

Ivo Duarte do Cabo Barreiros

# Relatório de Estágio

## Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Doutor Frederico Valido e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro, 2012



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



# Índice

---

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>III</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>I</b>
<b>II. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTAGIO .....</b>	<b>2</b>
<b>III. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS .....</b>	<b>5</b>
<b>A. QUÍMICA CLÍNICA E MICROBIOLOGIA.....</b>	<b>6</b>
<b>A.1. Química Clínica.....</b>	<b>6</b>
<b>A.2. Microbiologia.....</b>	<b>7</b>
<b>B. HORMONOLOGIA/ IMUNOLOGIA .....</b>	<b>8</b>
<b>B.1. O Setor.....</b>	<b>8</b>
B.1.1. Equipamentos, princípios de funcionamento e técnicas manuais.....	9
B.1.2. Controlo de Qualidade.....	14
<b>B.2. Marcadores Tumorais.....</b>	<b>15</b>
B.2.1. Alfa-fetoproteína (AFP).....	16
B.2.2. Calcitonina .....	16
B.2.3. Antígeno Carcinoembrionário (CEA) .....	16
B.2.4. CYFRA 21.1 .....	17
B.2.5. CA 15.3.....	17
B.2.6. CA 19.9.....	17
B.2.7. CA 72.4.....	18
B.2.8. CA 125.....	18
B.2.9. Enolase NeuroEspecífica (NSE).....	18
B.2.10. Antígeno Específico da Próstata (PSA) .....	19
B.2.11. Antígeno do Carcinoma de Células Escamosas (SCCA) .....	19
B.2.12. Tireoglobulina (TG) .....	19
B.2.13. $\beta$ -hCG .....	20
B.2.14. $\beta$ 2-Microglobulina.....	20
<b>B.3. Hormonas Sexuais.....</b>	<b>21</b>
B.3.1. Prolactina.....	21
B.3.2. Gonadotrofinas FSH e LH.....	21
B.3.3. Estradiol.....	22

B.3.4. Progesterona .....	22
B.3.5. Testosterona .....	22
B.4. <i>Hormonas de Avaliação da Função Tiroideia</i> .....	22
B.4.1. Hormona estimuladora da tiroide (TSH) .....	23
B.4.2. Tetraiodotironina (T4).....	23
B.4.3. Triiodotironina (T3) .....	23
B.5. <i>Eletroforese de proteínas</i> .....	24
B.6. <i>Imunofixação de proteínas</i> .....	24
C. HEMATOLOGIA.....	26
C.1. <i>O Setor</i> .....	26
C.1.1. Equipamentos, princípios de funcionamento e técnicas manuais .....	26
C.1.2. Controlo de Qualidade.....	31
C.2. <i>Hemograma</i> .....	32
C.2.1. Eritrograma.....	32
C.2.2. Leucograma .....	35
C.3. <i>Velocidade de Sedimentação (VS)</i> .....	37
C.4. <i>Hemóstase</i> .....	38
C.4.1. Tempo de Protrombina (PT).....	40
C.4.2. Fibrinogénio.....	40
C.4.3. Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (aPTT).....	41
C.4.4. Tempo de Trombina (TT).....	41
C.4.5. Produtos de Degradação da Fibrina (PDF) .....	42
C.4.6. Anticoagulante Lúpico (AL) .....	42
C.4.7. Fator II e Fator V de Leiden .....	43
<b>IV. CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>

# Lista de Abreviaturas

---

<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotrófica	<b>GnRH</b>	Hormona libertadora de gonadotrofinas
<b>AEQ</b>	Avaliação externa de qualidade	<b>Hct</b>	Hematócrito
<b>AFP</b>	Alfa-fetoproteína	<b>Hgb</b>	Concentração de hemoglobina
<b>AL</b>	Anticoagulante lúpico	<b>INR</b>	<i>International normalized ratio</i>
<b>aPTT</b>	Tempo de tromboplastina parcial ativada	<b>INSA</b>	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
<b>hCG</b>	Gonadotrofina coriônica humana	<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>BMG</b>	$\beta_2$ -microglobulina	<b>IPO</b>	Instituto português de oncologia
<b>CA~</b>	Antigénio carbohidrato	<b>IRMA</b>	<i>Immuno radiometric assay</i>
<b>CEA</b>	Antigénio carcinoembrionário	<b>ISI</b>	<i>International sensitivity index</i>
<b>CIV</b>	Coagulação intravascular disseminada	<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquidiano
<b>CLIA</b>	<i>Chemiluminescence immunoassay</i>	<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>CQI</b>	Controlo de qualidade interno	<b>LB</b>	Linfócitos B
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>LT</b>	Linfócitos T
<b>ECLIA</b>	<i>Electrochemiluminescence immunoassay</i>	<b>MCH</b>	Hemoglobina corpuscular média
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético	<b>MCHC</b>	Concentração de hemoglobina corpuscular média
<b>EMIT</b>	<i>Enzyme Multiplied Immunoassay Technique</i>	<b>MCV</b>	Volume corpuscular médio
<b>EP</b>	Embolismo pulmonar	<b>MN</b>	Mononucleares
<b>EPO</b>	Eritropoetina	<b>MT</b>	Marcador tumoral
<b>FSH</b>	Hormona folículo-estimulante	<b>NSE</b>	Enolase Neuroespecífica
		<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase

## ABREVIATURAS

<b>PDF</b>	Produtos de degradação da fibrina	<b>TVP</b>	Trombose venosa profunda
<b>PMN</b>	Polimorfonuclear	<b>TVVRd</b>	Tempo de veneno de víbora de <i>Russel</i> diluído
<b>PSA</b>	Antigénio específico da próstata	<b>T3</b>	Triiodotironina
<b>PT</b>	Tempo de protrombina	<b>T4</b>	Tetraiodotironina
<b>PTH</b>	Paratormona	<b>VCS Technology</b>	Acrónimo para Volume, Conductivity and Scatter
<b>RIA</b>	<i>Radio immuno assay</i>	<b>VDRL</b>	<i>Veneral Disease Research Laboratory</i>
<b>RBC</b>	Células sanguíneas vermelhas	<b>VS</b>	Velocidade de sedimentação
<b>RDW</b>	Amplitude de distribuição de eritrócitos	<b>WBC</b>	Células sanguíneas brancas
<b>RET</b>	Reticulócitos		
<b>RIQAS</b>	<i>Randox International Quality Assessment Scheme</i>		
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico		
<b>SCCA</b>	Antigénio do Carcinoma de Células Escamosas		
<b>SCT</b>	<i>Silica clotting time</i>		
<b>SPC</b>	Serviço de Patologia Clínica		
<b>TG</b>	Tireoglobulina		
<b>TRACE</b>	<i>Time Resolved Amplified Cryptate Emission</i>		
<b>TRH</b>	Hormona libertadora da tiriotrofina		
<b>TSH</b>	Hormona Estimuladora da Tireoide		
<b>TT</b>	Tempo de trombina		

# Resumo

---

Com o presente relatório de estágio, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, pretende-se descrever todas as atividades nas quais estive envolvido ao longo deste ano letivo no serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG).

Após uma breve introdução à instituição de acolhimento e descrição dos objetivos, será realizada uma apresentação do serviço de Patologia Clínica. Posteriormente serão abordadas as atividades desenvolvidas através de uma descrição muito simples das áreas de Química Clínica e Microbiologia e de uma descrição mais detalhada das áreas de Hormonologia/ Imunologia e Hematologia.

Nas áreas para maior aprofundamento serão ainda referidos os equipamentos existentes e esclarecidos os princípios das metodologias utilizadas. Finalmente serão abordados alguns dos principais parâmetros determinados com o respetivo enquadramento teórico.

**Palavras-chave:** IPO, Patologia Clínica, Hematologia, Imunologia, Endocrinologia.

# Abstract

---

The intention of this report under the Master's Degree in Clinical Analysis is to describe all the activities in which I have participated throughout the year at the Service of Clinical Pathology of Francisco Gentil Portuguese Institute of Oncology at Coimbra (IPOCFG).

After a brief description of the Institution and the objectives of this internship it will be present the Clinical Pathology Service. Posteriorly will be discussed and simple described the activities performed in the clinical chemistry and microbiology laboratories and in more detail the activities performed in the immunology/ endocrinology and haematology laboratories.

Within hormonology/ immunology and haematology activities will be also referred the existing equipment and the methodologies used. Finally, will be discussed some of the parameters determined in these laboratories with the respective theoretical framework.

**Keywords:** IPO, Clinical Pathology, Haematology, Immunology, Endocrinology.





# I. Introdução

---



O Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG) é uma instituição de reconhecido prestígio que presta cuidados de saúde altamente especializados nas áreas da oncologia médica.(1) O Serviço de Patologia Clínica (SPC) constitui um dos muitos serviços que esta unidade hospitalar tem ao dispor dos seus utentes e encontra-se sob a responsabilidade do Dr. Frederico Valido. Foi neste serviço que foi desenvolvido o estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas.

Com uma duração aproximada de seis meses e meio (mais de 800 horas), este estágio permitiu, não só, a integração na rotina laboratorial num serviço de características particulares, mas também a aquisição de uma melhor perceção do que poderá ser o nosso mercado de trabalho. A possibilidade de poderem ser realizados os mais diversos estudos, nos mais diversos fluidos biológicos do organismo humano, alguns deles até, recorrendo a técnicas de diagnóstico que se encontram na vanguarda da ciência e tecnologia, como a citometria de fluxo e a biologia molecular, demonstram a multidisciplinariedade e o quão valioso pode ser o domínio desta área na interpretação clínica e no estabelecimento do diagnóstico.

Após uma apresentação das infraestruturas existentes no serviço de patologia clínica o plano geral do estágio foi desde logo decidido. Iriamos passar um mês em cada setor começando pelo de Química Clínica, seguido da Microbiologia, Hematologia e por fim o setor da Hormonologia/ Imunologia. No final dos 4 meses teríamos de optar pelos setores onde pretendíamos aprofundar o estudo ficando mais um mês em cada um deles. Desta feita os eleitos foram o setor da Hematologia e o da Hormonologia/ Imunologia.

## II. Caracterização do Laboratório de Estágio

---

Todos os parâmetros analíticos realizados neste serviço são solicitados pelo médico mediante o preenchimento de uma requisição em que são assinalados individualmente os testes laboratoriais pretendidos ou por indicação do protocolo pretendido, ao qual corresponde uma bateria de análises. Vários protocolos foram definidos pelo SPC em conjunto com os outros serviços clínicos da instituição de forma a facilitar o pedido de análises.

Todas as requisições que chegam ao serviço são analisadas pelo pessoal administrativo que verificam se estas se encontram devidamente preenchidas antes de procederem à sua admissão. Além do pedido de análises, nestas requisições deve constar a identificação do doente (nome completo, data de nascimento, morada...), o código do serviço requisitante, a data, a assinatura do médico e o seu número mecanográfico, sendo também importante que o médico dê indicação do tipo de amostra a colher e que forneça informações clinicamente relevantes.

Uma vez reunidas estas condições, as requisições são organizadas de modo a gerenciar o processo de colheitas que tanto podem ser realizadas na sala de colheitas do SPC como nas enfermarias. Independentemente do processo de colheita são sempre os técnicos de diagnóstico e terapêutica que as executam, fazendo-se acompanhar da respetiva requisição. Quando a colheita se processa no SPC, o doente é atendido por ordem de chegada, sendo-lhe atribuído um número do dia e uma letra correspondente ao dia da semana que irá identificar a requisição e os tubos da respetiva colheita.

A cada doente é colhida, por punção venosa, a quantidade de sangue total necessária para a realização dos doseamentos requeridos, que de seguida é distribuído pelos diferentes tubos. Cada setor recebe o tubo/ contentor com a amostra a analisar, devidamente identificada e acompanhada pela respetiva requisição, destinada àquele setor.

Após o processamento analítico os resultados são validados pelo médico ou técnico superior de saúde responsável pelo setor que os pode disponibilizar ao clínico em suporte de papel, informaticamente, ou ainda por telefone nos casos de emergência. Quando fornecidos por escrito, devem ir assinados pelo responsável do setor sendo posteriormente recolhidos pelo pessoal administrativo que os reenviam aos serviços requisitantes.

Como qualquer laboratório que procura alcançar a qualidade do seu “produto”, o SPC possui todos os requisitos necessários para que tal seja possível, desde manuais de

procedimentos internos e programas de manutenção, até programas de garantia e controlo de qualidade e apostas na formação de todos os seus funcionários. Desta forma o SPC demonstra a preocupação com uma melhoria contínua da qualidade e garante um elevado grau de confiança e fiabilidade nos resultados reportados. Assim sendo, o SPC submete-se a dois sistemas de controlo de qualidade, o controlo de qualidade interno (CQI) e o controlo qualidade externo (CQE). Através do CQI é possível a monitorização contínua das práticas de trabalho, do equipamentos e dos reagentes. Neste controlo as concentrações do analito são previamente conhecidas. O CQE consiste na avaliação por terceiros, do desempenho do laboratório. É recebida uma amostra de características desconhecidas que deve ser manipulada sob as condições habituais de funcionamento do laboratório. Os resultados obtidos são depois analisados e comparados com os obtidos por outros participantes.

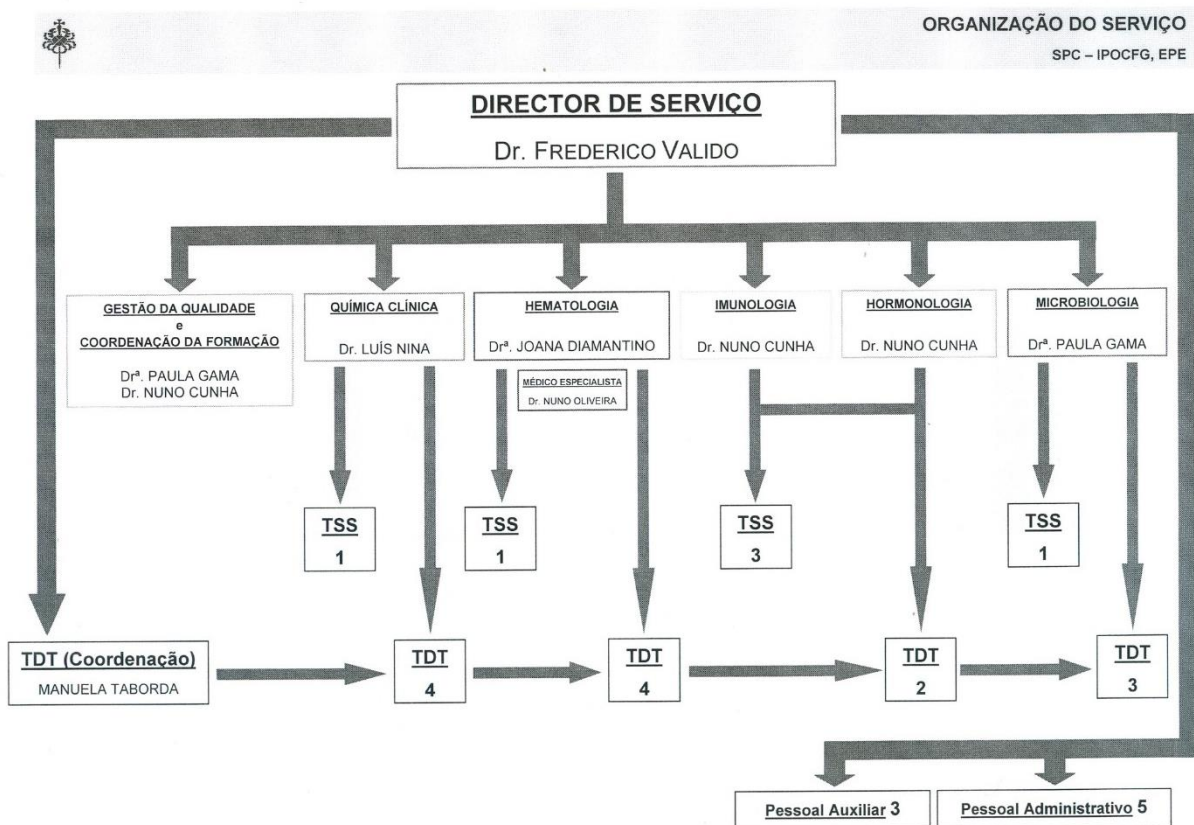


Ilustração I – Organograma do serviço de patologia clínica

**Número de Amostras**

	2010	2011
<b>Química Clínica</b>	792496	790891
<b>Microbiologia</b>	11971	10893
<b>Imunologia</b>	71300	69771
<b>Hormonologia</b>	38980	37501
<b>Hematologia</b>	133062	123675
<b>Número de Doentes</b>	65440	67351

