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (LES). Esta é uma doença autoimune que pertence ao grupo das colagenoses. Durante o decurso desta doença, imunocomplexos de DNA depositam-se em capilares subcutâneos, rins e outros órgãos, levando a danos nestes via ativação do sistema do complemento. A detecção de anticorpos anti-dsDNA é, então, um importante critério de diagnóstico de LES por ser muito específico – 70 a 98% dos paciente com LES desenvolvem anticorpos contra dsDNA^[137].

A detecção de anticorpos contra fosfolípidos é essencial para o diagnóstico de Síndrome do anticorpo antifosfolipídico, uma doença autoimune onde são produzidos anticorpos contra uma ou mais proteínas ligadas a fosfolípidos, levando a casos de trombose venosa ou arterial^[138].

Teste de Imunofluorescência Indireta

Este teste permite uma determinação qualitativa ou semiquantitativa de anticorpos humanos IgG em amostras de doentes para auxílio de diagnóstico de várias doenças autoimunes^[139]. No laboratório procurava-se detetar ANA (anticorpos anti-núcleo celular), ANCA (anticorpos anti-neutrófilos), AMA (anticorpos anti-mitochondriais) e também anticorpos anti-endomísio, gliadina e transglutaminase celular.

Para tal, a amostra era incubada em campos específicos do kit, onde os anticorpos, se presentes, ligam-se aos antígenos. Estes são posteriormente corados com anticorpos anti-IgG humanos marcados com FITC, possibilitando a sua visualização num microscópio de fluorescência^[139].

Como substrato, são utilizadas células HEP-2, fígado, esófago e tecido intestinal de macaco, endomísio e células transfetadas^[139].

A observação da fluorescência ao microscópio nos diferentes substratos vai permitir evidenciar e identificar diferentes padrões de fluorescência, que estão ilustrados na plataforma ICAP. A tabela abaixo ilustra alguns dos padrões visualizados durante o estágio em células HEP-2. A informação e imagens desta foram retiradas do site ICAP^{[140][141]}, que também é utilizado no laboratório para a consulta de padrões de imunofluorescência.

Tabela 6 - Descrição e ilustração dos principais padrões de fluorescência visualizados durante o estágio

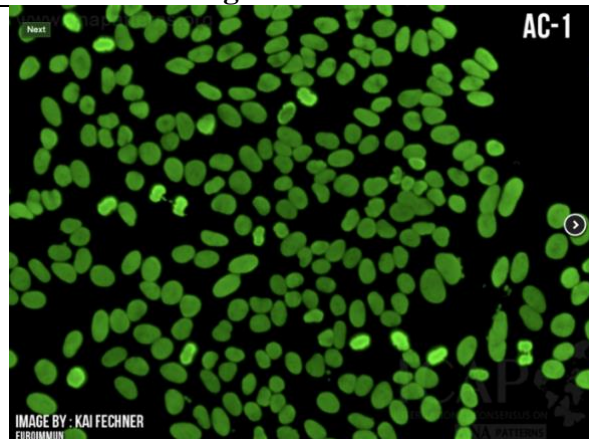
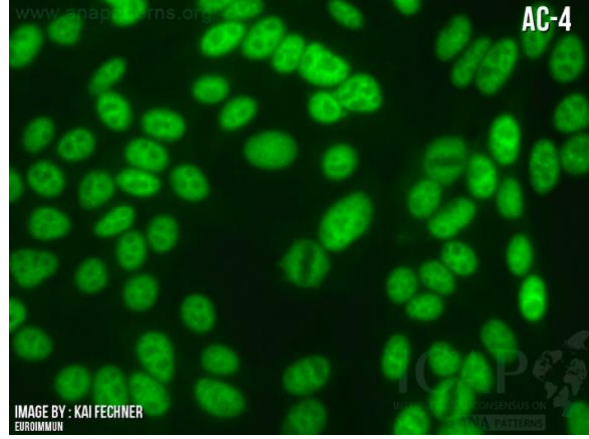
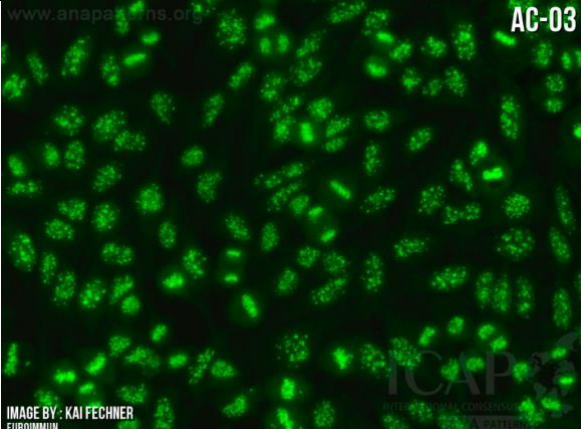

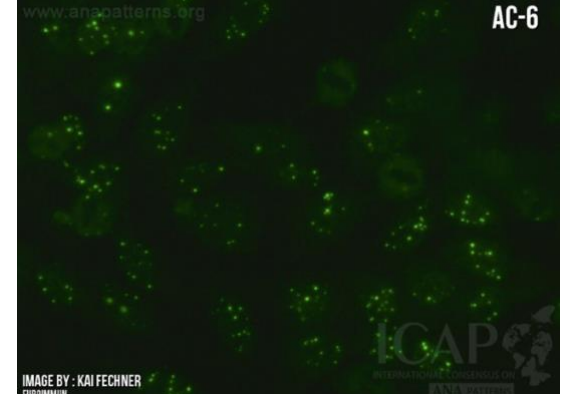
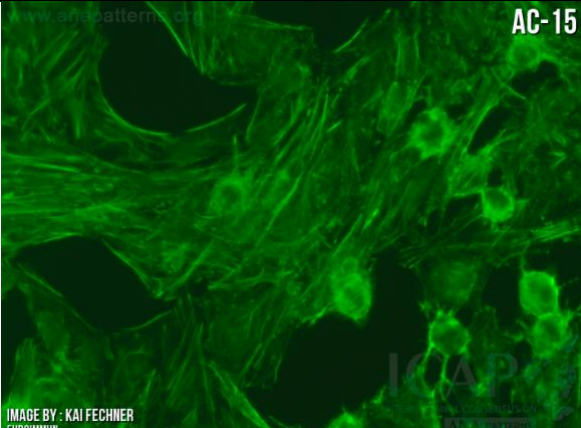
Padrão	Descrição	Imagem ilustrativa
Nuclear homogéneo	Fluorescência regular e homogénea em todo o núcleo. Células mitóticas apresentam a cromatina corada intensamente. Associado a LES, hepatite crónica autoimune ou artrite juvenil idiopática	 AC-1
Nuclear granular fino	Ponteados muito finos em todo o núcleo. O nucléolo pode estar ou não corado e células mitóticas apresentam a cromatina não corada. Associado a SjS, LES, lúpus eritematoso cutâneo subagudo, lúpus eritematoso neonatal, entre outros	 AC-4

Tabela 6 – Descrição e ilustração dos principais padrões de fluorescência visualizados durante o estágio (Cont.)

Padrão	Descrição	Imagem ilustrativa
<p>Centromérico</p>	<p>Pontilhado grosseiro e contável (40-80 por célula) que se encontra disperso em células interfásicas mas concentrado no centro em células mitóticas. Associado a pacientes com SSc cutâneo</p>	 <p>www.anapatterns.org AC-03 <small>ICAP</small> <small>IMAGE BY: KAI FECHNER EUROIMMUN</small></p>
<p>Nucleolar homogêneo</p>	<p>Fluorescência difusa do nucléolo, sendo que na metáfase, não apresenta fluorescência. Associado a SSc, SSc-AIM e outros.</p>	 <p>www.anapatterns.org AC-8 <small>ICAP</small> <small>IMAGE BY: KAI FECHNER EUROIMMUN</small></p>
<p>Múltiplos dots nucleares</p>	<p><i>Dots</i> contáveis (6-20 por célula) no núcleo. Associado a um grande espectro de doenças autoimunes, como PBC e outras situações inflamatórias.</p>	 <p>www.anapatterns.org AC-6 <small>ICAP</small> <small>IMAGE BY: KAI FECHNER EUROIMMUN</small></p>
<p>Citoplasmático fibrillar linear</p>	<p>Fibrilhas do citoesqueleto apresentam-se fluorescentes, evidenciando longas fibrilhas de actina ao longo da célula. Associado a pacientes com AIH tipo 1, infecção crônica por HIV e doença celíaca</p>	 <p>www.anapatterns.org AC-15 <small>ICAP</small> <small>IMAGE BY: KAI FECHNER EUROIMMUN</small></p>

Caso o padrão de fluorescência não seja característico, procede-se à determinação qualitativa de anticorpos IgG humanos na amostra.

Cada um dos padrões de fluorescência está associado a um painel de anticorpos que podem ser evidenciados recorrendo ao uso de diferentes antigénios. Deste modo, sabendo os anticorpos que existem na amostra, é possível esclarecer o padrão de fluorescência. Um dos painéis utilizados é, por exemplo, o painel DFS70, que contém os antigénios nRNPSm, Sm, SS-A, Ro-52, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, CENP B, PCNA, dsDNA, nucleossomas, histonas, proteína-P ribossomal e DFS-70^[142].

Esta pesquisa de antigénios é realizada recorrendo à técnica de *Immunoblot*. O kit teste contém tiras teste revestidas com linhas paralelas destes antigénios purificados. A adição de amostra às tiras permite a ligação de anticorpos aos antigénios, caso estes existam, e uma segunda incubação com um anticorpo anti-IgG humano marcado enzimaticamente permite evidenciar a presença do anticorpo via uma reação colorimétrica^[143].

*Parte II: Monografia - Marcadores Bioquímicos para o
Diagnóstico do Cancro do Pâncreas*

Introdução

O pâncreas é um órgão localizado na cavidade abdominal, abaixo do estômago e em

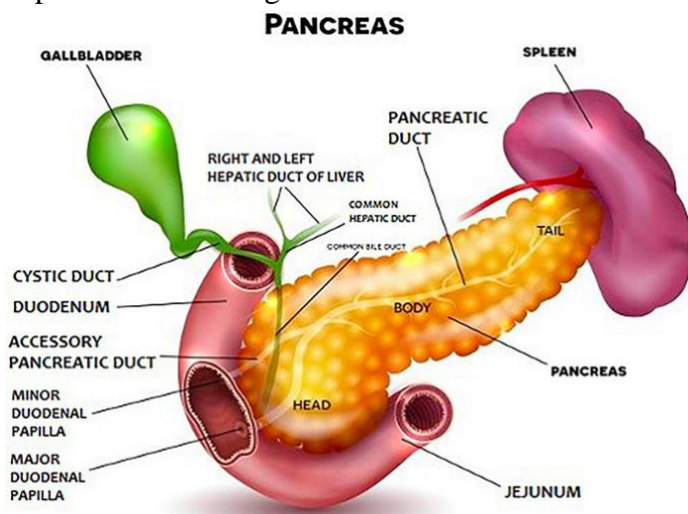


Figura 11 - Representação esquemática do pâncreas e algumas das suas relações anatômicas; retirado de "Pancreas - it's functions, disorders and physiological impact on the mammals' organism" [144]

íntima associação com o duodeno. É uma glândula com funções endócrinas e exócrinas. Secreta, via ducto pancreático para o intestino, o chamado suco pancreático que é constituído por enzimas digestivas, como a amilase pancreática, tripsina ou lipase, que auxiliam na digestão de hidratos de carbono, gorduras e proteínas no duodeno. Por outro lado, secreta para o sangue hormonas como a insulina e a glucagina que são cruciais para a regulação e manutenção dos níveis de glucose no sangue^[144].

O adenocarcinoma pancreático é uma condição fatal de incidência crescente^[145]. Atualmente, é o 12º cancro mais comum a nível mundial e o 5º mais comum na Europa. Estima-se que em 2014, foram diagnosticados 46 420 novos casos desta patologia, sendo que 39 590 destes acabaram na morte do indivíduo, apresentando uma taxa de mortalidade de cerca de 85%^[146].

A incidência geográfica do cancro do pâncreas varia muito, sendo mais elevada em países com maiores índices sociodemográficos como países europeus, da América do Norte, Austrália e Nova Zelândia^[145].

Os índices de mortalidade tendem a ser tão elevados porque, quando é detetado, em 80-85% dos casos, o tumor já não é passível de ser removido cirurgicamente^[147], encontrando-se num elevado estado de metastização. Há várias razões para que esta situação ocorra nomeadamente, sintomas não específicos e grande proximidade da massa tumoral a grandes vasos sanguíneos, o que facilita a metastização. Para os doentes que foram operados, a taxa de sobrevivência a 5 anos, após o diagnóstico seguido de participação em quimioterapia com adjuvante ou quimiorradioterapia, é de 4-26%^[148].

Por outro lado, para aqueles que apresentavam um tumor localmente avançado ou já metastizado, não há, atualmente uma cura, pelo que estes indivíduos têm um tempo médio de sobrevivência de 8-12 meses e 5-8 meses respetivamente^[148]. Em geral, a taxa de sobrevivência a 5 anos é de 2-9%^[145], pelo que é dos cancros com pior prognóstico.

Assim, a deteção precoce destes tumores é extremamente crucial para que o tratamento se inicie o mais depressa possível, aumentando desta forma a taxa de sobrevivência^[145]. Para tal, é necessário compreenderem-se os fatores de risco e sintomas associados à doença, de forma a identificarem-se os indivíduos de risco, aos quais se devem realizar testes de *screening* e avaliar quais os biomarcadores mais adequados para se alcançar uma maior precisão e exatidão do diagnóstico^[145].

Estão descritos dois grandes tipos de cancro pancreático: o exócrino e o endócrino^[149].

Tumores pancreáticos neuroendócrinos desenvolvem-se a partir de células endócrinas do pâncreas que secretam hormonas, como a insulina e a glucagina, na corrente sanguínea. Este tipo de cancro é raro, constituindo apenas 5% dos casos de tumores pancreáticos^[149].

