

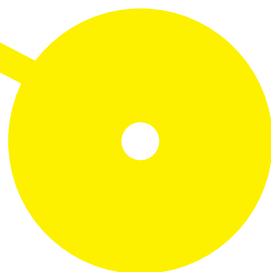


## Relatório de estágio

# Secção de Hormonologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça Testes bioquímicos de rastreio pré-natal na população de grávidas da RAM

Marta Franco Gomes

10/2021





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



**Relatório de estágio**

**Secção de Hormonologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça  
Testes bioquímicos de rastreio pré-natal na população de grávidas da RAM**

**Autor**

Marta Franco Gomes

**Orientadores**

MSc, Ilídio Ornelas, Hospital Dr. Nélio Mendonça

PhD, Mónica Vieira, ESS | IPP

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Bioquímica em Saúde** – Ramo em **Bioquímica Clínica e Metabólica** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## **Agradecimentos**

A conclusão desta etapa só foi possível com muito estudo, empenho e determinação. Desta forma, quero agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço à Dra. Graça Andrade, Diretora do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, que apesar das circunstâncias proporcionou-me a oportunidade de estagiar neste serviço, contribuindo para o enriquecimento da minha experiência profissional.

Ao meu orientador Ilídio Ornelas e restante equipa da secção de Hormonologia, que desde logo me integraram na dinâmica laboratorial e promoveram a partilha de informação e conhecimentos.

À minha orientadora institucional Professora Doutora Mónica Vieira pela ajuda, disponibilidade e contributo na revisão deste relatório. À Professora Doutora Ana Carolina Ribeiro por todo o auxílio prestado na redação do Capítulo II. Ao restante corpo docente do Mestrado em Bioquímica em Saúde pelos seus contributos na minha formação.

À minha família, especialmente, aos meus pais, Emanuel e Adelaide, à minha irmã, Francisca e aos meus padrinhos por todo o incentivo e compreensão. Contribuíram para o meu crescimento como pessoa e inspiraram-me a seguir em frente mesmo nos momentos difíceis.

Ao Dinarte, meu namorado, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus amigos e colegas, mas principalmente à Ana Gouveia pelo apoio, motivação e paciência que me dedicou.

## Resumo

O presente relatório reporta o trabalho desenvolvido durante o estágio curricular do Mestrado em Bioquímica em Saúde, realizado na secção de Hormonologia do laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça.

É apresentada a secção de Hormonologia com maior relevância para os parâmetros analíticos da função tiroideia, hormonas da fertilidade e da função gonadal, marcadores tumorais e cardíacos, marcadores de hipertensão, fármacos imunossupressores e marcadores bioquímicos de rastreio pré-natal.

O estágio teve como principal objetivo integrar o quotidiano de um laboratório de análises clínicas, permitindo o contacto com novos equipamentos e procedimentos, de modo a consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso. Para além da componente prática da aprendizagem, foi também realizada uma recolha de dados com o objetivo de analisar os testes bioquímicos de rastreio pré-natal que ocorreram em dois períodos homólogos, compreendidos entre junho de 2019 e janeiro de 2021, bem como estudar o comportamento das variáveis clínicas, proteína plasmática A associada à gravidez (PAPP-A) e fração livre da subunidade  $\beta$  da hormona gonadotrofina coriónica humana ( $\beta$ -hCG livre), ao longo do primeiro trimestre da gravidez e nos diferentes grupos etários.

No período em estudo, 1169 gestantes, com a idade média de 31 anos, realizaram os testes bioquímicos de rastreio pré-natal, no Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça. A recolha dos dados, em dois períodos distintos, permitiu evidenciar uma redução no número de gestações durante a pandemia de COVID-19, comparativamente com o período homólogo do ano anterior. A comparação entre as concentrações obtidas nos testes bioquímicos de rastreio pré-natal com os valores de referência mostrou que, na amostra em estudo, ambos os níveis hormonais de  $\beta$ -hCG livre e PAPP-A, apresentavam-se superiores aos valores de referência. Foi igualmente observada, em ambas as variáveis clínicas, a presença de *outliers* superiores. Contudo, como não foi realizada a conversão das concentrações obtidas de  $\beta$ -hCG livre e PAPP-A em múltiplos da mediana (MoMs), neste estudo, não é possível inferir conclusões relativamente à ausência ou presença de cromossomopatias.

**Palavras-chave:** patologia clínica; hormonas; marcadores bioquímicos; rastreio pré-natal.

## **Abstract**

The present report describes the work developed during the curricular internship of the Master's degree in Biochemistry in Health, performed in Hormonology section in Clinical Pathology Laboratory located at Dr. Nélio Mendonça Hospital's.

This work focuses on the Hormonology section of the laboratory with increased focus in the analytical parameters for toroidal function, fertility hormones and gonadal function, tumoral and cardiac biomarkers, diverse metabolites, hypertension biomarkers, immunosuppressors drugs and biochemical biomarkers of prenatal screening.

The main goal of the internship was to integrate the quotidian of a clinical analysis laboratory, allowing the contact with new equipment and procedures, resulting in the consolidation of the knowledge acquired throughout the course. In addition to the practical learning component, a data collection was also carried out to analyse the prenatal biochemical screening tests performed between June of 2019 and January of 2021, as well as to study the behaviour of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) and free beta human chorionic gonadotrophin (free  $\beta$ -hCG) through the first trimester of pregnancy and in different age groups.

During the study period, 1169 pregnant women with an average age of 31 years underwent prenatal biochemical screening test at the Clinical Pathology laboratory at Dr. Nélio Mendonça Hospital. The data collection in two different periods showed a reduction in the number of pregnancies during the COVID-19 pandemic when compared to the same period of the previous year. The comparison between the concentrations obtained from the prenatal biochemical screening tests with the reference values showed that, in the study sample, both free  $\beta$ -hCG and PAPP-A hormone levels were higher than the reference values. Furthermore, the presence of higher outliers was equally observed in both clinical variables. However, as the conversion of the obtained concentrations of free  $\beta$ -hCG and PAPP-A into multiples of the median was not part of this study, it is impossible to conclude anything about the absence or presence of chromosome abnormalities.

**Keywords:** clinical pathology; hormones; biochemistry biomarkers; prenatal screening.

## Índice

Capítulo 1 – Secção de Hormonologia.....	1
1. Introdução.....	2
2. Parâmetros analíticos.....	3
2.1. Função tiroideia.....	3
2.2. Marcadores tumorais.....	5
2.3. Hormonas da fertilidade e da função gonadal.....	11
2.4. Marcadores de hipertensão.....	14
2.5. Marcadores cardíacos.....	15
2.6. Imunossuppressores.....	16
3. Controlo de qualidade.....	17
3.1. Controlo de qualidade interno.....	17
3.2. Garantia de qualidade externa.....	18
4. Metodologia.....	18
4.1. Imunoensaio.....	18
4.1.1. Imunoensaio de eletroquimioluminescência (ECLIA).....	19
4.1.2. Imunoensaio de quimioluminescência (CLIA).....	20
4.1.3. <i>Time Resolved Amplified Cryptate Emission</i> (TRACE).....	20
4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	21
4.3. Amostras.....	21
5. Conclusão.....	22
Capítulo 2 – Testes bioquímicos de rastreio pré-natal.....	23
1. Introdução.....	24
2. Análise estatística.....	25
2.1. Objetivos.....	25
2.2. Metodologia.....	25
2.2.1. Tipo de estudo.....	25
2.2.2. Amostra em estudo.....	26
2.2.3. Critérios de inclusão e exclusão.....	26
2.2.4. Variáveis em estudo.....	26
2.2.5. Considerações éticas.....	27
2.2.6. Análise e tratamento de dados.....	27
3. Resultados.....	28

3.1. Variáveis sociodemográficas.....	28
3.2. Variáveis clínicas .....	30
3.2.1. Proteína plasmática A associada à gravidez (PAPP-A).....	31
3.2.2. Fração livre da subunidade $\beta$ da hormona gonadotrofina coriônica humana ( $\beta$ -hCG livre).....	32
4. Discussão .....	34
Capítulo 3 – Conclusões.....	38
1. Conclusões.....	39
Referências bibliográficas .....	41
Anexos.....	59
Anexo 1 – Parâmetros analíticos e respetiva metodologia.....	59
Anexo 2 – Restrições alimentares.....	61

## Lista de Abreviaturas

%fPSA	<i>Ratio</i> entre PSA livre e PSA total
ABEI	<i>Amino-butyl-ethyl-isoluminol</i>
ACT	$\alpha$ -1-antiquimiotripsina
AFP	Alfafetoproteína
AMH	Hormona anti-mulleriana
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ATg	Anticorpo tiroglobulina
ATPO	Anticorpo peroxidase específica da tiroide
BNP	Péptido natriurético cerebral (ou tipo B)
CA 125	Antigénio carbohidrato 125
CA 15-3	Antigénio carbohidrato 15-3
CA 19-9	Antigénio carbohidrato 19-9
CA 72-4	Antigénio carbohidrato 72-4
CEA	Antigénio carcinoembrionário
CgA	Cromogranina A
CL	Quimioluminescência
CLIA	Imunoensaio de quimioluminescência
CNIs	Inibidores da calcineurina
CQI	Controlo de qualidade interno
DHEA	Dihidroepiandrosterona
DIT	Diiodotirosina
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ECLIA	Imunoensaio de eletroquimioluminescência
EQAS	<i>External Quality Assurance Services</i>
FE:	Fase estacionária
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FM	Fase móvel
fPSA	PSA livre
FSH	Hormona folículo estimulante
FT <sub>3</sub>	Triiodotironina livre
FT <sub>4</sub>	Tiroxina livre
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofinas

GQE	Garantia de qualidade externa
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HPG	Hipotálamo-hipófise-gonadal
HPG	Hipotálamo-hipófise-tiroide
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
hs-cTnT	Troponina T de alta sensibilidade
IA	Imunoensaio
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> (Fator de crescimento tipo insulina)
IL-2	Interleucina-2
INE	Instituto Nacional de Estatística
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
K <sub>2</sub> EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético dipotássico
LH	Hormona luteinizante
MIT	Monoiodotirosina
MoMs	Múltiplos da mediana
mTOR	Alvo da rapamicina nos mamíferos
MUC 16	Mucina 16
NEQAS	<i>National External Quality Assessment Scheme</i>
NFAT	Fator nuclear das células T ativadas
NSE	Enolase neuro específica
NT-proBNP	N-terminal-proBNP
PAPP-A	Proteína plasmática A associada à gravidez
PCOS	Síndrome do ovário poliquístico
PNRN	Programa Nacional de Rastreio Neonatal
PSA	Antigénio específico da próstata
RAM	Região Autónoma da Madeira
RIQAS	<i>Randox International Quality Assessment Scheme</i>
RLUs	Unidades relativas de luz
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
SESARAM, E.P.E	Serviço de Saúde da Região Autónoma da Madeira, E.P.E.
SHBG	Proteína de transporte das hormonas sexuais
SPSS®	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SRAA	Sistema-renina-angiotensina-aldosterona
T <sub>3</sub>	Triiodotironina

<b>T<sub>4</sub></b>	Tiroxina
<b>TBG</b>	Globulina de ligação à tiroxina
<b>TDM</b>	<i>Therapeutic Drug Monitoring</i>
<b>Tg</b>	Tiroglobulina
<b>TGF-β</b>	Fator de crescimento transformador β
<b>TPA</b>	Tripropilamina
<b>TPO</b>	Peroxidase da tiroide
<b>tPSA</b>	PSA sérico
<b>TRAb</b>	Autoanticorpo contra o recetor da TSH
<b>TRACE</b>	<i>Time Resolved Amplified Cryptate Emission</i>
<b>TRH</b>	Hormona libertadora de tirotropina
<b>TSH</b>	Hormona estimulante da tiroide
<b>β-hCG livre</b>	Fração livre da subunidade β da gonadotrofina coriónica humana

## **Índice de figuras**

Figura 1 – Distribuição do nº de gestações por meses.....	29
Figura 2 – Caracterização da amostra em função do grupo etário.....	30
Figura 3 – Diagramas em caixas de bigodes dos níveis de PAPP-A em relação ao período de gestação.....	32
Figura 4 – Diagramas em caixas de bigodes dos níveis de $\beta$ -hCG livre em relação ao período de gestação.....	34

## **Índice de tabelas**

Tabela 1 – Testes de normalidade.....	28
Tabela 2 – Número de gestações por período.....	28
Tabela 3 – Caracterização da amostra em função da idade.....	29
Tabela 4 – Distribuição da PAPP-A e da $\beta$ -hCG livre por período de gestação e grupo etário.....	30
Tabela 5 – Valores da PAPP-A em função do grupo etário.....	31
Tabela 6 – Comparações por Método Pairwise de grupo etário para o marcador bioquímico PAPP-A. O nível de significância é 0,05.....	31
Tabela 7 – Variação da PAPP-A em função do período de gestação.....	32
Tabela 8 – Valores da $\beta$ -hCG livre em função do grupo etário.....	33
Tabela 9 – Variação da $\beta$ -hCG livre em função do período de gestação.....	33
Tabela 10 – Valores de referência para a PAPP-A.....	36
Tabela 11 – Valores de referência para a $\beta$ -hCG livre.....	36

## **Nota introdutória**

O presente relatório enquadra-se no âmbito do Mestrado em Bioquímica em Saúde ramo em Bioquímica Clínica e Metabólica, no qual tive a oportunidade de estagiar, pelo período de seis meses, na secção de Hormonologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça.

Este trabalho encontra-se estruturado em três capítulos.

O primeiro capítulo faz referência à rotina laboratorial desenvolvida na secção de Hormonologia. Inicialmente são descritos os parâmetros analíticos que integram a função tiroideia, hormonas da fertilidade e da função gonadal, marcadores tumorais e cardíacos, hormonas da hipertensão e fármacos imunossupressores. De seguida, são abordados os princípios do controlo de qualidade, nomeadamente o controlo de qualidade interno e a avaliação externa da qualidade. Por fim, é descrito o processamento das amostras e a base teórica das metodologias em uso nos vários equipamentos que foram utilizados durante o estágio.

O segundo capítulo corresponde ao estudo estatístico relativo aos testes bioquímicos de rastreio pré-natal, realizados no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça. A recolha dos dados abrangeu mulheres grávidas que realizaram os testes de rastreio, nomeadamente às variáveis clínicas PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre, entre junho de 2019 e janeiro de 2020, assim como, entre junho de 2020 e janeiro de 2021. O comportamento dos marcadores bioquímicos foi estudado ao longo do período gestacional e nos diferentes grupos etários.

O terceiro capítulo conclui este documento com a síntese das atividades laboratoriais executadas na secção de Hormonologia e as considerações finais do estudo estatístico relativo aos testes bioquímicos de rastreio pré-natal.

## **Capítulo 1 – Secção de Hormonologia**

## 1. Introdução

O Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, dirigido pela Dra. Graça Andrade, é constituído pelos setores de Hematologia, Imunologia Celular, Microbiologia, *LabCore*, Bioquímica Manual e Laboratório de Urgência. O laboratório de Patologia Clínica dispõe, ainda, de um serviço de logística laboratorial que inclui uma área de receção e triagem de amostras, salas de colheitas, sala de esterilização e lavagem de material, secretaria e área de gestão de reagentes.

Estruturalmente, a secção de Hormonologia, onde decorreu o estágio curricular, integra uma das maiores áreas do serviço, o *LabCore*, que inclui também as secções de Bioquímica Clínica e Imunologia. As amostras analisadas nesta secção são provenientes da central de colheitas, localizada no laboratório de Patologia Clínica, assim como de outros sistemas externos integrados no Serviço de Saúde da Região Autónoma da Madeira, E.P.E. (SESARAM, E.P.E), como unidades de cuidados intensivos e intermédios, serviços de internamento, consultas externas e centros de saúde, lares e domicílios.

Na sua maioria, os parâmetros analíticos determinados na secção de Hormonologia permitem o estudo clínico do sistema endócrino. Este sistema é composto por várias glândulas que se encontram distribuídas por todo o organismo, com a capacidade de controlar, assim como manter, uma função apropriada de muitos sistemas fisiológicos (1). Nas glândulas endócrinas ocorre a produção de hormonas, mensageiros químicos, que são libertados na corrente sanguínea. As hormonas analisadas nesta secção (Anexo 1 – Parâmetros analíticos e respetiva metodologia) refletem os seus efeitos predominantemente em três eixos: [1] eixo hipotálamo-hipófise-tiroide, um regulador essencial do metabolismo e da homeostasia energética, [2] eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, que desempenha um papel crucial na adaptação ao stress e [3] eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, importante para a reprodução (1).

Os testes realizados nesta secção são maioritariamente efetuados em amostras de soro, contudo, alguns testes específicos são realizados em plasma, sangue total ou urina de 24 horas. Os parâmetros são determinados, principalmente, em equipamentos automatizados que utilizam técnicas de eletroquimioluminescência e quimioluminescência. No entanto, alguns analitos são analisados em cromatografia líquida de alta eficiência.

O estágio curricular teve como principal objetivo permitir o contacto com o quotidiano de um laboratório de análises clínicas, incentivando a componente prática da aprendizagem, de modo a consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo do Mestrado em Bioquímica em Saúde.

## **2. Parâmetros analíticos**

### **2.1. Função tiroideia**

A tiroide, uma das maiores glândulas endócrinas, é composta por dois lóbulos que estão unidos por um istmo. Apresenta um formato de borboleta e encontra-se localizada em torno da traqueia.

A glândula tiroide e as suas hormonas atuam no desenvolvimento dos órgãos e influenciam o controlo homeostático dos mecanismos fisiológicos fundamentais, como o crescimento corporal e o gasto de energia (2). A tiroide é regulada através de um mecanismo fisiológico de retroação negativo que envolve o eixo hipotálamo-hipófise-tiroide (HPG). No hipotálamo, a hormona libertadora de tiotropina (TRH) estimula a adeno-hipófise a produzir a hormona estimulante da tiroide (TSH), por conseguinte, a TSH é responsável pela libertação e regulação das hormonas triiodotironina ( $T_3$ ) e tiroxina ( $T_4$ ) (3).

A avaliação da função tiroideia, através do doseamento das concentrações de hormonas da tiroide circulantes e de TSH, é considerada a abordagem mais precisa e confiável para diagnosticar hipofunção ou hiperfunção da glândula tiroideia (4). Por outro lado, a doença autoimune da tiroide, uma doença multifatorial, é geralmente despoletada pela interação entre características genéticas e fatores ambientais, as quais são acompanhadas pela presença de autoanticorpos, incluindo o anticorpo tiroglobulina, o autoanticorpo contra o recetor da TSH e o anticorpo peroxidase específica da tiroide (5).

A TSH, ou tiotropina, apresenta um padrão circadiano que permite regular o metabolismo humano, nomeadamente a função do sistema nervoso, sistema músculo-esquelético e tecido reprodutivo (6). A determinação do nível da TSH é definida como um método sensível para avaliar a função da glândula tiroideia, incluindo o diagnóstico de hipertiroidismo e hipotiroidismo. O seu doseamento possibilita o acompanhamento da terapia hormonal de substituição em pacientes com hipotiroidismo primário, e ainda, da terapia supressiva em pacientes com carcinoma da tiroide derivado do epitélio folicular (7).

As principais hormonas produzidas pela tiroide são a  $T_3$  e a  $T_4$ , processo que depende de uma ingestão adequada de iodeto. Enquanto a hormona  $T_4$  é secretada maioritariamente pela tiroide, a hormona  $T_3$  é essencialmente libertada nos tecidos periféricos, particularmente no fígado e nos rins, onde ocorre a desiodinação enzimática da  $T_4$ , dando origem à hormona  $T_3$ . Em comparação com a hormona tiroxina, a  $T_3$  é a principal forma ativa das hormonas tiroideias, uma vez que liga-se mais avidamente aos recetores da tiroide. A  $T_4$  e a  $T_3$  são hormonas lipofílicas, e assim sendo, circulam acopladas a proteínas de transporte, tais como a globulina de ligação à tiroxina (TBG), a albumina e a transtirretina.

