



Anabela Antunes Gomes de Faria

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela  
Professora Doutora Paula Cristina Luxo e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Imagem: Adaptada equimed .Bender Medsystems

Anabela Antunes Gomes de Faria

# Relatório de Estágio

## Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela  
Professora Doutora Paula Cristina Luxo e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA





“No meio da confusão, encontre a simplicidade.  
A partir da discórdia, encontre a harmonia.  
No meio da dificuldade reside a oportunidade.”

Albert Einstein



## **Agradecimentos**

Este estágio foi concretizado com a participação de várias pessoas a quem agradeço a colaboração, sabedoria, experiência e amabilidade.

À administração do grupo LABCO por ter possibilitado a realização do estágio no Laboratório Análises Clínicas Dra. Susana Rosas, a todos os colaboradores do laboratório em especial à Dra. Cristina Cruz pela disponibilidade e incentivo durante o período de estágio.

À Professora Catedrática Leonor Martins de Almeida, coordenadora do curso de Mestrado em Análises Clínicas, pelo apoio prestado ao longo dos dois anos de mestrado.

À Professora Doutora Paula Cristina Luxo pela orientação na realização deste relatório de estágio.

À família e amigos pela confiança, por todo o carinho e por estarem sempre presentes.

“Last but not least” ao Paulo Henrique, meu companheiro por todo o Amor e apoio incondicional.

O meu sincero obrigada!



# Índice

Capítulo 1. Introdução.....	1
Capítulo 2. Caracterização do Laboratório de Estágio.....	3
Capítulo 3. Hematologia.....	5
3.1 Amostras em Hematologia .....	5
3.1.1 Metodologia e Fundamentos do Equipamento Mindray BC-5800.....	7
3.1.2 Hemograma - Eritrograma.....	10
3.1.3 Hemograma - Plaquetas.....	12
3.1.4 Hemograma - Leucograma.....	13
3.1.5 Esfregaço de Sangue Periférico .....	14
3.1.6 Reticulócitos.....	16
3.2 Patologias associadas à Linhagem Eritróide .....	17
3.2.1 Classificação Morfológica da Anemia .....	18
3.2.2 Anemias Hemolíticas.....	21
3.3 Estudo de Hemoglobinopatias .....	21
3.3.1 Talassemias .....	23
3.4 Patologias associadas à Linhagem Linfóide e Mielóide.....	25
3.4.1 Alterações Quantitativas das Células Sanguíneas .....	26
3.4.2 Leucemias.....	27
3.5 Hemostase .....	30
3.5.1 Metodologia e Fundamentos do Equipamento Sysmex – série CA-540.....	31
3.5.2 Tempo de Protrombina.....	32
3.5.3 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada.....	33
3.6 Velocidade de Sedimentação Globular .....	34
3.6.1 Metodologia e Fundamentos do Equipamento VES-MATIC 30 Plus.....	34
Capítulo 4. Imunologia/Endocrinologia .....	37
4.1 Diagnóstico Laboratorial da Função Tiroideia .....	38
4.2 Amostras em Imunologia/Endocrinologia.....	39
4.3 Metodologia e Fundamentos do Equipamento de ADVIA .....	39
4.3.1 Método da Quimioluminescência Direta.....	40
4.4 Casos Clínicos .....	43

4.4.1	Caso clínico 1 .....	43
4.4.2	Caso clínico 2 .....	43
4.4.3	Caso clínico 3 .....	44
4.4.4	Caso clínico 4 .....	45
Capitulo 5.	Conclusão .....	47
Capitulo 6.	Bibliografia.....	49

## Índice de Figuras

Figura 1 - Equipamento Mindray BC-5800.....	viii
Figura 2 - Célula de fluxo.....	8
Figura 3 - Dispersão de luz.....	8
Figura 4 - Scattergram .....	9
Figura 5 - Representação esquemática do método colorimétrico.....	9
Figura 6 - Histogramas RBC e PLT.....	10
Figura 7 - Diagnóstico laboratorial – Morfologia e inclusões nos eritrócitos .....	14
Figura 8 - Técnica de execução de ESP e distribuição das células no esfregaço.....	15
Figura 9 - Células sanguíneas no ESP .....	16
Figura 10 - Identificação do gametócito do Plasmodium falciparum no ESP .....	16
Figura 11 - Reticulócitos .....	17
Figura 12 - Hemograma e histograma do utente de 80 anos.....	19
Figura 13 - Esfregaço sanguíneo de doente com anemia por doença crónica.....	19
Figura 14 - Hemograma e histograma da utente de 49 anos .....	20
Figura 15 - Esfregaço sanguíneo .....	21
Figura 16 - Representação esquemática da constituição dos cromossomas. ....	22
Figura 17 - Hemograma e histograma da utente de 44 anos .....	24
Figura 18 - Esfregaço sanguíneo .....	25
Figura 19 - Analisador CA-540.....	31
Figura 20 - Analisador VES-MATIC.....	34
Figura 21 - ADVIA Centaur CP Immunoassay System. ....	39

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Tabela adaptada da Norma da D.G.S. n.º 063/2011, (Parte I).....	6
Tabela 2 - Tabela adaptada da Norma da D.G.S. n.º 063/2011, (Parte II).....	7
Tabela 3 - Classificação Morfológica.....	18
Tabela 4 - Resultados laboratoriais das análises prescritas.....	19
Tabela 5 - Resultados laboratoriais das análises prescritas.....	20
Tabela 6 - Anemias Hemolíticas - Classificação.....	21
Tabela 7 - Os resultados laboratoriais de análises da cinética do ferro.....	24
Tabela 8 - Alterações do número de leucócitos.....	26
Tabela 9 - Classificação LMA e LLA (FAB).....	28
Tabela 10 - Classificação de Leucemias Mielóides Crónicas.....	28
Tabela 11 - Classificação das Leucemias Linfocíticas Crónicas.....	28
Tabela 12 - Classificação da LMA (OMS).....	29
Tabela 13 - Classificação da LLA (OMS).....	30
Tabela 14 - Fatores de coagulação.....	31
Tabela 15 - Testes de controle de anticoagulantes orais.....	33
Tabela 16 - Diagnóstico laboratorial de hipertireoidismo e de hipotireoidismo.....	38
Tabela 17 - Análises efetuadas no equipamento ADVIA.....	39
Tabela 18 - Resultados laboratoriais das análises do caso clínico 1.....	43
Tabela 19 - Resultados laboratoriais das análises do caso clínico 2.....	43
Tabela 20 - Resultados laboratoriais das análises do caso clínico 3.....	44
Tabela 21 - Resultado laboratorial da análise do caso clínico 3.....	44
Tabela 22 - Resultados laboratoriais das análises do caso clínico 4.....	45



## ABREVIATURAS

<b>Ac. anti-TG</b>	Anticorpos anti-tiroglobulina
<b>Ac. anti-TPO</b>	Anticorpos anti-peroxidase
<b>BASO</b>	Basófilos
<b>CQE</b>	Controlo de Qualidade Externo
<b>CQI</b>	Controlo de Qualidade Interno
<b>EOS</b>	Eosinófilos
<b>ESP</b>	Esfregaço do Sangue Periférico
<b>FAB</b>	Franco-Americano-Britânico
<b>FSC</b>	<i>Forward Scatter</i>
<b>FT<sub>3</sub></b>	Tri-iodotironina livre
<b>FT<sub>4</sub></b>	Tiroxina livre (FT <sub>4</sub> ),
<b>HCM=MCH=HGM</b>	Hemoglobina Corpuscular Média (Cell Hemoglobin Concentration Mean), Hemoglobina Globular Média
<b>HGB=Hb</b>	Hemoglobina
<b>HPLC</b>	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
<b>HTC</b>	Hematócrito
<b>INSA</b>	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
<b>EDTA k<sub>3</sub></b>	<i>Potassium (K3) Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
<b>LES</b>	Lúpus Eritematoso Sistémico
<b>LLA</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda
<b>LLC</b>	Leucemia Linfocítica Crónica
<b>LMA</b>	Leucemia Mielóide Aguda
<b>LMC</b>	Leucemia Mielóide Crónica
<b>LYN</b>	Linfócitos
<b>MCHC= CMHG</b>	Média da Concentração de Hemoglobina Corpuscular, Concentração Média da Hemoglobina Globular
<b>MONO</b>	Monócitos
<b>NEU</b>	Neutrófilos
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PDW</b>	<i>Platelet Volume Distribution Wigth</i> (Dispersão do Volume Plaquetar)
<b>PLT</b>	Plaquetas
<b>RBC</b>	<i>Red Blood Cells</i> (Eritrócitos)

<b>RDW</b>	<i>Red Cells Distribution Wigth</i> (Dispersão do Volume Eritrocitário)
<b>RET</b>	Reticulócitos
<b>RIQAS</b>	<i>Randox International Quality Assessment Scheme</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SEHH</b>	Sociedade Espanhola de Hematologia e Hemoterapia
<b>SEQC</b>	Sociedade Espanhola de Química Clínica
<b>SSC</b>	<i>Side Scatter</i>
<b>T<sub>3</sub></b>	Tri-iodotironina
<b>T<sub>4</sub></b>	Tiroxina ou tetra-iodotironina
<b>TIBC</b>	Capacidade Total da Fixação do Ferro
<b>TRAbs</b>	Anticorpo anti recetor da TSH
<b>TRH</b>	Hormona Libertadora da Tirotropina
<b>TSH</b>	Hormona Tiro – Estimulante ou Tirotropina
<b>TTPa</b>	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
<b>UK-NEQAS</b>	<i>United Kingdom National External Quality Assessment Service</i>
<b>VCM =VGM</b>	Volume Corpuscular Médio, Volume Globular Médio
<b>VPM= MPV</b>	<i>Mean Platelet Volume</i> (Volume Plaquetar Médio)
<b>VS = VSG</b>	Velocidade de Sedimentação Globular
<b>WBC</b>	<i>White Blood Cells</i> (Leucócitos)

## **Resumo**

Neste trabalho as atividades laboratoriais foram desenvolvidas nas áreas de Hematologia, Bioquímica Clínica, Imunologia, Endocrinologia e Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas Dra. Susana Rosas, utilizando as metodologias adequadas para os testes analíticos solicitados houve oportunidade de desenvolver e de consolidar conhecimentos nas diferentes áreas.

As áreas de Hematologia e de Endocrinologia foram as selecionadas para uma descrição mais detalhada sobre as metodologias aplicadas, os critérios utilizados na interpretação, na validação dos resultados e na gestão de qualidade. São abordadas as alterações mais frequentemente associadas aos exames hematológicos e imunológicos efetuados no laboratório e as patologias comumente associadas. Para cada valência foram selecionados casos clínicos reais exemplificativo da patologia em causa e cujo estudo laboratorial teve oportunidade de executar durante o estágio. Tendo as análises clínicas um papel importante na terapêutica e na monitorização de certas patologia, o laboratório assegura a fiabilidade e reduz variabilidade dos resultados obtidos, pela participação em programas de avaliação de controlo de qualidade interna e de controlo de qualidade externa.

## **Abstract**

The laboratory activities were developed in the areas of Hematology, Clinical Biochemistry, Immunology, Endocrinology and Microbiology of the Clinical Analysis Laboratory Dra. Susana Rosas, using the appropriate methodologies for the requested analytical tests. There was an opportunity to develop and consolidate knowledge in different areas. The areas of Hematology and Endocrinology were selected for a more detailed description of the methodologies used and the criteria used in the interpretation, for the validation of results and quality management. Changes most frequently associated with hematological and immunological tests performed in the laboratory and commonly associated diseases are addressed. For each valence selected to actual clinical cases illustrative of the condition in question and whose laboratory study had the opportunity to perform during the stage. Given that the results of clinical analysis were used to support clinical diagnosis and the establishment of a therapy and / or monitoring of certain pathologies, the Internal Quality Control and the External Quality control performed in the laboratory ensures reliability of analytical results of users and reduces the variability of results obtained.