Tumores exócrinos desenvolvem-se a partir de células que constituem a glândula exócrina e os ductos pancreáticos. O cancro pancreático exócrino corresponde a mais de 95% de todos os cancros do pâncreas^[149] e pode, por sua vez, ser subdividido em diferentes tipos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoscamoso, carcinoma colóide ou mucinoso, carcinoma anaplásico, carcinoma medular e carcinoma hepatóide^[149]. Destes, a grande maioria são adenocarcinomas dos ductos pancreáticos (e as suas variantes), ocorrendo, principalmente nas células que formam os ductos pancreáticos, mas também é possível que ocorram nas células que secretam enzimas pancreáticas (carcinoma das células acinares). 60-70% dos adenocarcinomas pancreáticos ocorrem na cabeça do pâncreas, sendo apenas 15% no corpo e 15% na cauda (figura 11). Aquando do diagnóstico, a maioria dos adenocarcinomas pancreáticos já se disseminaram por todo o órgão e metastizaram^[145].

Os seus sintomas não são específicos o que pode dificultar a distinção entre as várias causas benignas, atrasando o diagnóstico correto. Estes sintomas incluem dor de costas (12%) ou epigástrica/abdominal (40-60%), náuseas e vômitos (16%), inchaço, mudanças na consistência das fezes, provas hepáticas alteradas (50%), icterícia (30%), diabetes (13-20%), dispepsia (20%) e perda de peso (10%). Outros sintomas incluem obstrução intestinal, anorexia, depressão e trombose venosa, etc^[147].

Pensa-se que a patogénese da doença está relacionada com mutações nos genes das células da mucosa deste órgão, englobando a ativação de oncogenes, inativação de genes supressores de tumor e a desregulação de vias de sinalização que leva, primeiramente, ao aparecimento de lesões microscópicas nos ductos^[145]. A contínua reparação das lesões geradas vai permitir a propagação do processo de malignidade. Neoplasias intraepiteliais pancreáticas (PanIN) de baixo grau têm mutações no oncogene *K-RAS* e encurtamento de telómeros, ao passo que as PanIN de elevado grau têm mutações em cinases dependentes de ciclina (CDK) como *CDKN27*, *CDKN2A* e *CDKN1A*, *p53* e *SMAD4*^[145].

Devido à baixa incidência do cancro do pâncreas é muito difícil definir *guidelines* para o seu *screening*^[145]. Pelo mesmo motivo, o *screening* da população geral não é recomendado, já que a probabilidade de ocorrerem falsos positivos é elevada^[150]. Contudo, pode ser justificável em determinados subgrupos da população, em que a incidência é mais elevada, nomeadamente em doentes com pancreatite hereditária^[150]. O Consórcio Internacional de *Screening* de cancro de Pâncreas recomenda esta abordagem a indivíduos que têm risco de desenvolver cancro pancreático familiar. Apesar de se ter identificado uma população alvo para tal, o diagnóstico adequado ainda não se encontra bem definido. Exames imagiológicos como a Ressonância magnética (RM) e a Colangiopancreatografia de ressonância magnética vão de encontro ao que o ultrassom endoscópico pode revelar, mas este último tem uma maior sensibilidade na identificação de lesões com menos de 2 cm. Recomenda-se uma combinação destas 3 técnicas para o diagnóstico^[145].

Para além destes métodos, recomenda-se o uso de marcadores tumorais para auxiliar o *screening* da população de risco^[145]. Um marcador ideal deve possuir uma elevada especificidade (não ser detetado em sujeitos saudáveis ou em outras doenças) e uma elevada sensibilidade (ser capaz de detetar a doença em indivíduos com a patologia). Deve, também, ter um elevado valor preditivo positivo, isto é, a sua presença deve ser indicativa de doença, correlacionando com a fase do tumor e deve ser detetado precocemente^[151].

O marcador mais utilizado para o *screening* desta patologia é, atualmente, o CA19-9^[145, 151]. Contudo, outros marcadores já foram sugeridos para este fim. No artigo intitulado “*Biochemical diagnostics of pancreatic cancer – Present and future*”^[151] os autores exploram como possíveis marcadores os antígenos CA19-9, CA50, CA242 e antígeno carcino-embriónico (CEA), enzimas como a álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase, exoglicolase desidrogenase e catepsina D, bem como marcadores genéticos como a família de genes *K-RAS* e micro-RNAs e fatores de crescimento hematopoiéticos. Em “*Tumor Markers in Pancreatic Cancer – Recent Discoveries*”^[150] é proposto um grupo diferente de marcadores tumorais que englobam os antígenos CA19-9, CA50, CA242, CA195, CA125, CA494, alfa feto-proteína (AFP), CEA, antígeno oncofetal pancreático (POA), DuPAN-2, SPAN-1, CAM 17-1 (molécula de adesão celular 17-1), antígeno de polipéptido tecidular (TPA) e antígeno específico de polipéptido tecidular (TPS), enzimas como a TatI (enzima de restrição), cinase tumoral M2-piruvato, elastase e glicosiltransferase. O Grupo Europeu de Marcadores Tumorais (EGTM) explora como possíveis marcadores o CA19-9 e outros como a família de genes *K-RAS*, P53, micro-RNAs e certas mucinas^[148].

Marcadores mais comuns para o diagnóstico do cancro do pâncreas

Tendo a primeira parte desta monografia abordado, fundamentalmente, a incidência, classificação, sintomas e forma de diagnóstico do cancro do pâncreas, de seguida vai abordar-se, com maior detalhe, os marcadores mais comuns utilizados para o seu diagnóstico bioquímico.

CA19-9

Atualmente, o CA19-9 é o único biomarcador aprovado para o *screening*, diagnóstico e monitorização terapêutica de cancro pancreático^[151].

O CA19-9 é sintetizado por células dos ductos biliares e pancreáticos e por células do epitélio gástrico, do cólon, do endométrio e salivar, estando, também presente em pequenas quantidades no soro^[146]. Este antigénio é uma glicoproteína de alto peso molecular com um esqueleto proteico transmembranar e uma porção extracelular constituída por uma cadeia de oligossacáridos glicosilada. Faz parte da família de antigénios de Lewis, um grupo de antigénios eritrocitários sintetizados, não por estas células sanguíneas, mas por células epiteliais exócrinas, sendo, posteriormente, adsorvido à superfície de glóbulos vermelhos^[146].

Encontram-se distribuídos em vários tecidos humanos e são recetores para algumas bactérias patogénicas^[146]. Raramente têm importância clínica, já que são pouco frequentes as ocorrências de rejeição em casos de transfusão sanguínea, doença hemolítica do recém-nascido ou de transplante renal, devido a estes antigénios^[152].

A sua produção é dependente da expressão de genes que codificam para proteínas da família fucosiltransferase, que catalisam a adição de α -fucose a polissacáridos precursores do último passo da síntese destes antigénios^[146].

A expressão dos antigénios do sistema de Lewis depende dos alelos herdados nos *loci FUT2* e *FUT3*^[146, 152]. O gene do alelo *FUT3* (*Le*) codifica para uma transferase ($\alpha 1 \rightarrow 4$ fucosiltransferase) que adiciona uma fucose a cadeias precursoras, (em cadeias H tipo 1 ou nos antigénios A e B) numa posição subterminal^[146], criando o antigénio *Le^a*. O gene do alelo *FUT2* (*Se*) codifica para uma transferase ($\alpha 1 \rightarrow 2$ fucosiltransferase) que adiciona uma fucose a cadeias precursoras^[146] em secreções e fluidos para formar o antigénio H^[152], ou adicionar essa fucose ao antigénio *Le^a*, originando o antigénio *Le^b*. Para além disto, oses terminais A ou B podem ser adicionados ao antigénio H, levando à expressão de antigénios sanguíneos A e B^[152].

A síntese dos antigénios *Le^a*, *Le^b*, A e B podem ser observados na Fig 12^[152].

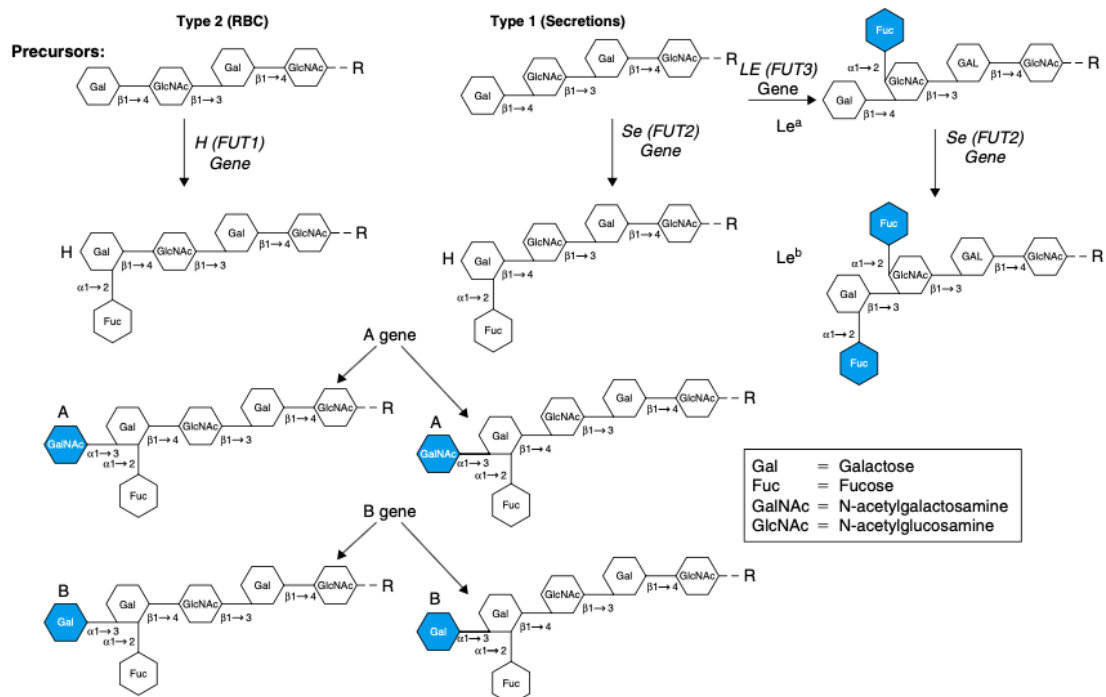


Figura 12 - Síntese de antígenos Lewis a partir de cadeias precursoras tipo 1 e tipo 2; Figura retirada de "Lewis, I and P Blood Group Systems" [152]

Os antígenos de Lewis no plasma são depois passivamente adsorvidos nas membranas celulares^[152]. Posteriormente, são adicionados 1 ou 2 resíduos de ácido siálico pela enzima $\alpha 2 \rightarrow 6$ sialiltransferase, formando o antígeno disialil-Lewis. Este antígeno funciona como um ligando para recetores imunossupressores, mantendo a homeostase imunológica^[146].

Em células cancerígenas há uma diminuição da transcrição do gene que codifica a $\alpha 2 \rightarrow 6$ sialiltransferase. Isto leva a uma síntese parcial da ligação ao segundo ácido siálico, levando a uma gradual transição do antígeno disialil-Lewis para o sialil-Lewis, que se acumula, o que resulta numa perda de reconhecimento célula-célula e o aumento da ligação de E-seletinas^[146]. Há, também, uma diminuição da atividade da enzima que realiza a 6-sulfatação, resultando na perda gradual de 6-sulfo Lewis X e no aumento de sialil Lewis X, outro ligando de E-seletinas^[146]. As E-selectinas são moléculas de adesão celular que desempenham um papel importante na inflamação. O sialil Lewis X é um isómero da molécula sialil-Lewis a, estando o primeiro mais presente no pulmão, mama e ovário ao contrário do último que se encontra em maiores níveis em cânceros do pâncreas, trato biliar, estômago, cólon e reto^[153].

O anticorpo monoclonal que reconhece o CA19-9 é apelidado de N19-9^[153]. Inicialmente, foi descrito contra células do cancro do cólon, mas descobriu-se que deteta glicoproteínas do soro que aparecem mais frequentemente em doentes com cancro pancreático ou cancro do trato biliar. Este anticorpo passou, juntamente com AFP e CEA, a ser muito usado para o diagnóstico de tumores, para a deteção de recorrências e para a monitorização terapêutica^[153].

O sialil-Lewis pode estar elevado em pacientes com doenças como a pancreatite, pelo que não é específico para condições cancerígenas^[153]. Isto acontece porque células epiteliais do ducto pancreático podem expressar naturalmente este antigénio. Aquando de uma inflamação, mais células são estimuladas a libertar sialil-Lewis, levando a falsos positivos em alterações de carácter benigno. Também, a obstrução dos ductos pancreáticos pode levar a uma acumulação deste antigénio, que ao entrar em circulação, pode originar falsos positivos em indivíduos com doenças quísticas^[153].

Em indivíduos saudáveis ou com alterações benignas é comum ver-se uma maior distribuição de disialil-Lewis. Pacientes com cancro tendem a ter maiores níveis de sialil-Lewis *a* do que disialil-Lewis. Assim, o rácio sialil-Lewis *a*/ disialil-Lewis é maior em pessoas com cancro e menor em indivíduos com patologias de carácter benigno^[153].

Enquanto marcador, o CA19-9 tem uma especificidade de 68-91% e uma sensibilidade de 70-90%^[150] para o cancro pancreático, pelo que não é exato o suficiente para ser usado no *screening* de indivíduos assintomáticos. Apesar de tudo, é atualmente o teste mais útil para diferenciar adenocarcinoma pancreático de pancreatite crónica ou recorrente^[150]. Contudo, o facto de se encontrar aumentado em outras doenças limita o seu valor de diagnóstico. É particularmente útil como fator de prognóstico e monitorização da eficácia terapêutica (pós-cirurgia) e como indicativo de doença remanescente^[150].

O nível de *cut-off* utilizado para o CA19-9 depende do contexto, mas frequentemente é usado o valor 37 U/mL para discriminar entre casos benignos e malignos^[148].