A determinação da  $T_4$  total, conjugada a proteínas transportadoras, reflete não só a fração livre da hormona, como também, a fração que está ligada à proteína. Assim, qualquer condição que altere os níveis das proteínas de transporte, em especial da TBG, pode resultar em níveis anormais de tiroxina e conduzir a avaliações erróneas do estado metabólico da tiroide (8). A fração livre da hormona  $T_4$  ( $FT_4$ ), biologicamente ativa, permite a ligação imediata aos recetores nucleares. Contrariamente à  $T_4$  total,

condições que afetam a TBG, como gravidez ou doença aguda, não interferem com o doseamento de FT<sub>4</sub> (9,10). Na prática clínica, a determinação da FT<sub>4</sub> é o teste de rotina mais solicitado para avaliar o estado da tiroide. Por outro lado, o doseamento da T<sub>4</sub> é realizado para o diagnóstico de distúrbios da glândula tiroideia e monitorização da terapêutica de supressão da TSH (4).

A determinação da T<sub>3</sub>, igualmente como ocorre com a hormona T<sub>4</sub> está sob influência das proteínas de transporte. No entanto, como é formada essencialmente fora da tiroide, a sua interpretação clínica irá refletir principalmente o estado funcional do tecido periférico e não o desempenho secretor da glândula tiroideia. O doseamento da FT<sub>3</sub> apresenta a mesma vantagem do que a hormona FT<sub>4</sub>, no que concerne ao efeito das proteínas de ligação na concentração das hormonas. Na prática clínica, a determinação sérica de T<sub>3</sub> total e livre, apresenta uma utilidade limitada no diagnóstico de hipotireoidismo, dado que, os seus níveis apresentam-se frequentemente normais (7). Por outro lado, o doseamento da T<sub>3</sub> total pode ser utilizado no diagnóstico de hipertireoidismo da T<sub>3</sub> e na indicação de um diagnóstico de tirotoxicose factícia (ingestão excessiva de T<sub>3</sub> ou T<sub>4</sub>) (11). A determinação da FT<sub>3</sub> é essencial para reconhecer as diferentes formas de hipertireoidismo.

Os anticorpos contra o recetor da TSH (TRAbs) são frequentemente encontrados em doenças autoimunes da tiroide (12). O TRAb comporta-se como anticorpo estimulador da tiroide, ao competir com a TSH pela ligação ao seu recetor. Essa estimulação induz o crescimento da tiroide, aumenta a vascularização da glândula, conduzindo também a um aumento na produção e secreção das hormonas tiroideias (7). Existem ainda dois outros tipos de TRAbs: anticorpo que atua como antagonista da TSH, denominado TRAb bloqueador e, anticorpo neutro, que não afeta a ligação da TSH (12). Na prática clínica, a determinação do TRAb é usada no diagnóstico diferencial de hipertireoidismo de Graves e na previsão de tirotoxicose fetal (9). Como os níveis do TRAb não são detetáveis na população em geral, é um teste específico para o diagnóstico da doença de Graves.

A tiroglobulina (Tg) produzida pelas células foliculares da tiroide, é a glicoproteína expressa em maior abundância na glândula tiroideia. No metabolismo do iodo, a Tg exerce funções importantes, nomeadamente, no armazenamento de iodo no interior da tiroide e como matriz para a biossíntese das hormonas T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> (13). Nos tirócitos, quando as hormonas da tiroide são secretadas, a maior parte da Tg é reabsorvida e degradada proteoliticamente. No entanto, há a possibilidade de pequenas quantidades de Tg serem libertadas para a corrente sanguínea, juntamente com T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>. Assim, concentrações baixas de Tg podem ser encontradas em indivíduos saudáveis sem doenças da tiroide associadas (7). A determinação da Tg é utilizada, principalmente, como auxiliar na monitorização de pacientes com carcinoma diferenciado da tiroide, que realizaram tiroidectomia (remoção da tiroide) (9). Uma vez que a Tg é produzida exclusivamente pelas células foliculares da tiroide, será expectável que, nestes pacientes, os níveis de Tg sejam indetetáveis. Consequentemente, o reaparecimento de Tg após tiroidectomia é

indicativo de doença residual ou recorrência do cancro (14). A presença de anticorpos de tiroglobulina pode causar interferência no doseamento da Tg e, conseqüentemente, originar interpretações incorretas (9).

Em pacientes com doenças autoimunes da tiroide, a destruição da glândula tiroideia induz a alterações estruturais na Tg e, conseqüentemente, a produção de anticorpos contra a Tg (ATg) (15). O ATg é um anticorpo intra-folicular, utilizado como biomarcador para autoimunidade tiroideia. Do ponto de vista clínico, no diagnóstico de disfunção tiroideia, o ATg não é tão sensível ou específico como o anticorpo peroxidase específica da tiroide, uma vez que a sua concentração se apresenta elevada em 10% da população, principalmente nas mulheres (9). Contudo, a determinação do ATg é recomendada no acompanhamento de pacientes com carcinoma diferenciado da tiroide, de modo a assegurar a confiabilidade no doseamento sérico da Tg (16).

A peroxidase da tiroide (TPO) é a enzima responsável pela biossíntese das hormonas tiroideias que catalisa a iodinação e a incorporação de resíduos de tirosina à Tg, promovendo a síntese de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> (13,17). Em doenças autoimunes da tiroide, tais como tiroidite de Hashimoto e doença de Graves, estão presentes autoanticorpos que atuam contra a função da TPO (18,19). Os anticorpos TPO (ATPO), por ativação da cascata do complemento ou por citotoxicidade mediada por células, têm a capacidade de danificar os tirócitos (20). A presença de níveis elevados de ATPO é um indicador de doença, sendo frequentemente utilizado como marcador para o diagnóstico de doenças autoimunes da tiroide, principalmente, no diagnóstico de tiroidite de Hashimoto (7).

A tiroide contém uma segunda população de células produtoras de hormonas, denominadas células parafoliculares ou células C, que fazem parte do sistema neuroendócrino e sintetizam principalmente calcitonina (2). A calcitonina é uma hormona polipeptídica, que está envolvida no metabolismo do cálcio e do fósforo e a sua libertação é estimulada em função dos níveis séricos elevados de cálcio e da secreção da hormona gastrina (21). A calcitonina, além de ser produzida pelas células parafoliculares, está igualmente presente nos pulmões, na bexiga, no intestino delgado e no fígado. Deste modo, patologias como insuficiência renal, hiperparatiroidismo, neoplasias neuroendócrinas, bem como vários fármacos, podem induzir o aumento da concentração de calcitonina (21). A determinação de calcitonina é útil no diagnóstico e acompanhamento de doenças que envolvam a tiroide e paratiroide, nomeadamente no carcinoma medular da tiroide e na hiperplasia de células C (22).

## **2.2. Marcadores tumorais**

Nas células neoplásicas, as sucessivas mutações que ocorrem conduzem à alteração do metabolismo celular e à libertação de compostos que, embora biologicamente inativos, podem ser analiticamente detetáveis nos fluídos corporais (23,24). Um marcador tumoral é descrito como um produto molecular expresso por um tecido neoplásico, metabolizado ou secretado por um tumor (25).

Estas substâncias libertadas na circulação são encontradas em células, tecidos ou fluídos corporais, podendo ser determinados qualitativa ou quantitativamente, por métodos de biologia molecular, químicos ou imunológicos.

Para que o doseamento de um marcador tumoral seja clinicamente útil, o resultado deve indicar claramente os pacientes que apresentam um tumor. Assim, um marcador tumoral ideal, deve ser específico para um único tipo de cancro e sensível o suficiente para detetar tumores pequenos, de modo a permitir um diagnóstico precoce (23). A concentração do marcador tumoral deve correlacionar-se de forma confiável com a carga tumoral, refletindo com precisão qualquer progressão ou regressão do tumor (26). Na prática, os marcadores tumorais são mais úteis na avaliação da progressão do estado da doença, antes de iniciar a terapia e na monitorização durante as modalidades do tratamento.

Existem muitos esquemas de classificação dos marcadores tumorais tendo por base diferenças na sua origem, estrutura, função biológica ou a relação com a formação do tumor (26). Assim, os marcadores tumorais podem agrupar-se em:

- I. Antígenos oncofetais
- II. Citoqueratinas
- III. Enzimas
- IV. Glicoproteínas
- V. Hormonas

### **Antígeno específico da próstata**

O antígeno específico da próstata (PSA) é uma serina protease pertencente ao grupo das calicreínas (27). Esta glicoproteína, codificada pelo gene  $KLK_3$  é produzida quase exclusivamente pelas células epiteliais do tecido prostático, benigno e maligno. Os ductos glandulares, geralmente fornecem uma barreira eficiente que evita a presença de concentrações elevadas de PSA na circulação.

O PSA é secretado no plasma seminal, apresentando como função a liquefação do sêmen, aumentando a motilidade dos espermatozoides (28,29). O PSA circulante está principalmente complexado com inibidores de proteases, sendo que, aproximadamente 65 a 95% do PSA forma um complexo com  $\alpha$ -1-antiquimiotripsina (PSA-ACT) (30). Uma pequena porção de PSA é considerada biologicamente inativa e apresenta-se na sua forma livre, denominada PSA livre (fPSA). O PSA sérico (tPSA) compreende as formas PSA complexado e livre.

Os níveis séricos de PSA encontram-se aumentados em contextos de inflamação ou neoplasia. Nestas condições, ocorre a perda da arquitetura do tecido prostático e o PSA é libertado para a circulação (29). Consequentemente, os níveis de PSA complexado irão igualmente aumentar. Nos pacientes em que o doseamento do tPSA se encontra entre 4 e 10 ng/mL (a denominada zona cinzenta), a determinação da

pequena quantidade de PSA que se encontra livre pode ser utilizada para calcular o *ratio* entre fPSA e tPSA (%fPSA), o que auxilia na diferenciação de uma situação maligna, como o cancro da próstata, ou de uma situação benigna, nomeadamente, a hipertrofia benigna da próstata (31). Em homens com cancro da próstata, foi descrito que a proporção de %fPSA para tPSA encontra-se diminuída (31). Assim, quanto menor o %fPSA, maior a probabilidade de cancro da próstata.

O PSA é um biomarcador precioso para determinar o prognóstico, estratificar o risco no momento da cirurgia e para monitorizar o tratamento de pacientes com cancro da próstata (31). Contudo, a utilização do PSA como biomarcador é limitada pela sua baixa especificidade. Sendo o PSA específico do órgão, a sua presença em concentrações elevadas pode dever-se não só à existência de cancro da glândula prostática, mas também a condições não malignas, tais como na hipertrofia benigna da próstata e prostatite (28).

### **Antigénio carcinoembrionário**

O antigénio carcinoembrionário (CEA) é uma glicoproteína envolvida na adesão celular, pertencente ao grupo dos antigénios oncofetais (32,33). Por norma, a sua formação ocorre durante o período embrionário e fetal, contudo, antes do nascimento, a sua produção é suprimida (34). Este antigénio é expresso por células da mucosa e está associado principalmente ao cancro colorretal.

Como existem várias etiologias não malignas que apresentam níveis elevados de CEA, a utilização deste marcador como ferramenta de rastreio para o cancro não é recomendada (32). Ainda que o CEA seja um marcador tumoral muito inespecífico, o seu valor laboratorial, quando muito elevado, está sempre associado a malignidade (32). Atualmente, o seu uso clínico está indicado para vigilância de recorrência do cancro colorretal (35). O CEA é também um marcador tumoral para outras doenças malignas, que podem ocorrer na mama, ovário, fígado, estômago e pâncreas (35,36).

### **Antigénio carboidrato 125**

O antigénio carboidrato 125 ou, simplesmente CA 125, pertence à maior classe de mucinas associadas à membrana (37). Esta glicoproteína, igualmente conhecida como mucina 16 (MUC 16), é normalmente expressa no revestimento epitelial de vários órgãos, de que são exemplo a superfície ocular, o trato reprodutivo feminino e o revestimento mesotelial da cavidade abdominal (38). O CA 125 funciona como barreira contra agressões externas e auxilia na lubrificação e manutenção das mucosas (38).

Como biomarcador, o CA 125 é indicado para monitorizar o cancro epitelial do ovário, assim como, para o diagnóstico de massas pélvicas (39). Contudo, a sua expressão anómala foi também observada em outras doenças malignas, incluindo cancro da mama, pâncreas e pulmão (38). Da mesma forma, em pacientes com doença hepática e pancreática, gravidez, endometriose, doença inflamatória pélvica e derrames pleurais, o nível de CA 125, pode também apresentar-se aumentado (31).

Na detecção do cancro do ovário, o CA 125 tem uma sensibilidade limitada, uma vez que, apenas 50% das mulheres no estadio inicial apresentam níveis aumentados deste biomarcador. A especificidade do CA 125 apresenta-se igualmente comprometida, pois muitas condições inflamatórias na área abdominal e outras doenças malignas não ovarianas podem conduzir ao seu aumento, o que frequentemente pode levar a falsos positivos (37). Devido à sua baixa especificidade e sensibilidade limitada, o uso isolado do CA 125 no rastreio da detecção de cancro do ovário não é favorável.

### **Antigénio carbohidrato 19-9**

O antigénio carbohidrato 19-9 (CA 19-9) é uma glicoproteína relacionada com o antigénio monossializado do grupo sanguíneo Lewis A (40). A sua síntese ocorre nas células pancreáticas e nos ductos biliares, bem como nos epitélios gástrico, do cólon, do endométrio e glândulas salivares (41,42). No entanto, pacientes com fenótipo sanguíneo Lewis negativo, aproximadamente 6% da população caucasiana e cerca de 22% da população não caucasiana, são incapazes de sintetizar o CA 19-9 (42).

O CA 19-9 é clinicamente usado como um marcador tumoral em pacientes com cancro gastrointestinal, principalmente pancreático ou colangiocarcinoma (43). Contudo, pode apresentar-se elevado em processos benignos como doença hepática (cirrose), pancreática (pancreatite), respiratória (fibrose pulmonar), insuficiência renal ou em doenças autoimunes (40,43).

Devido ao baixo valor preditivo positivo, a determinação sérica do CA 19-9, não pode ser usada como marcador de rastreio. Porém, a monitorização sequencial do CA 19-9 pode ser útil no acompanhamento de pacientes durante a quimioterapia, de modo a avaliar a eficácia do tratamento (42). Por outro lado, resultados falsos negativos podem ser observados em pacientes Lewis negativo, diagnosticados com doença maligna (43). Assim, a interpretação do significado da elevação do CA 19-9 deve ser efetuada de forma prudente.

### **Antigénio carbohidrato 15-3**

Na superfície apical da maioria das células epiteliais glandulares e, em menor quantidade, nas células hematopoiéticas, ocorre a expressão do antigénio carbohidrato 15-3 (CA 15-3), conhecido igualmente como mucina 1 (44,45).

A nível clínico, o CA 15-3 é o biomarcador mais amplamente utilizado em pacientes com cancro da mama, principalmente direcionado para monitorizar a terapêutica na presença de doença metastática (46). No processo de metástase, sucede-se a disrupção da membrana basal das células malignas, o que reflete o aumento dos níveis de CA 15-3, sendo o antigénio detetável no soro (47). O excesso de CA 15-3 pode também ser associado a tumores benignos da mama, assim como a cancro do pulmão, ovário, pâncreas e intestino.

## **Alfafetoproteína**

A família da albumina para além de conter a albumina sérica, a proteína de ligação da vitamina D e a afamina, inclui também a alfafetoproteína (AFP) (48). A sua síntese inicia-se com a hematopoiese embrionária no saco vitelino, que ocorre predominantemente no fígado. Porém, no trato gastrointestinal em desenvolvimento há também a produção de níveis significativos de AFP. Durante a vida fetal, a AFP permite a manutenção da pressão oncótica e, devido à sua capacidade de ligação a algumas moléculas, desempenha funções de transporte de metais pesados, ácidos gordos e bilirrubina (48,49).

Em condições fisiológicas, os recém-nascidos apresentam níveis elevados de AFP no nascimento, sendo que durante as primeiras 24 horas os níveis de AFP diminuem gradualmente e permanecem baixos ao longo da vida adulta (49). O reaparecimento de AFP na circulação está associado a condições patológicas, como tumores malignos do fígado, estômago, pâncreas e sistema reprodutivo (50). No entanto, a AFP é usada principalmente como marcador serológico no diagnóstico e monitorização do carcinoma hepatocelular. A concentração de AFP também pode estar aumentada em contexto não tumoral, nomeadamente na gravidez, doença hepática crónica, hepatite ou regeneração do fígado (31).

## **Subunidade $\beta$ da hormona gonadotrofina coriónica humana**

A hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) é uma hormona que pertence à classe das gonadotrofinas, secretada maioritariamente pela placenta durante a gravidez (51). Como marcador tumoral, a subunidade  $\beta$  da hCG ( $\beta$ -hCG) está frequentemente associada à doença trofoblástica gestacional e a tumores de células das linhas germinativas (52,53). As determinações da hCG são igualmente usadas na avaliação de mulheres com suspeita de gravidez ectópica, em conjunto com outros marcadores para o rastreio de cromossomopatias (descritos no Capítulo 2 – 24) (52).

## **Enolase neuro específica**

A enolase neuro específica (NSE), também conhecida como  $\gamma$ -enolase, é uma proteína cerebral solúvel que está localizada tanto no citoplasma dos neurónios centrais e periféricos, como nas células neuroendócrinas (54). Esta enzima glicolítica permite a conversão anaeróbica da glicose em metabolitos adequados para a oxidação (55). Uma isoforma de NSE está presente nas células sanguíneas circulantes, particularmente nos eritrócitos e nas plaquetas. Consequentemente, a hemólise pode induzir um aumento nos níveis de NSE, o que não reflete as condições *in vivo* (56).

Atualmente, a NSE é reconhecida como o marcador tumoral mais confiável para o acompanhamento de pacientes com tumores neuroendócrinos, principalmente carcinoma de pequenas células do pulmão e neuroblastoma (57). O seu doseamento auxilia não só o diagnóstico, como também o estudo da extensão da proliferação maligna e a resposta ao tratamento. Por outro lado, níveis séricos de

NSE podem estar aumentados em casos de dano ao tecido cerebral como lesão cerebral traumática ou acidente vascular cerebral (55).

#### **Antigénio carbohidrato 72-4**

O marcador tumoral antigénio carbohidrato 72-4 (CA 72-4) é um antigénio glicoproteico libertado durante a expansão das células tumorais, nomeadamente em tumores gastrointestinais, cancro do pâncreas, endométrio e ovário (58,59).

Quando o CA 72-4 é usado em associação com outros marcadores tumorais, pode ser observado um aumento na sua sensibilidade sem alterações substanciais na especificidade geral, melhorando a possibilidade de monitorização dos pacientes. Assim, o CA 72-4 em associação com o CEA e CA 19-9 tem utilidade clínica em cancros gastrointestinais ou com o CA 125 para cancro do ovário (60). Por outro lado, algumas condições inflamatórias benignas como pancreatite, cirrose, endometriose e tumores benignos do ovário, mostraram resultar em níveis aumentados de CA 72-4 (61).

#### **Cyfra 21-1**

As citoqueratinas são um grupo de proteínas estruturais mais abundantes nas células epiteliais, que formam subunidades de filamentos intermédios. Estão principalmente envolvidas na proteção das células epiteliais ao stress mecânico e não mecânico podendo resultar em morte celular (62). O Cyfra 21-1 é um fragmento solúvel da citoqueratina 19, uma citoqueratina ácida pertencente ao tipo I, que tanto pode ser encontrada nas células epiteliais normais como malignas.

Como marcador tumoral, o Cyfra 21-1, tem utilidade clínica no diagnóstico e prognóstico no cancro do pulmão de não-pequenas células, como no carcinoma da cabeça e pescoço. Os resíduos solúveis de citoqueratina 19 podem ser libertados na corrente sanguínea após a morte das células malignas e, portanto, o seu nível correlaciona-se muito bem com a massa tumoral ou mais especificamente com a necrose tumoral (63,64). Assim, níveis elevados de Cyfra 21-1 são indicadores de mau prognóstico.

#### **Cromogranina A**

A cromogranina A (CgA) é uma proteína monomérica que está predominantemente localizada na medula adrenal, no trato gastrointestinal e na adeno-hipófise. A CgA atua como pro-hormona e após sofrer modificações pós-traducionais origina péptidos biologicamente ativos, envolvidos em diferentes funções biológicas, nomeadamente na modulação negativa da função neuroendócrina (65,66).