## CAPITULO I. INTRODUÇÃO

Os principais objetivos deste estágio foram a aplicação prática dos conhecimentos teóricos adquiridos durante o período de formação curricular e a consolidação dos conhecimentos apreendidos durante a atividade profissional exercida no laboratório de análises clínicas como técnica superior.

As atividades laboratoriais foram realizadas nas diferentes fases do processo analítico:

1. A fase pré-analítica é o primeiro passo para a obtenção de resultados com elevado grau de confiança e fiabilidade. Está comprovado que é nesta fase que ocorre a maior percentagem de “erros” laboratoriais, pelo que se reveste de extrema importância para um bom resultado final. Foram realizadas as seguintes tarefas:
  - Receção e preparação do utente - consistem na análise da requisição, abertura do processo individual e sua orientação até à colheita.
  - Colheita, identificação inequívoca e transporte adequado das diferentes amostras biológicas. Estas etapas estão documentadas no Manual de Colheitas do laboratório, o qual inclui informação sobre o material de colheita específico para cada tipo de amostra e para cada determinação analítica a efetuar.
  - Receção, registo informático, tratamento, triagem e conservação das amostras.
  - Controlo da fase pré-analítica, designadamente pela verificação do processamento e manipulação primária das amostras biológicas, com registo das falhas de colheita e sua comunicação às unidades de colheita, laboratórios centrais e/ou utentes, caso necessário.
2. Na fase analítica foi feito acompanhamento na realização dos testes analíticos das diversas amostras biológicas. Foi seguido um conjunto de instruções operativas, de forma a garantir a qualidade dos resultados:
  - Verificação do estado de controlo dos sistemas/equipamentos analíticos: manutenção dos equipamentos e validade dos reagentes.
  - Monitorização dos processos de análise, utilizando regularmente amostras de controlo de qualidade interno (CQI) e controlo de qualidade externo (CQE).
3. Na fase pós-analítica, realizada por farmacêuticas especialistas em análises clínicas, foi feito o acompanhamento na análise dos boletins de resultados, a sua interpretação e

validação biopatológica, tendo em conta a rastreabilidade dos resultados, assim como registo de recomendações e preparação para o envio dos resultados analíticos.

## CAPITULO 2. CARATERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O laboratório Susana Pereira Rosas, fundado em 1972, está integrado no grupo LABCO desde 2007, cuja denominação passou a Laboratório Análises Clínicas Dra. Susana Rosas. O laboratório central, sito em Av. Combatentes da Grande Guerra, nº43, 2ªA/B. 2400-123 LEIRIA é composto por mais 10 unidades de colheitas, no distrito de Leiria e de Santarém.

A sua atividade é centralizada na prestação de serviços de saúde na área das análises clínicas, nas valências de Hematologia, Bioquímica Clínica, Microbiologia, Imunologia, Endocrinologia Laboratorial e Estudos Funcionais dos Metabolismos, Órgãos e Sistemas. O laboratório está equipado com aparelhos modernos adequados à realidade do trabalho desenvolvido em prol de um serviço de satisfação do utente e do médico. A confidencialidade dos resultados das análises e de todos os dados relativos aos utentes é garantida por um sistema informático e pelo compromisso de confidencialidade assumida pelos colaboradores. O Sistema informático APOLLO é um sistema de gestão global, que permite a integração com os equipamentos do laboratório “on line” disponibilizando em tempo real aos equipamentos as análises a processar e aos técnicos a visualização dos resultados das análises processadas, permitindo um controle imediato. As operações são efetuadas com segurança, garantindo a integridade e sigilo da informação. A equipa técnica é constituída pela Dra. Cristina Maria Rodrigues Cruz- Especialista em Análises Clínicas exerce função de Diretora Técnica do Laboratório Análises Clínicas Susana Rosas com a colaboração da Dra. Mercedes Isabel Vicente Lopes Ferraz Furriel - Especialista em Análises Clínicas, por Técnicos Superiores de Análises Clínicas, Técnicos de Análises Clínicas, Rececionistas/ Administrativas e Auxiliar de Laboratório.

Laboratório certificado desde 2005, encontra-se inserido no Sistema de Certificação Multisite Labco, pela Norma NP EN ISO 9001:2008, pela EIC, com Anexo XI ao Certificado Nº E-3315 emitido em 14 de Janeiro de 2015 e com validade até 26 de Junho de 2017.

Todas as áreas técnicas estão sujeitas a CQI. No caso dos equipamentos automatizados de Bioquímica Clínica e Imunologia/Endocrinologia o laboratório possui ainda um programa informático (MultiQC) o qual é uma mais valia na gestão diária do CQI.

No que respeita à avaliação externa de qualidade, o Laboratório Análises Clínicas Susana Rosas participa no programa do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) o

Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ), no programa *United Kingdom National External Quality Assessment Service* (UK-NEQAS), assim como nos programas da *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS), da Sociedade Espanhola de Química Clínica (SEQC) e da Sociedade Espanhola de Hematologia e Hemoterapia (SEHH).



## CAPITULO 3. HEMATOLOGIA

A hematologia inclui o estudo de células sanguíneas e da coagulação. Esta área engloba a análise da concentração, da estrutura e da função das células no sangue, dos seus precursores na medula óssea, dos constituintes químicos do plasma intimamente ligados com a estrutura das células sanguíneas, da função das plaquetas e das proteínas envolvidas na coagulação do sangue.

O avanço nas técnicas da biologia molecular e a sua crescente utilização contribuiu para a deteção de várias mutações genéticas com conseqüentes alterações de estrutura, da função das células e das proteínas podendo resultar em doença hematológica. Atualmente através da biologia molecular aplicações dos Microarrays, detetam-se doenças genéticas em hemóstase caso da doença de Von Willebrandt, hemofilia e trombose familiar, detetam-se mutações de genes em leucemias e síndromes mieloproliferativas. A aplicação da biologia molecular na hematologia tem um papel relevante no diagnóstico, prognóstico e na terapêutica destas doenças.

No setor de hematologia participei na realização de hemogramas, na contagem de reticulócitos, na determinação da velocidade de sedimentação, na preparação e observação de esfregaços de sangue periférico, a determinação do tempo de protrombina e do tempo de tromboplastina parcial ativada ou tempo de cefalino caulino e na pesquisa de eosinófilos em exsudado nasal.

Durante o estágio surgiram alguns casos clínicos que vou referir neste relatório.

### **3.1 Amostras em Hematologia**

As amostras de sangue total são colhidas para tubos com o anticoagulante EDTA k3 - *Potassium (K3) Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*, usado na forma de sal tripotássico, é o anticoagulante de eleição para as análises de hematologia, com exceção das análises para o estudo da coagulação já que forma quelatos insolúveis com os iões de cálcio presente no sangue, necessário para a coagulação. Assegura a conservação das células durante 24 horas em amostras refrigeradas. O citrato trissódico funciona como anticoagulante bloqueando o cálcio ionizado através de reação química com formação de citrato de cálcio insolúvel, é o anticoagulante utilizado para a determinação da velocidade de sedimentação e para provas

de coagulação. A heparina é o melhor anticoagulante para prevenção de hemólise e para as provas de fragilidade osmótica, atua formando um complexo com a antitrombina III do plasma. Devido a poder ocorrer pequenos agregados celulares não é usado para a análise hemograma completo.

Alterações nos parâmetros do hemograma fornecem dados importantes para o diagnóstico de diferentes patologias sanguíneas. É crucial conhecer o intervalo dos valores de referência para uma correta interpretação.

**Tabela I** - Tabela adaptada da Norma da D.G.S. nº 063/2011, atualizado em 12/09/2013).

Parâmetro (Unidades)	Sexo	Idade	Valor Referência
RBC ( $\times 10^{12}/L$ )	M/F	0-6 Meses	3.90 - 5.90
	M/F	6 Meses-11 Anos	3.80 - 5.40
	M	> 11 Anos	4.31 - 6.40
	F	> 11 Anos	3.85 - 5.20
HGB (g/dL)	M/F	0-6 Meses	14.0 - 18.0
	M/F	6 Meses-11 Anos	11.0 - 14.0
	M	> 11 Anos	13.6 - 18.0
	F	> 11 Anos	11.5 - 16.0
HTC (%)	M/F	0-2 Semanas	42.0 - 68.0
	M/F	2 Sem. - 2 Meses	35.0 - 50.0
	M/F	2 Meses - 1 Ano	30.0 - 40.0
	M/F	1 - 5 Anos	32.0 - 42.0
	M	> 5 Anos	39.8 - 52.0
	F	> 5 Anos	34.7 - 46.0
MCV (fL)	M/F	0-2 Semanas	88.0- 114.0
	M/F	2 sem. -6 Meses	85.0 - 97.0
	M/F	6 Meses - 11 Anos	72.0 - 86.6
	M/F	> 11 Anos	80.0 - 97.0
MCH (pg)	M/F	0-2 Semanas	34.0 - 37.0
	M/F	2 sem. -6 Meses	31.0 - 36.0
	M/F	6 Meses - 5 Anos	25.0 - 31.0
	M/F	> 5 Anos	26.0 - 34.0
MCHC (g/dL)	M/F	0-2 Semanas	31.0 - 35.0
	M/F	2 sem. -6 Meses	32.0 - 35.0
	M/F	> 6 Meses	32.0 - 36.0
RDW (%)	M/F	0-2 dias	14.9 - 18.7
	M/F	> 2 dias	11.5 - 15.0
PLT ( $\times 10^9/L$ )	M/F	0-2 Meses	140 - 440
	M/F	> 2 Meses	140 - 440
MPV (fL)	M/F	Qualquer Idade	6.5 - 12.4

(Fonte: adaptado da Norma da D.G.S. nº 063/2011, atualizado em 12/09/2013)

**Tabela 2** - Tabela adaptada da Norma da D.G.S. nº 063/2011, atualizado em 12/09/2013)

Parâmetro (Unidades)	Sexo	Idade	Valor Referência
WBC ( $\times 10^9/L$ )	M/F	0-2 Meses	5.0 - 20.0
	M/F	2 Meses-5 Anos	4.5 - 17.0
	M/F	5 - 11 Anos	4.5 - 13.0
	M/F	> 11 Anos	4.0 - 10.0
NEU ( $\times 10^9/L$ )	M/F	0-6 dias	1.5 - 16.0
	M/F	6 dias -2 Meses	0.8 - 9.0
	M/F	2 Meses - 1 Ano	0.7 - 7.6
	M/F	1 - 5 Anos	1.5 - 11.0
	M/F	5 - 11 Anos	1.5 - 8.5
	M/F	> 11 Anos	1.5 - 8.0
LYM ( $\times 10^9/L$ )	M/F	0-6 dias	0.5 - 10.0
	M/F	6 dias -5 Anos	2.0 - 14.0
	M/F	5 - 11 Anos	1.0 - 7.8
	M/F	> 11 Anos	0.8 - 4.0
MONO ( $\times 10^9/L$ )	M/F	0-2 Meses	0.0 - 2.4
	M/F	2 Meses-5 Anos	0.0 - 2.0
	M/F	5 - 11 Anos	0.0 - 1.6
	M/F	> 11 Anos	0.0 - 1.2
EOS ( $\times 10^9/L$ )	M/F	0-2 Meses	0.0 - 1.4
	M/F	2 Meses-5 Anos	0.0 - 1.2
	M/F	5 - 11 Anos	0.0 - 0.9
	M/F	> 11 Anos	0.0 - 0.3
BASO ( $\times 10^9/L$ )	M/F	0-2 Meses	0.0 - 0.6
	M/F	2 Meses-5 Anos	0.0 - 0.5
	M/F	5 - 11 Anos	0.0 - 0.4
	M/F	> 11 Anos	0.0 - 0.3

(Fonte: adaptado da Norma da D.G.S. nº 063/2011, atualizado em 12/09/2013).