Podem aparecer falsos negativos e falsos positivos em indivíduos com doenças benignas como doenças intra- ou extra-colestáticas, pancreatite aguda e crónica, colangite, cirrose hepática e icterícia. Estas condições podem levar a níveis elevados de CA19-9^[146], pelo que a interpretação dos valores de CA19-9 requer uma avaliação destas situações interferentes, o que dificultam o uso deste marcador clinicamente. Este marcador aparece, também, elevado em outros tipos de cancro como o cancro gastrointestinal, cancro do ducto biliar (67%), gástrico (41%), colorretal (34%) e hepatocelular^[148].

Para além disto, deve realçar-se que não é possível detetar CA19-9 em pessoas com deficiência em fucosiltransferase (indivíduos Lewis negativos)^[146, 152], que correspondem a 5-10% de caucasianos, porque estes não sintetizam CA19-9 de todo. Assim, nestes indivíduos é muito comum a identificação de falsos negativos mesmo em estadios avançados da doença^[146].

Por estes motivos, o CA19-9 deve ser usado com cuidado no diagnóstico, especialmente em casos iniciais da doença. Pode, no entanto, ser incluído em algoritmos para complementar exames radiológicos, particularmente em doentes não-ictéricos. Se justificado, deve ser usado para diagnóstico mas só em conjunto com outros exames, tais como tomografia computadorizada (TC e ultrassons endoscópicos^[148]). Falsos positivos em indivíduos com doenças benignas são inevitáveis, sendo por isso muito importante calcular a razão sialil/disialil-Lewis nestes casos. Assim, é possível distinguir casos benignos de malignos, diminuindo os casos de doentes que têm de ser hospitalizados durante longos períodos de tempo^[146].

Enquanto teste de *screening*, a medição de CA19-9 tem um uso limitado quando aplicado à população em geral, sendo apenas recomendado para a população de alto risco, em conjunto com outras técnicas de imagiologia como a ultrassonografia endoscópica, ressonância magnética, tomografia não computadorizada e outras^[146].

A sua medição é também importante para o prognóstico porque permite uma estratificação dos doentes em diferentes grupos, de acordo com os níveis deste marcador: indetetável, normal (< 37 U/mL), de 38 a 200 U/mL ou acima de 200 U/mL. Permite ainda averiguar se é possível a remoção cirúrgica da massa cancerígena, sendo para este caso usado o *cut-off* de 100 U/mL^[146]. Assim, há uma correlação inversa entre os níveis de CA19-9 e a sobrevivência mediana dos doentes, isto é, quanto maior o seu teor, menor a taxa de sobrevivência. É particularmente útil o uso deste marcador tumoral para avaliar a eficácia terapêutica. Valores diminuídos de CA19-9, após cirurgia, são indicativos de um bom prognóstico e a contínua medição deste marcador permite detetar, em conjunto com outros métodos, recorrências e metástases^[148].

CA50

O antigénio CA50 é um marcador de tumor utilizado para auxiliar no *screening* e diagnóstico de tumores e para a distinção entre casos de malignidade e de doenças benignas.

Foi primeiramente identificado por Lindholm *et al.* a partir de uma série de anticorpos monoclonais contra a linha celular de cancro colorretal humano 205 (COLO 205)^[154]. Os epítomos reconhecidos por este anticorpo contêm na sua estrutura grupos sialil-fucosil-lacto-tetraose e sialil-lacto-tetraose, que correspondem a epítomos sialil-Lewis e sialil-Lewis sem o resíduo de fucose, respetivamente^[154, 155]. Estes grupos já foram identificados em glicoproteínas de alto peso molecular de tecidos tumorais colorretais e pancreáticos. No entanto, é importante referir que há a possibilidade de ocorrerem reações cruzadas com o antigénio CA19-9 devido à elevada semelhança entre os seus epítomos^[154]. Em células cancerígenas, a inativação de certas glicosiltransferases e a ativação de glicosiltransferases embrionárias leva à alteração nas propriedades antigénicas de glicanos de superfície, incluindo o aumento da expressão de CA50 e outras estruturas proteicas associadas ao cancro^[154].

Em indivíduos considerados saudáveis, os níveis séricos deste marcador tumoral situam-se abaixo dos 25 U/mL^[154].

Níveis elevados de CA50 foram observados não só em indivíduos com cancro colorretal, mas, também, com outros tipos de cancro e em doenças benignas, indicando que este antigénio não é produzido apenas em células cancerígenas^[154]. Algumas das doenças não-neoplásicas em que este antigénio aparece aumentado incluem pancreatite crónica, cirrose, gastrite, colite ulcerativa, pneumonia, algumas doenças autoimunes e diabetes *mellitus* tipo 2^[154]. Para além do cancro do pâncreas, podem ser observados níveis elevados em casos de cancro do cólon, pulmão, útero, bexiga, fígado e vesícula biliar^[154].

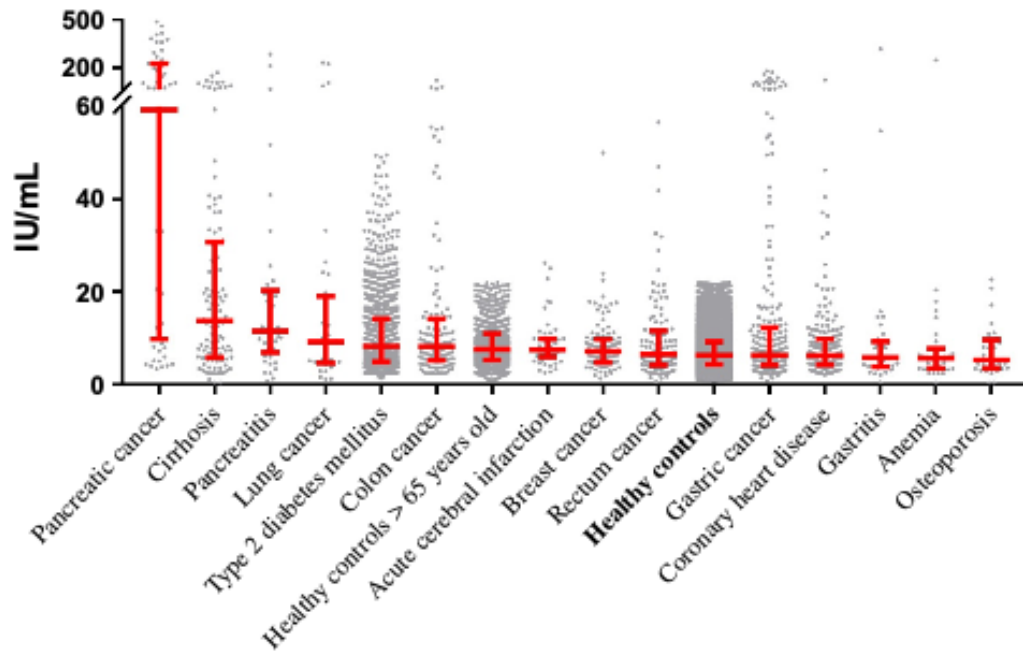


Figura 13 - Valores séricos de CA50 em 14 condições patológicas, comparadas com 2 grupos controlo; observa-se que certas doenças provocam um aumento dos níveis de CA50 quando comparados com os grupos controlos, mas os valores medianos em indivíduos com cancro pancreático estão muito acima do extremo máximo dos diagramas elaborados para outras patologias; retirado de “Serum CA50 levels in patients with cancers and other diseases” [154]

Num estudo efetuado por Haglund *et al.* [155], verificou-se que em indivíduos com doenças benignas, o valor de CA50 está aumentado acima do *cut-off* utilizado (17U/mL) em, apenas, 29% dos indivíduos, mas encontra-se sempre abaixo de 170U/mL em todos eles [155]. Valores elevados (até 250 U/mL) foram reportados em doentes com colestase extra-hepática, sendo que, também, foram reportados aumentos nos seus níveis em casos de icterícia hepatocelular, cirrose, hepatite viral e hepatite alcoólica aguda [155]. O valor mediano de CA50 em doentes com cancro pancreático era de 166U/mL, sendo que 71% destes tinham valores acima do limite de *cut-off* e que 45% destes tinha um nível superior a 250U/mL [155].

A expressão deste marcador é mais elevada em casos tumorais do que em condições benignas, permitindo, assim, um diagnóstico diferencial entre carcinomas pancreáticos e pancreatite crónica com uma sensibilidade de 46% e uma especificidade de 91% [154].

Níveis aumentados deste marcador estão, também, associados a invasão linfática, tumores de maior tamanho, metastização e avançado estado patológico, permitindo, assim, concluir que valores de CA50 elevados são um mau prognóstico para cancro pancreático. É também recomendado o seu uso para monitorização cirúrgica, já que os seus valores tendem a diminuir após a operação, pelo que o aumento destes pode indicar uma recorrência [154].

Apesar de não ser particularmente específico, o CA50 pode ser um marcador sensível para o diagnóstico de certos adenocarcinomas, estando aumentado de forma significativa em 51% dos indivíduos com cancro colorretal e em 84% de indivíduos com cancro pancreático [154]. Assim, é mais eficaz no diagnóstico de cancro pancreático com mais de 84% de sensibilidade. Fontes afirmam que este marcador tem uma sensibilidade de 69 a 96% [156] ou de 78-84% [150] e uma especificidade de 71 a 98% [156] ou de 70-85% [150].

Contudo, não deve ser usado isoladamente, sendo recomendado o seu uso em combinação com outros marcadores como o CA242 e o CEA para o diagnóstico e prognóstico de cancro pancreático^[154]. Devido à semelhança dos marcadores, a combinação de CA50 e CA19-9 não mostrou ter benefícios^[155].

A expressão de CA50 e CA19-9 parece seguir a mesma tendência nos doentes com cancro pancreático, mas há diferenças na sensibilidade e especificidade dos testes que dependem dos valores de *cut-off* utilizados, pelo que os autores recomendam uma combinação de ambos^[155].

Tal como o CA19-9, indivíduos Lewis negativos podem apresentar resultados negativos para este marcador, levando a diagnósticos falsamente negativos^[154].

CA242

Tal como o CA50, o anticorpo contra o CA242 foi primeiramente isolado por Lindholm *et al.* em 1985, tendo sido obtido por imunização de ratos com a linha celular COLO 205 e uma linha celular de mieloma de rato^[17].

A estrutura deste antigénio não se encontra bem definida, mas aparenta ser uma glicoproteína sialilada relacionada com cadeias precursoras do tipo I (Fig.12)^[157]. Estudos de marcação de antigénios vieram mostrar que antigénios como o CA19-9, CA50, CA242, CA241, CA239, entre outros, estão localizados numa mesma molécula glicoproteica, constituindo apenas diferentes epítomos desta^[158]. Esta molécula é designada por CanAg (Cancer Antigen), podendo estas proteínas ser divididas em 2 grupos: H-CanAg (Heavy Cancer antigen) e L-CanAg (Light cancer antigen)^[160]. A H-CanAg é uma glicoproteína de membrana ao contrário de L-CanAg, que se encontra no soro. Esta apresenta níveis baixos em secreções antigénicas, mas elevado em extratos celulares, ao passo que a L-CanAg é mais secretada pelas células, aparecendo em extratos antigénicos^[160].

Estas proteínas são altamente glicosiladas, carregando cadeias glucídicas de 13 a 18 oses ricas em fucose e ácido siálico. A abundância de fucose e ácido siálico nestas estruturas levanta a hipótese de que uma elevada atividade de enzimas fucosil- e sialil-trasferases esteja relacionada com fenómenos propiciadores de tumores^[160].

H-CanAg é um produto do gene MUC-1, já que reage com o antissoro contra o C-terminal do produto MUC-1^[160]. Apresenta características típicas de mucinas como solubilidade em ácido perclórico, elevado conteúdo glucídico e uma composição de aminoácidos rica em serina, treonina e prolina^[160].

Ambas as proteínas expressam os epítomos CA50, CA19-9, CA 242, CA 203, entre outros, mas só a H-CanAg carrega o epítomo sialilado Lewis X^[160].

A expressão deste marcador em indivíduos saudáveis é maior na extremidade apical das células ductais. Por outro lado, células acinares e ilhéus de Langerhans apresentam-se consistentemente negativos^[161].

No mesmo estudo verificou-se que 91% de indivíduos com pancreatite apresentava resultado positivo para CA242, sendo que nestes casos este antigénio é expresso não só na extremidade apical de células ductais mas também intracelularmente^[161]. A intensidade da coloração era também muito mais forte do que em indivíduos saudáveis.

No caso de ser pancreatite aguda, todo o pâncreas ficava corado, incluindo células centro-acinares, algo que não acontecia na pancreatite crónica^[161].

O padrão de expressão é semelhante ao do CA19-9, mas difere muito do padrão de expressão do CA50, que cora uniformemente nos ductos pequenos e células centro-acinares num pâncreas normal^[161]. Carcinomas coram mais intensamente do que o tecido circundante para CA242 e CA19-9, ao passo que o oposto se verifica para o CA50. Em casos de pancreatite aguda, o CA50 cora mais uniformemente as células centro-acinares do que o CA242^[161].

Tem uma sensibilidade de 75%, podendo variar de 57 a 82% de acordo com outras fontes, e uma especificidade de 85,5%, podendo, também, oscilar entre 76 a 93%^[150]. Para uma especificidade de 90%, o CA242 tem uma sensibilidade de 66,2%^[157]. Contudo, quando usado em conjunto com o CA50 ou o CA19-9, para uma especificidade de 90%, a sensibilidade aumenta para 75% e 72,1% respetivamente^[157].

A sua menor sensibilidade e especificidade quando comparados com a do CA19-9 e do CA50, aliado ao facto de sofrer interferências na presença de situações de colestase e icterícia, fazem com que este marcador não seja utilizado na rotina, tanto clínica como experimentalmente, para o diagnóstico de cancro pancreático^[150].

O CA242 é um constituinte normal do pâncreas humano, mas é expresso em baixas quantidades^[161]. O seu limite de *cut-off* normalmente utilizado para este marcador é de 20 U/mL^[159]. Em casos de cancro pancreático os seus níveis oscilam entre os 0,2 e 199,4 U/mL, com um valor mediano de 184 U/mL^[159]. Outras doenças apresentam, em média, valores inferiores aos do cancro pancreático^[158], sendo que apenas 54% dos indivíduos com pancreatite aguda tinham valores acima de 111 U/mL, o valor mais elevado encontrado em indivíduos com doenças benignas^[158]. Em doenças não cancerosas, os níveis de CA242 estão acima de 20 U/mL em, apenas, 9% dos casos^[159]. O doseamento deste marcador permite, também, diferenciar pancreatite crónica de cancro pancreático já que só 3 em 20 indivíduos com pancreatite crónica tinham os valores de CA242 aumentados, sendo o nível máximo registado de 46 U/mL^[159].