A principal utilidade da CgA como marcador tumoral é na avaliação de tumores neuroendócrinos, especialmente para o diagnóstico e tratamento de feocromocitoma, paraganglioma, neuroblastoma e neoplasias de origem gastroenteropancreática (65,66). A sensibilidade da CgA no diagnóstico e no tratamento de tumores de neuroendócrinos depende do grau de diferenciação da neoplasia, do sítio

primário e da extensão da doença (31,65). Por outro lado, existem várias condições não oncológicas caracterizadas por um aumento na concentração sérica de CgA, tais como o consumo de fármacos inibidores da bomba de prótons, pancreatite, hepatite crónica e doenças inflamatórias intestinais, o que afeta a especificidade do teste de forma considerável (67).

### **Metabolitos diversos**

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) envolve várias vias de *feedback* bioquímico entre o hipotálamo, a glândula hipofisária anterior e as glândulas adrenais (68). Este é o principal sistema neuroendócrino que, em conjunto com o sistema nervoso simpático, mantém a homeostasia do corpo (69). As glândulas adrenais, posicionadas bilateralmente na parte superior dos rins, apresentam funções principalmente relacionadas com a resposta ao stress. Esta glândula pode ser subdividida nas regiões do córtex e medula, com o córtex adrenal produtor de corticosteróides e a medula adrenal produtora de catecolaminas (70).

Na prática clínica, as catecolaminas plasmáticas, urinárias e os seus metabolitos são essenciais para o diagnóstico de neoplasias do sistema simpático-adrenal. O feocromocitoma e o paraganglioma são tumores neuroendócrinos raros, com origem nas células cromafins da medula suprarrenal e nos gânglios do sistema nervoso periférico, respetivamente (71,72). Estes tumores segregam catecolaminas, principalmente norepinefrina e epinefrinas, causando hipertensão, cefaleia, sudorese e palpitações (72,73).

### **2.3. Hormonas da fertilidade e da função gonadal**

A reprodução e a fertilidade são reguladas por hormonas do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG), que influenciam muitos processos relacionados com o desenvolvimento, maturação e envelhecimento (74). A continuação da espécie e o sucesso reprodutivo dependem de muitos neuropéptidos e sistemas hormonais que atuam em conjunto para garantir uma função reprodutora normal e regular o comportamento sexual (75).

Para a avaliação do funcionamento das gónadas são determinadas, na secção de Hormonologia, as seguintes hormonas: hormona luteinizante, hormona folículo estimulante, progesterona, testosterona total e livre, prolactina, estradiol, subunidade  $\beta$  da hormona gonadotrofina coriónica humana, proteína de transporte das hormonas sexuais, hormona anti-Mulleriana, dehidroepiandrostenediona-sulfato,  $\Delta 4$ -androstenediona e 17-hidroxiprogesterona.

O controlo hipotalâmico da reprodução é coordenado pela libertação da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH). A ligação e ativação do recetor da GnRH nas células gonadotrofinas da adenohipófise conduz à secreção da hormona folículo estimulante (FSH) e da hormona luteinizante (LH).

Por sua vez, as gonadotrofinas (FSH e LH) são libertadas na circulação geral para estimular a esteroidogênese, a gametogênese, a secreção de hormonas peptídicas e o crescimento das gónadas (76).

A FSH e a LH são glicoproteínas compostas por uma subunidade alfa comum e uma subunidade beta específica. Nos homens, os recetores da LH presentes nas células de Leydig e os recetores de FSH, expressos predominantemente pelas células de Sertoli, estimulam a síntese de testosterona e a maturação dos espermatozoides, respetivamente. Por outro lado, nas mulheres, a LH e a FSH são essenciais para a produção de estrogénios e progesterona. Nos ovários, a LH controla a esteroidogênese ao atuar sobre as células teca e da granulosa. Os perfis de secreção das gonadotrofinas são também sexualmente dimórficos, diferindo entre homens e mulheres. Ao passo que a secreção pulsátil de LH permanece constante no sexo masculino, esta varia ao longo do ciclo menstrual feminino, com pulsos de baixa frequência durante a fase lútea do ciclo e pulsos de alta frequência na fase folicular. A interrupção das vias de sinalização entre as gonadotrofinas e o eixo HPG estão associadas a doenças e distúrbios reprodutivos. A determinação da concentração da LH e da FSH é indicada para diagnosticar distúrbios hipofisários, para avaliar pacientes com suspeita de hipogonadismo, infertilidade e prever a ovulação.

A progesterona, uma hormona essencial no processo de reprodução, é produzida principalmente pelo corpo lúteo e placenta (77,78). Durante a idade reprodutiva feminina, as concentrações sanguíneas de progesterona são baixas na fase folicular do ciclo menstrual e, aumentam conforme o desenvolvimento do corpo lúteo (79). Caso não ocorra a fertilização do óvulo, os níveis de progesterona diminuem e o corpo lúteo regride antes de ocorrer a menstruação. A progesterona é um marcador importante para avaliar a ovulação e o corpo lúteo, no diagnóstico de infertilidade e para monitorizar a viabilidade fetal (77,80).

A testosterona, o androgénio mais abundante nos homens, é uma hormona esteroide sintetizada predominantemente nos testículos (81). Nas mulheres, pequenas quantidades de testosterona são também produzidas nos ovários. Na corrente sanguínea, a testosterona circula ligada avidamente à proteína de transporte das hormonas sexuais, fracamente ligada à albumina e como fração livre metabolicamente ativa (81,82). As indicações clínicas para a determinação da testosterona livre e total incluem deficiência na produção de androgénios nos homens, como hipogonadismo e, sinais de excesso de androgénios nas mulheres, como síndrome do ovário poliquístico (PCOS) e hirsutismo (81–83).

A prolactina é uma hormona proteica sintetizada e secretada por células especializadas da adeno-hipófise, os lactotrofos (84). A principal função atribuída à prolactina é estimular a proliferação e diferenciação das células mamárias necessárias para a lactação (85). A determinação da prolactina é indicada no diagnóstico de hiperprolactinemia, amenorreia, galactorreia e hipogonadismo (85,86).

Os estrogénios influenciam diversos sistemas presentes em ambos os sexos. Nas mulheres, o estradiol é principalmente produzido pelos folículos em desenvolvimento nos ovários, pelo corpo lúteo e pela placenta, nos homens, a produção de estradiol ocorre nos testículos (87). O estradiol regula o desenvolvimento, maturação e funcionamento do trato reprodutivo feminino. A quantificação de

estrógenos facilita a avaliação clínica de doenças como hipogonadismo, hirsutismo, PCOS, amenorreia, cancro da próstata, tumor dos testículos e do ovário (88).

A hCG (hormona gonadotrofina coriônica humana) secretada principalmente pela placenta é um análogo placentário da LH (89). No contexto de gravidez, a determinação da  $\beta$ -hCG permite monitorizar a gestação. Logo após a conceção, as células trofoblásticas começam a produzir hCG, que atua nas células do corpo lúteo para promover a produção de progesterona (80).

A proteína de transporte das hormonas sexuais (SHBG), uma glicoproteína homodimérica produzida pelos hepatócitos, tem como principal função o transporte das hormonas esteroides sexuais. A SHBG regula a biodisponibilidade dos androgénios (dihidrotestosterona e testosterona) e, com menos afinidade, a do estradiol, através das respetivas taxas de depuração metabólica (90,91). Concentrações anormalmente baixas de SHBG são frequentemente observadas em mulheres diagnosticadas com PCOS e contribuem para sintomas de hiperandrogenismo, como hirsutismo, acne, alopecia androgénica e virilização (90–92). Assim, a determinação da SHBG é importante no diagnóstico e acompanhamento de pacientes que apresentem os sintomas referidos anteriormente.

A hormona anti-mulleriana (AMH) é uma glicoproteína dimérica produzida pelas gónadas de indivíduos de ambos os géneros. Nos homens, a secreção de AMH pelas células de Sertoli é responsável pela regressão dos ductos de Muller, permitindo a diferenciação sexual masculina (93). No ovário, a libertação de AMH pelas células da granulosa ocorre somente às 36 semanas de gestação, o que permite o desenvolvimento das trompas, do útero e da parte superior da vagina, a partir dos ductos de Muller (94). Na prática clínica, a AMH é um conhecido marcador da função ovárica, em particular na avaliação do aspeto quantitativo da reserva ovárica. A AMH desempenha um papel crescente na previsão do início da menopausa, na amenorreia iatrogénica e na resposta ovárica à estimulação em técnicas de reprodução humana assistida (94,95).

A dehidroepiandrostenediona (DHEA) é uma hormona esteroide produzida no córtex adrenal a partir do colesterol. Uma porção significativa da DHEA é secretada na forma de sulfato de dehidroepiandrostenediona (DHEA-s), sendo esta a principal hormona presente na circulação (96). Nas gónadas, a DHEA atua como esteroide intermediário nas vias de síntese de testosterona e de estradiol (96,97). O metabolismo da DHEA é clinicamente significativo nas patologias que apresentam distúrbios na produção de esteroides sexuais e declínio da função gonadal (98).

A  $\Delta$ 4-androstenediona, presente nas gónadas e nas glândulas suprarrenais, é a hormona central na biossíntese de androgénios (99). O seu interesse clínico é particularmente relevante nos casos de hirsutismo e virilização, nos quais a  $\Delta$ 4-androstenediona é o único androgénio que se apresenta, frequentemente, elevado (99,100). A determinação da  $\Delta$ 4-androstenediona é útil no diagnóstico de deficiências enzimáticas na síntese de hormonas esteroides e na suspeita de tumores produtores de androgénios (100).

A 17-hidroxiprogesterona é um produto intermediário da via de síntese de hormonas esteroides formadas a partir do colesterol. A determinação da 17-hidroxiprogesterona é particularmente importante no diagnóstico de hiperplasia suprarrenal congénita, uma doença caracterizada pela deficiência hereditária de 21-hidroxilase, na qual a 17-hidroxiprogesterona é o substrato (101).

#### **2.4. Marcadores de hipertensão**

O sistema-renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é um sistema neuroendócrino complexo, responsável pela regulação da pressão arterial e homeostasia dos fluídos corporais (102,103). A ativação deste reflete os seus efeitos em todos os órgãos ao afetar a proliferação celular, a inflamação e a fibrose (104). Contudo, a desregulação do SRAA ou a ativação crónica induz hipertensão, bem como a perpetuação de uma cascata pró-inflamatória e pró-trombótica, sendo um fator importante na fisiopatologia de doenças cardiovasculares (102,104).

A cascata hormonal do SRAA inicia-se com a enzima renina, produzida a partir das células justaglomerulares do rim. Na primeira etapa, a renina regula o passo limitante do sistema, ao clivar o angiotensinogénio para formar a angiotensina I (Ang I), que por sua vez é catalisada em angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora da angiotensina (ECA) (105). Finalmente, a Ang II estimula a secreção de aldosterona a partir da glândula adrenal.

A síntese e secreção da renina é modulada pelo estado hemodinâmico, pela atividade do sistema nervoso simpático e pelas concentrações de sódio (106,107). A sua determinação apresenta relevância fisiológica e clínica em pacientes com hipertensão, sendo utilizada no rastreio de formas secundárias de hipertensão, como no hiperaldosteronismo primário (106,108).

A aldosterona é uma hormona mineralocorticóide secretada pelas glândulas suprarrenais, responsável pelos processos de reabsorção de sódio e excreção de potássio (109). A secreção excessiva de aldosterona, resultante de insuficiência adrenocortical, constitui uma das causas mais frequentes de hipertensão secundária (110). Para o rastreio desta patologia, as diretrizes de prática clínica atuais, recomendam a determinação da relação aldosterona-renina. A aldosterona pode igualmente ser determinada numa colheita de urina de 24 horas. No soro a sua concentração está dependente da produção pulsátil da hormona, enquanto que na urina de 24 horas está presente a produção diária total de aldosterona (109,111). Assim, a avaliação bioquímica das concentrações urinárias da hormona podem complementar o rastreio com informações adicionais.

## 2.5. Marcadores cardíacos

Os marcadores cardíacos desempenham uma função importante na detecção de episódios isquêmicos e dispneia cardíaca, principalmente em pacientes com síndrome coronária aguda e insuficiência cardíaca (112). O diagnóstico precoce é de extrema importância para instituir a terapia e, possivelmente, reverter o dano miocárdico.

Vários marcadores cardíacos são usados no diagnóstico e no tratamento das doenças cardiovasculares, os quais podem refletir lesão miocárdica, inflamação e remodelação cardíaca (113). Na síndrome coronária aguda, os marcadores cardíacos permitem diagnosticar precocemente episódios de enfarte do miocárdio (114). Por outro lado, na insuficiência cardíaca, os biomarcadores possibilitam a monitorização da doença a longo prazo e a seleção de uma terapia adequada (114).

Dentro da família dos péptidos natriuréticos, o péptido natriurético cerebral (ou tipo B) (BNP) é o biomarcador que auxilia o diagnóstico de ambos os tipos de insuficiência cardíaca (aguda ou crônica). A transcrição dos péptidos natriuréticos é induzida pelo aumento do fluxo sanguíneo e da pressão, que conduz ao estiramento das paredes do miocárdio (115,116). No interior dos miócitos ventriculares, o proBNP é processado proteoliticamente em BNP e no N-terminal-proBNP (NT-proBNP), na qual a porção NT-proBNP é a molécula biologicamente inativa. Na corrente sanguínea, as concentrações normais de BNP e NT-proBNP são muito baixas, contudo níveis elevados apresentam valor preditivo positivo para o diagnóstico de insuficiência cardíaca (117). A determinação do BNP/NT-proBNP é particularmente significativa quando a etiologia de dispneia não é clara (118).

As troponinas são um complexo de proteínas reguladoras que, em conjunto com os íons de cálcio, são responsáveis pela contração do músculo cardíaco (119). As isoformas T e I, denominadas troponinas cardíacas, são atualmente os biomarcadores padrão para o diagnóstico laboratorial de enfarte agudo do miocárdio, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade para lesão miocárdica (120). O ensaio para a determinação da troponina T de alta sensibilidade (hs-cTnT), exclusivo dos analisadores da Roche Diagnostics, é principalmente útil nos pacientes com enfarte do miocárdio sem elevação do segmento ST, o que possibilita o diagnóstico através de um único exame e, conseqüentemente, a aplicação de uma terapia precoce (112,121).

A mioglobina, uma hemoproteína presente nos miócitos cardíacos e nas fibras musculares esqueléticas, atua como tampão das concentrações intracelulares de oxigênio, bem como reserva de oxigênio no músculo (122). Devido ao seu baixo peso molecular, após ocorrer lesão muscular, a mioglobina é rapidamente libertada para a corrente sanguínea (123). Esta proteína tem sido o biomarcador de referência para o diagnóstico precoce de síndrome coronária aguda, uma vez que, a sua concentração plasmática aumenta na segunda hora, após o início dos sintomas (124). Contudo, nas diretrizes atuais, a

determinação da mioglobina para o diagnóstico de síndrome coronária aguda sem elevação do segmento ST não é mais aconselhada devido à ausência de especificidade cardiovascular (125).

## **2.6. Imunossupressores**

Os fármacos imunossupressores, administrados na terapia imunossupressora, permitem a redução da atividade do sistema imunitário. Esta terapia pretende prevenir uma resposta imunitária exacerbada, evitando a rejeição a um transplante de medula ou de órgão. A monitorização terapêutica de fármacos (*Therapeutic Drug Monitoring – TDM*) é essencial para manter a eficácia dos fármacos imunossupressores, ao mesmo tempo que minimiza a sua toxicidade (126). A determinação destes fármacos pode ser realizada antes ou após a administração de uma nova dosagem, permitindo, assim, avaliar a sua cinética. A TDM ajuda o clínico a individualizar a terapêutica e a ajustar as concentrações do fármaco, de modo a obter a resposta clínica desejável, reduzindo o risco de efeitos secundários dependentes da concentração do mesmo (127).

Na secção de Hormonologia são doseados os fármacos ciclosporina, tacrolimus, sirolimus e everolimus, os quais são classificados como agentes de manutenção, dado que, preveem uma profilaxia contínua contra a rejeição, ao exercer os seus efeitos nas células T e nas células plasmáticas (128).

Os imunossupressores ciclosporina e tacrolimus são um grupo de fármacos inibidores da calcineurina (CNIs). Os seus efeitos ocorrem pela ligação do fármaco a imunofilinas citoplasmáticas que resulta na inibição da atividade da calcineurina e evita a translocação do fator nuclear das células T ativadas (NFAT), envolvido na transcrição de genes de citocinas, como a interleucina-2 (IL-2) (129). A ciclosporina e o tacrolimus aumentam, ainda, a expressão do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), um potente inibidor da proliferação de linfócitos T (130). A nível celular, ambos os fármacos, apresentam efeitos semelhantes, porém, o tacrolimus parece ser mais eficiente na capacidade de inibir a IL-2 e a ativação das células T.

Por outro lado, o sirolimus e o everolimus são fármacos imunossupressores inibidores do alvo da rapamicina nos mamíferos (mTOR). Contrariamente aos CNIs, os inibidores do mTOR atuam na fase final do ciclo celular, ao impedir a progressão da fase G1 para a fase S (131). O mecanismo de imunossupressão ocorre pela interação do sirolimus com a proteína de ligação FK-12 (FKBP-12). Este complexo liga-se e modula a atividade do mTOR, e conseqüentemente, a proliferação de linfócitos em resposta à estimulação de citocinas é inibida (132). O everolimus, análogo estrutural do sirolimus, apresenta um mecanismo de ação idêntico, contudo, possui uma maior biodisponibilidade e uma semivida mais curta (131).

### **3. Controlo de qualidade**

Num laboratório clínico, o controlo de qualidade é um processo vital, que assegura a qualidade dos resultados, sendo essencial para o diagnóstico clínico, e conseqüentemente, para o paciente (133).

A qualidade dos resultados é alcançada por uma variedade de ferramentas do sistema de controlo de qualidade, incluindo o programa de controlo de qualidade interno e os programas de garantia de qualidade externa.

#### **3.1. Controlo de qualidade interno**

O controlo de qualidade interno (CQI) refere-se aos procedimentos que monitorizam e avaliam o fluxo de trabalho, de modo a identificar se está a ser executado de acordo com as especificações (134,135). O CQI garante uma vigilância contínua do sistema analítico, assegurando que os resultados são confiáveis o suficiente para serem divulgados (136).

Os gráficos de *Levey-Jennings* são utilizados para definir limites aos valores de controlo, permitindo a monitorização da variabilidade dos dados de controlo de qualidade. Estes gráficos são frequentemente aplicados com regras de *Westgard*, que implementam um conjunto de regras ou procedimentos individuais, de modo a definir critérios de rejeição e aceitação (135). Posteriormente os resultados são avaliados utilizando o programa informático *Unity-Real Time*.

Para avaliar o desempenho do método em uso, o laboratório deve calcular os seus próprios valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação. A média é um indicador de tendência central e, portanto, relacionado com a precisão ou erro sistemático. Por outro lado, o desvio padrão relaciona-se com a imprecisão ou com o erro aleatório. Relativamente à utilização do coeficiente de variação, este fornece uma melhor estimativa do desempenho do método quando comparada a precisão numa faixa de concentrações (137). Um programa de CQI com valores de desvio padrão apertados aumenta a probabilidade de um erro ser detetado pelo operador.

Dependendo do teste em causa, o CQI é efetuado diariamente ou semanalmente. O mesmo é realizado com materiais de controlo comerciais, cuja matriz é idêntica à amostra do paciente, apresentando uma faixa de concentrações previamente estabelecida, em dois ou três níveis, de forma a cobrir diferentes níveis de decisão médica (136). O CQI pode ainda ser subdividido em dependente ou independente. O CQI dependente é comercializado pela mesma entidade do analisador utilizado no laboratório clínico, contrariamente o CQI independente é comercializado por uma entidade diferente. A utilização de um CQI independente, garante uma maior confiança na qualidade dos resultados, uma vez que este é produzido de modo independente dos reagentes, calibradores e analisador que são utilizados no laboratório.

### **3.2. Garantia de qualidade externa**

A garantia de qualidade externa (GQE), avalia o desempenho analítico do laboratório em relação a padrões de referência, laboratórios acreditados ou por comparação entre laboratórios que usam o mesmo método ou equipamento (138).

Nos programas de GQE, o laboratório analisa amostras controlo facultadas por uma entidade externa, num intervalo de tempo predefinido, que na secção de Hormonologia é uma vez por mês (136). Esta secção participa em três programas de GQE, sendo eles o *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS), *External Quality Assurance Services* (EQAS) e *National External Quality Assessment Scheme* (NEQAS).