O processamento do hemograma completo é realizado pelo analisador Mindray BC-580. Inicia-se com manutenção do equipamento e a aplicação de controlo hematológico. A calibração é efetuada, com periodicidade programada, pela empresa representante do equipamento.

O programa de avaliação de CQI utilizado diariamente no laboratório é Mindray Hematology Control BC-5D. O programa de avaliação CQE do SEHH e do UK-NEQAS.

### **3.1.1 Metodologia e Fundamentos do Equipamento Mindray BC-5800**

A válvula de amostra aspira o sangue total que é dividido em 4 porções. As diferentes porções têm diluições diferentes com diferentes reagentes consoante os parâmetros a determinar. No processamento da amostra utiliza 3 metodologias:

- Citometrias de fluxo por laser os WBC são diferenciados e contados quando passam através do laser ocorrendo a dispersão da luz laser pelas células a diferentes ângulos.
- Método colorimétrico para determinação de HGB onde ocorre a formação de um complexo que é mensurável a 525nm.
- Método por impedância elétrica para a determinação de RBC/PLT obtida pela mudança na resistência elétrica pela passagem dos RBC/PLT. O impulso é detetado, amplificado e registrado.

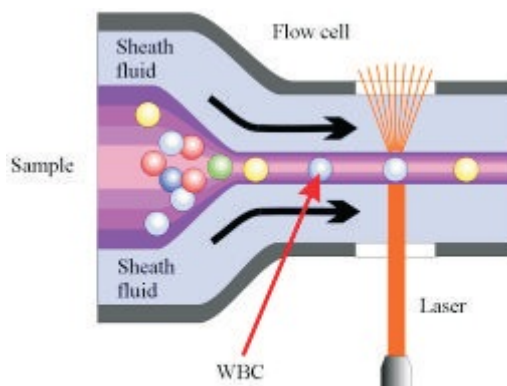


**Figura 1** - Equipamento Mindray BC-5800. (Fonte: Mindray Medical)

### 3.1.1.1 Citometria de fluxo por laser

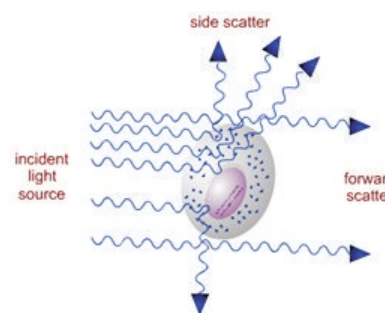
Canal BASO e Canal DIFF.

Do sangue total aspirado uma porção é diluída com o reagente Lise M-50LEO (I) que provoca a lise da membrana dos glóbulos vermelhos e ao adicionar o reagente Lise M-50LEO (II) obtém-se a diferenciação dos leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos) no canal DIFF. A outra porção é diluída com o Lise M-50LBA para se obter quantificação de WBC e de basófilos no canal BASO. Nos citômetros as células em suspensão são injetadas num fluxo laminar e passam alinhadas uma a uma em frente a um feixe de luz.



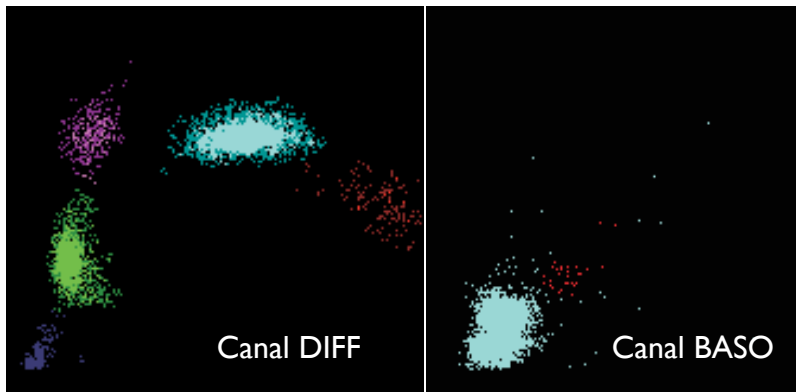
**Figura 2** - Célula de fluxo. (Fonte: Mindray Medical)

Os Citômetros possuem detetores localizados a 90° do feixe de luz. Estes detetores medem a capacidade da célula desviar o feixe luminoso. Da dispersão lateral (*Side Scatter* ou SSC) obtemos informações sobre a estrutura interna da célula (material granular do interior da célula, relação núcleo citoplasma) e a sua forma. Ou seja, a luz dispersa lateralmente correlaciona-se com a complexidade celular. A



**Figura 3** - Dispersão de luz. (Fonte: Mindray Medical)

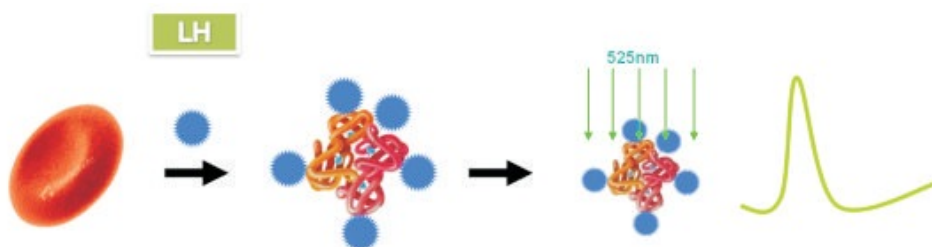
luz que é dispersa frontalmente (*forward scatter* ou FSC) é proporcional ao tamanho celular e ao número das células. Estes detetores convertem a luz dispersa em impulsos elétricos resultando na distribuição dimensional.



**Figura 4** - Scattergram.  
(Fonte: Mindray Medical)

### 3.1.1.2 Método Colorimétrico.

No analisador Mindray a determinação da concentração de hemoglobina é feita pelo método colorimétrico com reagentes isentos de cianeto. A amostra e o diluente Lise M-58LH são misturadas na câmara de reação, provocando o rompimento da membrana dos glóbulos vermelhos e a hemoglobina é libertada. Os sais do reagente ligam à hemoglobina formando um complexo que é mensurável a 525nm. A concentração da hemoglobina é expressa em g/dL.



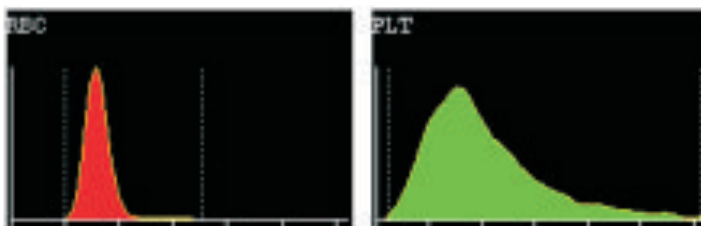
**Figura 5** - Representação esquemática do método colorimétrico.  
Fonte: Mindray Medical

### 3.1.1.3 Método por Impedância Elétrica

#### CANAL RBC /PLT

No método por impedância elétrica as células sanguíneas (os glóbulos vermelhos e as plaquetas) são contadas e dimensionadas a partir dos impulsos elétricos que geram quando imersas num meio condutor. As células são forçadas a passar uma a uma, por um orifício de tamanho conhecido. Esse orifício é ladeado por dois eletrodos, de forma a criar um campo elétrico. As alterações na corrente existente entre os eletrodos, que ocorrem aquando da passagem das células resistentes, são detetadas e registadas sob a forma de impulso. O número de impulsos gerados corresponde ao número de partículas que passaram através do fluxo. A amplitude de cada pulso é proporcional ao volume de cada partícula. Cada pulso é amplificado em comparação com o de um canal de tensão de referência interna se o impulso gerado está acima do limiar inferior da PLT, é contado como tal; e se o impulso gerado está acima do limiar inferior dos RBC, é contado como um RBC.

O analisador apresenta o histograma RBC e um histograma PLT onde a coordenada X representa o volume das células (fl) e a coordenada Y representa o número das células.



**Figura 6** - Histogramas RBC e PLT.  
(Fonte: Mindray Medical)

### 3.1.2 Hemograma - Eritrograma

#### 3.1.2.1 RBC – Eritrócito

Num indivíduo saudável os eritrócitos apresentam forma de disco bicôncavo, flexível de diâmetro médio de  $8\mu\text{m}$ , com ausência de núcleo e de citoplasma acidófilo. São produzidos aproximadamente  $10^{12}$  novos eritrócitos por dia, resultam de um processo de diferenciação e maturação designado por eritropoiese. A eritropoiese consiste na diferenciação da stem cell pluripotente (célula mãe pluripotente) em precursores de maior capacidade de diferenciação  $\text{CFU}_{\text{GEMM}}$ . Unidades de precursores das linhagens granulocitária, eritrocitária, monocitária e megacariocitária,  $\text{BFU}_{\text{E}}$  Fator estimulador da proliferação de eritroblastos e

CFU<sub>E</sub> - Unidade formadora de eritroblastos, originando a primeira célula eritroide que pode ser identificada morfológicamente, na medula óssea, o proeritroblasto. O proeritroblasto, tem núcleo central, nucléolos e basofilia citoplasmática, durante o processo de diferenciação forma-se o eritroblasto com núcleo central mas já não apresenta nucléolos. A maturação do eritroblasto consiste na perda do núcleo originando os reticulócitos que antes da maturação completa a eritrócito maduro permanece 2 a 4 dias na medula óssea e 1 dia no sangue periférico.

O número total de eritrócitos (n) medido diretamente pelo analisador é expresso em:

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

### 3.1.2.2 HGB- Concentração de Hemoglobina Medida

A hemoglobina é o componente principal dos eritrócitos, é uma proteína conjugada que transporta o oxigénio, hidrogénio e dióxido de carbono. Sendo a principal função o transporte do oxigénio dos pulmões para os tecidos e o dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões.

A determinação da concentração de hemoglobina é um critério fundamental para o diagnóstico de uma anemia, razão pela qual é considerada análise de rotina.

A concentração da hemoglobina é calculada por método colorimétrico e expressa em g/dL.

### 3.1.2.3 HCT- Hematócrito

O valor do hematócrito corresponde à relação entre o volume ocupado pelos eritrócitos numa determinada quantidade de sangue. Pode ser representado em % ou em litro/litro.

No analisador BC-5800 calcula o HCT em % pela determinação do volume corpuscular médio e do número total de eritrócitos, pela fórmula:

$$\text{HCT} = \text{RBC} \times \text{MCV} / 10$$

### 3.1.2.4 Índices eritrocitários

Wintrobe introduziu os cálculos para a determinação dos índices eritrocitários a partir do número dos eritrócitos, da concentração da hemoglobina e do hematócrito:

- VCM – Volume Corpuscular Médio/ Volume Globular Médio

O VCM é o volume médio do volume de cada eritrócito. Calcula-se pelo quociente do valor hematócrito e do número glóbulos vermelhos, é expresso em fentolitros (1fL = 10<sup>-15</sup> L).

$$\text{VCM (fL)} = \text{HCT (L/L)} / \text{RBC (10}^{12} / \text{L)} \times 10^3$$

O índice VCM permite estabelecer uma primeira orientação etiológica da anemia, pois permite distinguir os eritrócitos em microcíticos, macrocíticos e normocíticos.