Apesar dos seus valores aumentarem com o tamanho da massa tumoral, não se observou uma diferença estatisticamente significativa para este marcador, o que significa que o CA242 não é particularmente útil para o estadiamento do tumor^[157]. Permite, contudo, avaliar o estado de metastização^[157]. Tumores bem diferenciados têm níveis mais elevados de CA242 do que cancros indiferenciados ou anaplásicos^[159]. Pensa-se que os níveis aumentam menos em tumores pouco diferenciados porque a transformação de um epitélio normal para um epitélio pouco diferenciado, característico de tumores anaplásicos, leva a uma perda da distribuição polar de antígenos associados à membrana o que se reflete numa perda desta distribuição antigénica^[161].

Apesar das diferenças observadas, estas não são estatisticamente significativas de modo a utilizar a coloração de CA242 no diagnóstico e diferenciação de doenças benignas e malignas^[161].

Antigénio Carcinoembrionário (CEA)

Foi primeiramente detetado em células cancerígenas colorretais por Freedman e Gold, tendo sido, posteriormente, detetado noutras células como as do estômago, língua, esófago, cérvix e próstata^[162]. A sua expressão é controlada por oncogenes fetais, pelo

que é expectável a sua presença em maiores quantidades durante o desenvolvimento embrionário e consequente diminuição após o nascimento^[162].

O CEA é uma glicoproteína de 180 kDa com diversos epítomos antigénicos, tendo sido já identificados pelo menos 6 destes^[150]. Pertence à família de moléculas de adesão celular (CAMs), pelo que está associado a várias funções como a adesão, proliferação e migração de células. Pensa-se, também, que inibe a apoptose associando-se, portanto, a desregulação da sua expressão à patogénese tumoral^[162].

Foi, durante mais do que uma década, o único marcador para este cancro, mas ao longo do tempo tem vindo a ser substituído por outros marcadores com maior sensibilidade como o CA19-9^[150]. É uma proteína derivada do epitélio endodermal^[162] que, por norma, se encontra no fígado, pâncreas e trato gastro-intestinal do feto, diminuindo gradualmente após o nascimento, podendo aparecer em pequenas quantidades em adolescentes^[150].

É um biomarcador sérico não específico que se encontra elevado em várias patologias como o cancro colorretal, cancro da mama, da medula tiroideia, do ovário, entre outros^[162]. Devido à sua baixa especificidade, o seu uso isolado não é recomendado para o *screening* ou diagnóstico de doenças tumorais. É mais frequentemente utilizado para a monitorização da progressão da doença e avaliação da eficácia terapêutica^[162].

Em adultos saudáveis e não fumadores, os níveis de CEA são considerados normais até valores $\leq 3,0 \mu\text{g/L}$ ^[162]. Fumar aumenta os níveis séricos de CEA, pelo que em fumadores podem atingir valores até $5 \mu\text{g/L}$ ^[162], sendo este nível utilizado como valor de *cut-off*^[163]. Teores entre os 5 e os $10 \mu\text{g/L}$ sugerem uma doença localizada e com baixa probabilidade de recorrência, refletindo-se num melhor prognóstico^[162]. Níveis superiores a $20 \mu\text{g/L}$ estão associados a um pior prognóstico, sendo frequentemente indício de metastização^[162].

Devido à sua baixa sensibilidade, apresenta uma elevada taxa de falsos negativos, motivo pelo qual se recomendam medições seriadas bem como o uso de outros métodos de diagnóstico de neoplasias, nomeadamente imagiológicos^[162]. Enquanto biomarcador, tem um maior valor de prognóstico após remoção cirúrgica da massa tumoral e quimioterapia. Os valores tendem a normalizar ao fim de 6 semanas após a operação, pelo que teores consistentemente elevados podem indicar a permanência de parte da massa tumoral ou uma recorrência^[162].

O CEA encontra-se aumentado em 30 a 60% dos doentes com cancro pancreático^[163]. Quando usado sozinho, o CEA tem uma sensibilidade de 43%^[163] (podendo variar de 25 a 45%^[150]) e uma especificidade de 82%^[163] (podendo variar de 75 a 91%, dependendo das referências bibliográficas utilizadas^[150]). O uso de painéis que incluem o CEA garante uma maior sensibilidade e especificidade quando comparado ao uso de CEA ou CA 19-9 isolados^[163].

DuPAN-2

Duke Pancreatic Monoclonal Antigen type 2 (DuPAN-2) é um anticorpo monoclonal contra células de adenocarcinoma pancreático humano da linha celular HPAF^[150]. Este anticorpo deteta um antígeno diferente do CA19-9, sendo por isso particularmente útil em indivíduos Lewis negativos (15% da população), onde a ausência de antígeno CA19-9 resulta em resultados falsos negativos^[150].

Este anticorpo reconhece um antígeno presente em algumas células fetais do pâncreas e em células epiteliais do ducto de um pâncreas normal adulto, bem como em células cancerígenas pancreáticas e não pancreáticas^[150]. Apresenta, também, distribuição no intestino delgado e glândulas salivares do tecido fetal^[150]. Por outro lado, estes anticorpos não detetam antígenos associados ao antígeno leucocitário humano (HLA) já que nenhum reconheceu linhas celulares linfóides ou mielóides^[165]. Falham, também, na reação com células de cólon, intestino delgado, pulmão, rim, mama, próstata, glândula salivar, bexiga, fígado, nódulo linfático, gordura, vasos sanguíneos, músculo liso e endométrio de um indivíduo adulto^[165].

A sua purificação por métodos cromatográficos permitiu a eluição de 3 frações, sendo que a segunda fração, que apresenta mais de 80% da atividade, é a mais estudada^[166]. 60% desta proteína é constituída por aminoácidos serina, treonina, prolina, glicina e alanina, com uma dominância de resíduos de galactose e N-acetilglucosamina (GlcNAc)^[166]. A proteína é composta por uma repetição *tandem* dos mesmos 20 aminoácidos em aproximadamente 2/3 da sequência proteica^[164]. Ensaio com pepsinas, pronases e papaína levaram à inativação deste antígeno, o que indicia a presença, dispersa na sua estrutura, de pequenas regiões não glicosiladas, tornando-o suscetível à ação de proteases de espectro alargado. É, também, suscetível à neuraminidase, o que sugere a presença de resíduos de ácido siálico, relacionados com a sua função^[166].

A estrutura proposta para este antígeno é de um glicopéptido sialilado, similar às formas de Lewis C sialilados. A sua constituição de aminoácidos sugerem que o DuPAN-2 é uma glicoproteína tipo-mucina, algo que também é apoiado pela presença de ligações O-glicosídicas^[166].

Estudos têm sido feitos em indivíduos Lewis negativos com o intuito de encontrar um marcador tumoral que possa ser utilizado no diagnóstico do cancro pancreático. No estudo realizado por Kawa *et al*^[164], os autores estudaram o CA50, sialil-SSEA-1, DuPAN-2 e SPAN-1. Observaram que os valores de CA19-9, CA50 e SPAN-1 eram menores em pessoas com fenótipo Lewis negativo e que não havia uma diferença significativa entre os níveis de sialil-SSEA-1 destes indivíduos e o grupo controlo. Contudo, foi verificado que os níveis de DuPAN-2 eram significativamente superiores no grupo Lewis negativo quando comparado com o grupo controlo^[164]. Dos indivíduos testados, 13 eram Lewis negativos, sendo 7 destes, positivos para DuPAN-2, 5 para SPAN-1, 4 para sialil-SSEA-1 e 3 para CA50, sugerindo que DuPAN-2 é o melhor marcador alternativo ao CA19-9 nestes casos^[164].

A sensibilidade deste marcador, referido no artigo acima mencionado, era de 63-64%, sendo que outras fontes observam valores que oscilam de 48 a 72%^[164]. O valor acima do qual se considera um resultado positivo, para este marcador, foi definido como 150 U/mL^[164]. Em soro de indivíduos Lewis negativos com cancro pancreático, os valores oscilavam entre 8 U/mL e 2060 U/mL, sendo que, apenas, 5 dos 13 indivíduos testados tinham valores abaixo do *cut-off* (62% tinha valores acima desse limiar)^[164]. Em indivíduos saudáveis, o valor deste varia de 8,9 a 25,5 U/mL^[164].

Este ensaio é recomendado em conjunto com o CA19-9, já que fornece informação complementar importante em casos de indivíduos Lewis negativos que não expressam o

CA19-9. O uso combinado destes antígenos aumenta a sensibilidade do DuPAN-2 de 63-64% para 86% (figura 4)^[164].

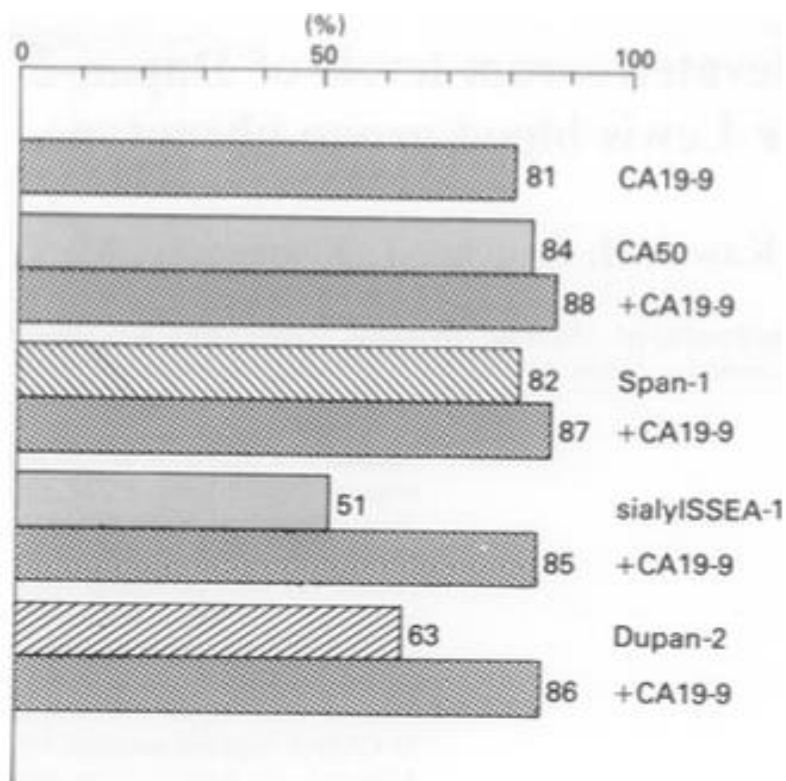


Figura 14 - Taxa de positivos para cada marcador isolado (CA50, SPAN-1, sialylSSEA-1 ou DuPAN-2) ou combinado com CA19-9; retirado de "Elevated serum levels of DUPAN-2 in pancreatic cancer patients negative for Lewis blood group phenotype" [164]

Família de genes RAS

Marcadores genéticos como este, ainda, não são usados na rotina da prática clínica, mas mostram ter potencial para tal, motivo pelo qual continuam a ser estudados^[151]. São detetados no suco pancreático e sangue, mas a baixa sensibilidade e especificidade do método usado para a sua deteção, limita muito o seu uso no diagnóstico da doença pancreática maligna ^[148].

A família de genes *RAS* representa o oncogene mais comum a mediar vias de transdução de sinal que envolvem inflamação e proliferação celulares^[151].

Estes genes codificam para uma proteína monomérica G que se liga a guanosina trifosfato (GTP), forma ativa, ou a guanosina difosfato (GDP), forma inativa^[167]. A sua expressão é ubiqüitária, apesar dos níveis de expressão variarem em função do tecido. Modera respostas celulares a fatores mitóticos e de diferenciação, bem como a estímulos externos como a radiação UV ou *stress* osmótico. Estes estímulos ativam várias vias de transdução de sinal que influenciam fenómenos como a apoptose e a diferenciação celular^[167].

Desta família fazem parte cerca de 150 genes distintos, sendo que os 3 mais estudados são Harvey-RAS (*H-RAS*), Kristen-RAS (*K-RAS*) e Neuroblastoma-RAS (*N-RAS*), com 3 kb, 35 kb e 7 kb, respetivamente^[167]. O *H-RAS* é expresso em maior quantidade na pele

e tecido esquelético, o *K-RAS* no cólon e timo e o *N-RAS* no tecido germinal masculino e timo^[168].

Proteínas desta família são caracterizadas pela presença de domínios G catalíticos, os GTP P-loops^[168]. Para além deste há ainda 2 outros domínios: um com o N-terminal, idêntico nas 3 formas de *RAS*, e o outro que apresenta mais variações na sequência nucleotídica das 3 variantes^[168]. Estes dois domínios, bem como o domínio catalítico encontram-se ilustrados na figura abaixo.