## **4. Metodologia**

Os parâmetros analíticos estudados na secção de Hormonologia são determinados, principalmente, em equipamentos automatizados que utilizam técnicas de eletroquimioluminescência e quimioluminescência. No entanto, alguns analitos são analisados em cromatografia líquida de alta eficiência.

### **4.1. Imunoensaio**

O imunoensaio é uma técnica analítica comumente utilizada em laboratórios clínicos, por definição, há a formação de um imunocomplexo que é resultante da interação entre um antigénio e um anticorpo (139). De acordo com os diferentes modos de reação, os imunoensaios podem ser divididos em “imunoensaio *sandwich*” e “imunoensaio competitivo”.

- **Imunoensaio *sandwich***

No imunoensaio do tipo *sandwich* são utilizados dois anticorpos, em que ambos são complementares ao antigénio a detetar (140). Numa primeira etapa, ocorre interação entre um anticorpo primário e o antigénio de interesse. Posteriormente, a adição de um segundo anticorpo acoplado a um marcador, uma molécula produtora de sinal, forma o imunocomplexo em *sandwich*.

Este método apresenta uma alta especificidade, assim como alta seletividade devido ao uso de anticorpos combinados (139). Consequentemente, é direcionado a moléculas grandes que exibam uma área de superfície suficiente para permitir a ligação de dois anticorpos.

Nesta técnica a quantidade de antigénio na amostra é diretamente proporcional ao sinal obtido. Logo, um sinal elevado indica que o antigénio de interesse está presente na amostra, a uma concentração alta.

- **Imunoensaio competitivo**

O imunoensaio do tipo competitivo é indicado para moléculas com baixo peso molecular. Esta técnica emprega um anticorpo que está presente em quantidade limitada, o antigénio de interesse, e um antigénio marcado com um material produtor de sinal, podendo ser isótopos radioativos, enzimas ou fluoróforos (139). Estes constituintes interagem entre si e ambos os antigénios competem pela ligação ao anticorpo.

No fim da reação, a proporção de antigénio que estabeleceu interação com os locais limitados do anticorpo é inversamente proporcional à concentração de analito na amostra.

#### **4.1.1. Imunoensaio de eletroquimioluminescência (ECLIA)**

A luminescência corresponde à emissão de luz quando um eletrão num nível excitado ou superior de energia regressa ao seu estado fundamental (141,142). Na eletroquimioluminescência, a reação é electroquimicamente estimulada, na superfície de um eléctrodo, pela aplicação de uma corrente elétrica (143). O imunoensaio de eletroquimioluminescência é a principal técnica de deteção de imunocomplexos utilizada na secção de Hormonologia.

A eletroquimioluminescência, princípio base dos analisadores Cobas 8000 e Cobas e411, é independente do modo de formação do imunocomplexo (competitivo ou *sandwich*). Este sistema recorre ao uso de dois anticorpos monoclonais específicos do antigénio, um anticorpo biotinilado e outro marcado com um complexo de ruténio. Na primeira incubação, a reação inicia-se entre os dois anticorpos e a amostra do paciente. Posteriormente, ao imunocomplexo posicionado num eléctrodo, são adicionadas micropartículas de estreptavidina, que sob a ação de um campo magnético, permite a separação das frações ligadas e livres. A utilização de uma solução de lavagem tem como função não só remover os constituintes não ligados, como também, adicionar à reação a molécula tripropilamina (TPA). Na etapa final, o sinal quimioluminescente produzido é devido à aplicação de corrente elétrica que conduz tanto à excitação do ruténio como à libertação de um radical de TPA, que atua como redutor (143). O sinal quimioluminescente resultante da reação é então detetado por um fotomultiplicador.

#### **4.1.2. Imunoensaio de quimioluminescência (CLIA)**

Na quimioluminescência, a energia emitida sobre a forma de luz é produzida através de uma reação química, que envolve a oxidação de um composto orgânico por um agente oxidante (140,142). A técnica de quimioluminescência (CL) combinada com um imunoensaio (IA), é o método base dos analisadores UniCel DxI 800 e MAGLUMI 600.

O analisador UniCel DxI 800 utiliza a molécula quimioluminescente dioxetano para detectar e quantificar reações imunológicas. A reação envolve anticorpos conjugados com fosfatase alcalina e partículas paramagnéticas revestidas com anticorpos, em que ambos são dirigidos ao antígeno de interesse. À semelhança do ECLIA, estes constituintes são incubados com a amostra do paciente, permitindo a formação de um imunocomplexo. De seguida, a adição do substrato quimioluminescente dioxetano permite quantificar o analito marcado com fosfatase alcalina (144). A luz emitida pelo produto de reação, expressa em unidades relativas de luz (RLUs), é detetada através de um luminómetro. Posteriormente, o resultado é interpretado consoante os valores de *cutoff* estabelecidos pela calibração.

O analisador MAGLUMI 600, utiliza a molécula *amino-butyl-ethyl-isoluminol* (ABEI) como reagente quimioluminescente para marcar diretamente o antígeno ou anticorpo, sem a necessidade de utilização de uma enzima (145). Neste imunoensaio, a formação do imunocomplexo ocorre pela interação de anticorpos contra o analito pretendido, no qual fazem parte partículas paramagnéticas, um anticorpo marcado com ABEI e um outro marcado com *fluorescein isothiocyanate* (FITC). A reação por quimioluminescência ocorre quando são adicionadas ao imunocomplexo duas soluções ativadoras. Contrariamente ao analisador UniCel DxI 800, o sinal de luz é detetado por um fotomultiplicador.

#### **4.1.3. Time Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE)**

A tecnologia TRACE, presente exclusivamente nos analisadores Kryptor®, está assente na transferência de energia não radioativa entre duas moléculas fluorescentes, como resultado de uma reação entre um anticorpo e um antígeno (146). Quando a amostra é excitada, a formação do imunocomplexo em *sandwich* permite a transferência de energia de uma molécula doadora (fluorocromo de criptato de európio) para uma molécula recetora (fluorocromo XL 665), resultando na emissão de um sinal de fluorescência. A fluorescência específica, que é proporcional à concentração de antígeno, poderá ser obtida tanto por seleção espectral, em que ocorre uma separação em função do comprimento de onda, como por seleção temporal, ao longo da emissão do sinal de fluorescência (147).

## **4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

A HPLC, uma técnica avançada de cromatografia líquida, é utilizada para separar uma mistura complexa, a fim de conhecer individualmente o papel das moléculas (148). Neste método de separação físico-químico, os componentes a serem separados estão distribuídos entre duas fases imiscíveis, uma fase móvel (FM) líquida que se desloca através de uma fase estacionária (FE). Assim, os compostos que apresentam mais afinidade para com a FM irão ser eluídos mais rapidamente do que aqueles que estabelecem interações mais fortes com a FE (149).

O Agilent 1260 infinity, equipamento de HPLC utilizado na secção de Hormonologia, permite a separação de amostras de urina de 24 horas através de cromatografia em fase reversa. Neste equipamento, a FM de concentração constante (isocrática) é bombeada a alta pressão, deslocando os componentes da amostra através da coluna e, de acordo com a afinidade, entre a FM e a FE ocorre a separação dos constituintes. Após a coluna cromatográfica, os analitos atingem um detetor eletroquímico do tipo amperométrico. Este tipo de detecção baseia-se na propriedade de um composto sofrer oxidação ou redução num elétrodo, quando aplicado um potencial (150). Ao atingirem o detetor, os analitos produzem uma certa diferença de potencial, que posteriormente é exibida num cromatograma sob a forma de picos. No cromatograma, a área dos picos é proporcional à concentração de analito.

## **4.3. Amostras**

Na secção de Hormonologia, os parâmetros bioquímicos são maioritariamente determinados em amostras de soro. Porém, alguns analitos específicos são doseados em amostras de plasma, sangue total ou urina de 24 horas (Anexo 1 – Parâmetros analíticos e respetiva metodologia).

O soro é obtido a partir de sangue colhido para um tubo sem anticoagulante que, no seu interior, contém partículas que ativam a coagulação e um gel separador. Após ocorrer a formação do coágulo, o tubo é centrifugado a 4500 rpm durante oito minutos, permitindo a separação do soro dos restantes elementos celulares. Neste processo, o coágulo é formado pela conversão do fibrinogénio em fibrina, o que leva à conseqüente agregação de glóbulos vermelhos, leucócitos e plaquetas à matriz de fibrina (151).

Relativamente à colheita para obtenção de plasma, esta é efetuada num tubo com o anticoagulante K<sub>2</sub>EDTA (ácido etilenodiaminotetracético dipotássico), sendo de seguida centrifugado a 2600 rpm durante seis minutos. Contrariamente ao soro, o plasma apresenta fibrinogénio e os fatores de coagulação, a formação do coágulo é inibida devido à presença de anticoagulante no tubo de colheita (151). As amostras de plasma para determinação da paratormona, hormona adrenocorticotrófica, metanefrina e normetanefrina, requerem centrifugação e conservação da amostra a baixa temperatura, uma vez que após a colheita, estes metabolitos apresentam-se instáveis devido à degradação proteolítica (152,153).

Contudo, no caso específico da renina, quando o doseamento não é realizado imediatamente após a colheita, o plasma obtido deve ser congelado. Este procedimento evita a transformação enzimática da prorenina a renina que pode ocorrer a baixas temperaturas, nomeadamente entre 0 e 4 °C (153).

As amostras de sangue total, utilizadas para o doseamento de fármacos imunossupressores, são obtidas pelo mesmo método empregue na colheita de plasma. Os fármacos imunossupressores estão fortemente ligados às proteínas plasmáticas nos eritrócitos (154). Assim, é necessário um pré-tratamento da amostra de sangue total, com um reagente que permita a lise das células sanguíneas e precipitação das proteínas, de modo a extrair o analito (155).

Na urina de 24 horas, colhida pelo paciente, é possível quantificar cortisol, péptido C, aldosterona, metanefrinas, catecolaminas, ácido vanilmandélico, ácido homovanílico e ácido 5-hidroxi-indolacético. Para uma colheita correta, o paciente deve rejeitar a primeira urina da manhã e recolher no frasco todas as micções posteriores, até às 24 horas correspondentes. Durante o período de recolha, o frasco contendo a urina, deverá ser armazenado no frigorífico. O doseamento de metanefrinas, catecolaminas, ácido vanilmandélico, ácido homovanílico e ácido 5-hidroxi-indolacético, requer ao paciente, adicionalmente, o cumprimento de uma restrição alimentar, dois dias antes e durante o dia da colheita, uma vez que alguns alimentos interferem com os metabolitos a analisar (Anexo 2 – Restrições alimentares).

## **5. Conclusão**

Nas diversas áreas de trabalho da secção de Hormonologia, este estágio promoveu uma aprendizagem não só de cariz prático, como também teórico, o que fomentou a consolidação dos conhecimentos adquiridos durante a fase curricular do Mestrado em Bioquímica em Saúde. A integração no meio profissional e o contacto com outros profissionais de saúde permitiu desenvolver a capacidade de trabalhar em equipa e, igualmente, de trabalho autónomo.

A aprendizagem foi aprofundada com recurso a documentos necessários à atividade do laboratório, tais como bulas de equipamentos e reagentes, protocolos e bibliografia recomendada. Foram adquiridos conhecimentos que habilitaram o manuseio de diversos equipamentos e amostras. No âmbito da rotina laboratorial, participei ativamente no processo de certificação do serviço, através da identificação de situações que promoveram a melhoria da fase analítica, nomeadamente a avaliação do CQI e a validação técnica ou analítica dos resultados.

A oportunidade de estagiar neste laboratório foi essencial para compreender a dinâmica e a importância do Serviço de Patologia Clínica no funcionamento do Hospital Dr. Nélio Mendonça e no tratamento dos doentes.

## **Capítulo 2 – Testes bioquímicos de rastreio pré-natal**

## 1. Introdução

No rastreio pré-natal é possível identificar malformações causadas por cromossomopatias, através de testes de rastreio não invasivos, como o doseamento de marcadores séricos maternos (156). As alterações cromossômicas mais comuns são a trissomia 21 (síndrome de Down), trissomia 13 (síndrome de Patau), trissomia 18 (síndrome de Edward) e monossomia X (157–159).

No primeiro trimestre, entre a 10<sup>a</sup> e a 13<sup>a</sup> semanas e 6 dias de gestação, a realização de testes de rastreio pré-natal é direcionada para permitir a oportunidade de intervenção precoce (156). O rastreio numa fase inicial da gestação oferece tempo aos pais e à equipa médica para interpretar os resultados e tomar decisões sobre cuidados adicionais à gravidez que podem incluir a adição de testes de diagnóstico, aconselhamento genético ou interrupção da gravidez se desejado (160).

Os principais marcadores bioquímicos a serem considerados para os testes bioquímicos de rastreio pré-natal do 1<sup>o</sup> trimestre de gravidez incluem a proteína plasmática A associada à gravidez e a fração livre da subunidade  $\beta$  da hormona gonadotrofina coriônica humana.

A proteína plasmática A associada à gravidez (PAPP-A) é uma glicoproteína secretada para a corrente sanguínea materna desde uma fase precoce da gravidez (161). A sua produção primordial é efetuada pela placenta, contudo, vários órgãos não reprodutores incluindo colón, mama, rim e múltiplos tecidos como células musculares lisas e osteoblastos, também expressam esta proteína (162). A função primária da PAPP-A é aumentar a biodisponibilidade do fator de crescimento tipo insulina (*insulin-like growth factor* – IGF) (163). O eixo IGF é responsável por uma placentação normal, facilitando o transporte de glicose e aminoácidos para a placenta, e pela regulação *major* do crescimento fetal tanto ao longo da gravidez como no período pós-natal (161,162).

A hormona gonadotrofina coriônica humana (hCG), uma glicoproteína heterodimérica, é composta por duas subunidades: uma subunidade  $\alpha$  muito conservada, comum a outras gonadotrofinas, e uma subunidade  $\beta$  (164). Embora ambas as subunidades sejam necessárias para a atividade biológica da hormona, apenas a subunidade  $\beta$ , por ser específica da hormona, confere propriedades biológicas e imunológicas (165). Esta hormona está presente nos fluídos biológicos em diferentes isoformas, incluindo a fração livre da subunidade  $\beta$  da hCG ( $\beta$ -hCG livre). A  $\beta$ -hCG é produzida em grande quantidade por células sinciotrofoblásticas durante o período gestacional, sendo essencial para a manutenção da gravidez, nomeadamente, na atividade endócrina do corpo lúteo e na produção de progesterona (166). Como marcador de rastreio de aneuploidias, no primeiro trimestre, o doseamento da  $\beta$ -hCG livre é mais específico do que a subunidade  $\beta$  da hCG (158,167).

## **2. Análise estatística**

Na Região Autónoma da Madeira (RAM), os testes bioquímicos de rastreio pré-natal do 1º trimestre de gravidez são realizados principalmente no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, sendo que uma percentagem ínfima de pacientes recorre a entidades localizadas fora da região, para a realização destes testes.

Em 2020, ano decretado pandemia mundial causada por uma nova forma de coronavírus, a Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), segundo dados do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), através do Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN), em Portugal, verificou-se uma tendência decrescente no número de nascimentos. Assim, como primeiro objetivo deste estudo, pretende-se analisar os testes de rastreio bioquímico que ocorreram entre junho de 2019 a janeiro de 2020 e entre junho de 2020 a janeiro de 2021, no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça.

Posteriormente, no período total do estudo, pretende-se estudar o comportamento dos testes bioquímicos de rastreio pré-natal ao longo do período gestacional e nos diferentes grupos etários, confrontando os resultados com valores de referência e com a literatura existente.

### **2.1. Objetivos**

- Comparar o número de gestações, variação nos meses, idades maternas e grupo etário em dois períodos diferentes: período anterior à pandemia (período normal) e período de pandemia.
- Comparar os valores resultantes da PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre nas diferentes semanas de gestação com os valores de referência.

### **2.2. Metodologia**

#### **2.2.1. Tipo de estudo**

Estudo observacional analítico transversal.

### **2.2.2. Amostra em estudo**

A amostra é constituída por mulheres grávidas que realizaram os testes bioquímicos de rastreio pré-natal, no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, no período de junho de 2019 a janeiro de 2020 e de junho 2020 a janeiro de 2021.

### **2.2.3. Critérios de inclusão e exclusão**

Foram definidos como critérios de inclusão as mulheres que apresentavam informação clínica referente às variáveis em estudo, no período de junho de 2019 a janeiro de 2020 e de junho 2020 a janeiro de 2021.

Como critérios de exclusão definiu-se a ausência de dados referentes às variáveis em estudo e os casos em que os testes bioquímicos foram realizados antes da 11<sup>a</sup> semana de gestação. No total foram excluídos 3 casos.

### **2.2.4. Variáveis em estudo**

- **Data** – variável qualitativa ordinal

A recolha de dados compreende dois períodos de tempo, classificados do seguinte modo:

- Período normal (compreendido entre junho de 2019 e janeiro de 2020).
- Período de pandemia (compreendido entre junho de 2020 e janeiro de 2021).

- **Idade** – variável quantitativa contínua, expressa em anos.

- **Grupo etário** – variável qualitativa ordinal, obtida através da categorização da variável contínua idade.

Agrupados do seguinte modo:

- Grupo I – grávidas com idade inferior a 20 anos.
- Grupo II – grávidas com idades compreendidas entre os 20 e os 29 anos.
- Grupo III – grávidas com idades compreendidas entre os 30 e os 35 anos.
- Grupo IV – grávidas com idade superior a 35 anos.

- **Proteína plasmática A associada à gravidez (PAPP-A)** – Variável quantitativa contínua, expressa em IU/L.
  
- **Fração livre da subunidade  $\beta$  da hormona gonadotrofina coriónica humana ( $\beta$ -hCG livre)**  
– Variável quantitativa contínua, expressa em IU/L.
  
- **Período de gestação** – Variável quantitativa contínua
  - 10<sup>a</sup> semana de gestação – período de gestação da 10<sup>a</sup> semana e 1 dia até 10<sup>a</sup> semana e 6 dias.
  - 11<sup>a</sup> semana de gestação – período de gestação da 11<sup>a</sup> semana e 1 dia até 11<sup>a</sup> semana e 6 dias.
  - 12<sup>a</sup> semana de gestação – período de gestação da 12<sup>a</sup> semana e 1 dia até 12<sup>a</sup> semana e 6 dias.
  - 13<sup>a</sup> semana de gestação – período de gestação da 13<sup>a</sup> semana e 1 dia até 13<sup>a</sup> semana e 6 dias.
  - 14<sup>a</sup> semana de gestação – período de gestação da 14<sup>a</sup> semana e 1 dia até 14<sup>a</sup> semana e 6 dias.

### **2.2.5. Considerações éticas**

Toda a informação utilizada neste estudo baseia-se em dados secundários, que não comprometem a identidade dos pacientes, respeitando o anonimato e confidencialidade dos dados de cada indivíduo envolvido no estudo.

Foi solicitado à Diretora do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, autorização para o acesso às informações necessárias à obtenção dos dados para a realização do estudo.

Este estudo decorreu de acordo com os pressupostos da Declaração de Helsínquia.

### **2.2.6. Análise e tratamento de dados**

O tratamento dos dados foi realizado com recurso aos programas estatísticos *Microsoft Excel 365®* e *SPSS® (Statistical Package for Social Sciences)*, versão 27.0 para *Windows*.

Para verificar a normalidade dos dados foi aplicado o teste *Kolmogorov-Smirnov*, com correção de Lilliefors (Tabela 1). Foram definidas as seguintes hipóteses nula ( $H_0$ ) e alternativa ( $H_1$ ):

H<sub>0</sub>: As variáveis em estudo seguem uma distribuição normal.

H<sub>1</sub>: As variáveis em estudo não seguem uma distribuição normal.

Tabela 1 - Testes de normalidade

	Testes de Normalidade					
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.
β-hCG livre	,212	1169	,000	,480	1169	,000
PAPP-A	,115	1169	,000	,833	1169	,000
Período de gestação	,107	1169	,000	,977	1169	,000
Idade utente	,071	1169	,000	,986	1169	,000
Data	,154	1169	,000	,901	1169	,000

a. Correlação de Significância de Lilliefors

De acordo com os resultados obtidos, como  $p\text{-value} \approx 0 < 0,05$  rejeita-se H<sub>0</sub>. Não existem evidências estatísticas para afirmar que as variáveis em estudo seguem uma distribuição normal. Sendo por isto utilizados testes não paramétricos nas análises seguintes.