Tabela I – Dados estatísticos relativos ao número de análises realizadas no serviço de patologia clínica. Pode verificar-se um decréscimo do número de análises pedidas mas o número de doentes aumentou

**Nº DE ANÁLISES 2011**

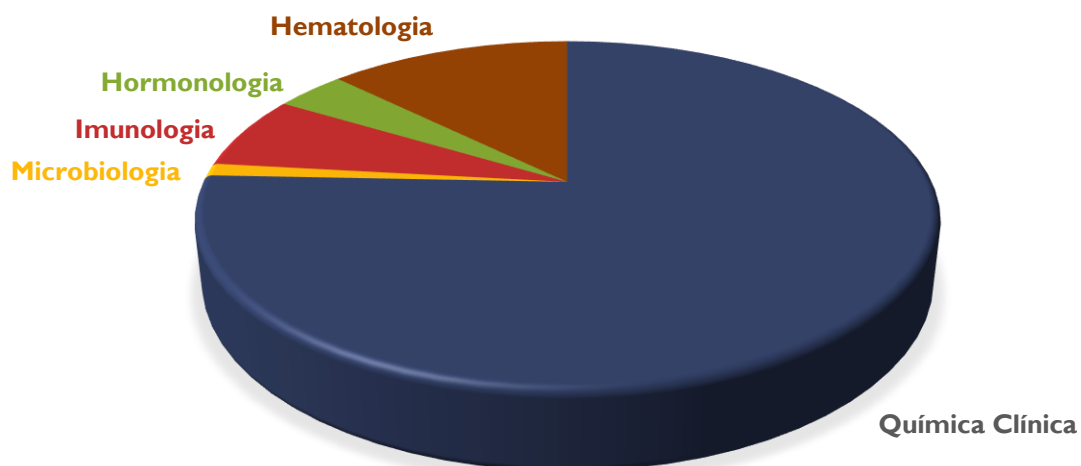


Gráfico 1 – Distribuição de análises realizadas por serviço no ano de 2011

### III. Atividades desenvolvidas

---

Ao longo de todo este estágio, os profissionais de saúde de qualquer um dos setores dispuseram-se a dar todo o apoio necessário promovendo sempre a participação proactiva quer na execução do trabalho de rotina quer já na validação dos resultados. Favoreceram a aprendizagem procurando esclarecer as questões práticas do dia-a-dia dos serviços e insistiram para que fossem colocadas dúvidas. Sugeriram, também, a realização de diversas técnicas manuais e todos os setores procuraram mostrar os procedimentos de calibração e realização dos controlos internos, bem como as manutenções periódicas dos equipamentos.

Dada a extensão do estágio tive ainda a oportunidade de participar ativamente num dos programas de avaliação externa da qualidade (AEQ) no setor de microbiologia ajudando o responsável pelo setor na identificação microbiológica e estabelecimento do perfil de suscetibilidade aos antibióticos. Ainda neste setor, surgiu a oportunidade de acompanhar os procedimentos efetuados quando são realizadas colheitas na enfermaria.

No setor da hematologia, além da integração na rotina, execução de técnicas manuais e interpretação dos resultados, tive a oportunidade de fazer a marcação celular para posterior estudo imunofenotípico por citometria de fluxo, tendo sido também avaliados alguns dos casos e feita a respetiva interpretação clínica.

Na hormonologia/ imunologia também me integrei a rotina diária, participei na admissão das amostras ao setor e executei algumas técnicas manuais. Como o estágio coincidiu com a altura dos concursos por parte das empresas que comercializam os seus produtos e equipamentos, foi possível assistir a algumas ações de formação promovidas pelas entidades empresariais que os comercializam e participar na avaliação destes equipamentos.

## A. Química Clínica e Microbiologia

### A.1. Química Clínica

É o setor que apresenta o maior fluxo de amostras diariamente. Aqui são avaliados os mais diversos parâmetros bioquímicos, característicos do funcionamento do organismo humano. Este será, provavelmente, o setor mais automatizado.

Em termos de recursos humanos, o serviço de química clínica é constituído por um médico especialista em patologia clínica, uma técnica superior de saúde e por quatro técnicas de diagnóstico e terapêutica.

Após a colheita, executada segundo o manual das boas práticas vigente, as amostras seguem para o setor sendo imediatamente centrifugadas e cuidadosamente identificadas. A maioria das determinações analíticas do serviço é realizada no soro pelo que é importante que os tubos utilizados apresentem micropartículas de aceleração da coagulação de forma a agilizar todo o procedimento analítico. Certas determinações, no entanto, poderão ser executadas em sangue total, plasma ou até outros produtos para além do sangue como o líquido cefalorraquidiano (LCR). Uma vez feita a admissão das amostras, estas são encaminhadas para os diferentes equipamentos conforme os parâmetros que se pretendem determinar.

Entre os parâmetros realizados, além de habitual a bateria de testes bioquímicos determinada nos laboratórios de análises clínicas (colesterol, triglicédeos, glicose, transaminases hepáticas,...), a gasometria ou o ionograma, são também executadas determinações mais específicas como a hemoglobina glicosilada, teste da mononucleose infecciosa, teste da *Brucella*, VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*), teste do Lúpus Sistémico Eritematoso, entre outros.

O controlo de qualidade a nível interno é realizado diariamente, antes do início do trabalho e para cada um dos equipamentos, com recurso a controlos comerciais. Os valores obtidos são depois estudados segundo as regras de Westgard. Os controlos internos poderão ainda ser repetidos sempre que tal se justifique.

O setor participa também em programas periódicos de AEQ promovidos pelo *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS) e pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).

## **A.2. Microbiologia**

Setor destinado ao estudo microbiológico de diversos produtos biológicos e o que mais depende do analista clínico. As amostras que aqui chegam podem ter como finalidade estudos bacteriológicos, parasitológicos ou até micológicos. Estas amostras podem ainda ser dos mais variados tipos, deste uma simples urina até exsudados vaginais, expetorações, lavados brônquicos, LCR e outros fluidos biológicos, pús, sangue (hemocultura), fezes, escamas da pele e unhas ou até dispositivos médicos, como cateteres. Como tal requerem cuidados próprios durante a sua colheita.

Os recursos humanos existentes no setor são constituídos por uma médica especialista em patologia clínica, uma técnica superior de saúde e três técnicos de diagnóstico e terapêutica.

Após a receção das amostras são verificadas as condições de colheita, segundo as considerações do manual das boas práticas para cada tipo de amostra, e quais os exames a executar. Pode ser necessário fazer uma simples análise quantitativa e qualitativa da urina ou uma observação do sedimento urinário, com uma cuidadosa pesquisa e identificação de microrganismos responsáveis por graves doenças respiratórias ou por uma septicémia, seguida da determinação do seu perfil de suscetibilidade aos antibióticos.

Neste setor é também essencial que se trabalhe em condições de assepsia e que a escolha dos meios a inocular seja muito bem pensada, de forma a obter uma boa recuperação dos microrganismos que pensamos ser causadores da situação patológica para podermos prosseguir os estudos. O microscópio ótico representa um dos mais valiosos suportes que nos pode guiar num diagnóstico preliminar.

No setor de microbiologia são também efetuados o CQI e o CQE. O CQI é efetuado periodicamente com estirpes conhecidas, adquiridas comercialmente, às quais são aplicadas as técnicas usadas na rotina. Periodicamente é também executado o CQE do INSA no qual são fornecidas amostras cegas e é solicitado que sejam processadas normalmente e que os resultados obtidos sejam enviados. Posteriormente são fornecidos os resultados esperados pela AEQ.

## **B. Hormonologia/ Imunologia**

### **B.1. O Setor**

O setor da endocrinologia/imunologia é, provavelmente, o mais desenvolvido no serviço de patologia clínica, o que é compreensível já que o IPOCFG E.P.E é uma unidade hospitalar de oncologia. Os recursos humanos do setor são compostos por profissionais de saúde, entre os quais, técnicos superiores de saúde especialistas e técnicos de diagnóstico e terapêutica.

A hormonologia e a imunologia são dois setores que ocupam o mesmo espaço físico comportando-se estrutural e organizacionalmente como um grande setor. De entre todos os outros, este é o setor de maiores dimensões e está dividido em vários espaços. Num deles, encontram-se os autoanalisadores de imunoquímica onde são estudados marcadores tumorais e hormonas, e realizados testes de avaliação cardíaca e monitorização de fármacos, além da serologia infecciosa. Possui ainda espaços apropriados à execução de técnicas manuais. Esta área está também dedicada ao registo, processamento e validação das amostras do setor. Um outro espaço está destinado ao estudo eletroforético e imunofixação das proteínas tendo ainda um contador gamma, uma estufa, uma centrífuga refrigerada, uma ultracentrífuga e uma *hotte*. Dentro do setor existe, ainda, um microscópio de fluorescência para estudos específicos de autoimunidade.

O sistema informático do setor de endocrinologia/imunologia possui um *software* de processamento de dados, independente dos outros setores, que atribui a cada doente um número de registo independente e interno para melhor organização e distribuição do serviço. Os tubos são identificados por código de barras com numeração sequencial, para além do número do dia de registo e do número de identificação do paciente (número de processo). Este sistema permite que os autoanalisadores funcionem em rede (LIS) com o *software* central. Além disso a comunicação feita em modo “*query*” é bidirecional, isto é, são enviados para os equipamentos os parâmetros a dosear e estes correspondem com os resultados, completando o pedido por doente. O processo é finalizado com a validação biopatológica.

Este sistema utiliza perfis analíticos internos (MAM, PUL, DI, TI,...) consoante os parâmetros a determinar e que facilitam o registo informático e informam o profissional de saúde sobre o percurso que cada amostra tem de fazer.



Neste setor a maioria das determinações são executadas no soro ou no plasma. Os tubos sem preparação são os mais utilizados por este setor e contêm microesferas que aceleram a coagulação e permitem uma separação física entre o soro e as células. Determinações como a hormona adrenocorticotrófica (ACTH) e as metanefrinas plasmáticas, são executadas em tubos com sangue contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), colhido e separado a frio, enquanto que para a renina o sangue é colhido e separado à temperatura ambiente. São realizadas determinações na urina tais como o iodo, proteína de *Bence-Jones*, metanefrinas, ácido 5-OH-indolacético e ácido vanilmandélico.

### B.1.1. Equipamentos, princípios de funcionamento e técnicas manuais

Este setor é constituído por diversos tipos equipamentos, que no geral executam diferentes tarefas e determinações. De seguida serão descritos aqueles com os quais tive maior contacto e que geralmente tem maior carga de trabalho.

#### B.1.1.1. Siemens IMMULITE® 2000™ e VersaCell System™



Fig. 1 – Siemens IMMULITE 2000

Analizador de imunologia da Siemens. Este sistema realiza ensaios tendo como base a tecnologia de quimioluminescência (CLIA) e utiliza esferas de poliestireno com anticorpos específicos adsorvidos à superfície como fase sólida.(2, 3) Cada esfera é dispensada num tubo de reação com características próprias que serve como recipiente

de incubação, lavagem e desenvolvimento do sinal. De seguida a amostra é incubada com o anticorpo marcado com uma enzima (fosfatase alcalina) sendo que, posteriormente, a mistura é separada da esfera através de uma rotação a alta velocidade do tubo de reação sobre o seu próprio eixo vertical, fazendo com que o material excedente se acumule numa câmara superior do tubo. Segue-se uma série de 4 lavagens para assegurar que a esfera fica desprovida de qualquer fração não ligada. A fração ligada é então quantificada utilizando como substrato quimioluminescente o dioxetano que, ao reagir com a fosfatase alcalina ligada à esfera, promove a emissão de luz. A intensidade de luz emitida é detetada por um fotomultiplicador sendo o resultado, calculado com base numa curva padrão. Podem ser realizados ensaios em sandwich ou competitivos.(2, 3)

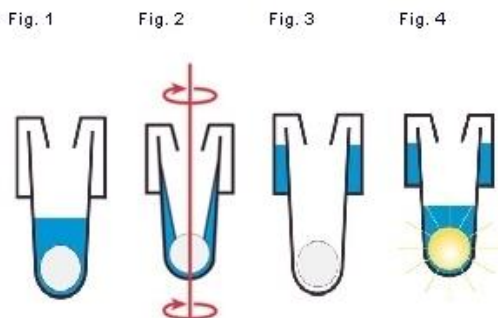


Ilustração 2 – Representação esquemática das diferentes fases da análise executada pelo IMMULITE

**B.1.1.2. B·R·A·H·M·S KRYPTOR®**



Fig. 2 – Brahms Kryptor

Analisador de imunologia para doseamento de marcadores tumorais cujo princípio de funcionamento se baseia na tecnologia TRACE (*Time Resolved Amplified Cryptate Emission*). Esta tecnologia consiste na transferência de energia não radioativa entre dois marcadores fluorescentes em que um funciona como dador (criptato de európio) e o outro

como recetor (XL665). Trata-se de um ensaio imunométrico tipo “sandwich” em que os dois anticorpos específicos do antígeno a dosear estão marcados com um fluorocromo.(4)

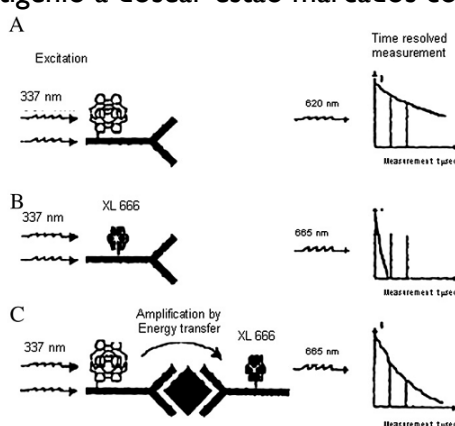


Ilustração 3 – Representação esquemática do processo de excitação e amplificação

Este tipo de interação requer uma proximidade física entre o dador e aceitador de modo que só quando se forma um complexo com o antígeno é que o fluorocromo aceitador é eficazmente excitado. A formação do complexo antígeno-anticorpo e a consequente transferência de energia do criptato para o XL665 permite o prolongamento temporal e a intensificação do sinal de fluorescência do XL665. A intensidade de sinal obtido será proporcional à concentração do antígeno.(4)

Estes ensaios baseiam-se no princípio de ensaio homogéneo sendo, deste modo, dispensados os processos demorados de separação e lavagem e tornado possível a execução de medições sem interromper a reação. Isto permite uma análise cinética que logo no início da incubação é capaz de reconhecer amostras altamente concentradas possibilitando que sejam automaticamente diluídas por um fator de diluição apropriado e então analisadas novamente.(4)

### B.1.1.3. Roche cobas® e 411



Fig. 3 – cobas e 411

Analizador de imunologia baseado na tecnologia de eletroquimioluminescência (ECLIA).(5) Este equipamento utiliza micropartículas revestidas com estreptavidina, anticorpos monoclonais específicos biotinizados e anticorpos monoclonais específicos para cada analito,

marcados com um quelato de rutênio. Todos estes compostos reagem entre si formando um complexo tipo “sandwich”. Esta mistura é então fixada magneticamente, graças as micropartículas de estreptavidina, na superfície de um elétrodo permitindo que todo o material não fixado seja removido. Por fim, é aplicada uma corrente elétrica no elétrodo que induz uma emissão quimioluminiscente, por parte do rutênio, que é medida por um fotomultiplicador. Neste caso a concentração do analito será diretamente proporcional à intensidade do sinal.(6)

Este equipamento poderá também executar ensaios competitivos que no lugar do antigénio monoclonal específico para o analito, é utilizado um derivado do analito marcado com o complexo de rutênio que irá competir diretamente com o da amostra do doente pelo local de ligação do anticorpo específico biotinizado. A concentração do analito será inversamente proporcional à intensidade do sinal.