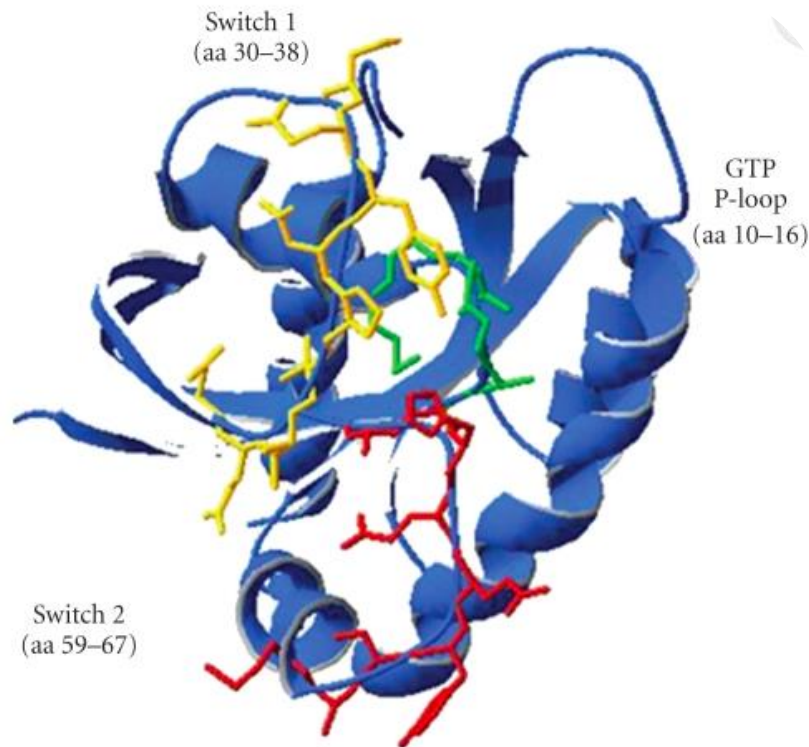


Figura 15 - Modelo da proteína *K-RAS*, ilustrando os seus principais domínios: switch 1 e 2 e o GTP p-loop; os resíduos de aminoácidos destacados a verde, amarelo e vermelho representam o domínio G catalítico; retirado do artigo "Clinical relevance of *KRAS* in human cancers" [168]

Após a transcrição e tradução dos genes desta família, as proteínas resultantes sofrem modificações pós-traducionais que levam ao aumento da sua hidrofobicidade, permitindo a sua inserção na membrana celular, essencial para a sua função^[167]. A esta, como já foi referido, liga-se GTP, resultando em alterações conformacionais que levam à consequente ativação da proteína, permitindo a sua interação com inúmeros transdutores de sinal^[168]. Apesar desta ativação ser transiente, é suficiente para estimular vias de transdução de sinal, levando a diferentes respostas celulares^[167].

Os principais efetores destas vias são a cinase de fibrosarcoma rapidamente acelerado (RAF), fator de permuta de nucleótidos de proteínas relacionadas com *RAS* (RAL-GEF) e cinase fosfatidilinositol 3 (PI3-K), cujas vias de sinalização podem ser visualizadas na figura 15. A ativação de RAF leva a mudanças conformacionais que possibilitam a sua inserção na membrana. Isto por sua vez permite a ativação de uma série de cinases em cascata que têm como consequência a ativação de fatores de transcrição^[167]. Culmina na expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas na proliferação e/ou diferenciação celular^[167]. RAL-GEFs ativam pequenas GTPases, que por sua vez ativam outras proteínas como Cdc42, RAC ou Rho que têm um papel importante na remodelação do citoesqueleto e ativam cinases que regulam a atividade de vários fatores de

transcrição^[167]. Por último, PI3-K liga-se a cinases do citoesqueleto e modula a sua atividade e a sua translocação para a membrana^[167].

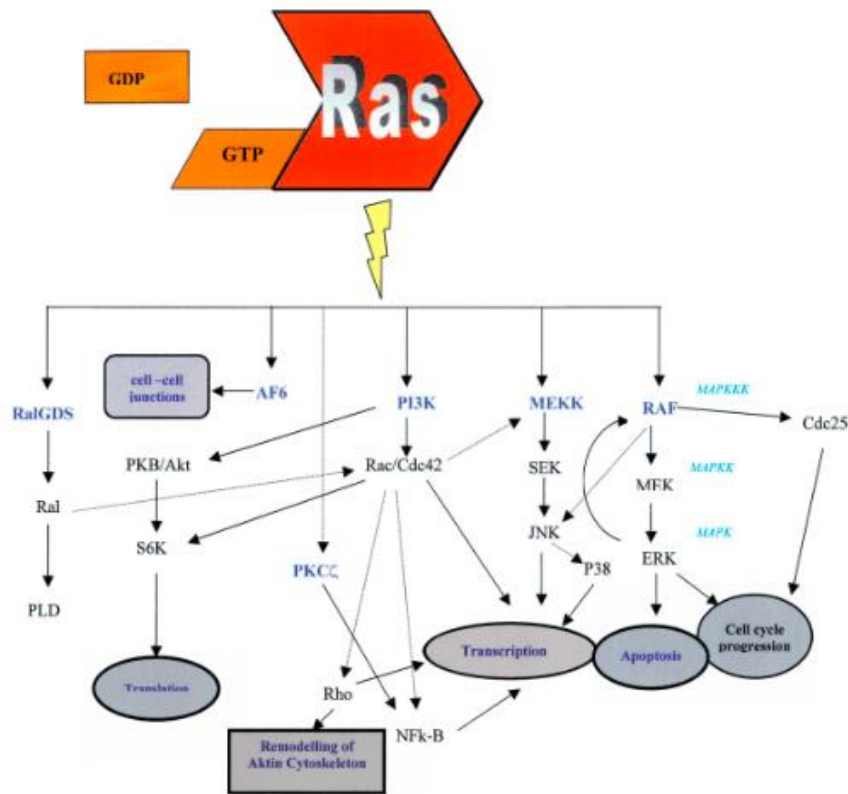


Figura 16 - Esquema dos efetores de RAS e as vias de transdução que este desencadeia, resultando em alterações na tradução, transcrição, apoptose, progressão do ciclo celular ou remodelação do citoesqueleto; retirado de "Ras Family Genes: An Interesting Link Between Cell Cycle and Cancer" [167]

Mutações nestes genes dão origem a proteínas oncogénicas, continuamente ativas, que causam desregulação do ciclo celular. Estas mutações são frequentemente encontradas em diferentes tumores, sugerindo o seu envolvimento no desenvolvimento desta doença^[24]. Mutações no gene *K-RAS* surgem em câncros colorretais, do pâncreas e dos pulmões, *H-RAS* no câncro da bexiga, rim e tireoide e *N-RAS* em carcinomas hepatocelulares, melanomas e neoplasias do sangue^[167].

O papel dos genes *RAS* na regulação do crescimento e diferenciação celular é evidenciado pelo facto de haver, em 70% dos casos de neoplasias, mutações nestes genes em diferentes localizações, especialmente nos codões 12 e 13^[167]. Mutações no gene *K-RAS* estão presentes em 85 a 90% dos carcinomas ductais do pâncreas e aparecem relativamente cedo na carcinogénese^[167]. Podem, também, aparecer noutros tipos de tumores como no câncro colorretal (40-50%) e no do pulmão (30-50%)^[167].

A forma mutante está permanentemente ativa e está constantemente a promover a transdução de sinal, envolvida na metastização e angiogénese ao estimular a produção de fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF)^[167]. O *RAS* mutado promove um crescimento celular independente de fatores externos de sinalização^[166]. A maioria destas mutações ocorrem nos codões 12, 13 e 61^[167, 168]. Outras mutações menos comuns incluem a dos codões 63, 117, 119 e 146, todos estes perto do local de ligação da GTP, o que resulta na diminuição da capacidade de hidrólise da GTP e consequente incapacidade de inativação da proteína^[168].

Estudos moleculares apontam para a ocorrência de mutações nestes genes numa fase precoce do processo de carcinogénese, uma vez que esta está presente em 25% dos casos de fase I de PanIN (neoplasia intraepitelial pancreática) [169]. Isto parece sugerir que mutações neste gene são um evento iniciador que despoleta o desenvolvimento deste cancro.

A identificação destas mutações apresenta, contudo, diversas limitações. Primeiramente, o gene mutado pode estar em minoria quando comparado com outras mutações de células tumorais ou de células normais presentes na amostra, o que dificulta o seu isolamento e deteção [168]. Deve, também, realçar-se que a maioria dos *kits* para a deteção de mutações nos genes *K-RAS* detetam apenas as mutações nos codões 12 e/ou 13 que, apesar de serem as mais comuns, não correspondem à totalidade de mutações que podem ocorrer nestes genes [168]. Outro problema prende-se com a falta de padronização do *kit* de ensaio bem como a falta de valores definidos para o limiar de *cut-off* [170].

A combinação do estudo da presença destas mutações com o uso de ultrassonografia endoscópica contribui para aumentar a sensibilidade, o valor preditivo negativo e a exatidão do uso da citologia como método de diagnóstico de cancro pancreático e como forma de diagnóstico diferencial deste com a pancreatite crónica [170]. O valor preditivo negativo de citopatologia quando combinado com a pesquisa de mutações do gene *K-RAS* aumenta de 67% para 88%, o que pode ser particularmente útil em casos de citopatologia inconclusiva [170].

O interesse clínico do estudo destas também está relacionado com o facto de poder ser utilizada para avaliar o prognóstico e sucesso terapêutico [168]. Por exemplo, a presença destas mutações está associada a uma maior resistência à quimioterapia e a certos fármacos como Paclitaxel ou à terapia que recorre ao uso de inibidores da tirosina cinase EGFR1 [168], uma alternativa utilizada em casos de impossibilidade do uso de terapia quimioterápica. Por outro lado, outros estudos vieram demonstrar que indivíduos com mutações neste gene beneficiariam de terapias com Bevacizumab, um anticorpo monoclonal anti-VEGF [168]. A presença destas mutações em casos de cancro localizado e passível de ser removido cirurgicamente, apresenta uma relação negativa com a probabilidade de sobrevivência do indivíduo [170]. Este estudo permitiu, também, evidenciar que indivíduos com a mutação G12D (mutação no codão 12 leva à substituição de glicina por ácido aspártico) tinham uma taxa de sobrevivência menor do que indivíduos com outras mutações (média 6 meses) [170].

Os genes da família *K-RAS* podem também, ser futuros alvos terapêuticos. Por exemplo, está a ser estudado o uso de oligonucleóticos *anti-sense* para a inativação de produtos deste gene mutante, de forma a bloquear o desenvolvimento desta cascata [168]. O problema do desenvolvimento de terapias envolvendo esta família de genes prende-se com a seletividade dos alvos terapêuticos [169], já que a inibição de proteínas destas vias por norma afetam também as mesmas proteínas em células não tumorais, levando à paragem do ciclo celular e apoptose destas.

Micro-RNAs

Micro-RNAs (miR ou miRNA) são pequenos RNAs não codificantes que regulam negativamente a expressão de genes a nível pós-transcricional [148]. Podem contribuir para a formação e progressão de neoplasias ao regularem a expressão de proto-oncogenes e

genes supressores de tumor^[148]. O interesse do estudo destas moléculas está relacionado com o seu potencial terapêutico e com a possibilidade de criação de algoritmos ou painéis de miRNAs que permitem diferenciar adenocarcinomas de situações benignas ou de tecido normal^[148].

Em 2005, estimou-se que há mais de 500 miRNAs que coletivamente regulam a expressão de aproximadamente 30% de todos os genes humanos, incluindo genes da família *RAS*^[168]. A regulação da expressão de genes por miRNAs ocorre devido à hibridação imperfeita entre esta pequena molécula e uma sequência complementar localizada na extremidade 3'UTR (untranslated region) do RNA mensageiro (mRNA) alvo^[168]. Esta interação afeta a estabilidade deste mRNA e previne a sua tradução, ao bloquear o local de ligação ao ribossoma^[168]. Assim, regulam processos essenciais como a divisão celular, proliferação, diferenciação, apoptose, entre outros^[171].

Os miRNAs podem desempenhar um papel importante na patogénese deste cancro ao influenciar mudanças genéticas como mutações no *K-RAS*, *Tp53* ou *SMAD* (gene que codifica para proteínas envolvidas na sinalização de recetores TGF- β , fator de crescimento transformante β) e ao apoiar o desenvolvimento de um microambiente tumoral^[171]. Por estes motivos, têm vindo a ser estudados com interesse do ponto de vista do diagnóstico clínico.

Cerca de 50% dos miRNA estão localizados em zonas consideradas “frágeis”, ou seja, locais sujeitos a frequentes rearranjos cromossómicos^[171]. Mutações nestas regiões estão frequentemente ligadas ao desenvolvimento de neoplasias^[171]. Desta forma, a expressão de miRNAs está associada a cancro, por ex., no cancro pancreático podem ocorrer alterações dos níveis de miR-155, miR-21, miR-221, miR-222, miR-36a, miR301^[171].

Um aumento de miRNA-221 estimula o crescimento e migração celulares^[171]. Outros, como miR-16, miR-21, miR-155, miR-181a, miR-181b, miR-196a e miR-210 também apresentam os seus níveis de expressão aumentados em amostras de doentes com cancro pancreático quando comparado com um grupo controlo (grupo de indivíduos sem cancro pancreático)^[171]. Do mesmo modo o MiR-155 é um bom marcador para a neoplasia pancreática precoce e a sua função oncogénica já foi associada a processos pró-apoptóticos da proteína TP53INP1, que aumenta a malignidade das células cancerígenas *in vivo*^[171]. O miR-21 e o miR-221 funcionam como oncogenes, estando a sua sobre expressão associada a muitos cancros^[171]. O MiR-21 atua em 2 alvos PTEN (*phosphate and tensin homolog*) e PDCD4 (*programmed cell death protein 4*), que têm um efeito supressor^[171]. O aumento da expressão deste miRNA resulta na redução da atividade destas proteínas, tendo como consequências a inibição da apoptose e a aquisição de propriedades invasivas^[171].

Smolarz et al sugerem que o uso de miR-21, miR-155, miR-196a e miR-210 permite, com maior sensibilidade e especificidade, a distinção entre indivíduos com adenocarcinoma pancreático e sujeitos saudáveis^[171].

Discussão

O CA19-9, como já foi referido anteriormente, é o biomarcador disponível mais amplamente aceite para o *screening*, diagnóstico, estadiamento e prognóstico de cancro pancreático^[151]. Contudo, este não é o marcador ideal, tendo diversas limitações, sendo a maior das quais a ocorrência de falsos negativos em indivíduos Lewis negativos^[146]. Pode, também, aparecer aumentado noutras doenças como o carcinoma do trato biliar, cancro do estômago (41%), cancro colorretal (34%), cancro do esófago (22%) ou outras doenças tais como a icterícia obstrutiva, pancreatite crónica, colangite e cirrose hepática^[146]. O facto de aparecer elevado noutros carcinomas põe em causa o seu valor preditivo positivo^[148].