### 3. Resultados

#### 3.1. Variáveis sociodemográficas

Durante o período do estudo 1169 gestantes realizaram os testes bioquímicos de rastreio pré-natal, no Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça (Tabela 2). Destas, 698 pacientes incluem-se no período normal, uma vez que, realizaram os testes de rastreio entre junho de 2019 a janeiro de 2020 e, 471 mulheres no período de pandemia.

Tabela 2 - Número de gestações por período.

	N
Período normal	698
Período de pandemia	471
Total	1169

Na distribuição dos dados por meses (Figura 1) verifica-se que o número de gestações foi sempre superior no período normal, comparativamente ao período pandémico. No período normal, os meses de julho e janeiro apresentaram o maior número de gestações, 104 e 107, respetivamente, representando 30% do total de gestações. Relativamente ao período de pandemia, foi no mês de dezembro que se observou o valor mais elevado de gestações, nomeadamente, 67 gestações.

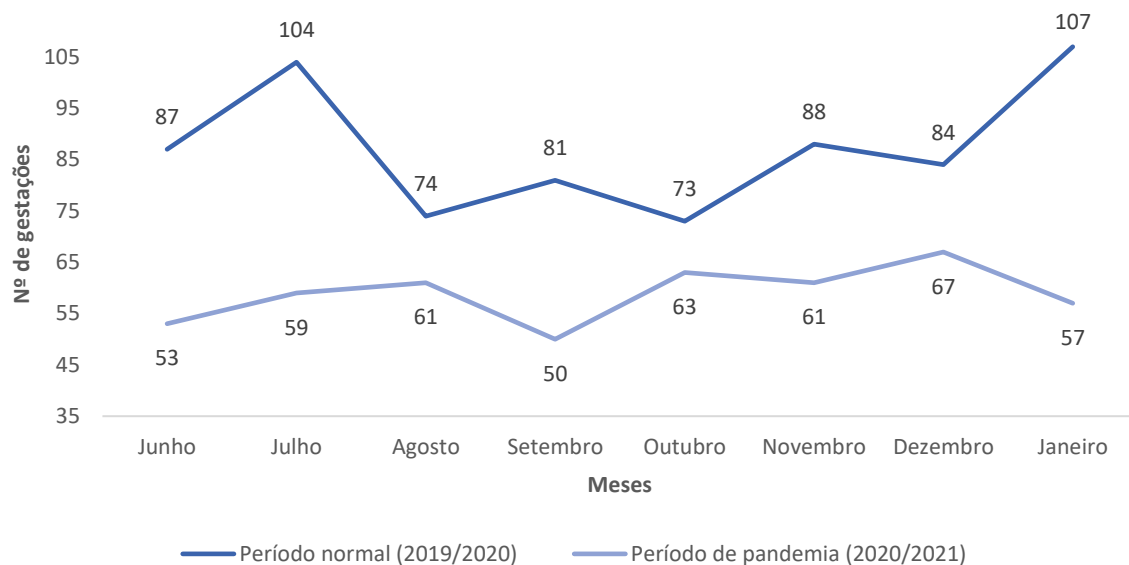


Figura 1 – Distribuição do nº de gestações por meses.

Na caracterização da amostra em função da idade (Tabela 3), no período normal, a amostra apresentou uma mediana de 31 anos (média de 30,77 anos e desvio padrão de 6,20), com um mínimo de 14 anos e máximo de 48 anos. Por outro lado, a idade mediana materna, no período de pandemia, foi igualmente 31 anos (média de 30,96 e desvio padrão 5,91) com um mínimo de 15 anos e máximo de 44 anos. Relativamente à amplitude, foi de 34 e 29, no período normal e no período de pandemia, respetivamente.

Tabela 3 – Caracterização da amostra em função da idade.

	Idade						
	Média	Desvio padrão	Mediana	Variância	Mínimo	Máximo	Amplitude
Período normal	30,77	6,20	31,00	38,47	14	48	34
Período de pandemia	30,96	5,91	31,00	34,88	15	44	29

Do total de 1169 pacientes submetidas aos testes de rastreio, 834 grávidas apresentaram idades compreendidas entre os 20 e os 35 anos, sendo os grupos II e III as classes etárias com mais gestantes (Figura 2). Contrariamente, as grávidas com idades inferiores a 20 anos foram o grupo onde se verificou o menor número de gestações, com 32 casos no período normal e 14 no período de pandemia.

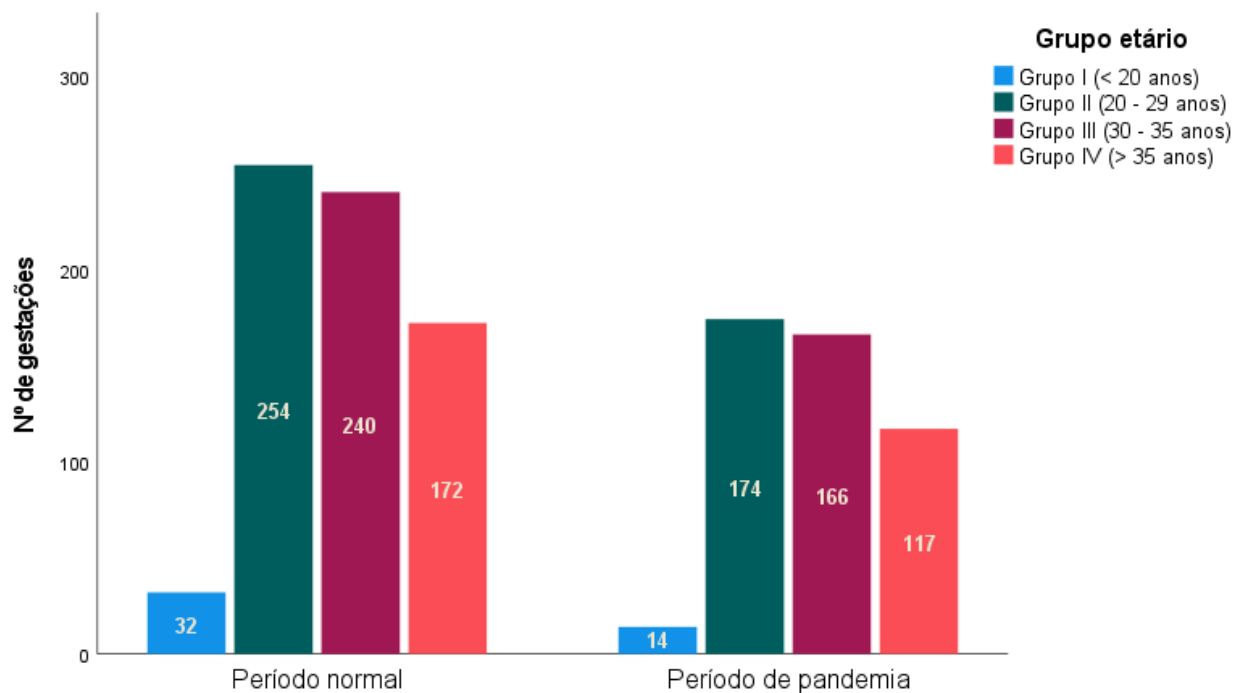


Figura 2 - Caracterização da amostra em função do grupo etário.

### 3.2. Variáveis clínicas

As distribuições das variáveis clínicas selecionadas para análise estão descritas na Tabela 4. No 1º trimestre de gravidez, a determinação da PAPP-A e da  $\beta$ -hCG livre ocorreu majoritariamente à 12ª semana de gestação (51,7%) seguida da 13ª semana (29,7%). Relativamente ao grupo etário, as gestações ocorreram principalmente em mulheres com idades compreendidas entre os 20 e os 35 anos (71,3%).

Tabela 4 - Distribuição da PAPP-A e da  $\beta$ -hCG livre por período de gestação e grupo etário.

		PAPP-A / $\beta$ -hCG livre	
		N	% de N
Período de gestação	10ª Semana gestação	21	1,8%
	11ª Semana gestação	170	14,5%
	12ª Semana gestação	604	51,7%
	13ª Semana gestação	347	29,7%
	14ª Semana gestação	27	2,3%
Grupo etário	Grupo I (< 20 anos)	46	3,9%
	Grupo II (20 - 29 anos)	428	36,6%
	Grupo III (30 - 35 anos)	406	34,7%
	Grupo IV (> 35 anos)	289	24,7%

### 3.2.1. Proteína plasmática A associada à gravidez (PAPP-A)

Os resultados das concentrações da PAPP-A nos diferentes grupos etários apresentam-se descritos na Tabela 5. A média registada deste marcador foi superior no grupo III (4,33) e inferior no grupo II (3,66).

Tabela 5 – Valores da PAPP-A em função do grupo etário.

	PAPP-A (IU/L)				
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Grupo I (< 20 anos)	4.28	3.10	4.86	.66	32.40
Grupo II (20 - 29 anos)	3.66	3.05	2.34	.37	14.77
Grupo III (30 - 35 anos)	4.33	3.71	2.89	.54	19.60
Grupo IV (> 35 anos)	4.20	3.43	3.02	.13	20.66

Como intuito de se verificar a existência de diferenças na concentração da PAPP-A segundo a faixa etária das gestantes, utilizou-se o teste de *Kruskal-Wallis* ( $H_0$ : a concentração da PAPP-A apresenta uma distribuição idêntica para cada um dos grupos etários;  $H_1$ : a concentração da PAPP-A não apresenta uma distribuição idêntica para cada um dos grupos etários). Os resultados obtidos na Tabela 6 permitem-nos rejeitar a hipótese nula e aceitar a hipótese alternativa, verificando-se a existência de diferenças significativas entre o Grupo II e o Grupo III (resultados salientados a negrito na tabela).

Tabela 6 – Comparações por *Método Pairwise* de grupo etário para o marcador bioquímico PAPP-A. O nível de significância é 0,05.

Grupo etário	Nível de significância
Grupo II - Grupo I	1,000
Grupo II - Grupo IV	,242
Grupo II - Grupo III	<b>,003</b>
Grupo I - Grupo IV	1,000
Grupo I - Grupo III	1,000
Grupo IV - Grupo III	1,000

Durante o primeiro trimestre de gravidez observou-se que os níveis médios da PAPP-A aumentaram com a idade gestacional (Tabela 7). A 14ª semana de gestação apresentou a média mais elevada para o marcador bioquímico PAPP-A, porém, foi na 11ª semana que se identificou o valor máximo (32.40).

Tabela 7 – Variação da PAPP-A em função do período de gestação.

	PAPP-A (IU/L)					
	Média	Desvio padrão	Máximo	Mínimo	Percentil 05	Percentil 95
10ª Semana gestação	1.53	.76	3.35	.37	.54	3.19
11ª Semana gestação	2.67	2.76	32.40	.45	.72	5.87
12ª Semana gestação	3.67	2.19	17.38	.13	1.01	7.60
13ª Semana gestação	5.25	3.17	20.66	.72	1.45	11.43
14ª Semana gestação	7.79	4.04	19.60	3.23	3.76	18.29

Na Figura 3 encontram-se os diagramas em caixa de bigodes da variável clínica PAPP-A nos diferentes períodos de gestação, nos quais a presença de *outliers* superiores foi observada em todas as semanas de gestação. Na 11ª semana de gestação a concentração da PAPP-A de 32,40 IU/L foi considerada *outlier* severo superior, sendo igualmente o maior valor da amostra global.

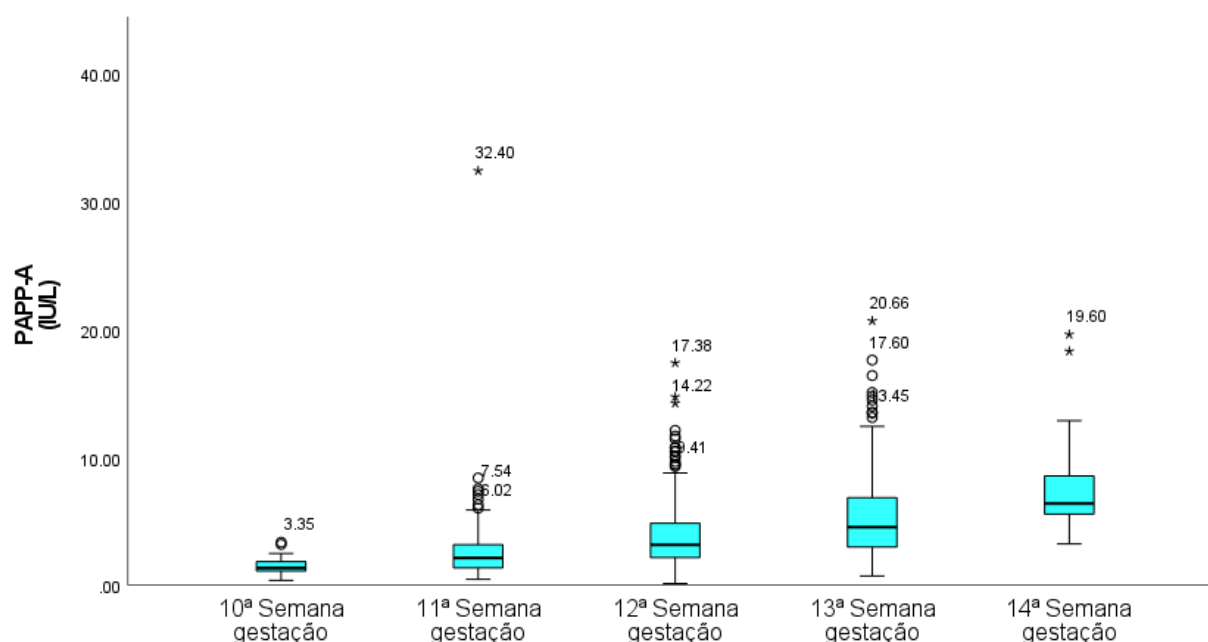


Figura 3 – Diagramas em caixas de bigodes dos níveis de PAPP-A em relação ao período de gestação.

### 3.2.2. Fração livre da subunidade $\beta$ da hormona gonadotrofina coriônica humana ( $\beta$ -hCG livre)

A distribuição da  $\beta$ -hCG livre em função do grupo etário está descrita na Tabela 8. Esta variável clínica apresentou a concentração média mais elevada no grupo II (46.33) seguida do grupo IV (42.75).

Tabela 8 – Valores da  $\beta$ -hCG livre em função do grupo etário.

	$\beta$ -hCG livre (IU/L)				
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Grupo I (< 20 anos)	40.18	33.10	23.75	2.40	115.50
Grupo II (20 - 29 anos)	46.33	33.50	59.96	4.70	779.30
Grupo III (30 - 35 anos)	38.87	31.80	25.72	6.90	166.70
Grupo IV (> 35 anos)	42.75	34.10	38.97	3.20	493.30

O teste de *Kruskal-Wallis* foi igualmente utilizado para verificar a existência de diferenças entre a concentração da  $\beta$ -hCG livre e a faixa etária das gestantes. A seguinte hipótese nula foi assumida:  $H_0$ : a concentração da  $\beta$ -hCG livre apresenta uma distribuição idêntica para cada um dos grupos etários. Os resultados obtidos indicam que não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas nas concentrações da  $\beta$ -hCG livre entre as grávidas com diferentes faixas etárias (por apresentarem valores- $p$  de  $0.534 > 0.05$ ).

Em relação ao período de gestação (Tabela 9), a variável clínica  $\beta$ -hCG livre apresentou um comportamento inverso ao observado na PAPP-A, em que os valores médios decrescem ao longo da idade gestacional.

Tabela 9 – Variação da  $\beta$ -hCG livre em função do período de gestação.

	$\beta$ -hCG livre (IU/L)					
	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 05	Percentil 95
10ª Semana gestação	54.95	26.86	20.40	123.00	25.90	100.70
11ª Semana gestação	56.40	74.34	2.40	715.30	14.70	118.10
12ª Semana gestação	42.09	41.94	4.70	779.30	12.30	100.30
13ª Semana gestação	37.09	24.63	6.90	206.20	12.20	89.50
14ª Semana gestação	28.82	16.58	8.70	75.80	13.00	62.70

No que concerne à análise dos diagramas em caixas de bigodes dos níveis da  $\beta$ -hCG livre em relação ao período de gestação (Figura 4), a presença de *outliers* superiores foi observada em todas as semanas de gestação. Na 12ª semana de gestação observam-se dois *outliers* severos superiores, sendo 779,30 o valor máximo da amostra global.

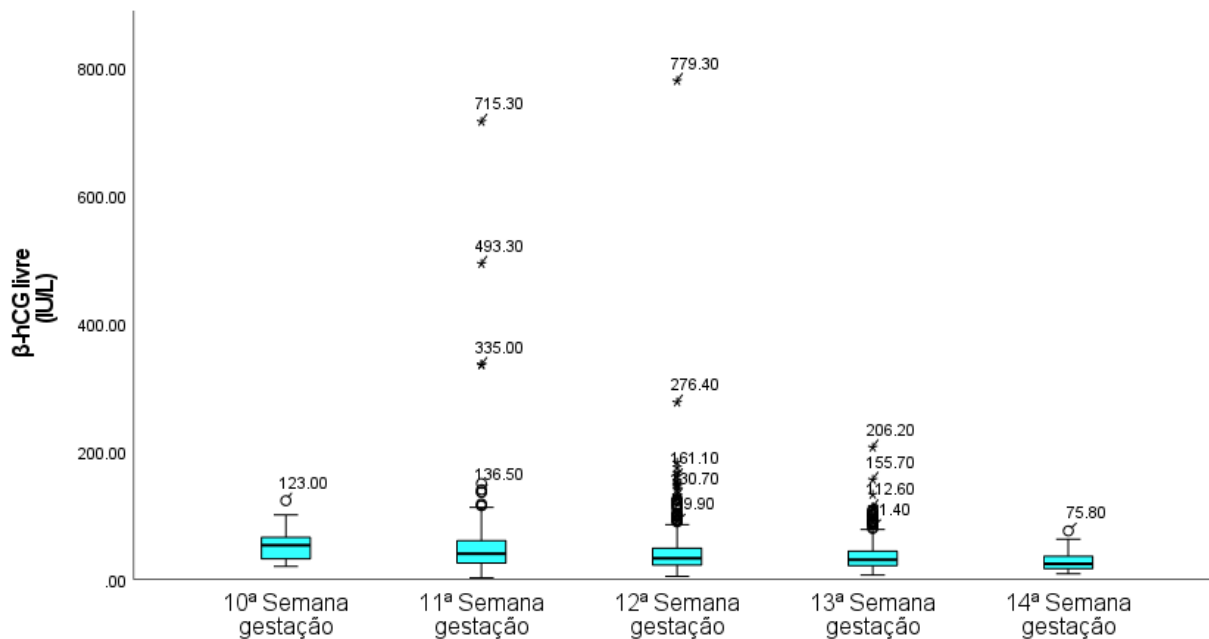


Figura 4 – Diagramas em caixas de bigodes dos níveis de  $\beta$ -hCG livre em relação ao período de gestação.

#### 4. Discussão

No laboratório do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, nos dois períodos homólogos compreendidos entre junho de 2019 e janeiro de 2021, os testes bioquímicos de rastreio pré-natal do 1º trimestre foram realizados a 1169 gestantes. A recolha dos dados em dois períodos distintos permitiu evidenciar uma redução no número de gestações no período de pandemia, comparativamente com o período homólogo do ano anterior. Ainda neste período, o número de gestações reduziu para 471, sendo julho e setembro de 2020 os meses que apresentaram os dados mais reduzidos. Segundo dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), no ano de 2020 entre os meses de julho e dezembro observou-se uma tendência decrescente no número de nados-vivos, comparativamente com o período homólogo de 2019, sendo esta variação mais acentuada em dezembro de 2020, correspondendo ao mês de nascimento de nados-vivos concebidos já em período de pandemia (168).

Nos oito meses em que decorreu este estudo, a idade média materna situou-se nos 31 anos, resultados que estão em concordância com os dados mais recentes do INE (169). Verificou-se que o número de gestações foi mais prevalente nas mulheres com idades compreendidas entre os 20 e os 35 anos. De modo geral, a idade em que a mulher engravida tem vindo a aumentar progressivamente, quer seja por motivos profissionais, educacionais, financeiros e pessoais ou para adquirir estabilidade no relacionamento conjugal antes de planear uma gravidez (167,170,171).