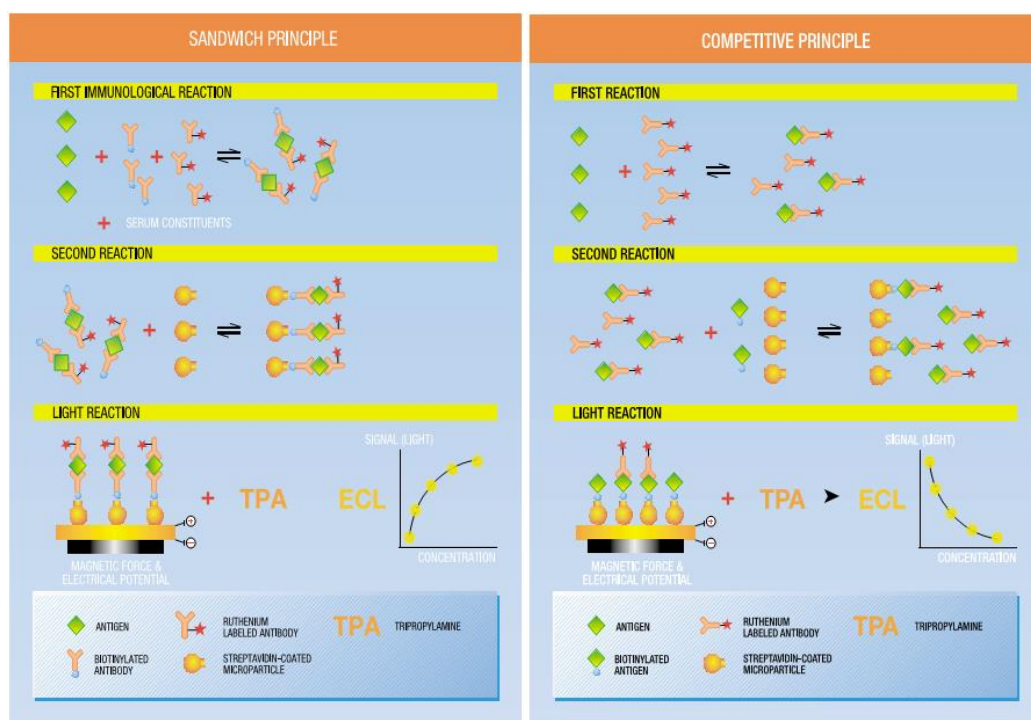


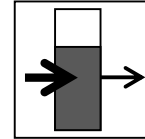
Ilustração 4 – Representação esquemática dos princípios de funcionamento do equipamento da Roche. À esquerda o método “sandwich”. À direita o método competitivo

**B.1.1.4. Thermo Scientific KoneLab 30**



Fig. 4 – KoneLab

Equipamento cujo princípio de funcionamento é a imunoturbidimetria. A turbidimetria baseia-se na detecção ótica de partículas muito pequenas suspensas em líquido por decréscimo da luz transmitida. Quando o anticorpo específico reage com o analito presente na amostra formam-se imunocomplexos insolúveis que induzem uma turbidez que é



medida por espectrofotometria. Esta turbidez será proporcional à concentração de analito na amostra.

**B.1.1.5. DiaSorin Liaison®**



Fig. 5 – Liaison

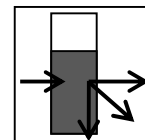
Equipamento destinado principalmente à determinação dos marcadores cardíacos e serologia infecciosa, baseado no princípio da quimioluminescência clássica. Distingue-se do Immulite por utilizar partículas paramagnéticas revestidas com os anticorpos monoclonais específicos e os anticorpos policlonais estarem conjugados com um derivado do isoluminol.(7)

**B.1.1.6. Siemens BN ProSpec®**



Fig. 6 – ProSpec

Equipamento baseado na tecnologia de nefelometria e especialmente dedicado ao doseamento de proteínas específicas. Possível substituto do KoneLab dada a sua tecnologia mais avançada que apesar do princípio ser o mesmo da turbidimetria difere no sistema de deteção.



Ao invés de ser medido o decréscimo da intensidade de luz, é medida a luz que é dispersa, tornando a determinação mais precisa.

**B.1.1.7. Siemens Viva-E®**

Fig. 7 – Viva-E

Sistema destinado à monitorização de fármacos e baseado na tecnologia EMIT (*Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*). É um ensaio imunoenzimático homogêneo competitivo no qual o analito alvo, presente na amostra, e um fármaco marcado enzimaticamente (G6PDH) competem pela ligação ao mesmo anticorpo. Na presença de fármaco na amostra, o fármaco marcado enzimaticamente não se liga ao anticorpo permitindo que esta enzima reaja com um substrato. A velocidade de formação deste produto é então determinada fotometricamente e a concentração do fármaco será calculada por comparação com a velocidade obtida em diferentes concentrações do fármaco conhecidas.(8)

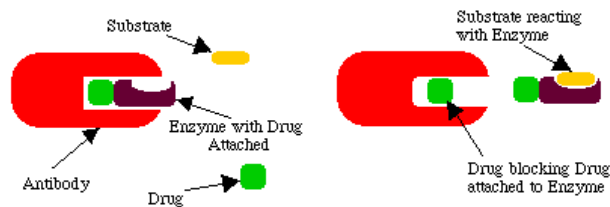


Ilustração 5 – Representação esquemática do princípio de funcionamento do Viva-E

**B.1.1.8. Pharmacia Diagnostics UniCAP® 100 E**

Fig. 8 – UniCAP 100 E

Equipamento destinado ao estudo das alergias e que também se baseia nas técnicas imunoenzimáticas heterogêneas. Difere, no entanto, no sistema de detecção uma vez que são utilizados anticorpos marcados com um fluorocromo contra o antígeno/ anticorpo de interesse. A intensidade de fluorescência será proporcional a quantidade do analito na amostra.

**B.1.1.9. Sebia Hydrasys®**

Fig. 9 – Hydrasys

Equipamento semiautomático destinado à eletroforese e imunofixação de proteínas. É constituído por dois módulos que funcionam de modo independente. O da esquerda é destinado à corrida eletroforética sendo apenas necessário colocar o gel de agarose e um “pente” aplicador da amostra. No caso de ser uma imunofixação é ainda necessário um passo extra no qual é usada uma “máscara” que serve para aplicar os anticorpos. O módulo da direita destina-se à coloração e secagem do gel de forma a revelar o resultado.

**B.1.1.10. Técnicas Manuais**

## B.1.1.10.1. Imunológicas

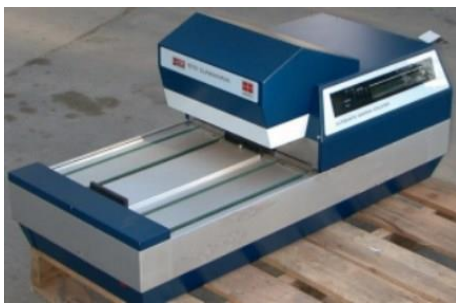


Fig. 10 – Contador Gamma

Consoante a técnica a executar o princípio do teste pode ser a RIA (*Radio Immuno Assay* – método competitivo) ou a IRMA (*Immuno Radiometric Assay* – método “sandwich”). Estas técnicas implicam o uso de material radioativo (anticorpos monoclonais marcados com  $^{125}\text{I}$ ) e de um leitor da radiação gamma emitida pelo radioisótopo. (9) Apresentam no entanto, diversos

inconvenientes, quer de ordem técnica, quer de segurança para o analista que manipula este tipo de substâncias. Entre outras, o marcador radioativo tem uma semi-vida curta pelo que os *kit's* têm de ser utilizados dentro do curto prazo estabelecido pela firma, são técnicas muito demoradas, com longos períodos de incubação e muitos passos que requerem grande prática de manuseamento por parte do analista. Por estas razões estes métodos tem vindo a ser substituídos, sempre que possível, pelos de quimioluminescência e de fluorescência.

## B.1.1.10.2. Cromatográficas

As técnicas manuais cromatográficas são utilizadas para a quantificação dos metabolitos excretados na urina. Estas técnicas usam colunas de extração que contém resinas de modo a permitirem a remoção diferencial do metabolito de interesse. Numa primeira etapa, fica retido na coluna e só após a adição de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) é que é eluído. Posteriormente é quantificado por espectrofotometria.

**B.1.2. Controlo de Qualidade**

Diariamente, e antes do início do trabalho, são efetuados dois níveis de CQI para todos os parâmetros doseados em cada equipamento. Uma vez executados, são avaliados segundo as regras de *Westgard*. Neste setor existe, ainda, a possibilidade destes controlos internos serem comparados e consultados através de um *software* informático com todos os laboratórios que usem os mesmos *kit's* e os mesmos equipamentos. Isto não só permite avaliar o desempenho do laboratório, como também permite despistar causas prováveis para o desvio aos valores esperados. São também realizados periodicamente controlos de AEQ, sendo que, este setor participa em dois diferentes programas, o *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS), e do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).



Sempre que se trate de uma técnica manual é realizado o controlo apropriado em simultâneo com as amostras, podendo também ser incluído um controlo de qualidade externo sempre que pretenda fazer esta avaliação.

## B.2. Marcadores Tumorais

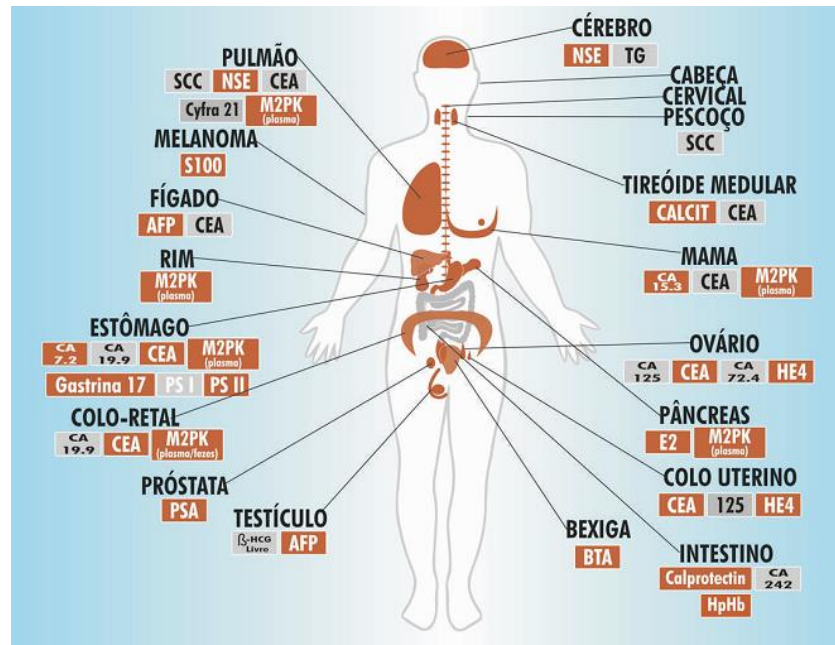


Ilustração 6 – Principais marcadores tumorais

Um marcador tumoral (MT) pode ser definido como uma molécula biologicamente estável e com características muito variáveis, cujo aparecimento ou alteração da sua concentração, poderá alertar para a génese, presença ou evolução de um tumor de características malignas.(10) O estabelecimento de uma classificação universal não é fácil pois cada um deles poderia pertencer a mais que um grupo. No entanto, podem considerar-se genericamente dois grandes grupos de marcadores tumorais, por um lado as moléculas produzidas de novo ou em maior quantidade pelas células malignas do que pelo tecido normal, por outro, moléculas que foram induzidas pelo próprio hospedeiro em resposta células malignas possivelmente presentes.(11)

Deste modo um marcador tumoral poderá ser qualquer tipo de molécula, com qualquer tipo de função biológica, desde enzimas e hormonas, até antigénios de função desconhecida ou oncoproteínas. A sua principal utilidade é a possibilidade de manipulação clínica de doentes com cancro, auxiliando nos processos de diagnóstico, estadiamento da doença, avaliação da resposta terapêutica, deteção de recidivas e prognóstico. (10)

Como não existe um marcador ideal, e porque as suas elevações podem estar associadas a processos fisiológicos ou de progressão benigna, é importante não esquecer que

os marcadores tumorais servem apenas como exame de diagnóstico complementar devendo ser solicitados devidamente enquadrados com o quadro suspeito e juntamente com outros métodos de diagnóstico clínico.

### **B.2.1. Alfa-fetoproteína (AFP)**

A alfafetoproteína é uma proteína produzida pelo feto em desenvolvimento com importantes funções de transporte plasmático e de manutenção da pressão oncótica que diminui depois do nascimento e permanece baixa em crianças e adultos. Pode estar elevada em doentes portadores de tumores gastrointestinais e hepatocarcinoma mas também nos casos de hepatite e cirrose. (10, 11)

Tem como principal utilidade a monitorização do hepatocarcinoma sendo que a sua presença sugere persistência da doença e a sua concentração relaciona-se com a massa tumoral. Pode ser ainda utilizada na monitorização terapêutica do carcinoma testicular.(10)

### **B.2.2. Calcitonina**

Trata-se de uma hormona polipeptídica secretada pelas células C parafoliculares da tiroide. Juntamente com a paratormona (PTH) regula o metabolismo do Cálcio e do Fósforo no organismo. Em resposta ao aumento dos níveis séricos de cálcio a sua principal função é a inibição da reabsorção óssea pela regulação do número e atividade dos osteoclastos.(10, 11)

A sua maior utilidade como marcador tumoral é no seguimento de doentes com carcinoma medular da tiroide. É utilizado no diagnóstico precoce em doentes de risco (história familiar) e os seus níveis parecem correlacionar-se com a massa do tumor e com a presença de metástases. Pode ainda estar elevado em doenças como anemia perniciosa, insuficiência renal crónica, cirrose alcoólica, hiperparatiroidismo e doença de *Paget* óssea.(10)

### **B.2.3. Antigénio Carcinoembrionário (CEA)**

Produzido pelas células da mucosa gastrointestinal, está principalmente relacionado com o carcinoma colo-retal e é particularmente útil para avaliação do estadio, monitorização terapêutica e prognóstico da doença. É também um marcador complementar frequentemente associado a outros marcadores, sendo encontrados níveis séricos elevados em neoplasias malignas do pulmão, pâncreas, trato gastrointestinal, trato biliar, tiroide, colo do útero, ovário e mama. Estes níveis podem ainda elevar-se em doentes com metástases.(10, 11)

Distúrbios benignos como cirrose alcoólica, doença de Crohn, doenças hepáticas, doenças intestinais, doença fibrocística da mama, bronquite, tabagismo e insuficiência renal podem também gerar elevações do CEA.(10)



**B.2.4. CYFRA 21.1**

É um fragmento da citoqueratina 19 encontrado no soro. Este marcador tem alta sensibilidade para o carcinoma de células escamosas e é um fator de mal prognóstico no carcinoma de células escamosas do pulmão. Encontra-se também elevado no carcinoma pulmonar de não pequenas células, cancro da bexiga, do colo uterino e da cabeça e pescoço. Aumentos inespecíficos podem ser encontrados em algumas patologias benignas pulmonares, gastrointestinais, ginecológicas urológicas e de mama.(10, 11)

As suas concentrações estão correlacionadas com o processo crescente do tumor e são particularmente uteis na monitorização do decurso da doença.(10)

**B.2.5. CA 15.3**

É o marcador tumoral, por excelência, do cancro da mama sendo mais específico e sensível que o CEA. A sua sensibilidade varia de acordo com a massa tumoral e estadio clínico sendo altamente sensível na doença disseminada. A concentração correlaciona-se com a progressão da doença e a sua diminuição está associada à regressão tumoral. No entanto, não tem valor diagnóstico na doença precoce.(10, 11)

A grande utilização do CA 15.3 é no diagnóstico precoce de recidiva, precedendo os sinais clínicos em até 13 meses.