- MCH – Hemoglobina Corpuscular Média/ Hemoglobina Globular Média

A MCH é o valor médio da hemoglobina existente em cada eritrócito. Determina-se pelo quociente entre o valor da concentração de hemoglobina em sangue total (g/dL) e o número de eritrócitos por litro (L), expresso em picogramas(pg).

$$\text{MCH(pg)} = \text{HGB (g/dL)} / \text{RBC (10}^{12} / \text{L)} \times 10$$

- MCHC- Concentração Corpuscular Média da Hemoglobina

A MCHC é a concentração média de hemoglobina em um volume determinado de concentração de eritrócitos. Determina-se pelo quociente entre o valor de concentração da hemoglobina e o valor do hematócrito, no analisador BC-5800 é expresso em g/dL sendo o cálculo baseado na fórmula:

$$\text{MCHC (g/dL)} = \text{HBG (g/dL)} / \text{HCT (L/L)} \times 100$$

- RDW (Red Cell Distribution Width)

RDW – CV – Coeficiente de variação da amplitude de distribuição dos eritrócitos, é expresso em %. Representa a percentagem de variação dos volumes obtidos é um índice de anisocitose eritrócitária. O RDW tende a ser elevado em anemia ferropriva.

### 3.1.3 Hemograma - Plaquetas

As plaquetas são pequenos fragmentos do citoplasma dos megacariócitos geralmente discoides de 2 a 4 µc de diâmetro. O precursor do megacariócito é o megacarioblasto que resulta de um processo de diferenciação e maturação designado por megacariopoiese a



partir da *stem cell* hematopoiética, na medula óssea. O megacariócito durante o processo de maturação sofre divisões do núcleo sem ocorrência de divisões do citoplasma aumentando o volume em função dos lóbulos formados, nas extremidades do citoplasma formam-se extensões que se fragmentam e originam as plaquetas. Cada megacariócito dá origem a 4000 plaquetas.

A contagem das plaquetas é medida automaticamente, o analisador calcula o MPV- volume plaquetar médio expresso em fl e o número de plaquetas é expressa em  $10^3/\mu\text{L}$ . A contagem das plaquetas é um indicador da hemóstase primária.

O valor de referência da contagem de plaquetas é de 140 a  $440 \times 10^3/\mu\text{L}$ . O aumento do número de plaquetas do valor de referência é denominado de trombocitose e a diminuição do número de plaquetas abaixo do valor de referência define-se de trombocitopenia.

Podem ocorrer falsas trombocitopenias devido ao efeito aglutinador do anticoagulante sobre as plaquetas, designada na clínica por pseudotrombocitopénia, e o designado “satelitismo plaquetário”, a adesão das plaquetas na superfície dos polinucleares neutrófilos. Estes casos não são detetados pelo analisador e só a observação do esfregaço sanguíneo permitirá detetar estes artefactos. Quando nos deparamos com esta situação, o utente repete a análise e a contagem das plaquetas é efetuado, no laboratório, imediatamente após a realização da colheita de sangue total.

### **3.1.4 Hemograma - Leucograma**

O leucograma compreende a contagem global de leucócitos e a fórmula leucocitária que consiste na contagem diferencial de cada um dos leucócitos presentes no sangue periférico. Alterações quantitativas e morfológicas fornecem ao clínico informações fundamentais para o diagnóstico de distúrbios hematológicos e para a monitorização de terapêutica (quimioterapia, radioterapia).















Os leucócitos ou glóbulos brancos constituem um conjunto de células com diversas funções relacionadas com a defesa do organismo perante agentes patogénicos (quimiotaxia, fagocitose, digestão e morte). Caracterizam-se por possuírem núcleo e organelos celulares. Do ponto de vista morfológico classificam-se em dois grandes grupos: polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (linfócitos e monócitos).

### 3.1.5 Esfregaço de Sangue Periférico

Apesar do enorme progresso dos métodos de diagnóstico em Hematologia o estudo morfológico do sangue periférico junto com as determinações dos restantes parâmetros hematológicos continua a ser um procedimento de inegável valor para confirmação dos resultados obtidos.

O estudo morfológico do sangue periférico baseia-se na observação do esfregaço tendo em atenção as seguintes linhagens:

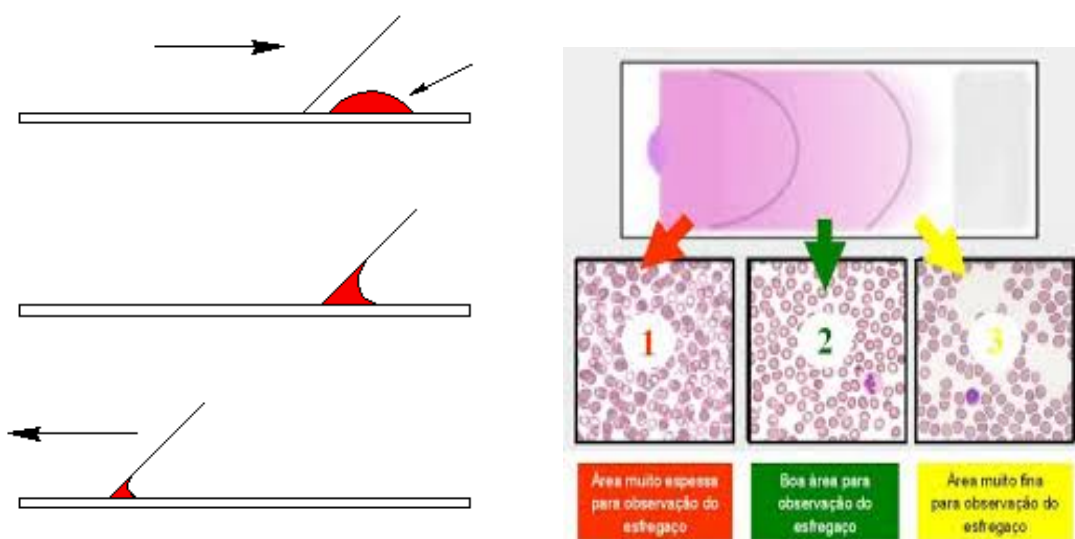
- Eritrocitária permite a observação de possíveis alterações morfológicas, tais como tamanho, forma, cor dos eritrócitos, das alterações do estado de maturação, de distribuição, das alterações numéricas e a presença de inclusões.
- Leucocitária é importante observar a presença de alterações morfológicas, de alterações do estado de maturação e de alterações numéricas.
- Plaquetária permite observar a presença de agregação plaquetar e de alterações morfológicas e alterações numéricas.

Anomalias eritrocitárias	Causas	Anomalias eritrocitárias	Causas
 Normal	-	 Microesferócito	Esferocitose hereditária, anemia hemolítica autoimune, septicemia
 Macrócito	Hepatopatia, alcoolismo Oval na anemia megaloblástica	 Fragmentos	CIVD, microangiopatia, síndrome hemolítico-urêmica, PTT, queimaduras, válvulas cardíacas
 Células em alvo	Deficiência de ferro, hepatopatia, hemoglobinopatia, pós-esplenectomia	 Eliptócito	Eliptocitose hereditária
 Estomatócito	Hepatopatia, alcoolismo	 Pecilócito em lágrima	Mielofibrose, hematopoese extramedular
 Célula em lápis	Deficiência de ferro	 Célula em cesto	Dano oxidante (p. ex., deficiência de G6PD, hemoglobina instável)
 Equinócito	Hepatopatia, pós-esplenectomia Artefato de conservação	 Célula falciforme	Anemia de células falciformes
 Acantócito	Hepatopatia, abetalipoproteinemia, insuficiência renal	 Micrócito	Deficiência de ferro, hemoglobinopatia

**Figura 7** - Diagnóstico laboratorial – Morfologia e inclusões nos eritrócitos.  
(Fonte: A.V.Hoffbrand / P.A.H. Moss)

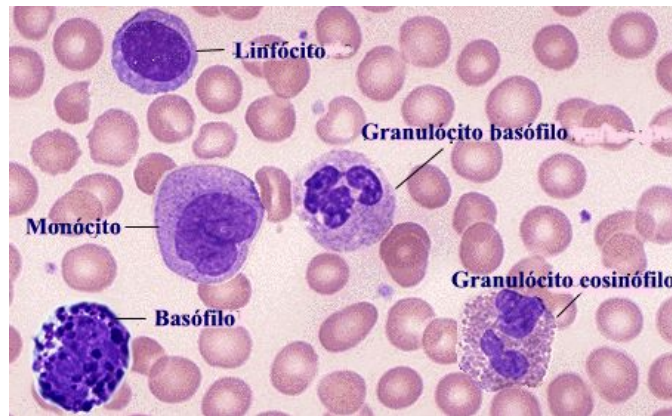
A técnica do esfregaço sanguíneo deve ser realizada dentro de duas horas após a colheita, se efetuada posteriormente poderá ocorrer um efeito do anticoagulante sobre os leucócitos levando a um inchamento nuclear com falso aumento do número de neutrófilos não segmentados, vascularização citoplasmática e a presença de alguns artefactos.

Uma boa aplicação da técnica de um esfregaço sanguíneo, permite obter 3 áreas de diferentes espessuras que refletem uma distribuição distinta de células sanguíneas.



**Figura 8** - Técnica de execução de ESP e distribuição das células no esfregaço.  
(Fonte: <http://www.ufrgs.br/lacvet/esfregaco.htm>)

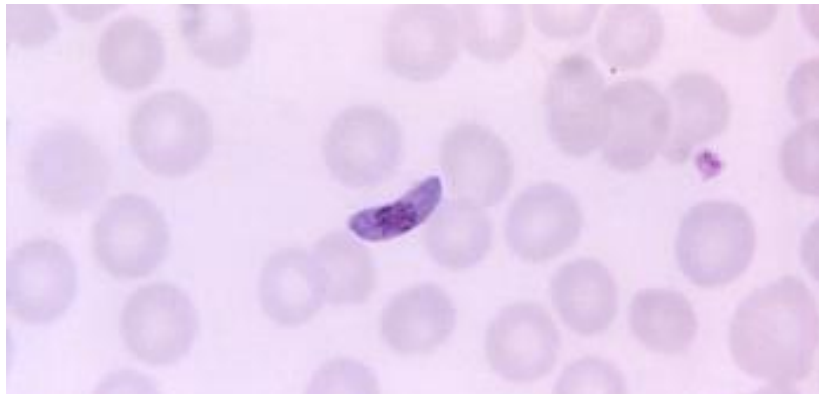
No laboratório a coloração dos esfregaços de sangue total é efetuado de modo automático com o equipamento HEMA-TEK. É uma coloração baseada no grupo de corantes tipo Romanowsky, o corante utilizado é uma combinação do corante Wright com o corante Giemsa, estes corantes são constituídos essencialmente por uma mistura de azul de metileno (corante básico) e eosina (corante ácido). Nos núcleos celulares (nucléolos) e no citoplasma (ribossomas) ficam corados com cores básicas, em tom de azul enquanto a hemoglobina fica corado com cores ácidas, em tom rosa. A diferente afinidade de certas granulações citoplasmáticas pelos corantes permite classificar os leucócitos polimorfonucleares em três grupos: Granulócitos eosinófilos que fixam o corante ácido, os granulócitos basófilos que fixam o corante básico e os granulócitos neutrófilos que fixam ambos os corantes. A mesma coloração é feita para pesquisa de eosinófilos em exsudado nasal.



**Figura 9** - Células sanguíneas no ESP.

Fonte: <http://soumaisenem.com.br/biologia/programa-de-saude/imunologia-conceitos-basicos>

O esfregaço sanguíneo além do estudo morfológico das células sanguíneas permite a pesquisa de hemoparasitas.