A análise do marcador bioquímico PAPP-A em função da idade materna, mostrou concentrações médias similares (Tabela 5). A partir do teste de *Kruskal-Wallis* foi possível observar que a concentração da PAPP-A não apresentou uma distribuição idêntica para cada um dos grupos etários, sendo observadas concentrações mais elevadas da PAPP-A nas idades compreendidas entre os 30 e os 35 anos. Em relação à  $\beta$ -hCG livre (Tabela 8), as concentrações da hormona apresentaram alguma variação nos diferentes grupos etários, porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre estas variáveis. Wright, D *et al.*(172) constatou que os níveis de  $\beta$ -hCG livre aumentaram em função da idade apenas no segundo e no terceiro trimestre. A gravidez em idades cada vez mais tardias está associada a risco e complicações. Contudo, neste estudo os resultados obtidos não apresentaram evidência estatística para afirmar que a variável idade influencia as concentrações dos marcadores bioquímicos PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre entre os grupos etários III e IV.

Após uma abordagem individualizada da amostra de grávidas que realizaram os testes de rastreio, estudou-se as variáveis clínicas  $\beta$ -hCG livre e PAPP-A no período total em que decorreu a análise. Os marcadores bioquímicos foram determinados principalmente na 12<sup>a</sup> e na 13<sup>a</sup> semana gestacional, o que está em concordância com o trabalho desenvolvido por Karadzov-Orlić, Natasa *et al.*(158). Os autores defendem a realização dos testes à 12<sup>a</sup> semana de gestação, período em que as taxas estimadas de detecção de trissomia do cromossoma 21 são 85 a 90%, ao passo que as taxas de falsos positivos são de 5%. Por outro lado, Shiefa, S *et al.*(173) sugerem a determinação dos marcadores bioquímicos em idades gestacionais diferentes, como a determinação da PAPP-A às 9 semanas e a determinação da  $\beta$ -hCG livre às 12 semanas de gestação.

No rastreio pré-natal a prática comum é a conversão das concentrações obtidas de  $\beta$ -hCG livre e PAPP-A em múltiplos da mediana (MoMs) ajustados à idade gestacional, peso materno, número de fetos, corionicidade e tabagismo (174,175). A utilização desta expressão permite que os resultados de diferentes laboratórios sejam interpretados de forma consistente. É de realçar que neste trabalho os resultados das variáveis clínicas foram interpretados conforme os valores de *cutoff* considerados pelo laboratório, definindo-se um *cutoff* menor (percentil 05) e um *cutoff* maior (percentil 95), para cada semana de gestação.

No primeiro trimestre, numa gravidez euploide, os níveis séricos da PAPP-A aumentam a cada semana gestacional. No presente trabalho, comparando os resultados obtidos (Tabela 7) com a Tabela 10, observou-se que em todas as semanas de gestação, tanto os valores médios como os percentis 05 e 95 encontram-se ligeiramente aumentados.

Tabela 10 – Valores de referência para a PAPP-A.

	PAPP-A (IU/L)		
	Percentil 05	Média	Percentil 95
11ª Semana gestação	,632	1,587	3,986
12ª Semana gestação	1,040	2,612	6,560
13ª Semana gestação	1,543	3,874	9,730
14ª Semana gestação	2,062	5,178	13,005

Estudos prévios (161,162,176,177) interpretaram os níveis baixos de PAPP-A na circulação materna como um sinal de risco, associados a insuficiência placentária e, conseqüentemente, a crescimento fetal anormal. Da mesma forma, a presença de concentrações elevadas de PAPP-A foram igualmente associadas a conseqüências adversas para a gravidez. Desai, N *et al.*(178) e Wang, Fengge *et al.*(179) relataram que pacientes com PAPP-A elevada apresentam um risco aumentado de placenta acreta, uma condição rara que se traduz numa anomalia de placentação.

Numa gravidez normal, seria espectável observar um aumento da  $\beta$ -hCG livre, atingindo um pico máximo entre a 8ª e 9ª semana gestacional, e após esse período, a diminuição de concentração até estabilizar (166). Neste estudo, à exceção da concentração da  $\beta$ -hCG livre obtida na 11ª semana de gestação, observou-se uma diminuição nos níveis hormonais, ao longo do período de gestação. Ao comparar com as concentrações de referência apresentadas na Tabela 11 observou-se que, em todos os períodos, os níveis de  $\beta$ -hCG livre obtidos foram superiores à referência.

Tabela 11 – Valores de referência para a  $\beta$ -hCG livre.

	$\beta$ -hCG livre (IU/L)		
	Percentil 05	Média	Percentil 95
11ª Semana gestação	16.68	44.83	120.47
12ª Semana gestação	14.63	39.33	105.69
13ª Semana gestação	11.28	30.32	81.49
14ª Semana gestação	8.29	22.29	59.59

Na literatura existe um consenso geral referindo a associação entre níveis baixos de  $\beta$ -hCG livre no primeiro trimestre e um risco aumentado de complicações na gravidez, como aborto espontâneo ou gravidez ectópica (164,180,181).

Shiefa, S *et al.*(173) e Karadzov-Orlić, Natasa *et al.*(158) em estudos relativos ao rastreio de aneuploidias, observaram que a  $\beta$ -hCG livre, quando encontrada em concentrações elevadas no soro materno, está associada a um risco aumentado de síndrome de Down, enquanto concentrações diminuídas da hormona estão associadas a trissomia 13 e 18. Por outro lado, uma vez que, a  $\beta$ -hCG livre favorece uma atividade promotora do crescimento fetal Soni, Shelly *et al.*(166) referem que na ausência de quaisquer complicações obstétricas e patologia placentária, concentrações elevadas da  $\beta$ -hCG livre

podem ser um reflexo de uma placenta e gravidez saudável. Resultados semelhantes foram observados no trabalho desenvolvido por Sirikunlai, P *et al.*(181) em que, no primeiro trimestre, níveis elevados da  $\beta$ -hCG livre podem diminuir o risco de parto prematuro, sendo os valores extremos clinicamente úteis para a vigilância pré-natal das gestações.

Na população estudada, *outliers* superiores foram observados em ambas as variáveis clínicas. No entanto, devido à informação clínica reduzida das pacientes, não foi possível apurar quais as causas que levaram ao aumento no soro materno dos marcadores bioquímicos  $\beta$ -hCG livre e PAPP-A.

Na literatura, níveis excessivos de  $\beta$ -hCG livre foram reportados em grávidas com insuficiência renal ou submetidas a transplante renal (182,183). Benachi, Alexandra *et al.*(182) afirmam que nestas pacientes, o rastreio de Síndrome de Down usando a  $\beta$ -hCG livre é inadequado devido à elevada taxa de falsos positivos. Contrariamente, em relação à PAPP-A não foi reconhecida uma variação significativa nos seus níveis em grávidas que apresentam uma função renal alterada (184).

No presente estudo é ainda necessário considerar a presença de gestações gemelares, dado que os níveis dos marcadores séricos em gémeos não são iguais aos encontrados em gestações únicas (175,185).

## **Capítulo 3 – Conclusões**

## 1. Conclusões

O estágio curricular desenvolvido na secção de Hormonologia do laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça permitiu a consolidação dos conhecimentos teóricos, adquirir a autonomia e responsabilidade necessárias para integrar a rotina de um laboratório clínico.

Não obstante à elevada automatização presente na secção de Hormonologia, durante o estágio, foi possível conhecer o desempenho do controlo de qualidade nos testes laboratoriais executados, compreender a base teórica das metodologias utilizadas, houve a oportunidade de manipular e processar vários produtos biológicos, acompanhar a validação dos resultados e correlacionar os dados laboratoriais com a presença ou ausência de doença, aspetos estes que são essenciais para o diagnóstico clínico, assim como, para o paciente.

O rastreio pré-natal, durante o primeiro trimestre de gravidez, é utilizado para identificar anomalias fetais. O uso de biomarcadores séricos maternos é aplicado para prever a presença de defeitos nos órgãos neonatais, anomalias cromossómicas e outras condições de risco peri e pós-natais.

No estudo estatístico desenvolvido, foi notória a tendência decrescente no número de gestações sucedidas entre junho de 2019 e janeiro de 2021. Na amostra em estudo, a maioria das grávidas apresentavam idades compreendidas entre os 20 e os 35 anos. A gravidez em idades cada vez mais tardias está associada a risco e complicações. Os resultados obtidos não apresentaram evidência estatística para afirmar que a variável idade influencia as concentrações dos marcadores bioquímicos PAPP-A e  $\beta$ -hCG livre entre os grupos etários III e IV.

Na amostra em estudo, a comparação entre as concentrações obtidas dos testes bioquímicos de rastreio pré-natal com os valores de referência, mostrou que ambos os níveis hormonais  $\beta$ -hCG livre e PAPP-A se apresentavam superiores aos valores de referência. A presença de *outliers* superiores foi igualmente observada, em ambas as variáveis clínicas. Contudo, como não fez parte deste estudo a conversão das concentrações obtidas da  $\beta$ -hCG livre e PAPP-A em MoMs, não foi possível inferir conclusões relativamente à ausência ou presença de cromossomopatias.

Quanto às limitações do estudo, refere-se como a principal, a contenção de informação clínica adicional das pacientes, que poderia ser importante na interpretação dos resultados, nomeadamente nas situações em que as concentrações das variáveis clínicas estudadas apresentavam muita discrepância com os valores de referência. Não sendo objetivo deste estudo a identificação de pacientes com anomalias cromossómicas, a interpretação dos resultados extremos e o efeito das limitações do estudo poderiam ter sido restringidas através da inclusão dos dados do rastreio ecográfico, nomeadamente a medição do comprimento do crânio-caudal e da translucência da nuca. Estes parâmetros em conjunto com os dados dos MoMs permitem calcular o risco de ter um feto afetado com uma determinada aneuploidia e, conseqüentemente, identificar as concentrações *outliers* que efetivamente são

consequência de uma cromossomopatia e não devido a outra condição clínica, como a presença de função renal alterada que, segundo a literatura, parece influenciar especificamente as concentrações da  $\beta$ -hCG livre.

## Referências bibliográficas

1. Neumann A-M, Schmidt CX, Brockmann RM, Oster H. Circadian regulation of endocrine systems. *Auton Neurosci* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2021 Mar 3];216:1–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30598120/>
2. Nilsson M, Fagman H. Development of the thyroid gland. *Development* [Internet]. 2017 Jun 15;144(12):2123–40. Available from: <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.145615>
3. Ozcan HM, Aydin UD. A simple immunosensor for thyroid stimulating hormone. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Mar 27];49(1):61–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33410369/>
4. Jonklaas J, Razvi S. Reference intervals in the diagnosis of thyroid dysfunction: treating patients not numbers. *Lancet Diabetes Endocrinol* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2021 Mar 19];7(6):473–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30797750/>
5. Duntas LH. The catalytic role of iodine excess in loss of homeostasis in autoimmune thyroiditis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2021 Mar 19];25(5):347–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30124478/>
6. Xing D, Liu D, Li R, Zhou Q, Xu J. Factors influencing the reference interval of thyroid-stimulating hormone in healthy adults: A systematic review and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 2021 Mar 21 [cited 2021 Mar 27];cen.14454. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33662155/>
7. Esfandiari NH, Papaleontiou M. Biochemical Testing in Thyroid Disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* [Internet]. 2017 Sep [cited 2021 Mar 24];46(3):631–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889852917300324>
8. Mendoza A, Hollenberg AN. New insights into thyroid hormone action. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2021 Mar 24];173:135–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28174093/>
9. Soh S-B, Aw T-C. Laboratory Testing in Thyroid Conditions – Pitfalls and Clinical Utility. *Ann Lab Med* [Internet]. 2019 Jan 28 [cited 2021 Mar 24];39(1):3–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30215224/>
10. Toloza FJK, Abedzadeh-Anaraki S, Maraka S. Subclinical hypothyroidism in pregnancy. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2021 Aug 27];26(5):225–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31356254/>
11. Gilbert J. Thyrotoxicosis – investigation and management. *Clin Med (Northfield Il)* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2021 Mar 24];17(3):274–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28572231/>

12. Diana T, Olivo P, Kahaly G. Thyrotropin Receptor Blocking Antibodies. *Horm Metab Res* [Internet]. 2018 Dec 4 [cited 2021 Mar 25];50(12):853–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30286485/>
13. Carvalho DP, Dupuy C. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2017 Dec 15 [cited 2021 Mar 19];458:6–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28153798/>
14. Silsirivanit A. Glycosylation markers in cancer. In: *Advances in Clinical Chemistry* [Internet]. Academic Press Inc.; 2019 [cited 2021 Feb 15]. p. 189–213. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30797469/>
15. Jo K, Lim D-J. Clinical implications of anti-thyroglobulin antibody measurement before surgery in thyroid cancer. *Korean J Intern Med* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2021 Mar 27];33(6):1050–7. Available from: <http://kjim.org/journal/view.php?doi=10.3904/kjim.2018.289>
16. Ringel MD, Nabhan F. Approach to Follow-Up of the Patient With Differentiated Thyroid Cancer and Positive Anti-Thyroglobulin Antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2021 Mar 27];98(8):3104–10. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2013-1412>
17. Godlewska M, Krasuska W, Czarnocka B. Biochemical properties of thyroid peroxidase (TPO) expressed in human breast and mammary-derived cell lines. Pizzo S V., editor. *PLoS One* [Internet]. 2018 Mar 7 [cited 2021 Sep 5];13(3):e0193624. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29513734/>
18. Williams D, Le S, Godlewska M, Hoke D, Buckle A. Thyroid Peroxidase as an Autoantigen in Hashimoto’s Disease: Structure, Function, and Antigenicity. *Horm Metab Res* [Internet]. 2018 Dec 25 [cited 2021 Mar 26];50(12):908–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30360003/>
19. Dhillon-Smith RK, Coomarasamy A. TPO antibody positivity and adverse pregnancy outcomes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Mar 26];34(4):101433. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521690X20300609>
20. Godlewska M, Gawel D, Buckle AM, Banga JP. Thyroid Peroxidase Revisited – What’s New? *Horm Metab Res* [Internet]. 2019 Dec 11 [cited 2021 Mar 26];51(12):765–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31826271/>
21. Giannetta E, Guarnotta V, Altieri B, Sciammarella C, Guadagno E, Malandrino P, et al. ENDOCRINE TUMOURS: Calcitonin in thyroid and extra-thyroid neuroendocrine neoplasms: the two-faced Janus. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2020 Dec [cited 2021 Mar 3];183(6):R197–215. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33112280/>
22. Costante G, Meringolo D. Calcitonin as a biomarker of C cell disease: recent achievements and

- current challenges. *Endocrine* [Internet]. 2020 Feb 10 [cited 2021 Mar 3];67(2):273–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31925733/>
23. Nagpal M, Singh S, Singh P, Chauhan P, Zaidi M. Tumor markers: A diagnostic tool. *Natl J Maxillofac Surg* [Internet]. 2016 [cited 2021 Feb 3];7(1):17. Available from: </pmc/articles/PMC5242068/?report=abstract>
  24. Hassanpour SH, Dehghani M. Review of cancer from perspective of molecular. *J Cancer Res Pract* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2021 Feb 6];4(4):127–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2311300617300125>
  25. Malhone C, Longatto-Filho A. Cervical, Ovarian and Endometrial Tumor Markers: Potential Clinical Value. *Semin Ultrasound, CT MRI* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2021 Feb 6];40(4):350–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887217119300125>
  26. Sharma S. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian J Med Paediatr Oncol* [Internet]. 2009 [cited 2021 Mar 3];30(1):1. Available from: </pmc/articles/PMC2902207/>
  27. Melichar B. Tumor biomarkers: PSA and beyond. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2021 Feb 8];50(11):1865–9. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2012-0631/html>
  28. Duskova K, Vesely S. Prostate Specific Antigen. Current clinical application and future prospects. *Biomed Pap* [Internet]. 2015 Mar 9 [cited 2021 Feb 11];159(1):018–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.5507/bp.2014.046>
  29. Moradi A, Srinivasan S, Clements J, Batra J. Beyond the biomarker role: prostate-specific antigen (PSA) in the prostate cancer microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2019 Sep 28 [cited 2021 Feb 8];38(3):333–46. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10555-019-09815-3>
  30. Stephan C, Ralla B, Jung K. Prostate-specific antigen and other serum and urine markers in prostate cancer. *Biochim Biophys Acta – Rev Cancer* [Internet]. 2014 Aug;1846(1):99–112. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.04.001>
  31. Faria SC, Sagebiel T, Patnana M, Cox V, Viswanathan C, Lall C, et al. Tumor markers: myths and facts unfolded. *Abdom Radiol* [Internet]. 2019 Apr 29 [cited 2021 Feb 3];44(4):1575–600. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30498924/>
  32. Asad-Ur-Rahman F, Saif MW. Elevated Level of Serum Carcinoembryonic Antigen (CEA) and Search for a Malignancy: A Case Report. *Cureus* [Internet]. 2016 Jun 20 [cited 2021 Feb 13];8(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27446768/>
  33. Gan N, Jia L, Zheng L. A Sandwich Electrochemical Immunosensor Using Magnetic DNA Nanoprobes for Carcinoembryonic Antigen. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2011 Oct 28 [cited 2021 Feb

- 15];12(11):7410–23. Available from: /pmc/articles/PMC3233412/
34. Grunnet M, Sorensen JB. Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. *Lung Cancer* [Internet]. 2012 May [cited 2021 Feb 14];76(2):138–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22153832/>
  35. Hall C, Clarke L, Pal A, Buchwald P, Eglinton T, Wakeman C, et al. A Review of the Role of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Practice. *Ann Coloproctol* [Internet]. 2019 Dec 31 [cited 2021 Feb 14];35(6):294–305. Available from: /pmc/articles/PMC6968721/
  36. Gao Y, Wang J, Zhou Y, Sheng S, Qian SY, Huo X. Evaluation of Serum CEA, CA19–9, CA72–4, CA125 and Ferritin as Diagnostic Markers and Factors of Clinical Parameters for Colorectal Cancer. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec 9 [cited 2021 Feb 15];8(1):2732. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29426902/>
  37. Bottoni P, Scatena R. The Role of CA 125 as Tumor Marker: Biochemical and Clinical Aspects. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. Springer New York LLC; 2015 [cited 2021 Feb 16]. p. 229–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26530369/>
  38. Aithal A, Rauth S, Kshirsagar P, Shah A, Lakshmanan I, Junker WM, et al. MUC16 as a novel target for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2018 Aug 3 [cited 2021 Feb 16];22(8):675–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29999426/>
  39. Felder M, Kapur A, Gonzalez–Bosquet J, Horibata S, Heintz J, Albrecht R, et al. MUC16 (CA125): tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress. *Mol Cancer* [Internet]. 2014 May 29 [cited 2021 Feb 16];13(1):129. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24886523/>
  40. Prieto de Paula JM, Mayor Toranzo E, Sanmamed Salgado N, Franco Hidalgo S. Elevación del CA 19.9 en ausencia de tumor de páncreas. *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2013 Aug [cited 2021 Feb 17];36(7):495–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23683714/>
  41. Kim S, Park BK, Seo JH, Choi J, Choi JW, Lee CK, et al. Carbohydrate antigen 19–9 elevation without evidence of malignant or pancreatobiliary diseases. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Feb 17];10(1):8820. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65720-8>
  42. Scarà S, Bottoni P, Scatena R. CA 19–9: Biochemical and Clinical Aspects. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. Springer New York LLC; 2015 [cited 2021 Feb 17]. p. 247–60. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-7215-0\\_15](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-7215-0_15)
  43. PARRA–ROBERT M, SANTOS VM, CANIS SM, PLA XF, FRADERA JMA, PORTO RM. Relationship Between CA 19.9 and the Lewis Phenotype: Options to Improve Diagnostic Efficiency. *Anticancer Res* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2021 Feb 17];38(10):5883–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30275214/>
  44. Begum M, Karim S, Malik A, Khurshid R, Asif M, Salim A, et al. CA 15–3 (Mucin–1) and Physiological Characteristics of Breast Cancer from Lahore, Pakistan. *Asian Pacific J Cancer Prev* [Internet].