Níveis elevados podem ser observados em varias outras neoplasias como cancro do ovário, pulmão, colo do útero, hepatocarcinoma e linfomas. Situações benignas como hepatite crónica, tuberculose, sarcoidose e lúpus eritematoso sistémico também podem levar à elevação do CA15.3.(10)

**B.2.6. CA 19.9**

Marcador tumoral indicado para a determinação do estadio e monitorização do tratamento do cancro do pâncreas e trato biliar e, quando associado ao CEA, no *follow-up* do cancro colo-retal. (10, 11)

O CA 19.9 possui uma sensibilidade variada consoante a localização do tumor podendo também positivar no carcinoma hepatocelular, gástrico, mama, pulmão e da cabeça e pescoço. Outras doenças como cirrose hepática, pancreatite, doença inflamatória intestinal e doenças autoimunes também podem levar à sua elevação.(10)

**B.2.7. CA 72.4**

Também denominado TAG-72, este marcador tem elevada especificidade para o cancro, mas baixa sensibilidade de órgão. No entanto, em associação com o CEA, é o MT de primeira escolha para despiste do carcinoma do estômago e um MT complementar do CA 125 para o carcinoma do ovário. Contrariamente ao CA 125, apresenta-se elevado no carcinoma mucinoso do ovário e dada a sua especificidade permite a discriminação entre tumor maligno e doenças benignas gastrointestinais. É ainda útil na monitorização terapêutica e controlo de recidiva de carcinomas do trato gastrointestinal.(10, 11)

Aumentos discretos do marcador podem ser encontrados em processos inflamatórios e em doenças benignas gastrointestinais.

**B.2.8. CA 125**

Produzido por uma variedade de células é o MT de eleição no carcinoma do ovário, mais particularmente dos adenocarcinomas serosos. Atualmente, a sua principal função é a monitorização da resposta terapêutica e o *follow-up* dos doentes com cancro epitelial do ovário já que a elevação deste MT pode ocorrer dois a doze meses antes de qualquer evidência clínica de recorrência.(10, 11)

Doentes com carcinoma da mama, útero (endométrio e colo), pulmão, estômago e colo-retal também podem estar associados à sua elevação.(10)

Podem ainda encontrar-se níveis elevados desta mucina em mulheres grávidas ou durante a menstruação, em condições benignas como endometriose e quistos no ovário e em pessoas com cirrose, hepatite ou pancreatite.

**B.2.9. Enolase NeuroEspecífica (NSE)**

A NSE é uma enzima glicolítica encontrada em tecido neuronal e nas células do sistema neuroendócrino. É utilizado como auxiliar de diagnóstico do carcinoma de pequenas células do pulmão, no entanto, tem sido também detetado em doentes com neuroblastoma, carcinoma medular da tiroide, tumores carcinoides, tumores do pâncreas endócrino e melanoma. Parece ser útil na monitorização do tratamento e os seus níveis correlacionam-se com o estadio da doença, apresentando utilidade prognóstica, e até possibilidade de antever uma recidiva da doença.(10, 11)

Este marcador possui uma fonte de erro pré-analítica importante, que é o facto dos eritrócitos, células plasmáticas e plaquetas possuírem NSE e, portanto, caso haja hemólise ou se a centrifugação do sangue for executada tardiamente podem-se gerar falsas elevações.

Situações benignas como insuficiência renal, pneumopatias e traumatismos cranianos podem ser causa de aumentos inespecíficos.(11)

### **B.2.10. Antígeno Específico da Próstata (PSA)**

Proteína produzida tanto por células prostáticas normais como patológicas. O nível de PSA no sangue pode estar elevado tanto em homens cujo crescimento da próstata seja benigno (comuns em homens idosos) como maligno não permitindo aos médicos fazer esta distinção. Todavia, um nível elevado de PSA alerta sempre para a necessidade de outros testes para determinar a presença, ou não, do tumor. Doseamento da PSA total juntamente com a PSA livre (com o cálculo razão  $(PSAL \times 100) / PSA_t$ ) e um exame médico como o toque retal tornam-se fundamentais para o estabelecimento do diagnóstico.(10, 11)

O teste de PSA é excelente para a monitorização da resposta ao tratamento do cancro da próstata. O nível sérico declina após tratamento curativo (embora níveis normais não excluam carcinoma persistente), enquanto níveis crescentes indicam doença residual e progressiva. O PSA não serve como método de triagem devido aos baixos níveis deste marcador nos estádios de desenvolvimento iniciais.(10)

Elevações dos níveis séricos podem ainda ser observadas em doentes com patologias prostáticas não malignas tais como Hiperplasia Benigna da Próstata e prostatite ou devido a procedimentos cirúrgicos ou de manipulação prostática durante procedimentos médicos.(10)

### **B.2.11. Antígeno do Carcinoma de Células Escamosas (SCCA)**

Glicoproteína de superfície celular que se correlaciona com o estadio de desenvolvimento clínico e decurso dos carcinomas das células escamosas do colo uterino, pulmão, cabeça e pescoço. Embora este marcador possa ser útil na monitorização destas neoplasias, a baixa especificidade e sensibilidade em estádios precoces limitam o seu papel na deteção precoce e diagnóstico.(11, 12)

Valores elevados de SCC antes do tratamento parecem estar associados a um mal prognóstico.(12)

### **B.2.12. Tireoglobulina (TG)**

Glicoproteína produzida pelas células foliculares da tiroide. É a proteína precursora das iodotironinas (T3 e T4) e a sua velocidade de síntese está dependente da TSH. Pode ser usada como MT do carcinoma da tiroide, folicular ou papilar mas como qualquer doença relacionada com a massa ou com o aumento da atividade do tecido tiroideu poderá também induzir o

aumento dos níveis séricos de TG, esta proteína não tem grande valor na discriminação entre doença benigna ou maligna. (11, 12)

Apresenta, porém um importante papel na abordagem do tumor da tireoide pois permite a monitorização da progressão da doença depois da tireoidectomia total. Após a cirurgia a TG sérica pode elevar-se temporariamente, retomando aos níveis normais dentro de 4 a 6 semanas. Níveis residuais ou recorrentes devem levantar suspeita de recidiva local ou metástases.(13)

Aumentos não específicos poderão ocorrer na tireoidite autoimune, adenoma toxico tireoideo e bócio.

### **B.2.13. $\beta$ -hCG**

Fração beta da Gonadotropina Coriônica Humana que normalmente é secretada pela placenta durante a gravidez. Devido aos elevados níveis de HCG no sangue e na urina de quase todas as mulheres com doença trofoblástica constitui um excelente marcador tumoral para essa doença. Elevações deste MT podem ainda estar associadas à presença de cancro das células germinativas (testículo e ovário).(10, 11)

Doentes com patologias benignas como, doença inflamatória do intestino, úlceras duodenais e cirrose ou cancros da mama, pulmão, pâncreas, ovário ou gastrointestinais podem induzir elevação dos níveis de HCG.(12, 13)

### **B.2.14. $\beta$ 2-Microglobulina**

Polipeptídeo associado a complexo major de histocompatibilidade HLA-tipo I e, por isso, expresso em quase todas as células nucleadas.(10)

O seu aumento no soro tem sido associado a uma variedade de doenças malignas incluindo o mieloma múltiplo, linfoma e tumores sólidos. Níveis elevados de BMG correlacionam-se com o volume tumoral e com a elevação dos níveis creatinina sérica que são importantes fatores na determinação do desenvolvimento e prognóstico no mieloma múltiplo. Níveis séricos elevados de BMG têm também mostrado valor preditivo de insucesso terapêutico e sobrevida insatisfatória em doentes com linfoma. (10, 13)

Por estas razões tornou-se um marcador utilizado para monitorizar o mieloma múltiplo e algumas leucemias e linfomas.

### **B.3. Hormonas Sexuais**

Sobre a regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gónadal as hormonas sexuais desempenham um papel muito importante na regulação de inúmeros processos fisiológicos tais como a maturação das células sexuais (óvulos e espermatozoides) e desenvolvimento de caracteres sexuais secundários. (12)

O hipotálamo produz a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), que por sua vez vai estimular a hipófise a secretar a hormona folículo-estimulante (FSH) e a hormona luteinizante (LH) que consoante se encontrem em indivíduos do sexo masculino ou do sexo feminino irão exercer funções distintas.

#### **B.3.1. Prolactina**

É uma hormona sintetizada na hipófise anterior e cuja secreção esta sob o controlo do hipotálamo. O órgão alvo da prolactina é a glândula mamária feminina adulta. Durante a gravidez ajuda a promover o aumento glandular e depois do parto, inicia e mantém a lactação. Nos homens promove o crescimento e desenvolvimento da próstata.

A hipersecreção de prolactina está associada hipogonadismo em ambos os sexos. Nos homens uma hiperprolactinémia pode levar à inibição da síntese de testosterona com consequente diminuição da espermatogénese e infertilidade. Nas mulheres pode levar á supressão da ovulação resultando em amenorreia e infertilidade.

O doseamento da prolactina sérica é ainda importante na deteção de desordens hipotalâmicas e da hipófise.(12)

#### **B.3.2. Gonadotrofinas FSH (Hormona Folículo-Estimulante) e LH (Hormona Luteinizante)**

São hormonas libertadas pela hipófise anterior, sob estímulo do hipotálamo. Nos ovários as gonadotrofinas estimulam o crescimento e amadurecimento do folículo e por conseguinte, a biossíntese de estrogénios e progesterona. Nas mulheres a FSH estimula o amadurecimento dos folículos ovários e quando na presença de LH, promove a secreção de estrogénios pelos folículos maduros. Já a LH induz a posterior a ovulação e a formação do corpo lúteo que, sobre libertação pulsátil da LH, secreta progesterona e estradiol. Nos homens a FSH estimula a espermatogénese pelas células de *Sertoli* nos testículos e a LH é responsável pela produção de testosterona pala células de *Leydig*.(12)

A FSH é ainda importante no diagnóstico e monitorização da eficácia terapêutica em distúrbios da hipófise e das gonadas e a LH no diagnóstico de anomalias testiculares e de infertilidade.

### **B.3.3. Estradiol**

Hormona esteroide pertencente ao grupo dos estrogénios e sintetizada, principalmente, nos folículos ováricos, corpo lúteo e placenta a partir do colesterol. É responsável pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias femininas nomeadamente o desenvolvimento do peito, distribuição dos pêlos corporais e deposição de gordura. A sua síntese é dependente dos níveis de FSH e LH e varia durante o ciclo menstrual.

O seu doseamento é útil no estudo da puberdade precoce nas raparigas e da ginecomastia no homem. É igualmente útil no doseamento diferencial da amenorreia e na monitorização da indução da ovulação.(12)

### **B.3.4. Progesterona**

Hormona esteroide sintetizada pelo corpo lúteo no período ovulatório e pela placenta durante a gravidez cuja secreção é dependente da LH. A sua principal função é preparar o útero para a possível implantação do blastocisto e manter essa gravidez. Atua também em associação com a prolactina na preparação da glândula mamária para a lactação.

O doseamento da progesterona é utilizado para a deteção da ovulação e de alterações do ciclo menstrual, bem como no diagnóstico e tratamento de doenças dos ovários ou da placenta.(12)

### **B.3.5. Testosterona**

Principal androgénio secretado pelos testículos e pelas glândulas adrenais. Esta hormona promove o desenvolvimento e crescimento dos testículos e o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários masculinos como a disposição dos pêlos corporais, aumento da libido e da massa muscular e da agressividade.

O doseamento da testosterona é executado principalmente quando se suspeita de hipogonadismo no homem. Nas mulheres um aumento do seu nível sérico pode estar relacionado com tumores no ovário ou hiperplasia das glândulas adrenais.(12)

## **B.4. Hormonas de Avaliação da Função Tiroideia**

A glândula da tiroide é constituída por 2 lóbulos ligados por um istmo e localiza-se na parte posterior do pescoço. A sua estrutura folicular, a única entre as glândulas endócrinas,

esta relacionada com a sua dependência funcional do oligoelemento, iodo, para a síntese das hormonas tiroideias.(12)

A principal função da glândula da tiroide é a produção e armazenamento das hormonas tiroideias triiodotironina (T3) e tetraiodotironina (T4). A produção destas hormonas ocorre após estimulação das células pela hormona da hipófise, TSH (Hormona Estimuladora da Tiroide) que por sua vez é previamente regulada pela TRH (Hormona libertadora da tirotrofina) ao nível Hipotalâmico.(12)

Na circulação sanguínea T3 e a T4 podem circular ligadas a um transportador ou sobre a forma livre sendo nesta última que elas exercem atividade biológica.

#### **B.4.1. Hormona estimuladora da tiroide (TSH)**

Também designada de hormona tireotrófica, é uma glicoproteína sintetizada pelo lóbulo anterior da hipófise e que se liga aos recetores da TSH permitindo estimular e regular a produção das hormonas da tiroide T3 e T4.

O doseamento desta hormona permite o diagnóstico diferencial do hipotiroidismo e a monitorização da terapêutica de substituição das hormonas da tiroide. Em casos de hipertiroidismo, os valores de TSH encontram-se normalmente reduzidos, por outro lado, em casos de hipotiroidismo os níveis séricos de TSH estão elevados.(12)

#### **B.4.2. Tetraiodotironina (T4)**

A T4 é a principal hormona da tiroide e encontra-se maioritariamente ligada a proteínas transportadoras plasmáticas.

Valores baixos de T4 são encontrados no hipotiroidismo e nas carências de iodios enquanto que valores elevados ocorrem no hipertiroidismo e nas subcargas de iodo. A fração livre da T4 é a que reflete melhor o estado funcional da tiroide já que não é influenciada pelas variações fisiológicas das proteínas transportadoras como a albumina e a TGB.