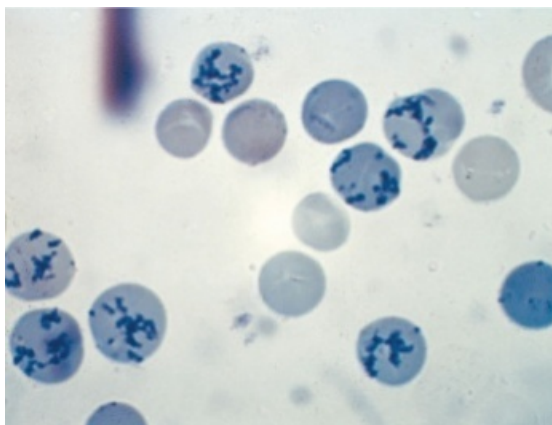
**Figura 10** - Identificação do gametócito do *Plasmodium falciparum* no ESP.  
(Fonte: [www.medicinanet.com](http://www.medicinanet.com))

### 3.1.6 Reticulócitos

Os reticulócitos são eritrócitos não nucleados, recém libertados pela medula óssea e que ainda contêm RNA ribossômico, apresentam citoplasma policromatófilo e com capacidade de sintetizar hemoglobina. Após entrarem na circulação perdem o seu RNA durante um período de 24h a 36h, pelo que a contagem de reticulócitos avalia a taxa efetiva da produção de eritrócitos, o seu estudo permite distinguir se estamos na presença de uma anemia regenerativa, para um número de reticulócitos  $> 100 \times 10^9/L$ , de uma anemia hiporegenerativa/arregenerativa para um número de reticulócitos  $< 50 \times 10^9/L$ .

A contagem dos reticulócitos no laboratório é efetuada pela coloração supravital, com o corante azul cresil brilhante e em amostras de sangue total em EDTA K<sub>3</sub>. O RNA ribossômico quando exposto ao azul cresil brilhante, forma um complexo que precipita e microscopicamente observamos um reticulo azul escuro (BAIN, 2007).

O resultado é expresso em percentual ou em reticulócitos por  $\mu\text{L}$ . Valores de referência: 0,5% – 2,7% ou 25.000/ $\mu\text{L}$  -75.000/ $\mu\text{L}$ .



**Figura 11** – Reticulócitos.  
(Fonte: bolihematologia)

### **3.2 Patologias associadas à Linhagem Eritróide**

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define anemia como uma redução da concentração de hemoglobina no sangue periférico, em função da idade e do sexo. Considera anemia nos adultos do sexo masculino quando a concentração de hemoglobina é inferior a 13,0 g/dL e nos adultos do sexo feminino quando a concentração de hemoglobina é inferior a 12,0 g/dL. (FAUCI,2008).

Para alguns hematologistas a anemia está presente se a concentração de hemoglobina e do hematócrito é inferior ao limite inferior do intervalo de referência tendo em conta a idade, sexo, etnia e localização geográfica (altitude).

Fisiologicamente as anemias podem ser classificadas:

- Anemia regenerativa, caracteriza-se por uma intensa regeneração eritroblástica medular para compensar a diminuição da concentração de hemoglobina, em que a concentração de reticulócitos  $> 100 \times 10^9/\text{L}$ . Pode ser devido a duas causas principais: hemorragia e hemólise.

- Anemia arregenerativa/Anemia hiporregenerativa, caracteriza-se pela incapacidade medular de compensar a diminuição da concentração de hemoglobina através do aumento da eritropoiese, sendo a concentração de reticulócitos  $< 50 \times 10^9/L$ . Pode ser devido anemia aplástica, a alterações na maturação eritroblástica por deficiência de certos fatores tais como: ferro, vitamina  $B_{12}$ , ácido fólico.

### 3.2.1 Classificação Morfológica da Anemia

A nível laboratorial a anemia é definida pela classificação morfológica, a partir do valor do parâmetro VCM, em anemia Microcítica/Hipocrómica, anemia Normocítica/Normocrómica e anemia Macroscítica.

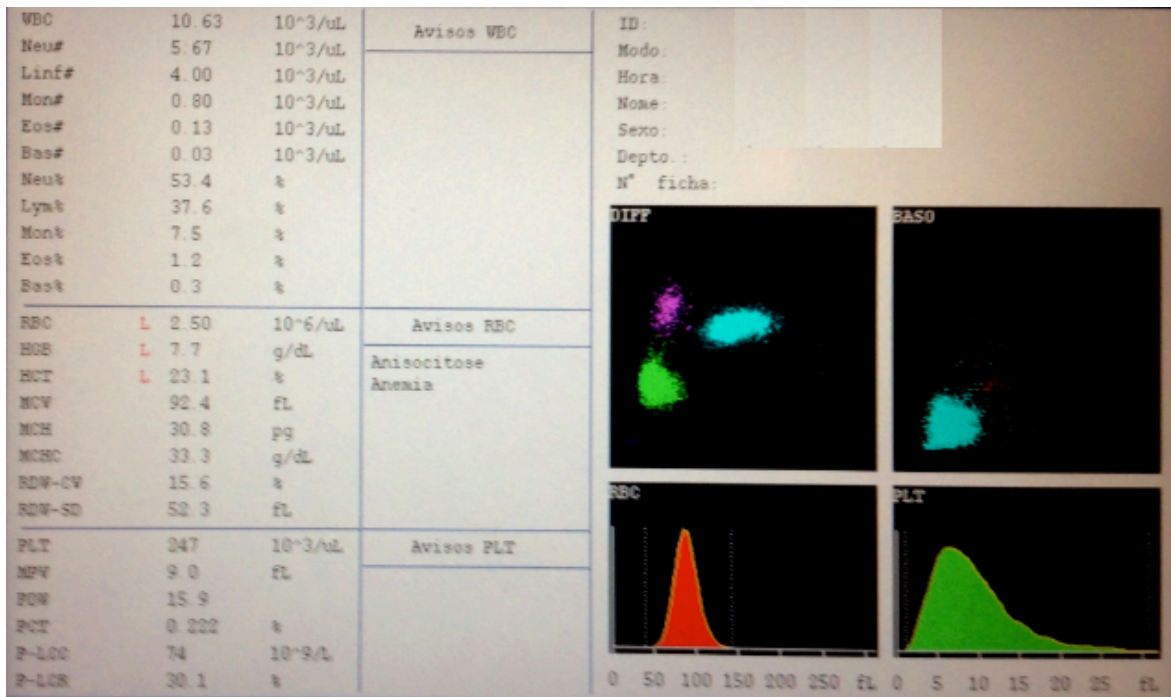
**Tabela 3** - Classificação Morfológica.

<b>Microcítica, hipocrómica</b>	<b>Normocítica, normocrómica</b>	<b>Macroscítica</b>
VCM $< 80$ fl HCM $< 27$ pg	VCM = 80-95 fl HCM $> 27$ pg	VCM $> 95$ fl
Deficiência de ferro	Nefropatias	<b>Anemia megaloblástica:</b> Déficit de vitamina $B_{12}$ e folato
Talassemias	Deficiências mistas	<b>Anemia não megaloblástica:</b> Consumo de álcool Hepatopatia Mielodisplasia Anemia aplástica
Anemia de doença crónica	Algumas anemias hemolíticas	
Por intoxicação por chumbo	Hemorragia aguda	
Anemia sideroblástica Congénita	Insuficiência da medula óssea (por.ex: pós- quimioterapia)	
Porfiria	Anemia de doença crónica	

(Fonte: adaptado A.V.Hoffbrand / P.A.H. Moss)

- Caso clínico de possível anemia doença crónica.

Um homem de 80 anos apresentava palidez cutânea, cansaço com mobilidade reduzida. O clínico prescreveu o hemograma completo, VSG e análises bioquímicas tais como: ferro sérico, transferrina, capacidade total da fixação do ferro e ferritina.

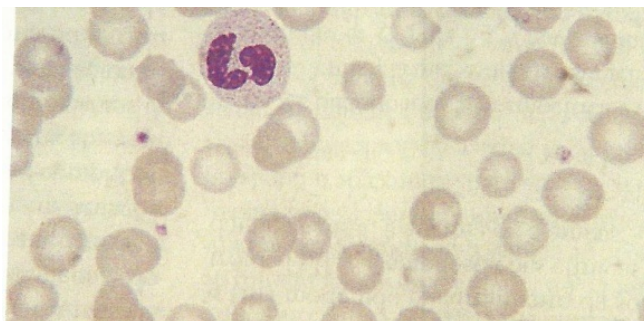


**Figura 12** - Hemograma e histograma do utente de 80 anos.

**Tabela 4** - Resultados laboratoriais das análises prescritas.

Análises	Resultado/Unidades	Valores de referência
Ferro	56 $\mu\text{g/dL}$	65-175
Ferritina	413.20 ng/mL	22.00- 322.00
Transferrina	112 mg/dL	202-364
TIBC	142 $\mu\text{g/dL}$	256-462

Na observação do esfregaço sanguíneo observa-se, anisocitose moderada, poiquilocitose e hipocromia.



**Figura 13** - Esfregaço sanguíneo de doente com anemia por doença crónica.  
(Fonte: Células Sanguíneas – Um Guia Prático/Barbara Bain)



Ao analisar o eritrograma verifica-se a existência de uma anemia normocrômica/normocítica, com uma concentração de hemoglobina baixa e RDW ligeiramente aumentado, indicativo de anisocitose. Quanto aos parâmetros de bioquímica: ferro sérico, ferritina, transferrina e TIBC estão diminuídos. A ferritina sérica está aumentada devido à síntese de apoferritina pelas células inflamatórias ou neoplásicas, caracterizando uma anemia da doença crônica, além de que a velocidade de sedimentação está elevada: VS= 124 mm (1º hora), Valores de referência: N <10mm.

- Caso clínico de possível anemia ferropênica

Mulher de 49 anos, apresentava palidez e queixava-se de cansaço. O clínico prescreveu hemograma completo, ferro, ferritina sérica.

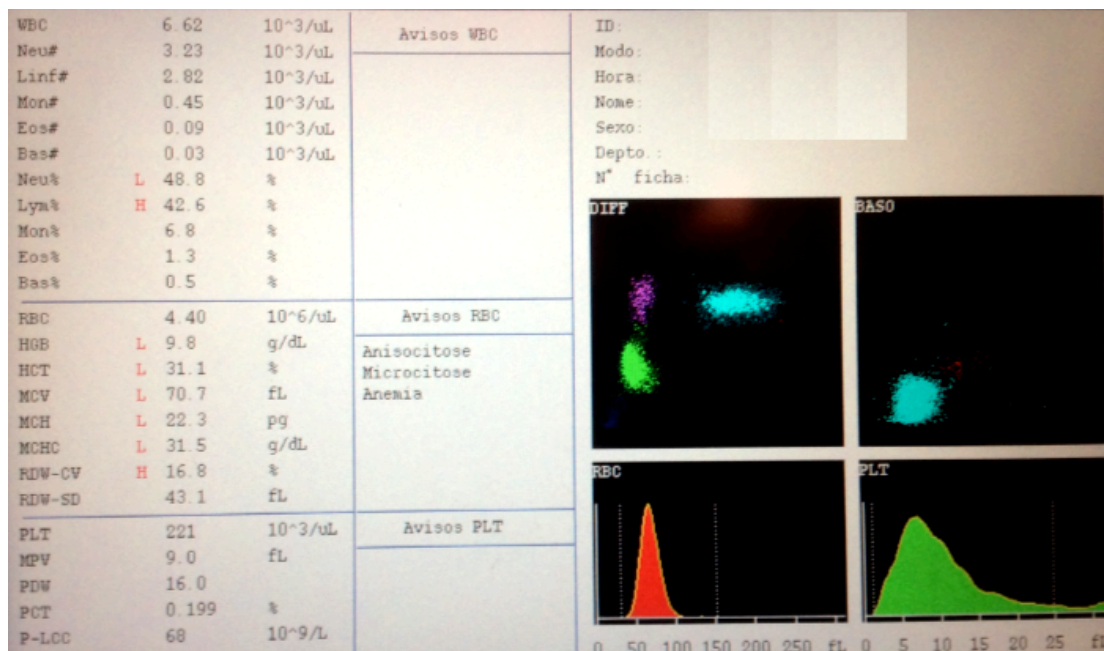


Figura 14 - Hemograma e histograma da utente de 49 anos.