- 2012 Oct 31 [cited 2021 Feb 20];13(10):5257–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23244146/>
45. Nabavinia MS, Gholoobi A, Charbgoon F, Nabavinia M, Ramezani M, Abnous K. Anti-MUC1 aptamer: A potential opportunity for cancer treatment. *Med Res Rev* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2021 Feb 20];37(6):1518–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28759115/>
  46. Duffy MJ, Evoy D, McDermott EW. CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2010 Dec 14 [cited 2021 Feb 20];411(23–24):1869–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20816948/>
  47. Haidar S, Bhanushali PB, Shukla KK, Modi D, Puri CP, Badgujar SB, et al. Simplified approach for in-vitro production and purification of cell derived Cancer Antigen 15-3. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2021 Feb 20];107(Pt B):1456–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29017885/>
  48. Sauzay C, Petit A, Bourgeois A-M, Barbare J-C, Chauffert B, Galmiche A, et al. Alpha-foetoprotein (AFP): A multi-purpose marker in hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2021 Feb 21];463:39–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27732875/>
  49. Rizzo A, Galgano M, Mutinati M, Sciorsci RL. Alpha-fetoprotein in animal reproduction. *Res Vet Sci* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 Feb 21];123:281–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528818316989>
  50. Wang X, Wang Q. Alpha-Fetoprotein and Hepatocellular Carcinoma Immunity. *Can J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Feb 26];2018:1–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29805966/>
  51. Borisova MA, Moiseenko DY, Smirnova O V. Human chorionic gonadotropin: Unknown about known. Vol. 43, *Human Physiology*. Maik Nauka Publishing / Springer SBM; 2017. p. 93–104.
  52. Grenache DG. Progress in understanding the use of human chorionic gonadotropin as a tumor marker. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2020 Feb 25 [cited 2021 Aug 24];58(3):323–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31926077/>
  53. Sisinni L, Landriscina M. The Role of Human Chorionic Gonadotropin as Tumor Marker: Biochemical and Clinical Aspects. In: *Advances in experimental medicine and biology* [Internet]. *Adv Exp Med Biol*; 2015 [cited 2021 Aug 24]. p. 159–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26530366/>
  54. Xu C-M, Luo Y-L, Li S, Li Z-X, Jiang L, Zhang G-X, et al. Multifunctional neuron-specific enolase: its role in lung diseases. *Biosci Rep* [Internet]. 2019 Nov 29 [cited 2021 Feb 26];39(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31642468/>
  55. Lee D, Cho Y, Ko Y, Heo NH, Kang HG, Han S. Neuron-specific enolase level as a predictor of neurological outcome in near-hanging patients: A retrospective multicenter study. *Martin AR*,

- editor. PLoS One [Internet]. 2021 Feb 10 [cited 2021 Feb 26];16(2):e0246898. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0246898>
56. Mastroianni A, Panella R, Morelli D. Invisible hemolysis in serum samples interferes in NSE measurement. *Tumori J* [Internet]. 2020 Feb 9 [cited 2021 Feb 27];106(1):79–81. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300891619867836>
  57. Isgrò MA, Bottoni P, Scatena R. Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. Springer New York LLC; 2015 [cited 2021 Feb 4]. p. 125–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26530364/>
  58. Li M, Xue F, Yang J, Pan X. Correlation between tumor marker CA72-4 and prognosis of patients with gastric cancer. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2020 Dec 24 [cited 2021 Mar 2];99(52):e23723. Available from: </pmc/articles/PMC7769321/>
  59. Hu P-J, Chen M-Y, Wu M-S, Lin Y-C, Shih P-H, Lai C-H, et al. Clinical Evaluation of CA72-4 for Screening Gastric Cancer in a Healthy Population: A Multicenter Retrospective Study. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 May 27 [cited 2021 Mar 2];11(5):733. Available from: </pmc/articles/PMC6562516/>
  60. Yarcı Gursoy A, Kiseli M, Ozdemir S, Şeker R, Caglar GS. Menstrual cycle variability of CA 72-4 in healthy women. *Clin Biochem* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2021 Mar 2];48(1-2):70–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25281797/>
  61. Kotzev AI, Draganov PV. Carbohydrate Antigen 19-9, Carcinoembryonic Antigen, and Carbohydrate Antigen 72-4 in Gastric Cancer: Is the Old Band Still Playing? *Gastrointest Tumors* [Internet]. 2018 [cited 2021 Mar 2];5(1-2):1–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30574476/>
  62. Jose J, Sunil P, Madhavan Nirmal R, Varghese SS. CYFRA 21-1: An overview. *Oral Maxillofac Pathol J [OMP]* [Internet]. 2013 [cited 2021 Mar 1];4(2):368–71. Available from: [http://journaldatabase.info/articles/cyfra\\_21-1\\_overview.html](http://journaldatabase.info/articles/cyfra_21-1_overview.html)
  63. Yu Z, Zhang G, Yang M, Zhang S, Zhao B, Shen G, et al. Systematic review of CYFRA 21-1 as a prognostic indicator and its predictive correlation with clinicopathological features in Non-small Cell Lung Cancer: A meta-analysis. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Jan 17 [cited 2021 Mar 1];8(3):4043–50. Available from: </pmc/articles/PMC5354811/>
  64. Liu L, Xie W, Xue P, Wei Z, Liang X, Chen N. Diagnostic accuracy and prognostic applications of CYFRA 21-1 in head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. Teh M-T, editor. *PLoS One* [Internet]. 2019 May 9 [cited 2021 Mar 1];14(5):e0216561. Available from: </pmc/articles/PMC6508679/>
  65. Di Giacinto P, Rota F, Rizza L, Campana D, Isidori A, Lania A, et al. Chromogranin A: From Laboratory

- to Clinical Aspects of Patients with Neuroendocrine Tumors. *Int J Endocrinol* [Internet]. 2018 Jul 2 [cited 2021 Mar 1];2018:1–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30057604/>
66. Díaz Pérez JÁ, Currás Freixes M. Chromogranin A and neuroendocrine tumors. *Endocrinol y Nutr* (English Ed [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2021 Mar 1];60(7):386–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2173509313001372>
  67. Marotta V, Zatelli MC, Sciammarella C, Ambrosio MR, Bondanelli M, Colao A, et al. Chromogranin A as circulating marker for diagnosis and management of neuroendocrine neoplasms: more flaws than fame. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 Mar 1];25(1):R11–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29066503/>
  68. Argentieri MA, Nagarajan S, Seddighzadeh B, Baccarelli AA, Shields AE. Epigenetic Pathways in Human Disease: The Impact of DNA Methylation on Stress-Related Pathogenesis and Current Challenges in Biomarker Development. *EBioMedicine* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2021 Jun 17];18:327–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28434943/>
  69. Locatelli V, Bresciani E, Tamiazzo L, Torsello A. Central Nervous System-Acting Drugs Influencing Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function. In: *Pediatric Neuroendocrinology* [Internet]. Basel: KARGER; 2009 [cited 2021 Jun 18]. p. 108–20. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/262533>
  70. Bergman J, Botling J, Fagerberg L, Hallström BM, Djureinovic D, Uhlén M, et al. The Human Adrenal Gland Proteome Defined by Transcriptomics and Antibody-Based Profiling. *Endocrinology* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2021 Jun 18];158(2):239–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27901589/>
  71. Cornu E, Belmihoub I, Burnichon N, Grataloup C, Zinzindohoué F, Baron S, et al. Phéochromocytome et paragangliome. *La Rev Médecine Interne* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2021 Jun 18];40(11):733–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31493938/>
  72. Ku EJ, Kim KJ, Kim JH, Kim MK, Ahn CH, Lee KA, et al. Diagnosis for Pheochromocytoma and Paraganglioma: A Joint Position Statement of the Korean Pheochromocytoma and Paraganglioma Task Force. *Endocrinol Metab* [Internet]. 2021 Apr 30 [cited 2021 Jun 18];36(2):322–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33820394/>
  73. Gorman LS. The Adrenal Gland: Common Disease States and Suspected New Applications. *Am Soc Clin Lab Sci* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2021 Jun 18];26(2):118–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23772480/>
  74. Salonia A, Rastrelli G, Hackett G, Seminara SB, Huhtaniemi IT, Rey RA, et al. Paediatric and adult-onset male hypogonadism. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2019 Dec 30 [cited 2021 Jun 15];5(1):38. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41572-019-0087-y>
  75. Acevedo-Rodriguez A, Kauffman AS, Cherrington BD, Borges CS, Roepke TA, Laconi M. Emerging

- insights into hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation and interaction with stress signalling. *J Neuroendocrinol* [Internet]. 2018 Oct 7 [cited 2021 Jun 15];30(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29524268/>
76. Stamatiades GA, Kaiser UB. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2018 Mar 5 [cited 2021 Aug 8];463:131–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29102564/>
  77. Di Renzo GC, Giardina I, Clerici G, Brillo E, Gerli S. Progesterone in normal and pathological pregnancy. *Horm Mol Biol Clin Investig* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2021 Aug 20];27(1):35–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27662646/>
  78. Taraborrelli S. Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet Gynecol Scand* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2021 Aug 20];94:8–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26358238/>
  79. Henderson VW. Progesterone and human cognition. *Climacteric* [Internet]. 2018 Jul 4 [cited 2021 Aug 19];21(4):333–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29852783/>
  80. Wahid B, Bashir H, Bilal M, Wahid K, Sumrin A. Developing a deeper insight into reproductive biomarkers. *Clin Exp Reprod Med* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2021 Aug 19];44(4):159. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/>
  81. Shea JL, Wong P-Y, Chen Y. Free Testosterone. In: *Advances in clinical chemistry* [Internet]. Adv Clin Chem; 2014 [cited 2021 Aug 19]. p. 59–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24783351/>
  82. Keevil BG, Adaway J. Assessment of free testosterone concentration. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2021 Aug 19];190:207–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30970279/>
  83. Bhasin S, Brito JP, Cunningham GR, Hayes FJ, Hodis HN, Matsumoto AM, et al. Testosterone Therapy in Men With Hypogonadism: An Endocrine Society\* Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2021 Aug 19];103(5):1715–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29562364/>
  84. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiol Rev* [Internet]. 2000 Jan 10 [cited 2021 Aug 20];80(4):1523–631. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11015620/>
  85. Bernard V, Young J, Binart N. Prolactin – a pleiotropic factor in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2019 Jun 21 [cited 2021 Aug 20];15(6):356–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30899100/>
  86. Štelcl M, Vrubleovský P, Machač Š. Prolactin and alteration of fertility. *Ces Gynekol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 20];83(3):232–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30764625/>

87. Kumar A, Banerjee A, Singh D, Thakur G, Kasarpalkar N, Gavali S, et al. Estradiol: A Steroid with Multiple Facets. *Horm Metab Res* [Internet]. 2018 May 22 [cited 2021 Aug 20];50(05):359–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29566418/>
88. Ketha H, Girtman A, Singh RJ. Estradiol assays – The path ahead. *Steroids* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2021 Aug 20];99(Pt A):39–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25159104/>
89. Borisova MA, Moiseenko DY, Smirnova O V. Human chorionic gonadotropin: Unknown about known. *Hum Physiol* [Internet]. 2017 Jan 4 [cited 2021 Aug 23];43(1):93–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29509368/>
90. Qu X, Donnelly R. Sex Hormone–Binding Globulin (SHBG) as an Early Biomarker and Therapeutic Target in Polycystic Ovary Syndrome. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2021 Aug 16];21(21):8191. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33139661/>
91. Goldštajn MŠ, Toljan K, Grgić F, Jurković I, Baldani DP. Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) as a Marker of Clinical Disorders. *Coll Antropol* [Internet]. 2016 Sep [cited 2021 Aug 16];40(3):211–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29139641/>
92. Deswal R, Yadav A, Dang AS. Sex hormone binding globulin – an important biomarker for predicting PCOS risk: A systematic review and meta–analysis. *Syst Biol Reprod Med* [Internet]. 2018 Jan 2 [cited 2021 Aug 16];64(1):12–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29227165/>
93. Xu H–Y, Zhang H–X, Xiao Z, Qiao J, Li R. Regulation of anti–Müllerian hormone (AMH) in males and the associations of serum AMH with the disorders of male fertility. *Asian J Androl* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2021 Aug 12];21(2):109. Available from: [/pmc/articles/PMC6413543/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32770239/)
94. Victoria M, Labrosse J, Krief F, Cédric–Durnerin I, Comtet M, Grynberg M. Anti Müllerian Hormone: More than a biomarker of female reproductive function. *J Gynecol Obstet Hum Reprod* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2021 Aug 12];48(1):19–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30352309/>
95. Moolhuijsen LME, Visser JA. Anti–Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2021 Aug 12];105(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32770239/>
96. Chimote BN, Chimote NM. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Its Sulfate (DHEA–S) in Mammalian Reproduction: Known Roles and Novel Paradigms. In: *Vitamins and hormones* [Internet]. Vitam Horm; 2018 [cited 2021 Aug 13]. p. 223–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30029728/>
97. Goodarzi MO, Carmina E, Azziz R. DHEA, DHEAS and PCOS. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2015 Jan [cited 2021 Aug 13];145:213–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25008465/>

98. Klinge CM, Clark BJ, Prough RA. Dehydroepiandrosterone Research: Past, Current, and Future. In: *Vitamins and Hormones* [Internet]. Academic Press; 2018 [cited 2021 Aug 13]. p. 1–28. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0083672918300360>
99. Doggui R. Immunoanalytical profile of androstenedione. *Ann Biol Clin (Paris)* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2021 Aug 12];74(4):495–502. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27492704/>
100. van Helden J, Weiskirchen R. Cross-method comparison of serum androstenedione measurement with respect to the validation of a new fully automated chemiluminescence immunoassay. *Clin Biochem* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 Aug 12];62:32–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30261182/>
101. Honour JW. 17-Hydroxyprogesterone in children, adolescents and adults. *Ann Clin Biochem Int J Lab Med* [Internet]. 2014 Jul 7 [cited 2021 Aug 12];51(4):424–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24711560/>
102. Giestas A, Palma I, Ramos MH. Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS): And its pharmacologic modulation. *Acta Med Port* [Internet]. 2010 [cited 2021 Jun 17];23(4):677–67788. Available from: [www.actamedicaportuguesa.com](http://www.actamedicaportuguesa.com)
103. Mirabito Colafella KM, Bovée DM, Danser AHJ. The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets. *Exp Eye Res* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2021 Jun 17];186:107680. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31129252/>
104. Terock J, Hannemann A, Janowitz D, Van der Auwera S, Bahls M, Völzke H, et al. Differential activation of the renin-angiotensin-aldosterone-system in response to childhood and adulthood trauma. *Psychoneuroendocrinology* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2021 Jun 17];107:232–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31174161/>
105. Daimon M, Kamba A, Murakami H, Takahashi K, Otaka H, Makita K, et al. Association Between Pituitary-Adrenal Axis Dominance Over the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Hypertension. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2021 Jun 17];101(3):889–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26731257/>
106. Alhenc-Gelas F, Menard J. Is Plasma Renin Activity Genetically Determined and How Much Does It Matter for Treating Hypertension? *Circ Genomic Precis Med* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2021 Jul 24];11(4):e002139. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29650769/>
107. Emdin M, Fatini C, Mirizzi G, Poletti R, Borrelli C, Prontera C, et al. Biomarkers of activation of renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure: how useful, how feasible? *Clin Chim Acta* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2021 Jul 24];443:85–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25445411/>
108. Athimulam S, Lazik N, Bancos I. Low-Renin Hypertension. *Endocrinol Metab Clin North Am*

- [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 Jul 24];48(4):701–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31655771/>
109. Bekkach Y, Heijboer AC, Endert E, Ackermans MT. Determination of urinary aldosterone using a plasma aldosterone 2D ID LC–MS/MS method. *Bioanalysis* [Internet]. 2016 Sep 5 [cited 2021 Jul 24];8(17):1765–75. Available from: <https://www.future-science.com/doi/abs/10.4155/bio-2016-0115>
  110. Nakamura Y, Yamazaki Y, Konosu-Fukaya S, Ise K, Satoh F, Sasano H. Aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex and associated disorders. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2021 Jul 24];153:57–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26051166/>
  111. Ceral J, Malirova E, Ballon M, Solar M. The Role of Urinary Aldosterone for the Diagnosis of Primary Aldosteronism. *Horm Metab Res* [Internet]. 2014 May 8 [cited 2021 Jul 24];46(09):663–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24810470/>
  112. Jacob R, Khan M. Cardiac Biomarkers: What Is and What Can Be. *Indian J Cardiovasc Dis Women WINCARS* [Internet]. 2018 Dec 28 [cited 2021 Jun 15];03(04):240–4. Available from: </pmc/articles/PMC6957084/>
  113. Toraih EA, Elshazli RM, Hussein MH, Elgaml A, Amin M, El-Mowafy M, et al. Association of cardiac biomarkers and comorbidities with increased mortality, severity, and cardiac injury in COVID-19 patients: A meta-regression and decision tree analysis. *J Med Virol* [Internet]. 2020 Nov 6;92(11):2473–88. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.26166>
  114. Wu AHB. Analytical validation of novel cardiac biomarkers used in clinical trials. *Am Heart J* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2021 Jun 15];169(5):674–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002870315001143>
  115. Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K. Atrial and brain natriuretic peptides: Hormones secreted from the heart. *Peptides* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2021 Jul 10];111:18–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29859763/>
  116. Forte, Madonna, Schiavon, Valenti, Versaci, Zoccai, et al. Cardiovascular Pleiotropic Effects of Natriuretic Peptides. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Aug 8 [cited 2021 Jul 10];20(16):3874. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31398927/>
  117. A C, C P, M F, M E. Cardiac biomarker testing in the clinical laboratory: where do we stand? General overview of the methodology with special emphasis on natriuretic peptides. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2021 Jul 8];443:17–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24937843/>
  118. Rubattu S, Volpe M. Natriuretic Peptides in the Cardiovascular System: Multifaceted Roles in Physiology, Pathology and Therapeutics. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Aug 16 [cited 2021 Jul

- 10];20(16):3991. Available from: [/pmc/articles/PMC6721730/](#)
119. Katrukha IA. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochem* [Internet]. 2013 Dec 12 [cited 2021 Jul 13];78(13):1447–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24490734/>
  120. Garg P, Morris P, Fazlanie AL, Vijayan S, Dancso B, Dastidar AG, et al. Cardiac biomarkers of acute coronary syndrome: from history to high-sensitivity cardiac troponin. *Intern Emerg Med* [Internet]. 2017 Mar 11 [cited 2021 Jul 13];12(2):147–55. Available from: [/pmc/articles/PMC5329082/](#)
  121. Welsh P, Preiss D, Sattar N. Utility of High-Sensitivity Troponin T and I: Are They the Same? *Am Coll Cardiol* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jul 13];1–10. Available from: <https://www.acc.org/latest-in-cardiology/articles/2019/11/21/07/26/utility-of-high-sensitivity-troponin-t-and-i>
  122. Vanek T, Kohli A. Biochemistry, Myoglobin [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2021 [cited 2021 Jul 15]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544256/>
  123. Zafar Gondal A, Foris LA, Richards JR. Serum Myoglobin [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2021 [cited 2021 Jul 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470441/>
  124. Pur MRK, Hosseini M, Faridbod F, Ganjali MR. Highly sensitive label-free electrochemiluminescence aptasensor for early detection of myoglobin, a biomarker for myocardial infarction. *Microchim Acta* [Internet]. 2017 Sep 27 [cited 2021 Jul 21];184(9):3529–37. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-017-2385-y>
  125. Servonnet A, Dubost C, Martin G, Lefrère B, Fontan E, Ceppa F, et al. Myoglobin: still a useful biomarker in 2017? *Ann Biol Clin (Paris)* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Jul 21];76(2):137–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29623882/>
  126. Kahan BD, Keown P, Levy GA, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Ther* [Internet]. 2002 Mar [cited 2021 Aug 27];24(3):330–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11952020/>
  127. Zhang Y, Zhang R. Recent advances in analytical methods for the therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs. *Drug Test Anal* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 Aug 27];10(1):81–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28851030/>
  128. Hartono C, Muthukumar T, Suthanthiran M. Immunosuppressive Drug Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2021 Apr 22];3(9):a015487–a015487. Available from: [/pmc/articles/PMC3753725/](#)
  129. Mok CC. Calcineurin inhibitors in systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2021 Apr 22];31(3):429–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29224682/>
  130. Allison TL. Immunosuppressive Therapy in Transplantation. *Nurs Clin North Am* [Internet]. 2016