Em casos de gravidez e de doentes sujeitos a terapêuticas à base de estrogénio e em hiperproteinémias verifica-se um aumento da T4 total por aumento das proteínas plasmáticas de transporte. Doentes com neoplasias hepáticas ou gastrointestinais assim como deficiência genética da TGB (proteína ligadora da tiroxina) apresentam valores de T4 total diminuídos.(12)

#### **B.4.3. Triiodotironina (T3)**

Esta hormona é proveniente na grande maioria da desiodinação periférica da T4 e uma pequena parte da secreção da tiroide. Pode encontrar-se ligada a proteínas de transporte ou

sobre forma livre que é a fisiologicamente ativa. O doseamento desta forma livre é sempre a mais indicada para a avaliação de patologias associadas à tiroide já que não é alterada por variações de concentração/produção das proteínas transportadoras das hormonas da tiroide. A elevação dos níveis de T3 livre no soro ocorre em situações de hipertiroidismo e de doenças autoimunes da tiroide.(12)

A T3 total é utilizada deteção de casos de hipertiroidismo, no entanto, existem outras patologias não relacionadas com a tiroide que elevam a concentração de T3.

### B.5. Eletroforese de proteínas

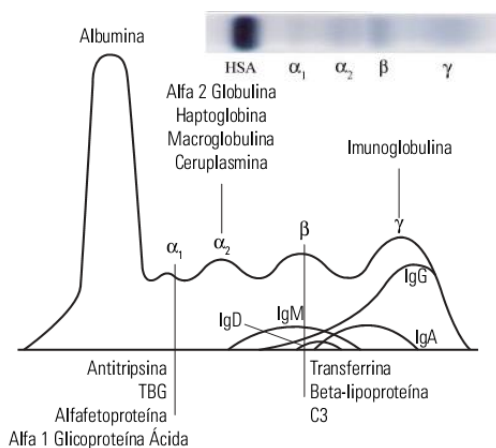


Ilustração 7 – Representação de um perfil eletroforético normal

A eletroforese das proteínas é uma análise muito útil, usada na rotina laboratorial das análises clínicas, com vista à deteção de anomalias no perfil proteico. Esta análise baseia-se na separação consoante a carga elétrica de superfície, o peso molecular e a estrutura proteica. Deste modo as proteínas percorrem diferentes distâncias formando as bandas denominadas de albumina,  $\alpha$ 1-globulina,  $\alpha$ 2- globulina,  $\beta$ -globulina e  $\gamma$ -globulina que posteriormente são quantificadas. (14)

Observa-se diminuição da concentração de albumina em situações que promovam a sua perda, por baixa ingestão proteica ou elevado catabolismo. As frações  $\alpha$ -globulina apresentam níveis aumentados em processos inflamatórios, infecciosos e imunes. O aumento das  $\beta$ -globulinas é observado em situação de perturbação do metabolismo lipídico ou anemia ferropriva. A ausência ou diminuição da banda- $\gamma$  indica imunodeficiências congénitas ou adquiridas. Já o seu aumento sugere elevação policlonal das imunoglobulinas, associado a condições inflamatórias, neoplásicas ou infecciosas. Um aumento monoclonal pode ser observado no mieloma múltiplo e em outras desordens linfoproliferativas como a macroglobulinemia de *Waldenström*.(14)

### B.6. Imunofixação de proteínas

A imunofixação é uma técnica que se destina à deteção de proteínas monoclonais no soro humano, por eletroforese em gel de agarose. Esta técnica é geralmente realizada quando é detetada uma gamopatia monoclonal no proteinograma ou quando os valores da fração das  $\gamma$ -globulinas estão muito acima do normal.



As proteínas são separadas por eletroforese em meio alcalino e depois imunoprecipitadas com antissoros de diferentes especificidades: anti-cadeias pesadas  $\gamma$  (IgG),  $\alpha$  (IgA) e  $\mu$  (IgM) e anti-cadeias leves  $\kappa$  e  $\lambda$  (livres e ligadas). (15)

Para se identificar de forma precisa a natureza das bandas monoclonais, cada amostra é testada com todos os antissoros simultaneamente. Depois da eletroforese, a pista ELP serve de referência onde não foi adicionado qualquer antissoro mostrando assim o perfil eletroforetico das proteínas da amostra. As restantes cinco pistas permitem a caracterização da(s) banda(s) monoclonal(ais).

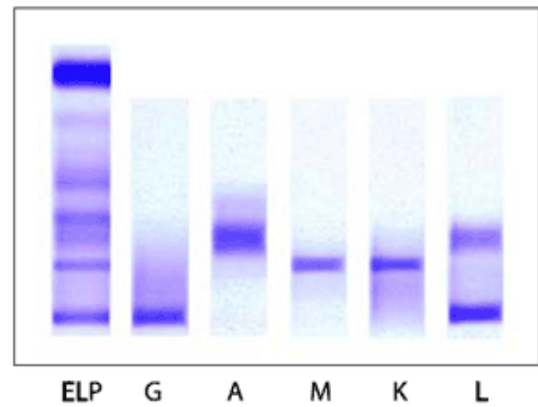


Ilustração 8 – Representação de uma imunofixação de proteínas em gel de agarose

## **C. Hematologia**

### **C.I. O Setor**

No setor da Hematologia trabalham diversos profissionais de saúde, empenhados em fornecer os melhores resultados. Entre estes, encontram-se técnicos de diagnóstico e terapêutica, técnicos superiores de saúde e médicos especialistas em patologia clínica.

O local de trabalho está dividido em várias áreas, sendo uma delas dedicada à realização dos hemogramas, velocidades de sedimentação (VS), observação microscópica de esfregaços sanguíneos e às técnicas manuais em geral, e a outra à hemóstase e citometria de fluxo. Dispõe ainda de uma sala polivalente onde se determinam parâmetros analíticos por biologia molecular relacionados com a patologia hematológica.

Tal como nos restantes setores, na hematologia as amostras seguem um circuito específico pelo que, logo após a admissão dos devidos tubos, estes são separados e etiquetados conforme se destinem a cada uma das áreas referidas. Na primeira área, as amostras com pedido de VS e hemograma são primeiramente colocadas num agitador de tubos passando de seguida para o contador de células e depois para a determinação da VS. Para pedidos de coagulação e hemóstase, assim como citometria de fluxo, são efetuadas colheitas específicas para o efeito. Posteriormente, e se necessário, é realizado o esfregaço sanguíneo, antes das amostras serem arrumadas.

É relevante referir que, neste setor, o volume de sangue é um dos fatores mais importantes a ter em conta. Aquando da colheita, e no próprio setor, o volume de sangue no tubo deve ser verificado, já que os efeitos de diluição do anticoagulante ou a hemoconcentração podem conduzir a alterações nos resultados.

#### **C.I.I. Equipamentos, princípios de funcionamento e técnicas manuais**

No global existem sete equipamentos a funcionar neste setor. Dois contadores de células, um analisador de VS, dois analisadores de coagulação e hemóstase, um citómetro e um analisador biomolecular. Os contadores de células e os analisadores de coagulação e hemóstase geralmente são utilizados alternadamente, a não ser para confirmação dos resultados, caso se justifique.

### C.1.1.1. Beckman Coulter LH 750 ®



Fig. 11 – Beckman Coulter LH 750

Trata-se de um contador de células. Este equipamento baseia-se no Princípio de Coulter, na medição fotométrica e na tecnologia VCS. Pelo princípio de Coulter ou princípio da impedância cada partícula (célula) suspensa num líquido condutor (diluyente) pode ser vista como um isolador que à medida que atravessa uma abertura aumenta momentaneamente a resistência ao percurso elétrico entre os dois eléctrodos submersos. Desta forma, é originado um impulso eléctrico que pode ser detetado e medido. Enquanto o número de impulsos indica a contagem das partículas, a sua amplitude será proporcional ao volume que cada partícula ocupa, neste caso, ao volume celular. (16-18)

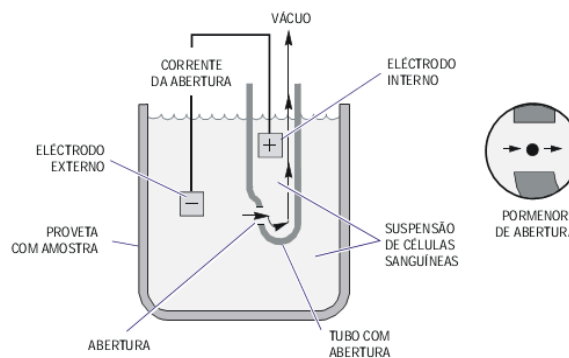


Ilustração 9 – Método Coulter para contagem e determinação do tamanho celular

A medição fotométrica destina-se exclusivamente à medição da concentração de hemoglobina. Neste método, um feixe de luz branca proveniente de uma lâmpada incandescente passa através de um filtro de comprimento de onda de 525 nm e depois através da cuvete, sendo medida a intensidade de luz no detetor. A absorvância do pigmento será proporcional à concentração de hemoglobina na amostra. (16, 17)

Por outro lado, a tecnologia VCS é aplicada na contagem diferencial de leucócitos utilizando três variáveis correspondentes ao volume celular individual, à condutividade de alta frequência e à dispersão de luz laser (Ilustração 10). Uma corrente de baixa frequência mede o volume dos leucócitos. Como as paredes da célula atuam como condutores de corrente de alta frequência, esta corrente ao atravessar as paredes e o interior de cada célula, permite detetar as diferenças nas propriedades isoladoras destes componentes. São desta forma caracterizados os constituintes nucleares e granulares e a composição química do interior da célula. Por fim, através da dispersão da luz laser é possível caracterizar a superfície celular. (16, 17)

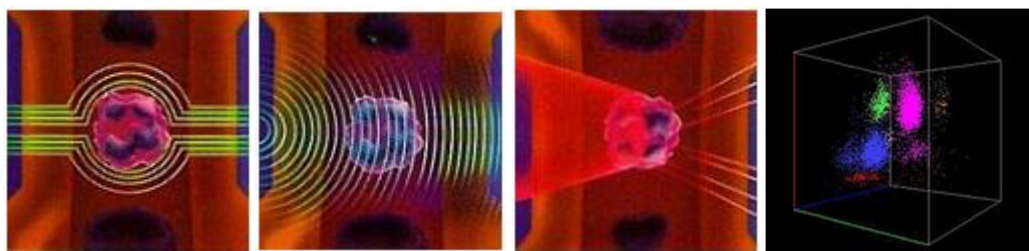


Ilustração 10 – Tecnologia VCS. À esquerda é aplicada a corrente de baixa frequência. Segue-se a de alta frequência e por fim a dispersão laser. À direita pode ser observada a perspectiva tridimensional

**C.1.1.2. ALIFAX® TESTI BCL**



Analizador automático fechado, destinado à medição de VS. A 37°C e após uma centrifugação a aproximadamente 20g, a microsedimentação eritrócitaria é medida quantitativamente por uma tecnologia baseada em fotometria capilar. Este sistema utiliza um microfotômetro de infravermelho com um comprimento de onda de 950 nm durante 20 segundos. Os impulsos elétricos são então medidos através de um detetor de fotodíodos e serão diretamente proporcionais à concentração de eritrócitos. Por fim é traçada uma curva e os dados são convertidos nos valores de Westergren através de um modelo de regressão linear.

Fig. 12 – TESTI BCL

(19)

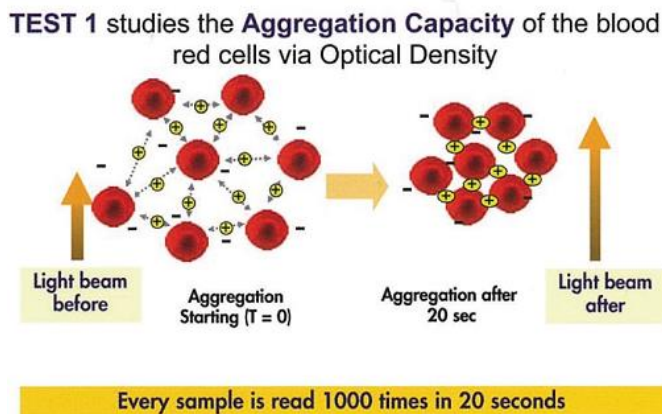


Ilustração 11 – Representação esquemática do princípio de funcionamento

**C.1.1.3. Instrumentation Laboratory ACL TOP 500®**



Fig. 13 – ACL TOP 500

Este é um analisador utilizado para estudos de coagulação e hemóstase. A detecção do coágulo é efetuada através da tecnologia fotométrica sendo executados neste caso dois tipos de testes, os coagulométricos e os imunológicos. Os coagulométricos baseiam-se no princípio da turbidimetria. Usando um comprimento de onda de 671 nm e uma detecção a 180° é medido

o decréscimo da luz transmitida à medida que o coágulo se vai formando. Os testes imunológicos baseiam-se no princípio da imuno-turbidimetria em que, após a formação de um complexo Antígeno-Anticorpo, é medido o decréscimo da luz por turbidimetria. Podem ser usados os comprimentos de onda de 405 ou 671 nm em função do teste. (20)

#### C.1.1.4. Beckman Coulter FC500-MCL ®



Fig. 14 – Beckman Coulter FC500

Trata-se de um equipamento automatizado que utiliza a citometria de fluxo. O sistema é constituído por uma fonte de radiação, câmara de fluxo, unidades de filtros óticos para seleção de um intervalo de comprimento de onda específico e fotodíodos ou fotomultiplicadores para a deteção e processamento dos sinais de interesse. Após injetar a suspensão celular, através da focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra, as células irão passar de forma individual e em regime laminar através da câmara. Posteriormente, estas células são intercetadas pelo feixe de radiação de excitação, que sofre dispersão, quer na direção frontal (*forward scattering*), quer lateral (*side scattering*) e que revelam informações sobre a morfologia celular tal como a dimensão e complexidade, respetivamente. Compostos celulares, passíveis de se ligarem a corantes fluorescentes, são também detetados e permitem a diferenciação seletiva de subpopulações com base na combinação de vários fluorocromos e respetiva emissão de fluorescência.(21)

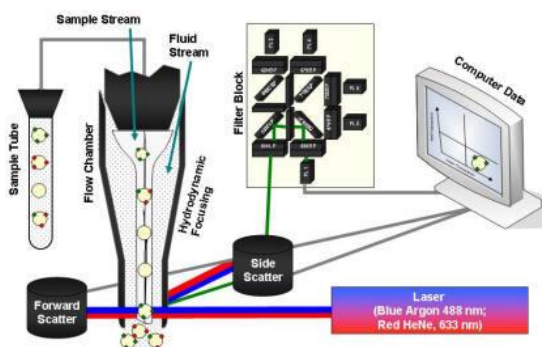


Ilustração 12 – Representação esquemática da configuração do FC 500

#### C.1.1.5. Cepheid GeneXpert ®



Fig. 15 – GeneXpert

O GeneXpert é um equipamento automatizado fechado, para análise de biomolecular baseado na Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (*Real-Time PCR*). Este método combina a amplificação, do tradicional método de PCR, com a deteção e quantificação em tempo real, através da monitorização contínua da fluorescência emitida à medida

que os produtos se vão formando. Deste modo todos os processos de amplificação, deteção e quantificação de DNA realiza-se numa só etapa sendo possível obter resultados rapidamente.

### C.1.1.6. Técnicas manuais

A maioria das técnicas manuais, existentes no setor de hematologia, tem vindo a ser menos utilizada devido ao aparecimento de técnicas mais eficazes, precisas e com tempos de resposta mais curtos, como é o caso dos modernos contadores de células e os citómetros de fluxo. Neste lote incluem-se as técnicas de contagem de reticulócitos e plaquetas, a Fosfatase Alcalina Leucocitária, Mieloperoxidase, Ácido Periódico de Schiff, Fosfatase Ácida e as Esterases, todas realizadas no estágio mas apenas didaticamente. As técnicas utilizadas com maior frequência são a Coloração de *Wright* e a Coloração de *Perl's* (Ferro).