Na grande maioria dos estudos realizados, o soro de indivíduos com cancro pancreático foi comparado ao soro de um grupo controlo, tendo-se estabelecido o limiar de *cut-off* de 37 kU/L com a sensibilidade de 81% e uma especificidade de 90%^[146]. O aumento deste limite aumentava em muito a especificidade, mas diminuía a sensibilidade. Todavia, enquanto marcador de *screening*, o CA19-9 tem pouca utilidade já que a percentagem de pessoas com este cancro na população em geral é muito baixa^[146]. De facto, um estudo com 70940 indivíduos em que foi testado os níveis de CA19-9 resultou em apenas 4 casos de cancro pancreático, mas revelou 1059 casos de falsos positivos, pelo que o seu valor preditivo positivo é de apenas 0,9%^[146]. Assim, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) alerta que o CA19-9 não deve ser usado para o *screening* de populações assintomáticas^[146]. O seu uso é recomendado, contudo, para avaliar a situação de indivíduos com suspeita de apresentarem esta patologia^[148].

Deve realçar-se que o valor de *cut-off* foi definido a partir do estudo de uma população de dadores de sangue, o que é relevante para o *screening* da população em geral. Contudo, para os casos de pacientes com patologias consideradas benignas (em oposição às doenças de carácter maligno), o grupo WGTMC (*Working Group on Tumor Marker Criteria*) recomenda o uso de uma população de indivíduos que apresente esse tipo de patologias de forma a possibilitar um melhor diagnóstico diferencial^[156].

Em indivíduos assintomáticos, a concentração sérica de CA19-9 é de 9.42-9.95U/mL. Níveis acima de 37U/mL são os mais apropriados para discriminar entre cancro do pâncreas e outras doenças sem carácter de malignidade^[146]. Todavia, e no que se refere ao prognóstico, o *cut-off* ótimo ainda não foi bem determinado, mas está claramente dependente do *timing* da colheita^[148]. Por exemplo, valores acima de 1000 kU/L em pré-operatório estão associados a um pior prognóstico. Contudo, após cirurgia, valores inferiores a 200 kU/L foram associados a um bom prognóstico^[148]. Estes limites devem, contudo, ser melhor estudados para facilitar a tomada de decisões clínicas.

Scarà *et al* realçam também que, apesar dos testes para a deteção de CA19-9 estarem disponíveis há cerca de 30 anos, a sua determinação continua a ter limitações nomeadamente no que se refere à falta de um padrão internacional o que resulta em diferenças nos resultados obtidos^[146]. Quando se compararam dois *kits* de doseamento disponíveis comercialmente, verificou-se que os ensaios eram comparáveis mas não eram equivalentes^[146], o que complica a interpretação clínica, particularmente em casos em que ensaios diferentes eram usados para fazer determinações seriadas do mesmo marcador. Por este motivo, é sempre recomendável a realização de doseamentos seriados com o mesmo método^[146]. Caso se mude de ensaio, os valores em soros antigos devem ser determinados com o novo método de forma a serem comparáveis.

Como já foi abordado no presente trabalho, o uso combinado de marcadores tem mostrado resultados mais promissores do que o uso isolado destes. No estudo efetuado por Röthlin *et al* ^[157], compara-se o valor preditivo positivo e a sensibilidade do CA19-9, CA50 e CA242 isoladamente e em conjunto com o objetivo de distinguir entre cancro pancreático e outras patologias e entre este carcinoma e pancreatite crónica em específico, já que a distinção entre estes dois é um obstáculo ao diagnóstico do cancro pancreático. Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 7.

Tabela 7 - Sensibilidade e valor preditivo positivo de CA242, CA19-9 e CA50, bem como das combinações entre estes marcadores, para uma especificidade de 90%; retirado de "CA 242 is a new tumor marker for pancreatic cancer" [157]

Marker	PC vs. others		PC vs. CP	
	Sensitivity	Predictive value	Sensitivity	Predictive value
CA 242	66.2%	63.4%	64.7%	93.6%
CA 19.9	70.6%	64.9%	79.4%	94.7%
CA 50	70.6%	64.9%	77.9%	94.6%
CA 242 and/or CA 50	75.0%	66.2%	79.4%	94.7%
CA 242 and/or CA 19.9	72.1%	65.3%	79.4%	94.7%

CP: chronic pancreatitis; PC: pancreatic cancer.

Para uma especificidade de 90%, o CA19-9 tem uma sensibilidade de 70,6% e um valor preditivo positivo de 64,9%, semelhante aos valores de CA50 e superior aos do CA242. Todavia, observa-se que, quando usado em conjunto com o CA242, a sensibilidade e o valor preditivo positivo aumentam para 72,1% e 65,3% respetivamente. O uso conjunto do CA242 e CA50 apresenta, ainda, valores mais elevados de 75,0% e 66,2% respetivamente. E quando se comparam os valores de sensibilidade e valor preditivo positivo para a distinção de cancro pancreático e pancreatite crónica, estes valores são ainda superiores: 79,4 e 94,7% respetivamente^[157].

A mesma tendência de melhor sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos observa-se com outros marcadores. Por exemplo, a determinação isolada do CEA apresenta uma sensibilidade de 43% e uma especificidade de 82%, mas quando usado num painel, estes valores aumentam, passando a ter uma sensibilidade de 45% e uma especificidade de 89%^[163]. Quando combinado com CA19-9, o seu valor preditivo positivo aumenta para 91,4%.

Da mesma forma, o marcador DuPAN-2 complementa o CA19-9 ao ser detetado mesmo em indivíduos Lewis negativos^[164]. A especificidade do CA19-9 e do DuPAN-2, isolados, é de 81% e 63% respetivamente, mas quando em conjunto aumenta para 86%. Como foi referido atrás, a especificidade de qualquer marcador testado aumenta quando utilizado em conjunto com o CA19-9^[164](figura 13).

Devido às limitações que cada marcador tumoral apresenta, o paradigma tem evoluído não no sentido da procura de um marcador "perfeito", mas na criação de painéis ou de algoritmos de marcadores cujas análises se complementam entre si de forma a melhorar a sensibilidade e/ou especificidade do diagnóstico quando comparado ao uso dos marcadores isoladamente.

Num estudo realizado por Hayakawa *et al.*^[172], os autores criaram um modelo computacional multivariado CAMPAS-PX2 (*computer-aided multivariate and pattern analysis system for pancreatic examination 2*) que consistia na utilização de 7 marcadores séricos: CA19-9, tripsina, amílase, ferro, rácio albumina/globulinas e lipase. Foram

escolhidos marcadores relativamente independentes uns dos outros para evitar redundâncias nos ensaios e para excluir um *bias* na seleção de pessoas. Usando os valores de cada marcador e aplicando uma equação por eles desenvolvida, foi possível calcular a probabilidade de cancro pancreático com um rácio de positividade, em caso de doença, de 89%, um aumento quando comparado com o rácio de 78% para o CA19-9 obtida no mesmo estudo. O mesmo aconteceu com todos os marcadores utilizados (tabela 8) [172].

Tabela 8 – Percentagem de positividade na doença, negatividade em indivíduos saudáveis, exatidão, previsibilidade positiva e área abaixo da curva ROC de vários marcadores do painel CAMPAS-PX2 para o diagnóstico de cancro pancreático; retirado de “A Prospective Multicenter Trial Diagnostic Validity of Multivariate Analysis and Individual Serum Marker in Differential Diagnosis of Pancreatic Cancer from Benign Pancreatic Diseases” [172]

Marker	Cutoff value	Positive in disease	Negative in health	Accuracy	Positive predictability	Area under ROC curve
CAMPAS-PX2	10 %	89%	87%	88%	50% (24/48)	91%
CA19-9	37 U/mL	78	82	80	41 (21/51)	84
Span-1	30 U/mL	78	85	81	53 (21/40)	88
TPA	110 U/mL	56	95	75	60 (15/25)	84
CA125	35 U/mL	44	98	71	80 (12/15)	79
DUPAN-2	150 U/mL	70	95	83	68 (19/28)	83
IAP	500 µg/mL	52	85	68	33 (14/43)	72
Elastase-1	400 ng/mL	41	86	63	29 (11/38)	69
PSTI	14.7 ng/mL	48	81	65	27 (13/49)	68
Trypsin	460 ng/mL	44	64	54	15 (12/80)	67
Lipase	48 IU/L	67	55	61	17 (18/104)	53
Amylase	200 IU/L	22	73	48	11 (6/57)	65
LDH	460 IU/L	11	96	53	27 (3/11)	52
ALP	260 IU/L	67	87	77	42 (18/43)	80
Ferritin	240 ng/mL	56	93	74	54 (15/28)	84
Total protein	6.8 g/dL	41	86	63	29 (11/38)	70
A/G ratio	1.3	56	44	50	12 (15/122)	52
Fe	54 µg/dL	37	85	61	26 (10/38)	64

Mellby *et al.* [173] recorreram a uma análise multi-paramétrica para complementar (ajudar) o diagnóstico aumentando os valores de sensibilidade (95%) e especificidade (94%). Neste estudo, múltiplas amostras de soro foram testadas em ensaios de *microarrays* com 349 fragmentos recombinantes contra 156 antigénios para avaliar se o tumor deixava uma “assinatura” de biomarcadores. Recorrendo a um algoritmo BE (*Backwards Elimination*), criou-se um painel com 29 marcadores, entre os quais se incluem proteínas como a apolipoproteína A1, cinase dependente de cálcio/calmodulina tipo IV, complemento C3, C4 e C5, cinase dependente de ciclina 2, molécula de adesão intracelular 1, interferão gama, interleucinas 13, 4 e 6, Lewis X, linfotóxina- α , guanilato cinase associada à membrana, sialil-Lewis X, fator de crescimento endotelial vascular.

Esta abordagem apresenta, contudo, algumas limitações: em primeiro lugar, foi desenvolvido com casos modelo, pelo que os autores não têm forma de saber qual o seu desempenho noutros cenários de vigilância ou terapêutica até se realizarem mais estudos [173]. Como todos estes dados foram colhidos a partir do soro de doentes pré-cirurgia, também não têm forma de prever como seria o desempenho do modelo após a remoção do tumor. Outra desvantagem prende-se com os custos económicos [174]. Apesar de ser um painel muito completo, com elevados valores de sensibilidade e especificidade, a implementação em larga escala da análise dos 29 parâmetros, alguns dos quais requerem ensaios muito específicos, não é viável.

Noutro ensaio, o modelo IVDMA (*in vitro diagnostic multivariate index assay*) [174] procura combinar múltiplos biomarcadores e análises algorítmicas para auxiliar no diagnóstico, nomeadamente: apolipoproteína-A1, fragmento 21.1 da citoqueratina 19, CEA, apolipoproteína A2 (ApoA2), transtirretina (TTR), beta-2-microglobulina (B2M) e D-dímeros. Todos estes marcadores, exceto a B2M, apresentavam diferenças significativas entre os níveis presentes nos doentes com cancro e os níveis do grupo controlo. Posteriormente, modelos foram gerados para criar algoritmos com todas as combinações possíveis de marcadores e tendo em conta variáveis como o género e a idade. Foi identificado um painel constituído por ApoA1, CA 125, CA 19-9, CEA, ApoA2 e TTR que aumenta a exatidão do diagnóstico para 95% para PDAC [174]. O painel apresentava uma especificidade de 95 e 96% nos grupos de teste e de validação, respetivamente, e uma sensibilidade de 96 e 93% nestes, uma melhoria quando comparado com o uso de CA 19-9 ou CEA isolados, bem como com o uso do conjunto destes 2 marcadores (Tabela 9).

Tabela 9 - Desempenho diagnóstico do painel, comparado com CA 19-9, CEA e o conjunto de ambos; AUC – área abaixo da curva ROC; RF – Random Forests, método utilizado para análise de dados; retirado de "Biomarker panel for the diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma" [174]

Marker	Training and Test Set				Validation Set			
	AUC	Accuracy (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)	AUC	Accuracy (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)
	RF							
Panel	0.992	95	95	96	0.993	95	96	93
CA19-9 + CEA	0.924	90	95	76	0.960	92	94	83
CA19-9	0.921	90	95	74	0.960	90	94	78
CEA	0.666	77	95	20	0.797	78	95	25

Apesar destes e muitos outros estudos, realizados com o objetivo de elaborar painéis de biomarcadores que contribuam para o diagnóstico do cancro pancreático, ainda não se chegou a um consenso sobre qual será o mais indicado.

Conclusão

Apesar de ter sido descoberto em 1979^[151], o CA19-9 continua a ser considerado o marcador bioquímico padrão para o diagnóstico de cancro pancreático. A sua especificidade de 68-91% e sensibilidade de 70-90% ^[150] limitam o seu uso para o *screening* da população assintomática, sendo por isso mais utilizado como marcador de prognóstico e de monitorização de indivíduos diagnosticados com esta patologia por outros métodos como MRI^[149]. Acrescenta-se a isto o facto de se encontrar aumentado em outras doenças e de indivíduos Lewis negativos poderem não o expressar, o que limita o seu valor de diagnóstico^[150].

Vários estudos propuseram outros marcadores para o diagnóstico desta doença^[146, 147, 148], alguns dos quais foram estudados com maior detalhe no presente trabalho. Todavia, tal como para o CA19-9, estes marcadores apresentam diversas limitações, entre as quais a questão da baixa sensibilidade e especificidade.

Concluiu-se que o uso combinado de diversos marcadores num painel pode melhorar a sensibilidade e especificidade de diagnóstico. Assim, para além da procura de novos e melhores marcadores, estudos futuros devem, também, focar-se na construção de um painel que não só permita um diagnóstico mais exato, mas também um diagnóstico mais precoce da doença que permita o início da terapia mais cedo de forma a diminuir a fatalidade desta patologia.