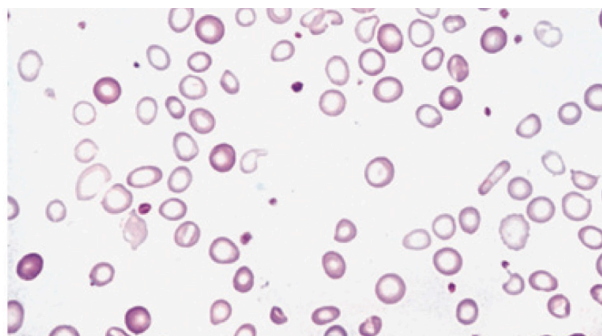
Tabela 5 - Resultados laboratoriais das análises prescritas.

Análises	Resultado/Unidades	Valores de referência
Ferro	27 µg /dL	50 - 170
Ferritina	2.40 ng/mL	10.00 - 291.00

Ao analisar o hemograma a primeira evidência de deficiência de ferro é o aumento de RDW, indicativo da anisocitose que precede a anemia, seguida de uma diminuição do parâmetro da Hb e dos parâmetros do VGM e HGM, que caracterizam uma anemia hipocrômica e microcítica. A deficiência de ferro é a principal causa de anemia no mundo e a principal causa de anemia hipocrômica e microcítica.



No estudo do esfregaço sanguíneo observaram-se eritrócitos microcíticos, hipocrômicos, poiquilocitose com a existência de células em lápis e anisocitose.



**Figura 15** - Esfregaço sanguíneo.  
(Fonte: Fundamentos em hematologia/ A.V.Hoffbrand)

### 3.2.2 Anemias Hemolíticas

As anemias hemolíticas resultam de uma destruição aumentada de eritrócitos. São classificadas em anemias hereditárias que resultam de defeitos “intrínsecos” dos eritrócitos e em anemias adquiridas que em geral se originam de alterações “extracorpúscular” ou ambiental.

**Tabela 6** - Anemias Hemolíticas – Classificação.

<b>Hereditárias</b>	<b>Adquiridas</b>
Membrana	Imune
Esferocitose hereditária Eliptocitose hereditária	Autoimune Autoimune
Metabolismo	Síndrome de fragmentação do GV
Defice G6PD Defice PK	Hemólise cardíaca Malformações AV Microangiopática
Hemoglobina	Hemoglobinúria da marcha
HbS HbC Talassemias	Infeções Agentes químicos e físicos Secundária

(Fonte: adaptado A.V.Hoffbrand / P.A.H. Moss)

### 3.3 Estudo de Hemoglobinopatias

Definem-se hemoglobinopatias sendo anomalias hereditárias da síntese das cadeias globínicas da hemoglobina. (BAIN,2007).

A hemoglobina é um tetrâmero constituída por 2 pares de cadeias polipeptídicas (globinas),  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta),  $\delta$  (delta) e /ou  $\gamma$  (gama), que entre si estão ligadas por ligações não covalentes, e por quatro grupos “heme” ligados covalentemente a cada cadeia, o grupo

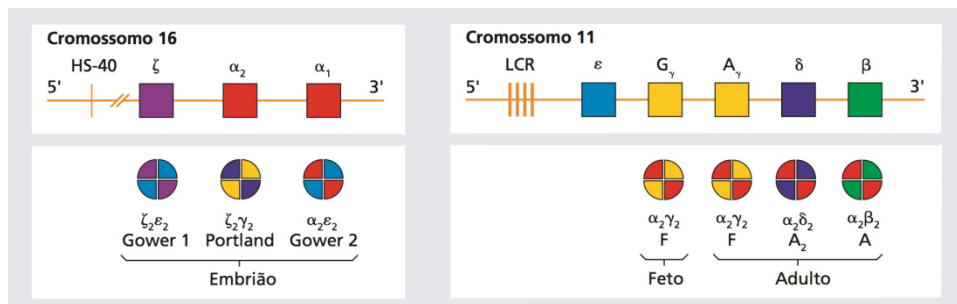
heme é o componente não proteico da hemoglobina. A combinação destas cadeias entre si dá origem a diversas formas moleculares normais de hemoglobina. No adulto existem três tipos de hemoglobinas fisiológicas:

- Hemoglobina A ( $\alpha_2 \beta_2$ ), sendo os valores normais de 97%;
- Hemoglobina A<sub>2</sub> ( $\alpha_2 \delta_2$ ), sendo os valores normais de 2-3%;
- Hemoglobina F ( $\alpha_2 \gamma_2$ ), sendo os valores normais <1%.

No feto a hemoglobina dominante é a Hb F, que vai diminuindo gradualmente ao longo do primeiro ano de vida.

As hemoglobinas humanas são codificadas em dois grupos de genes estreitamente ligados; os genes da globina  $\alpha$  estão agrupados no cromossoma 16, enquanto os genes  $\beta$  residem no cromossoma 11 (Hoffbrand, 2013).

Os indivíduos normais herdam 2 genes para a cadeia  $\beta$  e 4 genes para a cadeia  $\alpha$  e  $\gamma$ .



**Figura 16** - Representação esquemática da constituição dos cromossomas.  
(Fonte: A.V.Hoffbrand / P.A.H. Moss)

Na classificação das hemoglobinopatias estão referenciadas:

- Hemoglobinopatias estruturais que são hemoglobinas com sequências de aminoácidos alteradas, modificando as suas propriedades físicas e químicas:
  - Polimerização anormal da hemoglobina – HbS (Afoiçamento dos eritrócitos - anemia falciforme);
  - Alteração da afinidade pelo oxigénio;
  - Hemoglobinas instáveis quando a substituição dos aminoácidos reduzem a solubilidade ou aumentam a suscetibilidade à oxidação provocando a precipitação e formação de corpúsculos, ex: corpúsculos de Heinz.
- Talassemias que ocorrem por defeito na biossíntese das cadeias globínicas.

- Variantes talassémicas da hemoglobina que se caracterizam-se por hemoglobina ter estrutura anormal associada a fenótipo talassémico co-hereditário:
  - Hemoglobina E;
  - Hemoglobina Lepore.
- Persistência hereditária da hemoglobina fetal.
- Hemoglobinopatias Adquiridas:
  - Alteração da estrutura e função da hemoglobina no transporte de oxigénio (Metahemoglobina, decorrente de exposições tóxicas, carboxihemoglobina);
  - Diminuição da síntese de cadeias globínicas em doentes com mielodisplasia, distúrbios mieloproliferativos pode observar-se a doença de Hb H adquirida (FAUCI,2008).

### 3.3.1 Talassemias

As síndromes talassémicas surgem de mutações que comprometem a produção ou a tradução do mRNA da globina, resultando em biossíntese deficiente das cadeias de globina; quando ocorre ao nível do cromossoma 16, existe a diminuição de síntese da cadeia  $\alpha$  causando a  $\alpha$  talassemia, ao nível do cromossoma 11 leva a uma redução de síntese da cadeia  $\beta$  causando  $\beta$ -talassemia (FAUCI, 2008).

Na  $\beta$ -talassemia verifica-se uma diminuição da hemoglobina  $A_1$  e uma tentativa de compensação fisiológica, com maior produção das outras cadeias não  $\alpha$ , ocorrendo um aumento da Hemoglobina  $A_2$  e Hemoglobina F. (RIBEIRO, 2015).

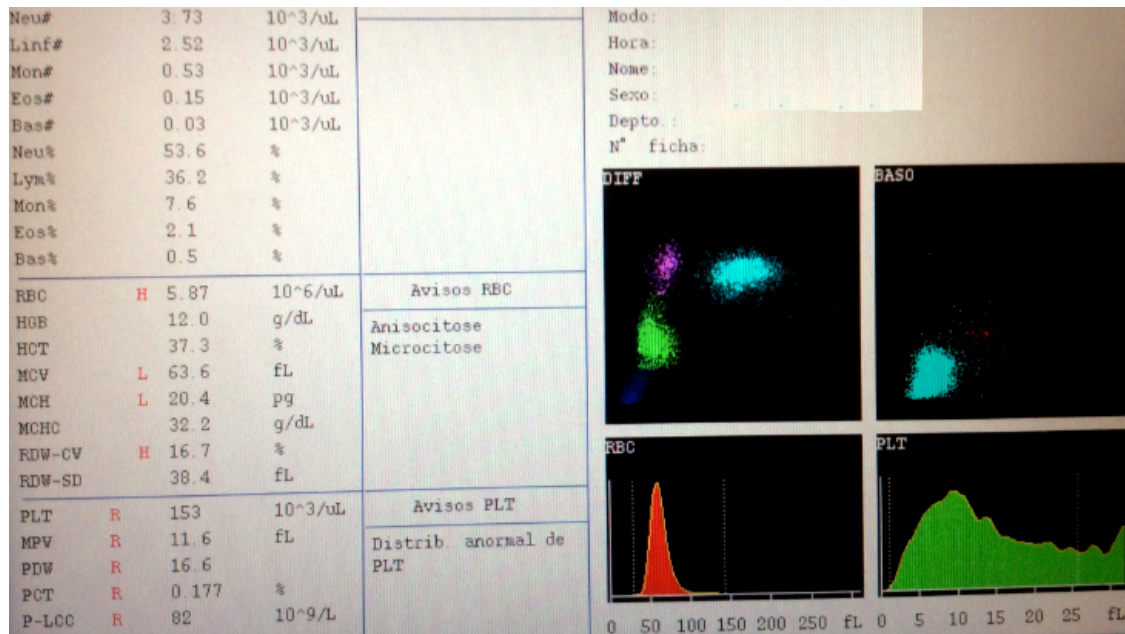
Na  $\beta$ - talassemia minor ocorre heterozigotia, anemia ligeira, hipocrómica e microcítica Hb  $A_2$  elevada (>3,5%).

Na  $\beta$ - talassemia intermédia ocorre homozigotia ou dupla heterozigotia ( $\beta^+/\beta^+$ ), anemia moderada, hipocrómica e microcítica, esplenomegália, Hb  $A_2$  >3,5% e HbF 10-60%.

Na  $\beta$ -talassemia major ocorre ausência de síntese de cadeias ( $\beta^0/\beta^0$ ), anemia severa, dependente de transfusões desde o 1º ano de vida, hepatoesplenomegália, não há Hb A; Hb F elevada.

- Caso clínico de uma provável  $\beta$ -talassemia menor

Uma mulher com 44 anos fez análises por motivos de cansaço. As análises requeridas pelo clínico foram hemograma completo, ferro sérico, ferritina, transferrina e capacidade de fixação do ferro (TIBC).



**Figura 17-** Hemograma e histograma da utente de 44 anos.

No hemograma observa-se uma microcitose acentuada, hipocromia e anisocitose. O número de eritrócitos é elevado. A hiperplasia eritroide compensatória leva a produção de grande número de eritrócitos com tamanho e conteúdo hemoglobínico reduzido. A maioria dos indivíduos com  $\beta$ -talassemia menor têm uma concentração de hemoglobina dentro dos limites mínimos dos valores de referência.