#### C.1.1.6.1. Esfregaço sanguíneo

Qualquer uma das técnicas manuais implica sempre a realização prévia de um esfregaço sanguíneo seguida da secagem e coloração. Desta forma torna-se essencial que este seja bem executado, pois só assim permitirá uma boa identificação das células sanguíneas. Um dos primeiros aspetos a ter em consideração é o tamanho da gota de sangue pois pretende-se um esfregaço fino de modo que se forme apenas uma camada de células. O esfregaço deve apresentar bordos retos, longos e contínuos e ser uniforme, sem apresentar “buracos” ou linhas de interrupção. Com isto, asseguramos uma mais fácil observação morfológica e contagem ao microscópio ótico. Esta observação é importante que se realize no centro do esfregaço onde as células estão melhor distribuídas e íntegras.

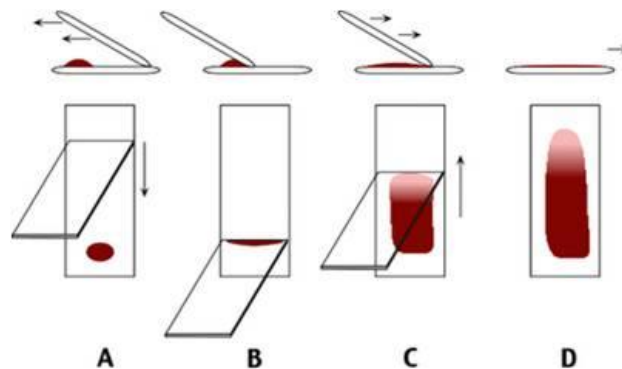


Ilustração 13 – Representação esquemática da realização de um esfregaço sanguíneo

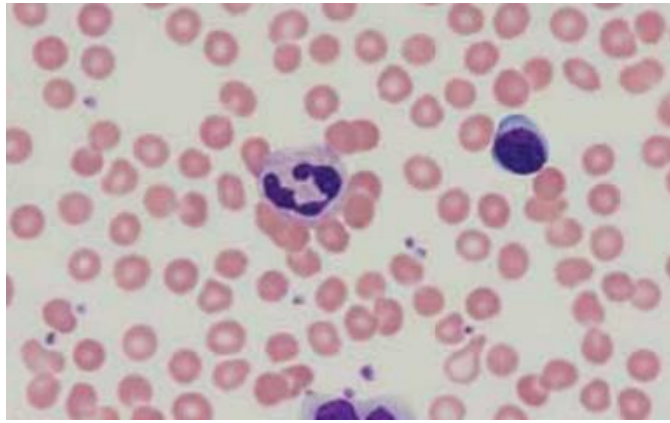


Ilustração 14 – Demonstração de um esfregaço sanguíneo

#### C.1.1.6.2. Coloração de Wright

Consiste na combinação de um corante ácido (Eosina) com um corante básico (Azul de Metileno). Após esta coloração será possível fazer a fórmula leucocitária assim como a observação das características morfológicas das células. Tais estudos são realizados sempre que os resultados ou a situação clínica o justifique. Enquanto os núcleos devem apresentar diversos tons de púrpura, os citoplasmas poderão variar de azul a cor-de-rosa; eosinófilos terão grânulos cor-de-laranja claros e os basófilos grânulos grossos e azuis-escuros. (22)

#### C.1.1.6.3. Coloração de Perl's

Destina-se à coloração histológica do ferro em fragmentos de medula óssea. Baseia-se na reação do azul da Prússia em que o ferro iônico reage com ferrocianeto ácido produzindo uma cor azul. É especialmente usada para avaliar os depósitos de ferro em fragmentos de

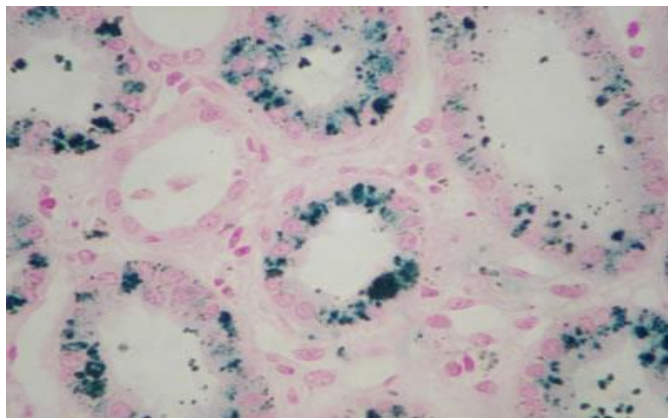


Ilustração 15 – Coloração de perl's num fragmento de medula óssea

medula óssea e identificação de sideroblastos e siderócitos. (23)

### C.1.2. Controle de Qualidade

Além do CQI diário para cada um dos equipamentos este setor participa também em dois programas de AEQ, do RIQAS e INSA. Diariamente são executados, antes do início do



trabalho, três diferentes níveis de controlo e os resultados obtidos são tratados e avaliados segundo as regras de *Westgard*.

No que respeita à coagulação e hemóstase, o CQE é feito de igual modo. No entanto, no caso do CQI, além do que é feito com os restantes equipamentos, a cada mudança dos reagentes ou a cada 100 testes o equipamento executa automaticamente novo controlo de forma a verificar se os resultados continuam dentro dos limites de aceitabilidade.

## **C.2. Hemograma**

É sem dúvida um dos exames complementares de diagnóstico mais requisitados e que permite a quantificação dos elementos celulares do sangue tais como eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Este exame é, deste modo, fundamental para o estudo da função hematológica. No entanto, consoante a situação clínica do doente, pode ser necessária uma análise mais cuidadosa dos elementos celulares, que para além de uma simples quantificação implica também um estudo morfológico que pode ser realizado através de um esfregaço sanguíneo.

Uma colheita e um processamento apropriado da amostra de sangue é essencial para a obtenção de um bom hemograma. Assim, após uma cuidadosa venipuntura, o sangue é transferido para um tubo contendo anticoagulante, no caso o EDTA tripotássico (EDTA-3K), cujo objetivo é bloquear o cálcio necessário à ocorrência da coagulação ao mesmo tempo que conserva a morfologia dos leucócitos e eritrócitos permitindo também uma contagem das plaquetas mais correta. No entanto, quando em excesso, este anticoagulante pode alterar morfológicamente os eritrócitos, que ficam com um aspeto crenado, diminuir o hematócrito e o volume corpuscular médio, aumentar a concentração de hemoglobina corpuscular média e promover a aglutinação das plaquetas levando a contagens falsamente baixas (pseudotrombocitopenia).(24)

### **C.2.1. Eritrograma**

Os eritrócitos, além de serem as células mais abundantes do organismo humano, caracterizam-se pela ausência de núcleo, mitocôndrias e ribossomas e por apresentarem a forma de disco bicôncavo. É esta forma que lhes permite ter uma extensa área de superfície em relação ao volume citoplasmático amentando assim a eficiência da difusão das trocas gasosas. Além disso como cerca de 98% da proteína presente no citoplasma dos eritrócitos circulantes é a hemoglobina estas células são altamente especializadas no fornecimento de O<sub>2</sub> aos tecidos e o retorno de CO<sub>2</sub> dos tecidos para os pulmões. O eritrograma destina-se, assim, ao rastreio, quantificação e diagnóstico causal das anemias e poliglobulias e consiste na determinação de três parâmetros quantitativos, a contagem dos eritrócitos (RCB),



concentração de hemoglobina (Hgb) e hematócrito (Hct), e de três índices que permitem descrever as características qualitativas, o volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC). (18, 25)

#### **C.2.1.1. Contagem de Eritrócitos**

Inicialmente, esta contagem era realizada em câmara de contagem ao microscópio. Contudo, dada a imprecisão desses métodos, atualmente é feita recorrendo a métodos automáticos, mais precisos, e que realizam as contagens em sangue total diluído em meio isotônico. O número de eritrócitos é, assim, medido diretamente pelo princípio de *Coulter*, e multiplicado pelo fator de calibração. (16, 18)

$$RBC = n \times 10^6 \text{ células} / \mu L$$

#### **C.2.1.2. Concentração de Hemoglobina**

Como a hemoglobina é uma proteína dotada de uma coloração forte, a sua quantificação é possível recorrendo a métodos espectrofotométricos. Deste modo, as várias formas de hemoglobina presentes no sangue podem ser convertidas num componente comum estável, a cianometahemoglobina. A absorvância deste composto será proporcional à concentração de hemoglobina presente, sendo o valor desta proteína expresso em grama por decilitro de sangue (g/dl). (16, 18)

#### **C.2.1.3. Hematócrito**

Corresponde ao volume relativo dos eritrócitos existentes no sangue total, não coagulado. A forma original para a sua determinação passava pela centrifugação do sangue total em tubo capilar lendo-se de seguida a altura da coluna de eritrócitos. No entanto, apesar da reprodutibilidade, era sistematicamente inexato. (18) O resultado expressa-se em percentagem e atualmente é um parâmetro calculado pelo autoanalisador, multiplicando o número de eritrócitos pelo volume corpuscular médio. (16)

$$HCT (\%) = (RBC \times MCV) / 10$$

#### **C.2.1.4. Volume Corpuscular Médio**

Este parâmetro representa o volume médio dos eritrócitos e é útil na classificação das anemias (normocíticas, macrocíticas e microcíticas). Geralmente é determinado pelos autoanalisadores recorrendo ao histograma de RBC's mas pode ser calculado pelo quociente entre o hematócrito e o número total de eritrócitos. Expressa-se em fentolitros (fL). (18)

$$MCV (fL) = \frac{HCT (\%)}{N^{\circ} \text{ Eritr\u00f3citos } (\times 10^6 / \mu L)} \times 10$$

#### **C.2.1.5. Hemoglobina Corpuscular M\u00e9dia**

Representa a quantidade m\u00e9dia de hemoglobina por cada eritr\u00f3cito expressa em picogramas (pg) e \u00e9 um par\u00e2metro calculado pelo quociente entre a hemoglobina e o n\u00famero total de eritr\u00f3citos.(18)

$$MCH (pg) = \frac{HGB (g/dL)}{N^{\circ} \text{ Eritr\u00f3citos } (\times 10^6 / \mu L)} \times 10$$

#### **C.2.1.6. Concentra\u00e7\u00e3o de Hemoglobina Corpuscular M\u00e9dia**

O valor que \u00e9 obtido representa a concentra\u00e7\u00e3o m\u00e9dia de hemoglobina por eritr\u00f3cito permitindo avaliar a cromia (normocromia ou hipocromia). Pode ser calculada atrav\u00e9s do quociente entre a hemoglobina e o hemat\u00f3crito e expressa-se em grama por decilitro (g/dL).(18)

$$MCHC (g/dL) = \frac{HGB (g/dL)}{HCT (\%)} \times 100$$

#### **C.2.1.7. Amplitude de distribui\u00e7\u00e3o de eritr\u00f3citos (RDW)**

O RDW corresponde \u00e0 distribui\u00e7\u00e3o do tamanho da popula\u00e7\u00e3o de eritr\u00f3citos calculados a partir do histograma de RBC. Expressa-se em coeficiente de varia\u00e7\u00e3o (CV) % e permite a avalia\u00e7\u00e3o da heterogeneidade volum\u00e9trica das popula\u00e7\u00e3o de eritr\u00f3citos. Atrav\u00e9s desta determina\u00e7\u00e3o, caso se demonstre, por exemplo, um valor acima do limite normal, poder\u00e1 ser sugestivo de anisocitose alertando o profissional de sa\u00fade que o poder\u00e1 confirmar atrav\u00e9s de um esfrega\u00e7o.(18)

#### **C.2.1.8. Reticul\u00f3citos (RET)**

A eritropoiese corresponde ao processo atrav\u00e9s do qual a partir de c\u00e9lulas tronco indiferenciadas, presentes na medula \u00f3ssea, se formam os eritr\u00f3citos e encontra-se sob a regula\u00e7\u00e3o da eritropoetina (EPO). Ao longo deste processo de maturaç\u00e3o o n\u00facleo acaba por ser expelido persistindo, no entanto, os organelos necess\u00e1rios \u00e0 s\u00edntese proteica mas que v\u00e3o sofrendo progressivo catabolismo. Quando s\u00e3o usados os corantes habituais, este RNA ribossomal, atribui aos eritr\u00f3citos imaturos uma colora\u00e7\u00e3o acinzentada geralmente designada de *policromasia* que nem sempre \u00e9 f\u00e1cil de ser observada ao microsc\u00f3pio. Usando uma colora\u00e7\u00e3o supravital como o caso do novo azul-de-metileno ocorre precipita\u00e7\u00e3o destes ribossomas formando gr\u00e2nulos corados de azul de f\u00e1cil observa\u00e7\u00e3o e que nos confirmam a

presença de reticulócitos. Através desta contagem será assim possível avaliar o funcionamento da medula em resposta a alterações na contagem de eritrócitos. Existem no entanto diversas partículas não RNA, nomeadamente corpos de *Heinz* e de *Howell-Jolly*, que facilmente são confundíveis induzindo o profissional de saúde a contagens falsamente elevadas. (18, 25)

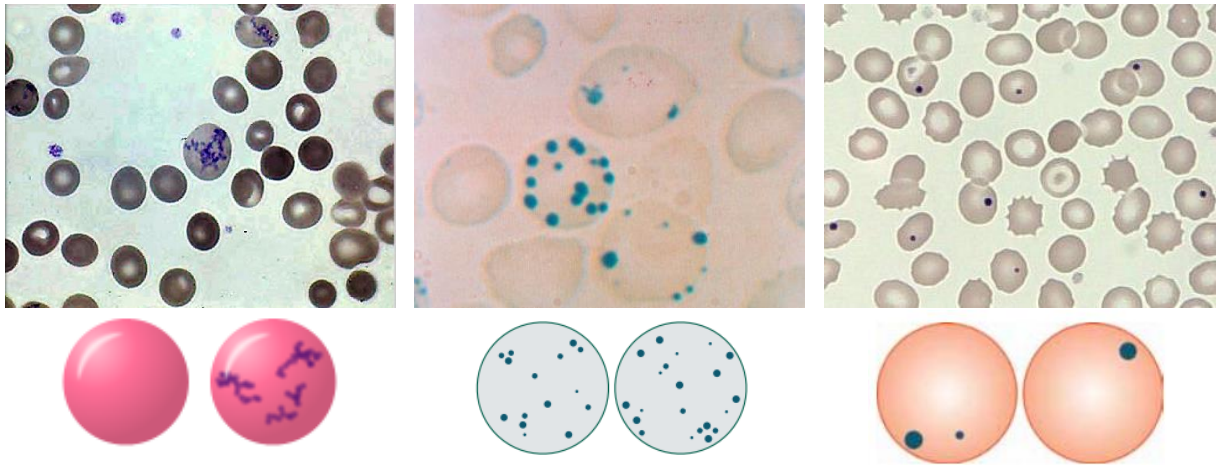


Ilustração 16 – À esquerda é possível observar a aparência dos reticulócitos. Ao centro corpos de Heinz. À direita corpos de Howell-Jolly

### C.2.2. Leucograma

Geralmente os leucócitos são divididos em dois grandes grupos, os polimorfonucleares (PMN), ou “granulócitos”, que incluem os neutrófilos, eosinófilos e basófilos e os mononucleares (MN), ou “agranulócitos”, que incluem os monócitos e os linfócitos. Enquanto os granulócitos se caracterizam por terem um citoplasma com grânulos específicos, um núcleo segmentado e irregular, os agranulócitos possuem um núcleo grande, mais regular e sem segmentações, sendo o citoplasma desprovido de granulação específica.(18)

É a partir destas características que se determina o leucograma e que se torna possível a contagem de leucócitos, a determinação da fórmula leucocitária e a quantificação e avaliação morfológica destas diferentes populações celulares. A quantificação será particularmente útil para identificar situações de infeção e seguir o progresso de certas doenças e terapias, como leucemias e linfomas alertando, no caso, o profissional de saúde para o recuso a metodologias mais sofisticadas.