Bibliografia

1. mediadetails - Comunicação Interactiva. Líder em análises Clínicas E Diagnósticos Médicos [Internet]. mediadetails - Comunicação Interactiva; [cited 2023 Jun 4]. Available from: <https://www.synlab.pt/institucional/quem-somos.aspx>
2. SIEMENS Healthineers. Albumin – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* CH; 2019
3. SIEMENS Healthineers. Alanine Aminotransferase – Rev 05; *Atellica*® *Solutions* CH; 2020
4. SIEMENS Healthineers. Alkaline Phosphatase, Concentrated – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* CH; 2019
5. SIEMENS Healthineers. Aspartate Aminotransferase – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* CH; 2020
6. SIEMENS Healthineers. Gamma-Glutamyl Transferase – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* CH; *Atellica*® *Solutions* CH; 2022
7. SIEMENS Healthineers. Direct Bilirubin 2 – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* CH; 2020
8. SIEMENS Healthineers. Total Bilirubin_2 – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* CH; 2020
9. SIEMENS Healthineers. β 2-Microglobulin – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* CH; 2019
10. SIEMENS Healthineers. Calcium – Rev 02; *Atellica*® *Solutions* CH; 2019
11. SIEMENS Healthineers. Creatinine_2 – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* CH; 2019
12. SIEMENS Healthineers. Inorganic Phosphorus – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* CH; 2020
13. SIEMENS Healthineers. Total Protein II – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* CH; 2020
14. SIEMENS Healthineers. Uric Acid – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* CH; 2019
15. SIEMENS Healthineers. Urea Nitrogen – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* CH; 2020
16. SIEMENS Healthineers. Microalbumin_2 – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* CH; 2019
17. SIEMENS Healthineers. Apolipoprotein A-1– Rev 02; *Atellica*® *Solutions* CH; 2019
18. SIEMENS Healthineers. Apolipoprotein B – Rev 02; *Atellica*® *Solutions* CH; 2019
19. SIEMENS Healthineers. Cholesterol_2 – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* CH; 2020
20. SIEMENS Healthineers. Direct HDL Cholesterol – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* CH; 2020
21. SIEMENS Healthineers. LDL Cholesterol Direct – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* CH; 2019
22. SIEMENS Healthineers. Triglycerides_2 – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* CH; 2022
23. SIEMENS Healthineers. Glucose Hexokinase_3 – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* CH; 2020
24. SIEMENS Healthineers. Fructosamine – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* CH; 2021
25. SIEMENS Healthineers. Hepatitis A IgM (OUS) – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* IM; 2020
26. BIOMÉRIEUX. VIDAS® Anti-HAV IgM (HAVM); VIDAS®; 2016
27. SIEMENS Healthineers. Hepatitis A Total (OUS) – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* IM; 2020

28. BIOMÉRIEUX. VIDAS® Anti-HAV Total (HAVT); VIDAS®; 2016
29. SIEMENS Healthineers. Anti-HBe2 (OUS) – Rev 02; *Atellica® Solutions IM*; 2022
30. SIEMENS Healthineers. Anti-Hepatitis B surface Antigen (OUS) – Rev 05; *Atellica® Solutions IM*; 2021
31. BIOMÉRIEUX. VIDAS® HBe/Anti-HBe (HBE/HBET); VIDAS®; 2016
32. SIEMENS Healthineers. Hepatitis C (OUS) – Rev 04; *Atellica® Solutions IM*; 2021
33. BIOMÉRIEUX. VIDAS® Anti-HCV (HCV); VIDAS®; 2016
34. SIEMENS Healthineers. HIV Ag/Ab Combo (OUS) – Rev 05; *Atellica® Solutions IM*; 2020
35. BIOMÉRIEUX. VIDAS® HIV DUO Ultra (HIV5); VIDAS®; 2015
36. SIEMENS Healthineers. Rubella IgM (OUS) – Rev 04; *Atellica® Solutions IM*; 2022
37. SIEMENS Healthineers. Rubella G II (OUS) – Rev 02; *Atellica® Solutions IM*; 2020
38. BIOMÉRIEUX. VIDAS® RUB IgG II (RUBG); VIDAS®; 2016
39. BIOMÉRIEUX. VIDAS® RUB IgM (RUBM); VIDAS®; 2016
40. SIEMENS Healthineers. Syphilis (OUS) – Rev 05; *Atellica® Solutions IM*; 2020
41. SIEMENS Healthineers. Toxoplasma IgM (OUS) – Rev 03; *Atellica® Solutions IM*; 2023
42. SIEMENS Healthineers. Toxoplasma IgG (OUS) – Rev 03; *Atellica® Solutions IM*; 2022
43. BIOMÉRIEUX. VIDAS® TOXO IgG II (TXG); VIDAS®; 2015
44. BIOMÉRIEUX. VIDAS® TOXO IgM (TXM); VIDAS®; 2015
45. BIOMÉRIEUX. VIDAS® TOXO IgG AVIDITY (TXGA); VIDAS®; 2017
46. SIEMENS Healthineers. CMV IgM (OUS) – Rev 01; *Atellica® Solutions IM*; 2021
47. SIEMENS Healthineers. CMV IgG (OUS) – Rev 03; *Atellica® Solutions IM*; 2019
48. BIOMÉRIEUX. VIDAS® CMV IgM (CMVM); VIDAS®; 2016
49. BIOMÉRIEUX. VIDAS® CMV IgG (CMVG); VIDAS®; 2016
50. Vidas® Torc panel [Internet]. BIOMÉRIEUX; 2022 [cited 2023 Jun 5]. Available from: <https://www.biomerieux-diagnostics.com/vidasr-torc-panel-0>
51. BIOMÉRIEUX. EBV VCA IgM (VCAM); VIDAS®; 2016
52. BIOMÉRIEUX. EBV VCA/EA IgG (VCAG); VIDAS®; 2016
53. DiaSorin. LIAISON® QuantiFERON®-TB Gold Plus: The world's leading IGRA technology, now with unique workflow efficiency; LIAISON®; 2022
54. Liaison® XL [Internet]. DiaSorin; [cited 2023 Jun 5]. Available from: <https://www.diasorin.com/en/immunodiagnostic-solutions/systems/clia-systems/liaisonr-xl>
55. Abbott. SARS-CoV-2 IgM; Architect; 2021
56. Abbott. SARS-CoV-2 IgG; Architect; 2022
57. SIEMENS Healthineers. Total IgE (OUS) – Rev 03; *Atellica® Solutions IM*; 2020
58. ThermoFisher; ImmunoCAP™ Specific IgE; Phadia™ 1000; 2011
59. SIEMENS Healthineers. Iron3 – Rev 02; *Atellica® Solutions CH*; 2022
60. SIEMENS Healthineers. Total Iron Binding Capacity – Rev 02; *Atellica® Solutions CH*; 2019
61. SIEMENS Healthineers. Transferrin – Rev 03; *Atellica® Solutions CH*; 2019

62. SIEMENS Healthineers. Ferritin (OUS) – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
63. SIEMENS Healthineers. Folate (OUS) – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* IM; 2020
64. SIEMENS Healthineers. Vitamin B12 – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
65. SIEMENS Healthineers. Amylase – Rev 02; *Atellica*® *Solutions* CH; 2019
66. SIEMENS Healthineers. Lipase – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* CH; 2019
67. SIEMENS Healthineers. Pancreatic Amylase_2 – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* CH; 2020
68. SIEMENS Healthineers. C-peptide – Rev 05; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
69. SIEMENS Healthineers. Insulin – Rev 06; *Atellica*® *Solutions* IM; 2022
70. SIEMENS Healthineers. Alpha Fetoprotein (OUS) – Rev 05; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
71. SIEMENS Healthineers. CA 125II (OUS) – Rev 05; *Atellica*® *Solutions* IM; 2022
72. SIEMENS Healthineers. CA 15-3 (OUS) – Rev 05; *Atellica*® *Solutions* IM; 2022
73. SIEMENS Healthineers. CA 19-9 (OUS) – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* IM; 2022
74. SIEMENS Healthineers. Carcinoembryonic Antigen (OUS) – Rev 05; *Atellica*® *Solutions* IM; 2022
75. SIEMENS Healthineers. Enhanced Estradiol (OUS) – Rev 06; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
76. SIEMENS Healthineers. Follicle Stimulating Hormone (OUS) – Rev 07; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
77. SIEMENS Healthineers. Prostate-Specific Antigen (OUS) – Rev 05; *Atellica*® *Solutions* IM; 2022
78. SIEMENS Healthineers. Free Prostate-Specific Antigen (OUS) – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* IM; 2022
79. SIEMENS Healthineers. Prolactin (OUS) – Rev 05; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
80. SIEMENS Healthineers. Progesterone (OUS) – Rev 05; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
81. SIEMENS Healthineers. Sexual Hormone Binding Globulin (OUS) – Rev 07; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
82. SIEMENS Healthineers. Total hCG (OUS) – Rev 05; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
83. SIEMENS Healthineers. Testosterone II (OUS) – Rev 07; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
84. SIEMENS Healthineers. Total Thyroxine (OUS) – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
85. SIEMENS Healthineers. Total Triiodothyronine (OUS) – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
86. SIEMENS Healthineers. Free Triiodothyronine (OUS) – Rev 04; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
87. SIEMENS Healthineers. Free Thyroxine (OUS) – Rev 07; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
88. SIEMENS Healthineers. Thyroid Stimulating Hormone 3-Ultra (OUS) – Rev 05; *Atellica*® *Solutions* IM; 2023
89. SIEMENS Healthineers. Intact Parathyroid Hormone (OUS) – *Atellica* IM – Rev 06; 2023
90. SIEMENS Healthineers. A-LYTE Integrated Multisensor – Rev 03; *Atellica*® *Solutions* CH; 2019
91. DiaSorin. LIAISON® Direct Renin; LIAISON®; 2013
92. DiaSorin. LIAISON® Aldosterone; LIAISON®; 2013

93. SIEMENS Healthineers. CLINITEK Novus 10 Urinalysis Cassete IFU – Rev G; CLINITEK Novus; 2022
94. Baños-Laredo ME, Núñez-Álvarez CA, Cabiedes J. Análisis de Sedimento Urinario. *Reumatología Clínica*. 2010 Jun 12;6(5):268–72. doi:10.1016/j.reuma.2010.03.002
95. Westgard JO. “Westgard rules” [Internet]. Westgard; 2019 [cited 2023 Jun 19]. Available from: <https://www.westgard.com/mltirule.htm>
96. BIOMÉRIEUX. chromID – Get a Culture Ahead [Internet]. [cited 2023 Jun 13]. Available from: https://www.biomerieux.es/sites/subsidiary_es/files/02-12_9301631-002-gb-c_catalogue_ppm.pdf
97. CDC. Gram-Stain; 2020
98. American Society for Microbiology. *Acid-Fast Stain Protocols*; 2008
99. American Society for Microbiology. *Coagulase Test Protocol*; 2010
100. BD. Hektoen Enteric Agar (HE Agar); 2013
101. Johnson JG, Kunz LJ, Barron W, Ewing WH. Biochemical differentiation of the *enterobacteriaceae* with the aid of lysine-iron-agar. *Applied Microbiology*. 1966 Mar;14(2):212–7. doi:10.1128/am.14.2.212-217.1966
102. Guentzel MN. Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Chapter 26. Galveston, Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
103. American Society for Microbiology. *Oxidase Test Protocol*; 2010
104. Vitek® MS [Internet]. [cited 2023 Jun 17]. Available from: <https://www.biomerieux.pt/produto/vitek-r-ms-0>
105. Vitek® 2: Healthcare [Internet]. [cited 2023 Jun 17]. Available from: <https://www.biomerieux-usa.com/vitek-2>
106. Michalik S. How does Vitek® 2 generate MIC values? [Internet]. 2018 [cited 2023 Jun 17]. Available from: <https://www.biomerieux-microbio.com/how-does-vitek-2-generate-mic-values/>
107. Dege J. RIDA®Quick Rotavirus / Adenovirus Combi (EN) [Internet]. *Clinical Diagnostics*; 2023 [cited 2023 Jun 17]. Available from: <https://clinical.r-biopharm.com/products/ridaquick-rotavirusadenovirus-combi-cassettes/>
108. H.pylori (Helicobacter pylori) AG AB Rapid test [Internet]. 2019 [cited 2023 Jun 17]. Available from: <http://www.biozek.com/h-pylori%EF%BC%88helicobacter-pylori%EF%BC%89ag-ab-rapid-test/>
109. Gd-Admin. CE certification carbapenem-resistant K.N.I.V.O. detection K-set (lateral flow assay) manufacturers and suppliers: Genobio [Internet]. [cited 2023 Jun 17]. Available from: <https://www.genobio-pharm.com/carbapenem-resistant-k-n-i-v-o-detection-k-set-lateral-flow-assay-product/>
110. Zhang H, Liu M, Fan W, Sun S, Fan X. The impact of mycobacterium tuberculosis complex in the environment on one health approach. *Frontiers in Public Health*. 2022 Sept 7;10. doi:10.3389/fpubh.2022.994745
111. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *American Review of Respiratory Disease*. 1990;142(3):725–35. doi:10.1164/ajrccm/142.3.725
112. Ardito F, Posteraro B, Sanguinetti M, Zanetti S, Fadda G. Evaluation of bactec mycobacteria growth indicator tube (MGIT 960) automated system for drug susceptibility testing of *mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(12):4440–4. doi:10.1128/jcm.39.12.4440-4444.2001
113. Bioline TB AG MPT64 [Internet]. Abbott; [cited 2023 Jun 17]. Available from: <https://www.globalpointofcare.abbott/en/product-details/bioline-tb-ag-mpt64-rapid.html>