- Mar 1 [cited 2021 Apr 22];51(1):107–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0029646515001164>
131. Holt CD. Overview of Immunosuppressive Therapy in Solid Organ Transplantation. *Anesthesiol Clin* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2021 Apr 26];35(3):365–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28784214/>
  132. Wiseman AC. Immunosuppressive Medications. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2016 Feb 5 [cited 2021 Apr 26];11(2):332–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26444444/>
  133. Tzortzopoulos A, Raftopoulos V, Talias MA. Performance characteristics of automated clinical chemistry analyzers using commercial assay reagents contributing to quality assurance and clinical decision in a hospital laboratory. *Scand J Clin Lab Invest* [Internet]. 2020 Jan 2 [cited 2021 Mar 18];80(1):46–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31766906/>
  134. Pai S, Frater JL. Quality management and accreditation in laboratory hematology: Perspectives from India. *Int J Lab Hematol* [Internet]. 2019 May 8 [cited 2021 Mar 18];41(S1):177–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31069974/>
  135. Capina R, Li K, Kearney L, Vandamme A-M, Harrigan PR, Van Laethem K. Quality Control of Next-Generation Sequencing-Based HIV-1 Drug Resistance Data in Clinical Laboratory Information Systems Framework. *Viruses* [Internet]. 2020 Jun 14 [cited 2021 Mar 18];12(6):645. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32545906/>
  136. Kumar BV, Mohan T. Sigma metrics as a tool for evaluating the performance of internal quality control in a clinical chemistry laboratory. *J Lab Physicians* [Internet]. 2018 Apr 19 [cited 2021 Mar 18];10(02):194–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29692587/>
  137. Westgard J. QC – The Calculations – Westgard [Internet]. 2009 [cited 2021 Aug 26]. Available from: <https://www.westgard.com/lesson14.htm>
  138. Kim H, Kim S, Yun Y-M, Um T-H, Chang J, Lee KS, et al. Status of Quality Control for Laboratory Tests of Medical Institutions in Korea: Analysis of 10 Years of Data on External Quality Assessment Participation. *Healthcare* [Internet]. 2020 Mar 27 [cited 2021 Mar 18];8(2):75. Available from: <https://www.mdpi.com/2227-9032/8/2/75>
  139. Kannan P, Chen J, Su F, Guo Z, Huang Y. Faraday-Cage-Type Electrochemiluminescence Immunoassay: A Rise of Advanced Biosensing Strategy. *Anal Chem* [Internet]. 2019 Dec 3 [cited 2021 Mar 4];91(23):14792–802. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31692335/>
  140. XIAO Q, LIN J-M. Advances and Applications of Chemiluminescence Immunoassay in Clinical Diagnosis and Foods Safety. *Chinese J Anal Chem* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2021 Mar 4];43(6):929–38. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872204015608313>
  141. Richter MM. Electrochemiluminescence (ECL). *Chem Rev* [Internet]. 2004 Jun [cited 2021 Mar

- 7];104(6):3003–36. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cr020373d>
142. Dodeigne C. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. *Talanta* [Internet]. 2000 Mar 6 [cited 2021 Mar 9];51(3):415–39. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914099002945>
  143. Li L, Chen Y, Zhu J-J. Recent Advances in Electrochemiluminescence Analysis. *Anal Chem* [Internet]. 2017 Jan 3 [cited 2021 Mar 7];89(1):358–71. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.analchem.6b04675>
  144. Hananya N, Shabat D. Recent Advances and Challenges in Luminescent Imaging: Bright Outlook for Chemiluminescence of Dioxetanes in Water. *ACS Cent Sci* [Internet]. 2019 Jun 26 [cited 2021 Mar 10];5(6):949–59. Available from: <http://pubs.acs.org/journal/acscii>
  145. Zhang H, Qi S. A rapid and sensitive chemiluminescence immunoassay based on magnetic particles for squamous cell carcinoma antigen in human serum. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2011 Aug 17 [cited 2021 Mar 10];412(17–18):1572–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21600892/>
  146. Bazin H, Trinquet E, Mathis G. Time resolved amplification of cryptate emission: a versatile technology to trace biomolecular interactions. *Rev Mol Biotechnol* [Internet]. 2002 Jan [cited 2021 Mar 11];82(3):233–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11999692/>
  147. Bereciartua E. Trace Technology for Assays of Novel Biomarkers. *EJIFCC* [Internet]. 2011 Jan [cited 2021 Mar 11];21(4):118–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27683382>
  148. Siddiqui MR, AlOthman ZA, Rahman N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arab J Chem* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2021 Mar 15];10:S1409–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535213001056>
  149. Blum F. High performance liquid chromatography. *Br J Hosp Med* [Internet]. 2014 Feb 18 [cited 2021 Mar 15];75(Sup2):C18–21. Available from: <https://www.magonlinelibrary.com/doi/abs/10.12968/hmed.2014.75.Sup2.C18>
  150. Swartz M. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. *J Liq Chromatogr Relat Technol* [Internet]. 2010 Jul 13 [cited 2021 Mar 15];33(9–12):1130–50. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2010.484356>
  151. Lima-Oliveira G, Monneret D, Guerber F, Guidi GC. Sample management for clinical biochemistry assays: Are serum and plasma interchangeable specimens? *Crit Rev Clin Lab Sci* [Internet]. 2018 Oct 3 [cited 2021 Aug 26];55(7):480–500. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408363.2018.1499708>
  152. Nandakumar V, Paul Theobald J, Algeciras-Schimnich A. Evaluation of plasma ACTH stability using the Roche Elecsys immunoassay. *Clin Biochem* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Mar 29];81:59–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.04.004>

153. Locsei Z, Racz K, Patocs A, Kovacs GL, Toldy E. Influence of sampling and storage conditions on plasma renin activity and plasma renin concentration. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2009 Apr [cited 2021 Mar 29];402(1–2):203–5. Available from: chrome-extension://dagcmkpagilhakfdhnbomgmjdpkdklff/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fpdf.sciencedirectassets.com%2F271330%2F1-s2.0-S0009898109X00033%2F1-s2.0-S0009898109000230%2Fmain.pdf%3FX-Amz-Security-Token%3DIQoJb3JpZ2luX2VjEBcaCXVzLWVhc
154. Becker A, Backman JT, Itkonen O. Comparison of LC-MS/MS and chemiluminescent immunoassays for immunosuppressive drugs reveals organ dependent variation in blood cyclosporine a concentrations. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Mar 29];508:22–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898120302059>
155. Fung AWS, Knauer MJ, Blasutig IM, Colantonio DA, Kulasingam V. Evaluation of electrochemiluminescence immunoassays for immunosuppressive drugs on the Roche cobas e411 analyzer. *F1000Research* [Internet]. 2017 Oct 13 [cited 2021 Mar 29];6:1832. Available from: <https://f1000research.com/articles/6-1832/v1>
156. Temming LA, Macones GA. What is prenatal screening and why to do it? *Semin Perinatol* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2021 Mar 20];40(1):3–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26708051/>
157. Hui L. Noninvasive Approaches to Prenatal Diagnosis: Historical Perspective and Future Directions. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. Humana Press Inc.; 2019 [cited 2021 Mar 20]. p. 45–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30506189/>
158. Karadzov-Orlić N, Egić A, Filimonović D, Marinković M, Damjanović-Pazin B, Milovanović Z, et al. Screening for aneuploidies by maternal age, fetal nuchal translucency and maternal serum biochemistry at 11–13+6 gestational weeks. *Srp Arh Celok Lek* [Internet]. 2012 [cited 2021 Mar 20];140(9–10):606–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23289277/>
159. Wellesley D, Dolk H, Boyd PA, Greenlees R, Haeusler M, Nelen V, et al. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2012 May 11 [cited 2021 Oct 28];20(5):521–6. Available from: [/pmc/articles/PMC3330224/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/223330224/)
160. Carlson LM, Vora NL. Prenatal Diagnosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2021 Mar 20];44(2):245–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28499534/>
161. Mohamad Jafari R, Masihi S, Barati M, Maraghi E, Sheibani S, Sheikhvatan M. Value of Pregnancy-Associated Plasma Protein-A for Predicting Adverse Pregnancy Outcome. *Arch Iran Med* [Internet]. 2019 [cited 2021 Mar 20];22(10):584–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31679360/>

162. Ornelas M, Ramalho C. Proteína plasmática A associada à gravidez como marcador de restrição de crescimento fetal: o que se sabe até agora? *Acta Obs e Ginecológica Port* [Internet]. 2018 [cited 2021 Mar 20];12(3):204–2013. Available from: [http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1646-58302018000300006&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1646-58302018000300006&lng=pt&nrm=iso)
163. Donovan BM, Nidey NL, Jasper EA, Robinson JG, Bao W, Saftlas AF, et al. First trimester prenatal screening biomarkers and gestational diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. Qu H-Q, editor. *PLoS One* [Internet]. 2018 Jul 26 [cited 2021 Mar 20];13(7):e0201319. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30048548/>
164. Szczerba A, Białas P, Pięta P, Jankowska A. hCG – related molecules and their measurement. *Polish Gynaecol* [Internet]. 2016 [cited 2021 Mar 22];87(01):65–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27306471/>
165. Montagnana M, Trenti T, Aloe R, Cervellin G, Lippi G. Human chorionic gonadotropin in pregnancy diagnostics. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2011 Aug 17 [cited 2021 Mar 22];412(17–18):1515–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898111003007>
166. Soni S, Krantz DA, Blitz MJ, Vohra N, Rochelson B. Elevated maternal serum-free  $\beta$ -human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -hCG) and reduced risk of spontaneous preterm delivery. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2019 Oct 2 [cited 2021 Mar 22];32(19):3191–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29642747/>
167. Marques B, Palha F, Moreira E, Valente S, Abrantes M, Saldanha J. Ser Mãe Depois dos 35 Anos: Será Diferente? *Acta Med Port* [Internet]. 2017 Sep 29 [cited 2021 Apr 8];30(9):615. Available from: [www.actamedicaportuguesa.com](http://www.actamedicaportuguesa.com)
168. INE. Estatísticas Vitais 2020 [Internet]. Lisboa, Portugal; 2021. Available from: [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_destaques&DESTAQUESdest\\_boui=471108445&DESTAQUESmodo=2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaques&DESTAQUESdest_boui=471108445&DESTAQUESmodo=2)
169. INE. Portal do INE [Internet]. [cited 2021 Oct 26]. Available from: [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0008219&contexto=bd&selTab=tab2&xlang=pt](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0008219&contexto=bd&selTab=tab2&xlang=pt)
170. Brandt JS, Cruz Ithier MA, Rosen T, Ashkinadze E. Advanced paternal age, infertility, and reproductive risks: A review of the literature. *Prenat Diagn* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2021 Apr 8];39(2):81–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30520056/>
171. Cooke C-LM, Davidge ST. Advanced maternal age and the impact on maternal and offspring cardiovascular health. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2021 Apr 8];317(2):H387–94. Available from: [www.ajpheart.org](http://www.ajpheart.org)
172. Wright D, Papadopoulos S, Silva M, Wright A, Nicolaidis KH. Serum free  $\beta$ -human chorionic

- gonadotropin in the three trimesters of pregnancy: effects of maternal characteristics and medical history. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2021 May 13];46(1):51–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25846870/>
173. Shiefa S, Amargandhi M, Bhupendra J, Moulali S, Kristine T. First Trimester Maternal Serum Screening Using Biochemical Markers PAPP-A and Free  $\beta$ -hCG for Down Syndrome, Patau Syndrome and Edward Syndrome. *Indian J Clin Biochem* [Internet]. 2013 Jan 12 [cited 2021 May 5];28(1):3–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24381414/>
  174. Andrade C, Santos J, Rita Pinto A, Manso P, Pereira S. Marcadores Bioquímicos do Primeiro Trimestre e Recém-Nascidos Leves para Idade Gestacional. *Acta Med Port* [Internet]. 2014 Apr 30 [cited 2021 May 12];27(2):191. Available from: [www.actamedicaportuguesa.com](http://www.actamedicaportuguesa.com)
  175. Bergstrand E, Borregaard Miltoft C, Tabor A. Performance of first trimester screening for Trisomy 21 in twin pregnancies. *Prenat Diagn* [Internet]. 2021 Jan 12 [cited 2021 May 12];41(2):210–7. Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pd.5857>
  176. Ruipérez Pacheco E, Sánchez Díez D, Izquierdo Méndez N, Asenjo de la Fuente E, Coronado Martín P, Herráiz Martínez MÁ. Low levels of PAPP-A and perinatal complications. *Progresos Obstet y Ginecol* [Internet]. 2019 [cited 2021 Mar 21];62(3):243–6. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6970724>
  177. Antsaklis P, Fasoulakis Z, Theodora M, Diakosavvas M, Kontomanolis EN. Association of Low Maternal Pregnancy-associated Plasma Protein A with Adverse Perinatal Outcome.
  178. Desai N, Krantz D, Roman A, Fleischer A, Boulis S, Rochelson B. Elevated first trimester PAPP-A is associated with increased risk of placenta accreta. *Prenat Diagn* [Internet]. 2014 Feb [cited 2021 May 12];34(2):159–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24226752/>
  179. Wang F, Chen S, Wang J, Wang Y, Ruan F, Shu H, et al. First trimester serum PAPP-A is associated with placenta accreta: a retrospective study. *Arch Gynecol Obstet* [Internet]. 2021 Mar 30 [cited 2021 May 12];303(3):645–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33515274/>
  180. Yaron Y, Ochshorn Y, Heifetz S, Lehavi O, Sapir Y, Orr-Urtreger A. First Trimester Maternal Serum Free Human Chorionic Gonadotropin as a Predictor of Adverse Pregnancy Outcome. *Fetal Diagn Ther* [Internet]. 2002 [cited 2021 May 13];17(6):352–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12393965/>
  181. Sirikunalai P, Wanapirak C, Sirichotiyakul S, Tongprasert F, Srisupundit K, Luewan S, et al. Associations between maternal serum free beta human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -hCG) levels and adverse pregnancy outcomes. *J Obstet Gynaecol (Lahore)* [Internet]. 2016 Feb 17 [cited 2021 May 13];36(2):178–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26368010/>
  182. Benachi A, Dreux S, Kaddioui-Maalej S, Czerkiewicz I, Fakhouri F, Thervet E, et al. Down syndrome maternal serum screening in patients with renal disease. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2010 Jul

- 1 [cited 2021 May 13];203(1):60.e1-60.e4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937810001109>
183. Karidas CN, Michailidis GD, Spencer K, Economides DL. Biochemical screening for Down syndrome in pregnancies following renal transplantation. *Prenat Diagn* [Internet]. 2002 Mar [cited 2021 May 13];22(3):226–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11920899/>
184. Valentin M, Muller F, Beaujard MP, Dreux S, Czerkiewicz I, Meyer V, et al. First-trimester combined screening for trisomy 21 in women with renal disease. *Prenat Diagn* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2021 May 13];35(3):244–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25395363/>
185. Çelen Ş, Engin-Üstün Y, Türkçapar F, Aktulay A, Yılmaz N, Öksüzoğlu A, et al. First trimester biochemical markers in twin pregnancies. *Polish Gynaecol* [Internet]. 2015 [cited 2021 May 17];86(5):362–5. Available from: <http://www.journalssystem.com/gp/Biochemiczne-markery-pierwszego-trymestru-w-ciazy-blizniaczej,2423,0,2.html>

## Anexos

### Anexo 1 – Parâmetros analíticos e respectiva metodologia

	Parâmetros analíticos	Amostra	Equipamento	Metodologia
<b>Função Tiroideia</b>	FT4	Soro	Cobas 8000	ECLIA
	FT3	Soro	Cobas 8000	
	T4	Soro	cobas e411	
	T3	Soro	cobas e411	
	TSH	Soro	Cobas 8000	
	ATg	Soro	Cobas 8000	
	ATPO	Soro	Cobas 8000	
	TRAb	Soro	cobas e411	
	Tiroglobulina	Soro	cobas e411	
	Calcitonina	Soro	cobas e411	
<b>Fertilidade</b>	Progesterona	Soro	Cobas 8000	ECLIA
	Testosterona	Soro	Cobas 8000	
	FSH	Soro	Cobas 8000	
	LH	Soro	Cobas 8000	
	Prolatina	Soro	Cobas 8000	
	Estradiol	Soro	Cobas 8000	
	DHEA-S	Soro	Cobas 8000	
	β-hCG	Soro	Cobas 8000/e411	
	SHBG	Soro	Cobas 8000	
	AMH	Soro	Cobas e411	
	Testosterona livre	Soro	Maglumi	QL
	17-OH-Progesterona	Soro	Maglumi	QL
	Δ4-Androstenediona	Soro	Maglumi	QL
<b>Anemias</b>	Ácido Fólico	Soro	Cobas 8000	ECLIA
	Vitamina B12	Soro	Cobas 8000	
	Ferritina	Soro	Cobas 8000	
	Eritropoietina	Soro	DXI 1	QL
	Anticorpo Fator Intrínseco	Soro	DXI 1	
<b>Marcadores Tumorais</b>	PSA Total	Soro	Cobas 8000	ECLIA
	PSA livre	Soro	Cobas 8000	
	CEA	Soro	Cobas 8000	
	CA-125	Soro	Cobas 8000	
	CA-19.9	Soro	Cobas 8000	
	CA-15.3	Soro	Cobas 8000	
	AFP	Soro	Cobas 8000	
	NSE	Soro	Cobas 8000	
	CA-72.4	Soro	Cobas 8000	
Cyfra 21.1	Soro	Cobas 8000		

	Cromogranina A	Soro	Kryptor	TRACE
<b>Marcadores Cardíacos</b>	Troponina T de alta sensibilidade	Soro	Cobas e411/8000	ECLIA
	Mioglobina	Soro	Cobas e411/8000	
	PRO-BNP	Soro	Cobas e411/8000	
	Digoxina	Soro	Cobas e411	ECLIA
<b>Metabolismo Ósseo</b>	Vitamina D total	Soro	cobas 8000	ECLIA
	Hormona paratiróideia	Plasma	cobas 8000	
	Osteocalcina	Soro	cobas e411	
<b>Crescimento</b>	Hormona do crescimento	Soro	Cobas 8000	
	Insulin-like growth factor 1 (IGF-I)	Soro	cobas e411	
<b>Metabolismo</b>	Cortisol sérico	Soro	Cobas 8000	ECLIA
	Cortisol urinário	Urina 24h	DXI 1	QL
	Hormona adrenocorticotrófica	Plasma	Cobas 8000	ECLIA
<b>Diabetes</b>	Insulina	Soro	Cobas e411	ECLIA
	Péptido C	Soro	Cobas e411	
	Péptido C urinário	Urina 24h	Cobas e411	
<b>Doenças inflamatórias</b>	Procalcitonina	Soro	Cobas e411	ECLIA
<b>Rastreo pré-natal</b>	Papp-A	Soro	Kryptor	TRACE
	$\beta$ -hCG livre	Soro	Kryptor	
<b>Metabolitos diversos</b>	Norepinefrina urinárias	Urina 24h	Agilent HPLC	HPLC
	Epinefrina urinárias	Urina 24h	Agilent HPLC	
	Dopamina urinárias	Urina 24h	Agilent HPLC	
	Ac Vanilmandélico urinárias	Urina 24h	Agilent HPLC	
	Ac. Homovanílico urinárias	Urina 24h	Agilent HPLC	
	Ac. 5- hidroxindolacético urinárias	Urina 24h	Agilent HPLC	
	Metanefrinas totais urinárias	Urina 24h	Agilent HPLC	
	Normetanefrina urinárias	Urina 24h	Agilent HPLC	
	3-Metoxitiramina urinárias	Urina 24h	Agilent HPLC	
<b>Hipertensão</b>	Renina	Plasma	Maglumi	QL
	Aldosterona	Soro	Maglumi	
	Aldosterona urinária	Urina 24h	Maglumi	
<b>Imunossupressores</b>	Ciclosporina	Sangue total	Cobas e411	ECLIA
	Tacrolimus		Cobas 8000	
	Everolimus		Cobas e411	
	Sirolimus		Cobas e411	

ECLIA – Imunoensaio de eletroquimioluminescência, QL – Quimioluminescência, ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay.

## Anexo 2 – Restrições alimentares

Não deve beber	Não deve comer
<ul style="list-style-type: none"><li>• Refrigerantes (ex: coca-cola)</li><li>• Chocolates, cacau, café e chá</li><li>• Bebidas alcoólicas</li><li>• Efervescentes</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Vegetais (ex: beterraba, tomate, beringela, kiwi, banana e ananas)</li><li>• Laranja e outros citrinos</li><li>• Baunilha (em geral doces e confeitaria)</li><li>• Nozes</li></ul>