#### C.2.2.1. Neutrófilos

Também denominados PMN, são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico do adulto. Caracterizam-se por ter um núcleo com cromatina densa e segmentada em 2 a 5 lóbulos. O citoplasma é abundante, apresenta uma granulação fina de origem lisossômica, contendo principalmente enzimas hidrolíticas e cora de rosa após coloração de *Wright*. Por vezes poderão aparecer no sangue periférico os neutrófilos em bastão que correspondem aos neutrófilos que ainda não completaram o seu desenvolvimento.(25)

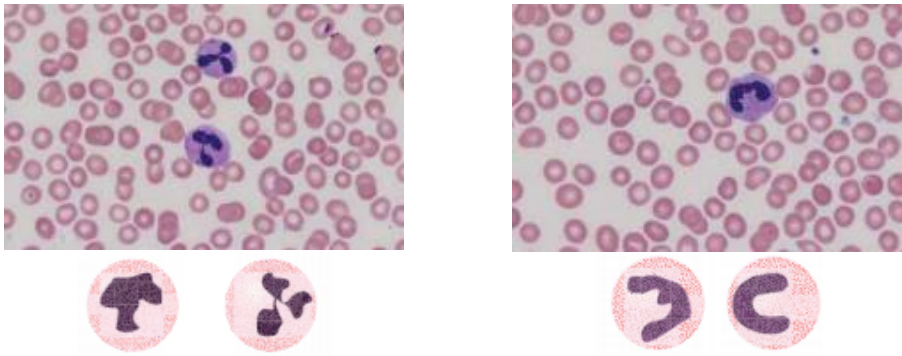


Ilustração 17 – Aparência dos neutrófilos ao microscópio ótico. À esquerda um neutrófilo maduro à direita um imaturo ou em bastão

### C.2.2.2. Eosinófilos

Apresentam um núcleo com 2 a 3 lóbulos e uma cromatina densa e sem nucléolos. O citoplasma caracteriza-se pela forte presença de grânulos com afinidade para corantes ácidos, que após coloração de *Wright* adquirem uma coloração laranja e por isso são facilmente identificados por microscopia. Participam nos mecanismos de defesa contra corpos estranhos e parasitas estando ainda envolvidos nas reações alérgicas e na remoção de fibrina formada durante o processo inflamatório. (25)

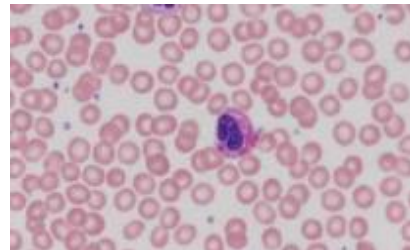


Ilustração 18 – Aparência dos eosinófilos ao microscópio ótico

### C.2.2.3. Basófilos

São os leucócitos menos numerosos do sangue periférico. Caracterizam-se por terem abundantes grânulos citoplasmáticos, que geralmente cobrem o núcleo por completo, e que têm uma grande afinidade para corantes básicos, adquirindo uma cor azul escura após coloração de *Wright*. O núcleo, quando visível, apresenta-se pouco segmentado mas com dois a três lóbulos. A sua principal função consiste em libertar heparina de forma a evitar a formação do coágulo e histamina para promover a vasodilatação, permitindo assim a migração dos neutrófilos, monócitos e eosinófilos aos locais de inflamação. Estão também envolvidos na reação de hipersensibilidade imediata. (25)

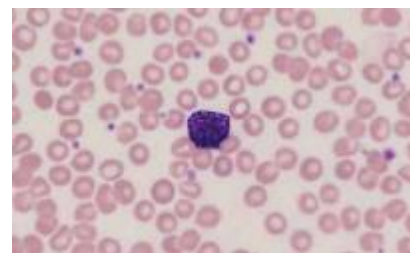
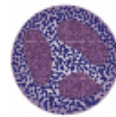


Ilustração 19 – Aparência de um basófilo ao microscópio ótico

### C.2.2.4. Monócitos

Os monócitos, juntamente com os macrófagos e células dendríticas constituem o sistema mononuclear fagocítico cuja principal função é a fagocitose. São células com núcleo não lobulado, irregular e geralmente com a forma de feijão ou ferradura, em posição central ou excêntrica na célula. O citoplasma é abundante e adquire uma coloração azul-acinzentada

não apresentando grânulos específicos. Na corrente sanguínea são capazes de eliminar fatores de coagulação ativados, limitando o processo de coagulação, eliminar proteínas desnaturadas e complexos antígeno-anticorpo. Em resposta à inflamação, migram para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos e eventualmente células dendríticas desempenhando importante papel no desenrolar da resposta imunitária. (25)

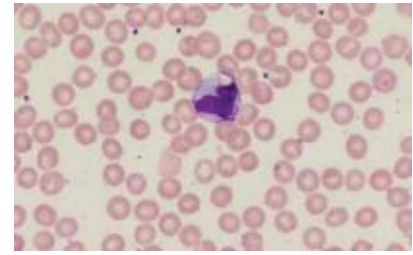


Ilustração 20 – Aparência de um monócito ao microscópio ótico

### C.2.2.5. Linfócitos

Juntamente com os monócitos são também células MN, no entanto apresentam um núcleo regular que ocupa grande parte da célula e cromatina muito condensada que cora de azul-escuro após coloração de *Wright*. O citoplasma não tem grânulos específicos e apresenta uma cor azul clara. Existem duas importantes populações de linfócitos, os linfócitos B (LB), “B” de “*bone marrow*” por completarem a sua maturação na medula óssea, e os linfócitos T (LT), “T” de “*thymus*” por completaram a sua maturação no timo. Enquanto os LB são responsáveis pela imunidade humoral, através da produção e liberação de anticorpos capazes de neutralizar os antígenos, os LT estão envolvidos na imunidade celular e subdividem-se genericamente em LT CD4<sup>+</sup> (auxiliares) e LT CD8<sup>+</sup> (citotóxicos). Os LT CD4<sup>+</sup> medeiam a defesa do organismo através da liberação de citocinas que vão ativar, entre outras células, os LB e os macrófagos. Os LT CD8<sup>+</sup> estão mais envolvidos na resposta contra antígenos endógenos, por exemplo peptídeos virais, através da produção de perforinas e granzimas e ainda na atividade antitumoral. Ao microscópio ótico pode observar-se que, quando os linfócitos se encontram ativados, apresentam o citoplasma mais volumoso e mais basofílico sendo sugestivo da existência de um processo inflamatório mesmo que não se verifique leucocitose.(25)

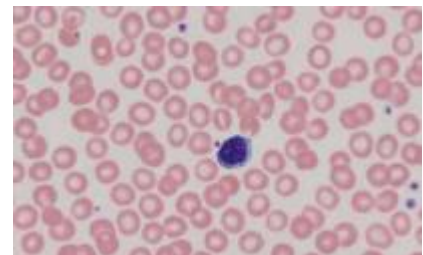


Ilustração 21 – Aparência dos linfócidos ao microscópio ótico

### C.3. Velocidade de Sedimentação (VS)

É um teste não específico mas frequentemente utilizado para medir a velocidade de sedimentação dos eritrócitos no plasma durante o período de uma hora. Para a sua realização é utilizado o mesmo tubo, contendo EDTA, em que previamente se realizou o hemograma.

A composição do plasma é um dos fatores que mais diretamente influencia a velocidade de sedimentação globular pois, um aumento da presença de proteínas plasmáticas como o fibrinogénio e as imunoglobulinas, provocam alterações da carga de superfície dos eritrócitos,

normalmente carregados negativamente, favorecendo a sua agregação e consequente formação de *rouleaux* e aglutinados eritrocitários que aumentam a VS. Fatores relacionados com os eritrócitos como o seu tamanho também irão causar alterações nestes valores.

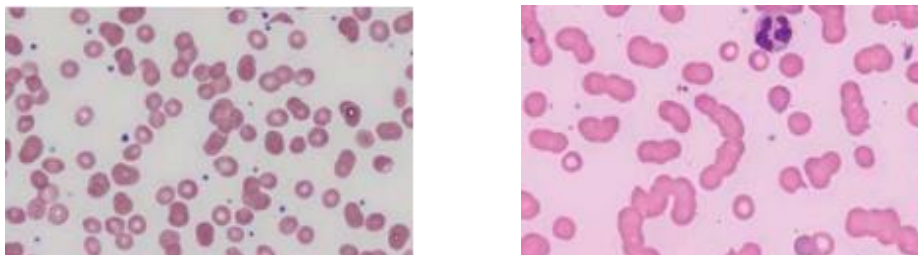


Ilustração 22 – À esquerda pode ser observada a aglutinação. À direita observa-se o fenómeno de *rouleaux*

Num indivíduo saudável ou com uma situação patológica não inflamatória, a VS apresenta um valor até 20 mm/h. Este valor geralmente vem alterado em condições patológicas do tipo infeccioso ou inflamatório embora possam ocorrer causas não patológicas como a gravidez que também podem alterar a VS. Fatores de origem pré-analítica como a concentração de anticoagulante e hemólise também a poderão alterar.(26)

#### C.4. Hemóstase

Na realização de estudos de hemóstase, além dos cuidados já referidos para o hemograma, a amostra tem, no entanto, de ser colhida para um tubo próprio contendo o citrato de sódio (9:1). Apesar deste anticoagulante também bloquear o processo de coagulação através da quelação do cálcio, tem a vantagem do efeito ser facilmente reversível pela simples adição de mais cálcio, que é essencial para este tipo de estudos, pois é um importante ativador em várias fases da cascata de coagulação. Talvez ainda mais importante do que para o hemograma, é o facto do volume de sangue ter de ser rigorosamente o indicado pelo tubo, pois qualquer fenómeno de diluição poderá alterar o equilíbrio entre o sangue e o anticoagulante.

Depois da colheita e etiquetagem, os tubos são centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. O que nos interessa é a obtenção de um plasma pobre em plaquetas já que são estas as condições exigidas neste tipo de estudos. No entanto, caso de trate da pesquisa do anticoagulante lúpico (AL) os tubos devem ser centrifugados novamente, sob as mesmas condições, de forma a obter um plasma sem plaquetas. Depois de executados estes passos procede-se as determinações, sendo que as mais frequentemente solicitadas no IPOCFG são o Tempo de Protrombina (PT), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT), Tempo de Trombina (TT) e o Fibrinogénio. A determinação de outros parâmetros menos requisitados como os D-Dímeros, o anticoagulante lúpico, Anti-trombina, Proteína C, Proteína S e outros fatores específicos envolvidos na cascata de coagulação, também pode ser solicitada, no



entanto, os reagentes necessários a sua execução terão de ser colocados no equipamento no próprio dia. As amostras são, então, processadas da mesma forma que todas outras. Este cuidado é necessário pois este tipo de reagentes apresentam um tempo de estabilidade relativamente reduzido quando no equipamento. São ainda executadas técnicas de biologia molecular para detetar mutações pontuais do Fator II e/ ou do Fator V de Leiden.

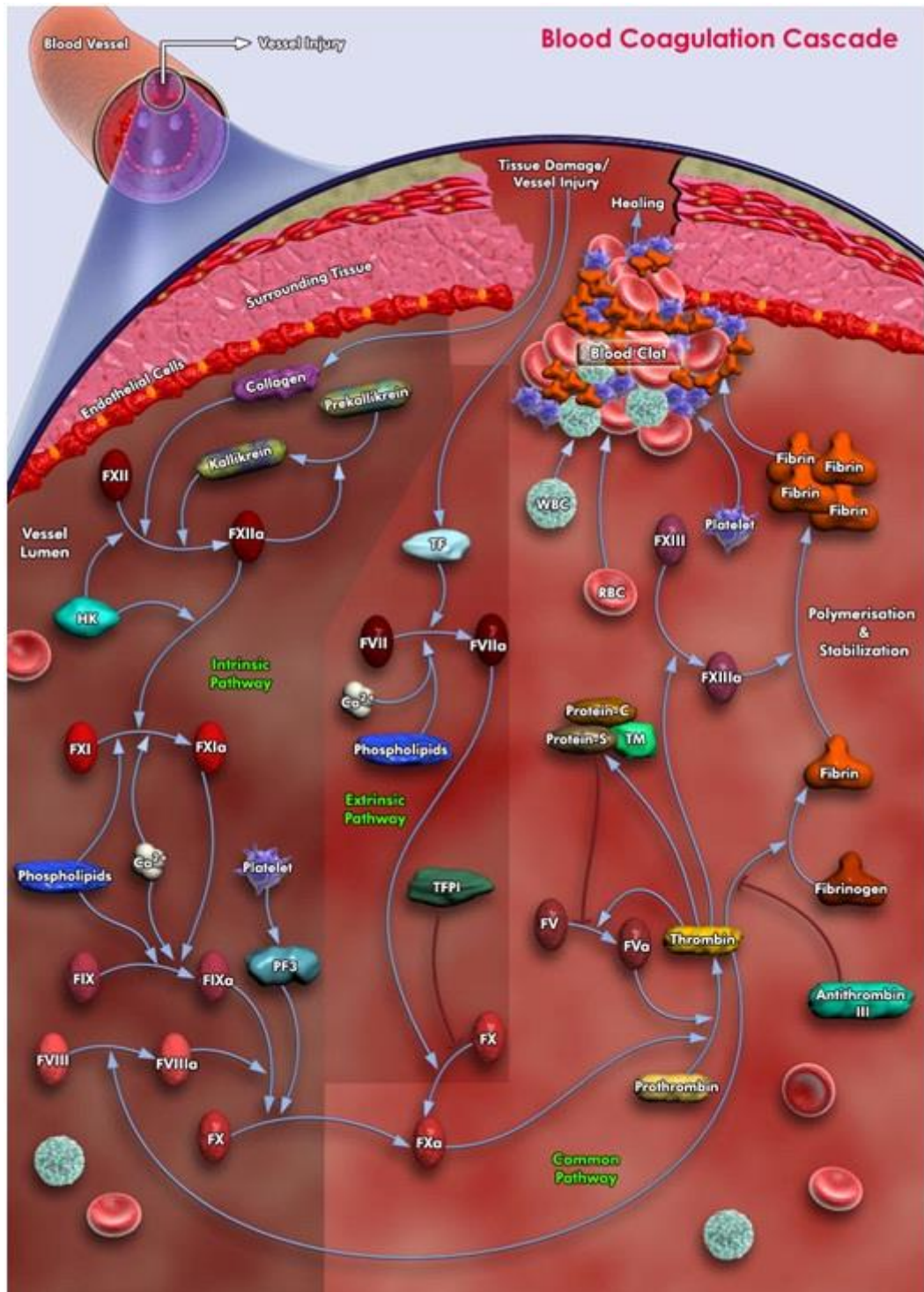


Ilustração 23 – Representação esquemática da Cascata de coagulação

### C.4.1. Tempo de Protrombina (PT)

Através deste parâmetro é possível avaliar a via extrínseca da cascata da coagulação e a subsequente via comum. Este ensaio reflete as alterações de três fatores dependentes da vitamina K (fator II, VII e X), do fibrinogénio e do fator V. É igualmente útil para a monitorização dos anticoagulantes orais.