114. BD. BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Kit; BACTEC™ MGIT™ 960; (2019)
115. BD. BBL MGIT™ AST SIRE System; BACTEC™ MGIT™ 960; (2019)
116. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomycin. *Clinical Microbiology Reviews*. 2016 Apr;29(2):321–47. doi:10.1128/cmr.00068-15
117. Squadrito FJ, Portal D. Nitrofurantoin - StatPearls [Internet]. NCBI Bookshelf; 2023 [cited 2023 Jun 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470526/>
118. Squadrito FJ, Portal D. Ciprofloxacin - statpearls [Internet]. NCBI bookshelf; 2023 [cited 2023 Jun 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535454/>
119. Sebia. Capillarys Protein(e) 6; Capillaris; 2019
120. Sebia. Hydragel 54 Protein(e); Hydrasys; 2020
121. Sebia. Hydragel 1, 2, 4 and 9 IF; Hydrasys; 2021
122. Ramakrishnan N, Jialal I. Bence-Jones protein - StatPearls [Internet]. NCBI bookshelf; 2023 [cited 2023 Jun 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541035/>
123. Sebia. Hydragel 1, 2, 4 and 9 Bence Jones; Hydrasys; 2021
124. Sebia. Capillarys Hemoglobin(e); Capillarys Hemoglobine; 2020
125. Karna B, Jha S, Zaabi E. Hemoglobin C disease - StatPearls [Internet]. NCBI bookshelf; 2023 [cited 2023 Jun 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559043/>
126. Vichinsky E. Hemoglobin e Syndromes. *Hematology*. 2007 Jan 1;2007(1):79–83. doi:10.1182/asheducation-2007.1.79
127. Shanthala Devi AM, Rameshkumar K, Sitalakshmi S. HB D: A not so rare hemoglobinopathy. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 2014;32(S1):294–8. doi:10.1007/s12288-013-0319-3
128. Atlas Medical; Waaler Rose – Slide hmagglutination; 2015
129. Paul Bunnell test [Internet]. 2021 [cited 2023 Jun 18]. Available from: <https://www.synnovis.co.uk/our-tests/paul-bunnell-test>
130. BIORAD. Genie™ Fast HIV 1/2 ; 2016
131. Thermofisher. TPHA Test; 2014
132. Thermofisher. VDRL Test Kit; 2013
133. Reckon Diagnostics; Widal Slide Test (“O”, “H”, “AH”, “BH” antigens and positive control); 2020
134. Cox A, Zubair M, Tadi P. Weil Felix Test - StatPearls [Internet]. NCBI Bookshelf; 2023 [cited 2023 Jun 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559225/>
135. Díaz R, Casanova A, Ariza J, Moriyón I. The rose bengal test in human brucellosis: A neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011 Apr 19;5(4). doi:10.1371/journal.pntd.0000950
136. ELISA - EUROIMMUN’s ELISAs [Internet]. EUROIMMUN; 2023 [cited 2023 Jun 18]. Available from: <https://www.euroimmun.com/products/techniques/elisa/>
137. EUROIMMUN; Anti-dsDNA-NcX ELISA (IgG); EUROIMMUN Analyzer I-2P; 2020

138. Anti-phospholipid syndrome [Internet]. EUROIMMUN; 2023 [cited 2023 Jun 18]. Available from: <https://www.euroimmun.com/products/autoimmune-diagnostics/id/rheumatology/anti-phospholipid-syndrome/>
139. EUROIMMUN. IIFT: Fígado (MACaco)/Esófago (Macaco)/ Intestino (Macaco)/ Gliadina (GAF-3X) – Instruções para o teste de imunofluorescência indireta; Sprinter XL; 2021
140. ANA Patterns - Nuclear Patterns [Internet]. ICAP; 2015 [cited 2023 Jun 18]. Available from: https://www.anapatterns.org/nuclear_patterns.php
141. ANA Patterns - Cytoplasmatic Patterns [Internet]. ICAP; 2015 [cited 2023 Jun 18]. Available from: https://www.anapatterns.org/cytoplasmic_patterns.php
142. ANA Profile 3 Plus DSF70 [Internet]. EUROIMMUN; 2023 [cited 2023 Jun 19]. Available from: <https://www.euroimmun.com/products/autoimmune-diagnostics/pd/rheumatology/sle/1590-30/3/145288/>
143. Immunoblot [Internet]. EUROIMMUN; 2023 [cited 2023 Jun 19]. Available from: <https://www.euroimmun.com/products/techniques/immunoblot/>
144. Karpińska M, Czauderna M. Pancreas—its functions, disorders, and physiological impact on the mammals’ organism. *Frontiers in Physiology*. 2022;13. doi:10.3389/fphys.2022.807632
145. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*. 2018;24(43):4846–61. doi:10.3748/wjg.v24.i43.4846
146. Scarà S, Bottoni P, Scatena R. CA 19-9: Biochemical and clinical aspects. *Advances in Cancer Biomarkers*. 2015;247–60. doi:10.1007/978-94-017-7215-0_15
147. Mizrahi JD, Surana R, Valle JW, Shroff RT. Pancreatic cancer. *The Lancet*. 2020;395(10242):2008–20. doi:10.1016/s0140-6736(20)30974-0
148. Duffy MJ, Sturgeon C, Lamerz R, Haglund C, Holubec VL, Klapdor R, et al. Tumor markers in pancreatic cancer: A European Group on tumor markers (EGTM) status report. *Annals of Oncology*. 2010 Aug 18;21(3):441–7. doi:10.1093/annonc/mdp332
149. Pancreatic cancer types [Internet]. 2021 [cited 2023 May 9]. Available from: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/pancreatic-cancer/pancreatic-cancer-types>
150. Rückert F, Pilarsky C, Grützmann R. Serum tumor markers in pancreatic cancer—recent discoveries. *Cancers*. 2010 Jun 2;2(2):1107–24. doi:10.3390/cancers2021107
151. Jelski W, Mroczko B. Biochemical diagnostics of pancreatic cancer - present and future. *Clinica Chimica Acta*. 2019;498:47–51. doi:10.1016/j.cca.2019.08.013
152. Shaz BH. Lewis, I and P Blood Group Systems. *Transfusion Medicine and Hemostasis*. 2009;139–44. doi:10.1016/b978-0-12-374432-6.00026-9
153. Kannagi R. Carbohydrate Antigen Sialyl Lewis a – Its Pathophysiological Significance and Induction Mechanism in Cancer Progression. *Chang Gung Med J*. 2007;30(3):189–209.
154. Shan M, Tian Q, Zhang L. Serum CA50 levels in patients with cancers and other diseases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2019 Mar 21;162:187–98. doi:10.1016/bs.pmbts.2018.12.006

155. Haglund C, Kuusela P, Jalanko H, Roberts PJ. Serum ca 50 as a tumor marker in pancreatic cancer: A comparison with CA 19-9. *International Journal of Cancer*. 1987;39(4):477–81. doi:10.1002/ijc.2910390412
156. Plsson B, Masson P, Andrén-Sandberg Å. Tumour marker CA 50 levels compared to signs and symptoms in the diagnosis of pancreatic cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 1997;23(2):151–6. doi:10.1016/s0748-7983(97)80011-x
157. Röhlin MA, Joller H, Largiadèr F. CA 242 is a new tumor marker for pancreatic cancer. *Cancer*. 1993 Feb 1;71(3):701–7. doi:10.1002/1097-0142(19930201)71:3<701::aid-cnrcr2820710308>3.0.co;2-c
158. Johansson C, Nilsson O, Baeckström D, Jansson E-L, Lindholm L. Novel epitopes on the ca50-carrying antigen: Chemical and Immunochemical Studies. *Tumor Biology*. 1991;12(3):159–70. doi:10.1159/000217701
159. Haglund C, Lundin J, Kuusela P, Roberts P. CA 242, a new tumour marker for pancreatic cancer: A comparison with CA 19-9, CA 50 and Cea. *British Journal of Cancer*. 1994;70(3):487–92. doi:10.1038/bjc.1994.332
160. Baeckström D, Hansson GC, Nilsson O, Johansson C, Gendler SJ, Lindholm L. Purification and characterization of a membrane-bound and a secreted mucin-type glycoprotein carrying the carcinoma-associated sialyl-lea epitope on distinct core proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1991 Nov 15;266(32):21537–47. doi:10.1016/s0021-9258(18)54672-x
161. Haglund C, Lindgren J, Roberts P, Kuusela P, Nordling S. Tissue expression of the tumour associated antigen ca242 in benign and malignant pancreatic lesions. A comparison with CA 50 and ca 19-9. *British Journal of Cancer*. 1989;60(6):845–51. doi:10.1038/bjc.1989.377
162. Kankanala VL, Mukkamalla SKR. Carcinoembryonic Antigen. [Updated 2023 Jan 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK578172/>
163. Meng Q, Shi S, Liang C, Liang D, Xu W, Ji S, et al. Diagnostic and prognostic value of carcinoembryonic antigen in pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis. *OncoTargets and Therapy*. 2017 Sept 15;Volume 10:4591–8. doi:10.2147/ott.s145708
164. Kawa S, Oguchi H, Kobayashi T, Tokoo M, Furuta S, Kanai M, et al. Elevated serum levels of dupan-2 in pancreatic cancer patients negative for Lewis Blood Group phenotype. *British Journal of Cancer*. 1991 Nov;64(5):899-902. doi:10.1038/bjc.1991.422
165. Metzgar RS, Gaillard MT, Levine SJ, Tuck FL, Bossen EH, Borowitz MJ. Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cells defined by murine monoclonal antibodies1 [Internet]. American Association for Cancer Research; 1982 [cited 2023 May 10]. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/42/2/601/486393/Antigens-of-Human-Pancreatic-Adenocarcinoma-Cells>
166. Lan MS, Khorrami A, Kaufman B, Metzgar RS. Molecular characterization of a mucin-type antigen associated with human pancreatic cancer. the du-PAN-2 antigen. *Journal of Biological Chemistry*. 1987 Sept 15;262(26):12863–70. doi:10.1016/s0021-9258(18)45286-6
167. Macaluso M, Russo G, Cinti C, Bazan V, Gebbia N, Russo A. Ras family genes: An interesting link between cell cycle and cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 2002;192(2):125–30. doi:10.1002/jcp.10109

168. Jančík S, Drábek J, Radzioch D, Hajdúch M. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010 Jun 7;2010:1-13. doi:10.1155/2010/150960
169. Luo J. Kras mutation in pancreatic cancer. *Seminars in Oncology*. 2021 Feb;48(1):10–8. doi:10.1053/j.seminoncol.2021.02.003
170. Buscail L, Bournet B, Cordelier P. Role of oncogenic kras in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2020 Jan 31;17(3):153–68. doi:10.1038/s41575-019-0245-4
171. Smolarz B, Durczyński A, Romanowicz H, Hogendorf P. The role of microrna in pancreatic cancer. *Biomedicines*. 2021 Sept 26;9(10):1322. doi:10.3390/biomedicines9101322
172. Hayakawa T, Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Kondo T, Kurimoto K, et al. A prospective multicenter trial evaluating diagnostic validity of multivariate analysis and individual serum marker in differential diagnosis of pancreatic cancer from benign pancreatic diseases. *International Journal of Gastrointestinal Cancer*. 1999 Feb;25(1):23–30. doi:10.1385/ijgc:25:1:23
173. Mellby LD, Nyberg AP, Johansen JS, Wingren C, Nordestgaard BG, Bojesen SE, et al. Serum biomarker signature-based liquid biopsy for diagnosis of early-stage pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2018 Oct 1;36(28):2887–94. doi:10.1200/jco.2017.77.6658
174. Kim H, Kang KN, Shin YS, Byun Y, Han Y, Kwon W, et al. Biomarker panel for the diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancers*. 2020 Jun 1;12(6):1443. doi:10.3390/cancers12061443

Anexo

Tabela 10 - parâmetros analisados no laboratório por cada equipamento na secção de bioquímica

Equipamento		Parâmetro
Atellica® Solutions	Química	Ácido úrico, AST, ALT, ALP, GGT, creatinina cinase, colesterol, creatinina, glucose, LDL direta, HDL, ionograma, magnésio, amílase pancreática, Proteínas totais, lactato desidrogenase, ureia, antiestreptolisina O, β -2-microglobulina, transferrina, péptido C reativo, μ -albuminúria, albumina, amílase, cálcio, CO ₂ , bilirrubina direta, ferro, frutose, lípase, bilirrubina total, capacidade total de fixação do ferro, triglicéridos, apolipoproteína A1, apolipoproteína B, fator reumatóide, valproato, CH50
	Imunologia	CEA, ferritina, fT3, fT4, PSA, fPSA, T3, T4, TSH, ThCG, AFP, CA-125, CA-15.3, CA-19.9, mioglobina, BNP, pro-BNP, aHBs, HBs, HIV, HCV, sífilis, PTH, DHEAS (dehidroepiandrosterona), estrogénio, FSH, IgE total, LH, progesterona, prolactina, anticorpo anti-transglutaminase, anticorpo anti-tiroperoxidase, procalcitonina, folatos, Vitamina B12, HAVM, HAVT, IgM e IgG de Rubéola, IgM e IgG de Toxoplasma
VIDAS®		Anticorpo HAVT, anticorpo HCV, IgG, IgM e avidéz de CMV, IgM e IgG de VCA, IgG de EBNA, HBc, antigénio e anticorpo de HBe, HIV, IgM e IgG de rubéola, IgM, IgM e avidéz de toxoplasma
Liaison® XL		Aldosterona, 1,25 dihidroxivitamina D, tuberculose, ACTH, hormona de crescimento, insulin-like growth factor, renina, SARS-CoV-2, tiroglobulina, 25-OH vitmina D total, calprotectinas, EBV, IgM e IgG anti-borrelia, IgG e IgM de CMV, IgM e IgG EBNA, HTLV. Insulina, IgM e IgG de sarampo, IgM e IgG de Parvovírus B19, antigénio de SARS-CoV-2, IgG VCA, IgM e IgG de vírus varicela-zona, androstenediona, IGRAs
Architect™		IgM, IgG e spike de SARS-CoV-2, IgG e avidéz de toxoplasma, homocisteína
Phadia™ 250		Fator intrínseco, gliadina, anticorpo anti-recetor TSH, IgGe IgA de ASCA, IgG e IgA de anticorpo anti-transglutaminase anti-tecidual, IgG e IgM anti-cardiolipina, IgG e IgM anti- β 2-glicoproteína, anticorpos contra proteinase 3, anticorpos contra a mieloperoxidase, IgG específica, fator reumatóide, IgG contra a cadeia alfa de colagénio tioIV (ANCA)
Phadia™ 1000		IgE específica
BN ProSpec® System		IgG, IgA, IgM, cadeias kappa, cadeias lambda, haptoglobina, ceruloplasmina, antitrombina III, alfa-1-antitripsina, cadeias leves livres tipo kappa/lambda