**Tabela 7 -** Os resultados laboratoriais de análises da cinética do ferro.

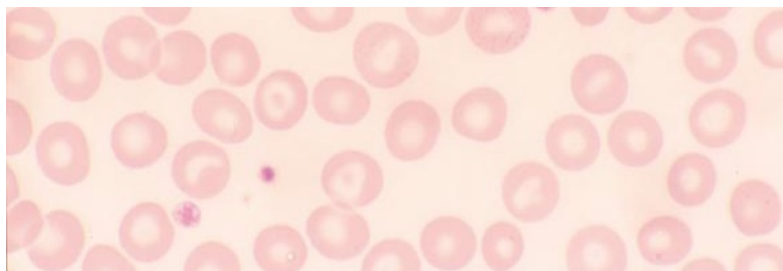
Análises	Resultado/Unidades	Valores de referência
Ferro	152 $\mu\text{g}$ /dL	50 - 170
Ferritina	129.30 ng/mL	0.00 - 291.00
Transferrina	293 mg/dL	202 - 364
TIBC	372 $\mu\text{g}$ /dL	256 - 462

Perante estes resultados, o clínico solicitou a análise eletroforética.

Na eletroforese da hemoglobina, pelo método HPLC, revelou uma intensificação da banda correspondente à zona de migração de HbA<sub>2</sub>.

HbA<sub>2</sub> = 5.3 (valores de referência < 3.7)

No ESP observou-se anisocitose, e poiquilocitose com células em alvo, eritrócitos microcíticos e hipocrômicos e pontuações basófilas.



**Figura 18** - Esfregaço sanguíneo.  
(Fonte: Pdq Hematology)

Os resultados laboratoriais são compatíveis com o fenótipo de portador de  $\beta$ -talassemia minor.

A detecção de uma  $\beta$ - talassemia minor é um problema de saúde pública e de planejamento familiar, obrigando à sua pesquisa em todos os familiares; a probabilidade de um casamento entre dois progenitores é significativa e, nesse caso existe em cada gravidez um risco de 25% de a criança ter a  $\beta$ -talassemia major. Enquanto a  $\beta$ -talassemia minor é uma situação assintomática, a  $\beta$ -talassemia major é considerada uma situação grave pois não há praticamente a síntese de HbA<sub>1</sub>, que é fisiologicamente a mais importante.

### **3.4 Patologias associadas à Linhagem Linfóide e Mielóide**

As alterações adquiridas que afetam principalmente os leucócitos podem ser reacionais a doenças não hematológicas, ou podem ser neoplásicas. As neoplasias das células linfóides e mielóide, originam-se devido a alterações no crescimento a diferenciação hematopoiética normal e alterações genéticas na célula hematopoiética precursora, por perda de genes supressores tumorais e/ou mutação de oncogenes, resultando em uma ampla variedade de tumores do tecido hematopoético e linfóide.

### 3.4.1 Alterações Quantitativas das Células Sanguíneas

A leucocitose é um aumento de leucócitos na corrente sanguínea, que normalmente resulta de aumento de neutrófilos (neutrofilia) mas poderá ocorrer por aumento de linfócitos (linfocitose) ou mesmo um aumento de eosinófilos (eosinofilia). A leucopenia define-se como uma diminuição de leucócitos, o indicador mais comum é a diminuição de neutrófilos (neutropenia) em alguns casos ocorre devido a diminuição de linfócitos (linfopenia). A contagem global dos leucócitos e a contagem diferencial fornecem dados valiosos ao clínico tanto no diagnóstico como na monitorização terapêutica.

**Tabela 8** - Alterações do número de leucócitos, as suas possíveis causas e/ou a patologia que poderá estar associada.

População	Alterações Numericas	Algumas Causas
<b>Neutrófilos</b>	Neutrofilia	Inflamação e necrose tecidual, doenças metabólicas, neoplasias de todos os tipos, infeções bacterianas, hemorragias ou hemólise agudas, fármacos: corticosteroides, lítio, tetraciclina, tratamento com fatores mieloides de crescimento (por ex. G-CSF).
	Neutropenia	Congénita: S.Kostmann (AR), neutropenia cíclica, neutropenia crónica benigna, neutropenia crónica grave idiopática. Adquirida: induzida por fármacos (AINE, ADO); imune: AI, LES, hipersensibilidade ou anafilaxia; infeção viral e bacteriana. Benigna: racial ou familiar.
<b>Eosinófilos</b>	Eosinofilia	Doenças alérgicas, doenças parasitárias, doenças cutâneas, hipersensibilidade a fármacos, síndrome hipereosinófila, Linfoma Hodgkin e outros tumores sobretudo com clonalidade T, poliarterite nodosa, vasculite.
	Eosinopenia	Infeções agudas, inflamações agudas, S.de Cushing, induzida por drogas tais como: corticosteroides, ACTH, histamina.
<b>Basófilos</b>	Basofilia	Doença endócrina (hipotireoidismo), infeções (varicela, varíola, sinusite crónica), urticária, LMC, outros síndromes mieloproliferativos, colite ulcerosa, carcinoma pulmonar.
	Basopenia	Doença endócrina (hipertireoidismo), administração de ACTH, reações alérgicas agudas.
<b>Linfócitos</b>	Linfocitose	Infeções Agudas: inf. Virusais (EBV, CMV, Hepatite infecciosa, Rubéola, HIV); herpes-simples ou zóster, Bordetella pertussis. Infeções Crónicas: tuberculose, toxoplasmose, brucelose e sífilis.
	Linfopenia	Falência medular grave, terapêutica imunossupressora, linfoma de Hodgkin, radioterapia, imunodeficiência: HIV.
	Monocitose	Infeções: virusais, sífilis, brucelose, malária, tripanossomíase. Neutropenia crónica, Doença de Hodgkin, leucemias agudas e crónicas: LMA, LMC, LMMC, tratamento com fatores de crescimento – GM – ou M-CSF.
	Monocitopenia	A administração de corticosteroides, no dano pulmonar agudo, anemia aplásica, LLC, leucemia das células cabeludas, radioterapia.

(Fonte: Adaptado BAIN, Barbara J e A.V.Hoffbrand / P.A.H. Moss )

### 3.4.2 Leucemias

As leucemias são classificadas em quatro tipos: leucemias agudas e crônicas, que por sua vez, se subdividem em linfóides ou mielóides:

- Leucemia Mielóide Aguda (LMA);
- Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA);
- Leucemia Mielóide Crônica (LMC);
- Leucemia Linfocítica Crônica (LLC).

As leucemias agudas são um grupo de alterações malignas caracterizado pela acumulação de blastos ou células hematopoiéticas imaturas na medula óssea (>20%), são doenças mais agressivas. Nas leucemias crônicas verifica-se uma predominância de células maduras e geralmente têm uma progressão mais lenta da doença.

A leucemia mielóide aguda é um grupo de doenças caracterizadas pela proliferação e acumulação de células hemapoiéticas imaturas, da linha mielóide na medula óssea e sangue periférico.

Segundo OMS para se considerar o diagnóstico da leucemia mielóide aguda os blastos (células hematopoiéticas precursoras) devem corresponder a mais de 20% na contagem diferencial de 200 células no sangue periférico ou 500 células na medula óssea.

Na prática clínica do laboratório a classificação das leucemias que serve de referência é a adotada pelo grupo franco-americano-britânico (FAB) que é baseada em parâmetros morfológicos observados no sangue periférico e na medula óssea.

**Tabela 9** - Classificação LMA e LLA (FAB).

<b>Leucemia Mielóide Aguda</b>
M0 - LMA minimamente diferenciada
M1 - LMA sem maturação
M2 - LMA com maturação
M2v - LMA com maturação variante
M3 - Leucemia Promielocítica Aguda hipergranular
M3v - Leucemia Promielocítica Aguda variante hipogranular
M4 - Leucemia Mielomonocítica Aguda
M4v - Leucemia Mielomonocítica Aguda variante eosinofílica
M5a - Leucemia Monocítica Aguda sem maturação
M5b - Leucemia Monocítica Aguda com maturação
M6 - Leucemia Eritróide Aguda
M7 - Leucemia Megacariocítica Aguda

<b>Leucemia Linfoblástica Aguda</b>
L1 - com blastos pequenos, uniformes, relação núcleo-citoplasma alta
L2 - com blastos maiores, heterogêneos, relação núcleo-citoplasma mais baixa
L3 - com blastos vacuolizados, citoplasma basófilo

**Tabela 10** - Classificação de Leucemias Mielóides Crônicas.

Leucemia Mielóide Crônica (LMC)
Leucemia Mielóide Crônica, Ph positiva
Leucemia Mielóide Crônica, Ph negativa
Leucemia Mielóide Crônica juvenil
Leucemia Neutrofílica Crônica
Leucemia Eosinofílica
Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC)

**Tabela 11** - Classificação das Leucemias Linfocíticas Crônicas.

<b>Celulas B</b>	<b>Celulas T</b>
Leucemia Linfocítica Crônica das células B (LLC-B, LLC)	Leucemia Linfocítica granular grande
Leucemia Prolinfocítica Crônica das células B (LPL-B)	Leucemia Prolinfocítica das células T (LPL-T)
Leucemia das Células Pilosas (LCP)	
Leucemia dos Plasmócitos	



Actualmente a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), para os tumores dos tecidos hematopoiético e linfóide, 4ª edição de 2008, é que se encontra em vigor. Inclui diferentes grupos biologicamente distintos com base no imunofenótipo bem como nas manifestações clínicas e alterações moleculares, citogenéticas e morfológicas.

**Tabela 12** - Classificação da LMA (OMS).

<p><i>Leucemia mieloide aguda com anormalidades recorrentes</i>  LMA com t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>  LMA com inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;6)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>  LMA com t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>  Entidade provisória: LMA com <i>NPM1</i> mutado  Entidade provisória: LMA com <i>CEBPA</i> mutado</p>
<p><i>Leucemia mieloide aguda com alterações relacionadas à mielodisplasia</i></p>
<p><i>Neoplasias mieloides (t-LMA) relacionadas à terapia</i></p>
<p><i>Leucemia mieloide aguda (não especificadas separadamente)</i>  LMA com diferenciação mínima  LMA sem diferenciação  LMA com maturação  Leucemia mielomonocítica aguda  Leucemia monoblástica/monocítica aguda  Leucemia eritroide aguda  Leucemia megacarioblástica aguda  Leucemia basofílica aguda  Panmielose aguda com mielofibrose</p>
<p><i>Sarcoma mieloide</i></p>
<p><i>Proliferações mieloides relacionadas à síndrome de Down</i>  Mielopoese anormal transitória  Leucemia mieloide associada à síndrome de Down</p>

(Fonte: A.V.Hoffbrand / P.A.H. Moss – Fundamentos em hematologia)

**Tabela 13** - Classificação da LLA (OMS).

**Neoplasias de precursores *linfoides***

*Leucemia/linfoma linfoblástico B*

Leucemia/linfoma linfoblástico B, NES

Leucemia/linfoma linfoblástico B com  
anormalidades genéticas recorrentes

Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(9; 22)(q34;  
q11.2); *BCR-ABL1*

Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(v; 11q23);  
*MLL* rearranjado

Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(12; 21)  
(p13; q22); *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)*

Leucemia/linfoma linfoblástico B com  
hiperdiploidia

Leucemia/linfoma linfoblástico B com hipodiploidia  
(LLA hipodiploide)

*Leucemia/linfoma linfoblástico T*

(Fonte: A.V.Hoffbrand / P.A.H. Moss – Fundamentos em hematologia)

### 3.5 Hemostase

A coagulação do sangue envolve um sistema biológico de amplificação, segundo o conceito do modelo celular da coagulação sanguínea. A via da coagulação do sangue é iniciada pelo fator tecidual (FT), ligado à membrana, exposto após lesão vascular e ativado por uma proteína enzimática dissulfeto-isomerase, com fator VIIa.