O PT consiste na adição de uma tromboplastina completa (equivalente a tromboplastina tecidual) a plasma em citrato de sódio seguida da avaliação do tempo de coagulação após adição de cálcio.

Dada a necessidade dos doentes que tomam anticoagulantes orais terem que ser monitorizados frequentemente a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs que as tromboplastinas fossem padronizadas segundo uma preparação de referência internacional e criou o *International Sensitivity Index* (ISI). O ISI reflete a sensibilidade das tromboplastinas e permite ajustar o resultado face à tromboplastina utilizada. Usando este valor como expoente, e através da razão entre o PT do paciente e o PT de referência, em segundos, obtém-se assim o *International Normalized Ratio* (INR).

$$INR = \left( \frac{PT_{teste}}{PT_{poolnormal}} \right)^{ISI}$$

O PT pode encontrar-se elevado em casos de deficiência de um ou mais fatores envolvidos na via extrínseca, deficiência de vitamina K, na presença de terapêutica anticoagulante e em casos de doença hepática grave ou coagulação intravascular disseminada (CIV).(27, 28)

### C.4.2. Fibrinogénio

O fibrinogénio caracteriza-se por ser uma proteína de fase aguda transformando-se em fibrina através da ação da trombina. O aumento dos seus níveis pode associar-se a um maior risco de vir a desenvolver doenças cardiovasculares, a quadros inflamatórios ou tumores malignos. Níveis aumentados também podem ser encontrados em quadros não patológicos com o uso de contraceptivos orais e durante a gravidez. Por outro lado, níveis baixos de fibrinogénio poderão estar associados a terapêutica trombolítica, em casos de doença hepática e de CIV.

O método de rotina usado para a quantificação do fibrinogénio pelos equipamentos existentes no IPOCFG é o ensaio cinético, no teste do PT. O aparelho mede a taxa de aumento da turvação durante o teste, delineando uma curva, e esta taxa será proporcional à



concentração de fibrinogénio no plasma. De seguida, a primeira derivada desta curva é comparada com uma curva de referência, elaborada com plasmas de referência cujas concentrações de fibrinogénio são conhecidas. No entanto, este método, apenas pode ser utilizado quando os valores de PT se encontram no intervalo de referência. O método de *Clauss*, método de referência, deve então ser aplicado nestes casos. Através dele, um excesso de trombina é adicionado ao plasma diluído e o tempo de coagulação será inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio plasmático. O tempo de coagulação obtido será então comparado, com uma preparação de fibrinogénio padronizada.(27, 28)

#### **C.4.3. Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (aPTT)**

Avalia a via intrínseca da cascata de coagulação testando a pré-caliceína, cininogénio de alto peso molecular e os fatores XII, XI, IX e VIII e a via comum testando os fatores X, V, II e I. É também utilizado para deteção de anticorpos antifosfolipídicos, como o AL, e para a monitorização laboratorial da heparina.

Para a determinação do aPTT são utilizados fosfolípidos plaquetários sintéticos como a cefalina e o fosfatidilinositol que são tromboplastinas parciais, incapazes de ativar a via extrínseca. Assim, ao plasma são adicionados estes fosfolípidos pró-coagulantes, um ativador por contato (sílica) e cálcio. O tempo, em segundos, até ocorrer a coagulação é então determinado podendo estar alongado em casos de deficiência de qualquer um dos fatores envolvidos na via intrínseca e comum, terapêutica com heparina e doses elevadas de anticoagulantes orais e em casos de doença hepática grave ou CIV.

A presença de AL poderá também ser responsável por valores de aPTT elevados pelo que, sempre que tal se verificar dever-se-á realizar novo aPTT mas associando plasma do doente com uma *pool* de plasmas normais. Se o valor normalizar, o plasma do doente terá deficiência em fatores, se se mantiver prolongado será então importante o despiste de AL através de testes mais específicos.(27, 28)

#### **C.4.4. Tempo de Trombina (TT)**

Avalia a conversão do fibrinogénio em fibrina. Consiste na adição de trombina ao plasma em citrato de sódio e reflete o tempo necessário para formação do coágulo.

O TT pode vir aumentado por inibição da trombina devido à presença de heparina e terapêutica anticoagulante, produtos de degradação da fibrina ou por alterações qualitativas e quantitativas do fibrinogénio.(27, 28)

#### **C.4.5. Produtos de Degradação da Fibrina (PDF)**

Em condições fisiológicas normais, a coagulação e a fibrinólise estão equilibradas, pelo que a fibrina e os produtos de degradação da fibrina podem ser importantes no diagnóstico de distúrbios do equilíbrio hemostático. De fato, com a degradação da fibrina estabilizada (insolúvel), pela ação da plasmina são criados uma série de derivados solúveis de diferentes pesos moleculares, entre os quais o D-Dímero.(28)

É através deste teste, que se torna possível, detetar e avaliar semiquantitativamente os D-Dímeros presentes no plasma. Consiste na adição de numa suspensão de partículas de latex revestidas por um anticorpo monoclonal altamente específico contra D-Dímero ao plasma do doente, em que o grau de aglutinação será diretamente proporcional à concentração de D-Dímero presente. Estes agregados provocam com uma descida da luz transmitida que é determinada pelo aparelho (técnica imunotubidimétrica).

A sua determinação é cada vez mais utilizada para o diagnóstico de trombose e monitorização de terapêutica trombolítica. São observados níveis elevados em casos de trombose venosa profunda (TVP), embolismo pulmonar (EP), CIV, doença hepática, angina de peito, enfarte agudo do miocárdio ou até cancro. Situações não patológicas como a gravidez também podem levar a aumento dos seus níveis, ainda que menos pronunciados.(27, 29)

#### **C.4.6. Anticoagulante Lúpico (AL)**

O anticoagulante lúpico pertence a um grupo heterogéneo de anticorpos dirigidos contra fosfolípidos de carga negativa ou contra complexos formados entre fosfolípidos e proteínas plasmáticas. Estes anticorpos interferem em provas de coagulação em que participam fosfolípidos, tais como o aTTP e o Teste de Veneno de Víbora de *Russell*. Doentes com AL têm ainda maior probabilidade de sofrer manifestações trombóticas e abortos de repetição.(30)

Segundo as recomendações do Subcomité de Anticoagulante Lúpico/ Anticorpos Anti-Fosfolípidicos, dado o elevado espectro dos anticorpos lúpicos e dos seus epítomos e, por consequência, a não existência de um teste capaz de detetar todos os tipos de AL, é recomendada a utilização de duas metodologias em simultâneo, com distintos princípios analíticos e cada uma com diferentes concentrações de fosfolípidos. O primeiro teste a ser considerado é o tempo de veneno da víbora de *Russel* diluído (TVVRd) e que baseia-se na ativação do fator X, na presença de cálcio, por uma fração do veneno de víbora de *Russel*. O segundo é um teste de *Silica Clotting Time* (SCT) que contém sílica como ativador, e que também na presença de cálcio ativa diretamente a via intrínseca da coagulação. Na prática as

amostras devem ser submetidas a quatro testes em simultâneo: TVVRd *screening* e confirmatório, e SCT *screening* e confirmatório. Enquanto os ensaios de *screening* possuem baixa concentração de fosfolípidos (neste caso os AL conseguem reagir com os fosfolípidos mantendo o tempo de coagulação prolongado), os confirmatórios tem elevada concentração e assim estes fosfolípidos adicionais serão capazes de neutralizar os AL corrigindo o tempo de coagulação. A amostra é considerada positiva para AL, se um dos dois testes der resultado positivo. (30)

Na eventualidade de nem os ensaios confirmatórios forem capazes de corrigir os tempos poderemos estar na presença de um inibidor específico de um fator de coagulação, que não o AL, sendo necessários estudos adicionais.

#### **C.4.7. Fator II e Fator V de Leiden**

As trobofilias hereditárias são condições genéticas que conferem ao indivíduo uma predisposição para a ocorrência de eventos trombóticos como a TVP. Podem ser causadas pela inibição insuficiente da cascata de coagulação por mutações com perda de função, ou por maior atividade coagulante através de mutações por ganho de função.(31)

Recorrendo à biologia molecular, e porque são das principais desordens genéticas, é possível fazer pesquisa de mutações no fator II e fator V. A função do fator V consiste em estimular a produção de trombina sendo que na presença de proteína C ativada o fator é inibido e consequentemente a produção de trombina também. No entanto, na presença desta mutação a inativação pela proteína C é muito mais lenta o que gera uma quantidade superior de trombina que contribui para um estado de hipercoagulabilidade. No caso do fator II, vitamina K dependente, durante a coagulação é transformado em trombina através do complexo protrombinase (fator Xa, Va, Ca<sup>2+</sup> e fosfolípidos de membrana). Sabe-se apenas que a presença da mutação esta associada a níveis plasmáticos elevados de protrombina e consequentemente de trombina levando assim a maior risco trombótico.(31)



## IV. Conclusão

---

A realização deste estágio, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, foi sem dúvida uma mais-valia para a minha formação pessoal e profissional, pois permitiu o contacto com um grupo de doentes muito próprio mas, infelizmente, cada vez mais comum. São doentes que à partida já apresentam muitas alterações nos parâmetros analíticos, particularmente na contagem de células e nos esfregaços sanguíneos de doentes sujeitos a tratamentos com consequências devastadoras, como é o caso da quimioterapia. Por esta razão valores analíticos que num hospital comum já seriam preocupantes, neste hospital fazem parte do dia-a-dia.

Dada a sua extensão, neste estágio foi ainda possível a integração total na rotina dos setores, principalmente nas áreas mais aprofundadas, o que permitiu vivenciar uma experiência muito próxima do que será efetivamente trabalhar num laboratório de análises clínicas a nível hospitalar.

A frequência das aulas foi também essencial para uma melhor integração e compreensão dos parâmetros determinados, já que reforçou o espírito crítico e capacidade cognitiva de interpretação e correlação clínica dos resultados.

É, no entanto, uma pena que não tenhamos total disponibilidade para a realização do estágio uma vez que ainda são lecionadas cadeiras no segundo ano do mestrado. Compreendo que seja difícil ajustar as coisas de outra forma mas acredito que a possibilidade de termos pelo menos o segundo semestre inteiramente dedicado ao estágio permitiria um melhor acompanhamento do mesmo. Seria até possível, quem sabe, desenvolver um projeto de índole científica no local do estágio.



## Referências Bibliográficas

---

1. [cited 2012 Maio]. Available from: [http://www.croc.min-saude.pt/Hospital/Apresentacao/?sm=I\\_0](http://www.croc.min-saude.pt/Hospital/Apresentacao/?sm=I_0).
2. Diagnostics SMS. IMMULITE® 2000/2500 Operator's Manual 2007.
3. Owen WE, Martins TB, Litwin CM, Roberts WL. Performance characteristics of six IMMULITE 2000 TORCH assays. *American journal of clinical pathology*. 2006 Dec;126(6):900-5. PubMed PMID: 17074686.
4. Truchaud A, Bois E, Ferre A, Morin D, Chevelder JC, Colombier G, et al. An Innovative Modular Approach in an Automated Compact Immunoassay System. *Journal of the Association for Laboratory Automation*. 2009 February 1, 2009;14(1):41-8.
5. Diagnostics R. Roche Diagnostics Elecsys 2010 Iminunoassay System Reference Guide. 2004. p. (Cap.4):3-5.
6. Mathew BC, Biju RS, Thapalia N. An overview of electrochemiluminescent (ECL) technology in laboratory investigations. *Kathmandu University medical journal*. 2005 Jan-Mar;3(1):91-3. PubMed PMID: 16401954.
7. Kinn S, Akhavan S, Agut H, Thibault V. Performance of the DiaSorin LIAISON® anti-HBs II for the detection of hepatitis B surface antibodies: Comparison with the Abbott Architect anti-HBs assay. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011;50(4):297-302.
8. André Rinaldi Fukushima ERB, Marcos Leilo Fernandes Janaina Ferrari, Welington França HM, Alexandre Katafai Pererira, Juliana Ribeiro, Erasmo, Chasin SdSeAAAdM. Aplicação de imunoensaios para análise de fármacos e drogas de abuso em sangue total, com finalidade forense. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*. 2009;vol.2, nº1:49-61.
9. M MPB. Les marqueurs tumoraux. Masson. Paris 1989.
10. José Ricardo Chamhum de Almeida NdLP, Juliana Brovini Leite, Tânia Ribeiro do Prado Fleming, Vanessa Henriques de Carvalho, Antônio de Assis Alexandre Cardoso. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007;53(3):305-16.
11. Molina R. FX. Marcadores tumorales: Estado actual y perspectivas de futuro. : Roche Diagnostics.; 2003.
12. Burtis C.A. AER, Bruns D.E. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6th edition ed: Saunders Elsevier; 2008.
13. I. S. Tumour Diseases: A clinical guide.: Abbott Diagnostics; 1992.

14. Roberta Oliveira de Paula e Silva AdFL, Rosa Malena Delbone de Faria. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Revista Médica de Minas Gerais*.18(2):116-22.
15. Keren DF AR, Goeken JA,. Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123:106-7.
16. Sistema LH 750 da Coulter: Adenda às Instruções de utilização. Beckman Coulter, Inc; 2010.
17. TRACEY FERNANDEZ LBD, DINAH MONTES, RICHARD PINEIRO, EILEEN LANDRUM, ESTHER VITAL. Performance Evaluation of the Coulter LH 750 Hematology Analyzer. *Laboratory Hematology*. 2001;7:217–22. Carden Jennings Publishing Co., Ltd.
18. Failace R. Hemograma: Manual de Intrepretação. 5ª ed ed: Artmed; 2009.
19. Romero A, Munoz M, Ramirez G. Length of sedimentation reaction in blood: a comparison of the test I ESR system with the ICSH reference method and the sedisystem I5. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2003 Feb;41(2):232-7. PubMed PMID: 12667012. Epub 2003/04/02. eng.
20. ACL TOP 500. *Repreclin Lab*; 2011.
21. Silva TL, Reis A, Hewitt C, Roseiro JC. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia*. 2004;vol. 77:p. 32-40.
22. Coloração de Wright Accustain (R). Sigma-Aldrich, Inc; 2006.
23. Coloração de Ferro Accustain (R). Sigma-Aldrich, Inc.; 2006.
24. Carvalho LMSADLMVMdG. Pseudotrombocitopenia. *J Bras Patol Med Lab*. 2004;40(5):321-4.
25. Hoffbrand AV, P.A.H. Moss, and J.E. Pettit,. *Fundamentos em Hematologia*. 5ª ed ed: Artmed; 2006.
26. Lewis SM, B.J. Brain, and I. Bates. *Miscellaneous tests in Dacie and Lewis Practical Haematology tenth edition*. Churchill Livingstone Elsevier2006.
27. Instrumentation Laboratory; [cited 2012 Julho]. Available from: [http://portal.ilus.com/vt000/vt\\_002/vt\\_002\\_go\\_002.aspx](http://portal.ilus.com/vt000/vt_002/vt_002_go_002.aspx).
28. Coelho DTH, Moreira PDAL. *Função hemostática e sua avaliação*. 2001.
29. Franco RF. *Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise*. Medicina, Ribeirão Preto. 2001;34:229-37.
30. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on



Thrombosis and Haemostasis. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2009 Oct;7(10):1737-40. PubMed PMID: 19624461.

31. Silva A.S. BML, Granito S., Escórcio S., Jardim M., Silva S., Andrade J.L., Vieira R. Teixeira C., Freitas D., Araújo J.N. Prothrombotic disturbs/Thrombofilia. Serviço de Medicina I do Hospital Central do Funchal. 2010;17(1).