O funcionamento da cascata de coagulação necessita de uma concentração localizada de diferentes fatores de coagulação no local da lesão. A atividade dos fatores II, VII, IX e X depende da vitamina K, para a síntese e de  $\text{Ca}^{2+}$  para a ativação. Os fatores I, V, VIII interagem com a trombina e aumentam nos processos inflamatórios, durante a gravidez e no uso de contraceptivos orais.

**Tabela 14** - Fatores de coagulação.

Número do fator**	Nome descritivo	Forma ativa
I	Fibrinogênio	Subunidade de fibrina
II	Protrombina	Serina-protease
III	Fator tecidual	Receptor/cofator*
V	Fator lábil**	Cofator
VII	Proconvertina**	Serina-protease
VIII	Fator anti-hemofílico**	Cofator
IX	Fator Christmas**	Serina-protease
X	Fator Stuart-Prower**	Serina-protease
XI	Antecedente de tromboplastina plasmática**	Serina-protease
XII	Fator Hageman (contato)	Serina-protease
XIII	Fator estabilizador da fibrina Pré-caliceína (fator Fletcher) HMWK (fator Fitzgerald)	Transglutaminase Serina-protease Cofator*

HMWK, quininogênio de alto peso molecular.

(Fonte: A.V.Hoffbrand / P.A.H. Moss – Fundamentos em hematologia)

No laboratório a hemóstase primária é avaliada pela quantificação e morfologia das plaquetas pelo analisador BC-5800, como já foi descrito.

O Sysmex – série CA-540 é o aparelho automático utilizado para a determinação dos parâmetros: Tempo de Protrombina (PT) e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) para avaliação da hemóstase secundária.

### 3.5.1 Metodologia e Fundamentos do Equipamento Sysmex – série CA-540

Este aparelho utiliza o método de detecção foto-óptica de coágulos que consiste em determinar o tempo de coagulação medindo as variações da intensidade da luz dispersa.

A turvação que ocorre da formação do coágulo de fibrina é medida pelo aumento da intensidade de luz dispersa quando submetida a um comprimento de onda de 660nm (DACIE, 2012).



**Figura 19** - Analisador CA-540.  
(Fonte: Sysmex)

A luz dispersa é convertida em sinais elétricos. Um microprocessador controla estes sinais e estabelece uma correlação entre a intensidade da luz dispersa e o tempo decorrido até à coagulação estar concluída.

Para assegurar a integridade do sistema sempre que o lote de reagente muda, efetua-se uma curva de calibração. No CA 540 as especificações de cada curva já se encontra pré programado. O CQI utilizado Dade C<sub>1</sub>- Trol 1e 2e Control P. O programa de controlo de avaliação externa é SEHH.

### 3.5.2 Tempo de Protrombina

A determinação do tempo de protrombina (PT) pode orientar o clínico no diagnóstico de um utente com hemorragias espontâneas e na monitorização da terapia com anticoagulantes orais: os antagonistas da vitamina K (varfarina, por ex.) ou heparina de baixo peso molecular. É igualmente prescritas pelo clínico quando o utente vai ser sujeito a intervenções cirúrgicas ou a exames invasivos.

- Princípio do método. O tempo de protrombina é o tempo necessário para que ocorra a coagulação em plasma, colhido em citrato de cálcio, após a adição de uma concentração ótima de extrato tecidular com tromboplastina contendo cálcio. Avalia fundamentalmente a via extrínseca da coagulação (fatores V, VII e X), assim como a protrombina e fibrinogénio. Os valores de referência normais são entre 10s - 14s.

Devido a grande variabilidade dos resultados do tempo de protrombina já que depende da tromboplastina usada em cada laboratório, a OMS introduziu um novo parâmetro a Razão Normalizada Internacional (INR) para padronizar o controlo do tratamento com anticoagulantes orais.

O valor do INR, no equipamento CA-540, é calculado em função da razão de PT, elevado ao índice de sensibilidade internacional (ISI) que é determinado por cada fabricante do reagente tromboplastina comparando com a tromboplastina padrão (OMS).

$$\text{A razão PT} = \frac{t}{\text{Valor normal de PT}}$$

t = tempo real de coagulação da amostra de PT

Valor normal de PT = valor normal de PT para a população de utentes do laboratório.,

INR = (razão de PT)<sup>ISI</sup>

**Tabela 15** - Testes de controlo de anticoagulantes orais. Recomendados pela *British Society Hematology*.

<b>INR- alvo</b>	<b>Situação Clínica</b>
2.5 (2-3)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tratamento de trombose venosa profunda, fibrilação Auricular, trombofilia hereditária sintomática, miocardiopatia.</li></ul>
3,0 (2.5-3.5)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tratamento de trombose venose profunda sob varfarina,</li><li>• Próteses mecânicas de válvulas cardíacas, síndrome</li><li>• antifosfolipídico (alguns casos).</li></ul>

Como desenvolvimento de anticoagulantes orais diretos (AOD) emergiu uma opção que possibilita eficácia e segurança na terapêutica de tromboembolismo venoso. Estes fármacos, inibidores de um fator específico de coagulação (por ex. o dabigatrano atua sobre a trombina, o rivaroxano atua sobre o fator Xa) sem efeito direto na agregação plaquetar e em outras serinas proteases (MANSILLA, 2015).

Atualmente, em algumas situações clínicas, os anticoagulantes antagonistas da vitamina K estão a ser substituídos pelos anticoagulantes orais diretos já que estes têm poucas interações medicamentosas (farmacologicamente previsíveis), sem restrições alimentares e não necessitam de monitorização, na determinação do tempo de protrombina. Deve avaliar-se a função renal pela determinação da clearance de creatinina.

### **3.5.3 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa)**

A determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) pode orientar o clínico para detetar deficiências congénitas ou adquiridas de fatores das vias intrínseca e comum, para monitorizar o tratamento com heparina clássica e na pesquisa de anticoagulante lúpico.

- Princípio do método. Mede o tempo de coagulação do plasma citratado, após adição de um reagente ativador dos fatores de contato, com um reagente fosfolípido aniónico e a incorporação de iões cálcio (solução de cloreto de cálcio). Avalia os fatores VIII, IX, XI e XII, além dos fatores X, V, protrombina e fibrinogénio. Os resultados são expressos em segundos, os valores de referência variam entre 23 a 35 segundos (KERN,2002).

O aumento do tempo de tromboplastina parcial pode ocorrer em situações tais como:

- Insuficiência hepática;
- Terapêutica com anticoagulantes orais (ex: heparina);
- Deficiência de vitamina K;

- Presença de anticoagulante lúpico;
- Deficiência de fibrinogénio, F IIc, F V<sub>c</sub>, F X<sub>c</sub>;
- Coagulação intravascular disseminada (CID).

### 3.6 Velocidade de Sedimentação Globular (VSG)

A velocidade de sedimentação globular é um teste de rotina, apesar de ser um teste não específico, como marcador da resposta inflamatória. A *International Commmittee por Standardization in Haematology (ICSH)* recomenda o método de *Westergren* na prática clínica.

O valor de VSG depende do tamanho dos eritrócitos, da diferença de densidade entre os eritrócitos e o plasma, da temperatura e principalmente da concentração plasmática de proteínas como o fibrinogénio e as imunoglobulinas. Os níveis elevados de fibrinogénio e de alfa<sub>2</sub>, beta e gamaglobulinas favorecem uma VGS aumentada. Estas moléculas proteicas assimétricas provocam maiores alterações na carga da superfície dos eritrócitos (diminuição da carga negativa) que as outras proteínas existentes no plasma o que promove uma maior agregação. Existem numerosas situações patológicas com alterações proteicas do plasma com consequentes modificações na velocidade de sedimentação entre elas destacam-se, um provável, aumento de VSG nas infeções agudas, infeções reumáticas, neoplasias, gamopatias monoclonais, necrose tecidular e anemia. Nas situações fisiológicas o aumento ocorre principalmente na gravidez e no envelhecimento.

#### 3.6.1 Metodologia e fundamentos do equipamento VES-MATIC 30 Plus

No laboratório, a determinação da VSG é executado automaticamente, pelo analisador VES-MATIC 30 Plus, permite obter resultados, expressos em mm/h, que são equivalentes aos calculados usando o método de *Westergren* (1<sup>a</sup> hora) em 25 minutos e aos calculados usando o método de *Westergren* (2<sup>a</sup> hora) em 45 minutos.



**Figura 20** - Analisador VES-MATIC  
(Fonte: Diesse)

O sangue total colhido em tubos com anticoagulante citrato de sódio é cuidadosamente homogeneizado pelo equipamento. Posteriormente durante um período de tempo as amostras são deixadas a sedimentar, sendo a leitura do nível de sedimentação globular efetuada por sensores óptico-eletrónicos.

Os valores de referência para a primeira hora variam entre 1mm a 10mm para os homens e nas mulheres entre 1mm a 15mm.

Para monitorizar os valores de VSG o laboratório usa diariamente o sangue controlo ESR nível 1 e nível 2, como CQI, que permite a determinação da precisão e exatidão do equipamento e participa no Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ).





## CAPITULO 4. IMUNOLOGIA/ENDOCRINOLOGIA

A endocrinologia define-se como: “ Parte da Medicina que trata das glândulas de secreção interna e das suas hormonas, em particular dos pontos de vista fisiológico e patológico.” O termo “endócrino” significa a secreção interna de substâncias biologicamente ativas, as hormonas, que são libertadas para a corrente sanguínea para regularem funções do tecido alvo.

Nos últimos anos, a solicitação de exames laboratoriais para a avaliação e monitorização da função tiroideia tem aumentado significativamente, já que existe uma elevada prevalência da disfunção tiroideia e da patologia nodular da tiróide na população portuguesa. Segundo os dados do Observatório Europeu do Cancro (ECO) no ano de 2012, Portugal apresentou uma incidência anual (novos casos) de cancro da tiróide de 4.4 casos por 100,000 (6.4 no sexo feminino e 2.2 no sexo masculino por 100,000) e uma mortalidade de 0,5%.

Segundo Dr. Luís Raposo, médico endocrinologista e coordenador do Grupo de Estudo da Tiróide (GET) da Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo (SPDM), “As doenças associadas à Tiróide são cada vez mais frequentes, mas podem ser prevenidas ou facilmente tratadas quando diagnosticadas atempadamente. Estudos recentes conduzidos pelo Grupo de Estudo da Tiróide em grávidas e crianças em idade escolar vieram revelar uma insuficiência moderada dos níveis de iodo na população portuguesa, traduzindo um aporte inadequado de iodo na alimentação”.

O iodo ingerido liga-se às proteínas séricas, particularmente à albumina e a captação do iodo pela tiroide é extremamente importante para a síntese de hormonas tiroideias.

A Direção Geral de Saúde, consciente desta realidade tem vindo a elaborar normas de orientação clínica para avaliação e monitorização da função tiroideia, sobre o nódulo da tiróide e aporte de iodo em mulheres na preconceção, gravidez e amamentação.

#### 4.1 Diagnóstico Laboratorial da Função Tiroideia

A tiróide é uma glândula endócrina designada por glândula tiroideia, produz a Tri-iodotironina ( $T_3$ ) e a tiroxina ou tetra-iodotironina ( $T_4$ ). A produção das hormonas  $T_3$  e  $T_4$  é estimulada pela hormona tiro-estimulante ou tirotropina (TSH), produzida na adenohipófise pela estimulação da hormona libertadora da tirotropina (TRH). A ligação da hormona TSH aos recetores nas células foliculares estimula a produção da proteína tireoglobulina responsável pela síntese das hormonas tiroideias.

A tri-iodotironina e a tiroxina no sistema circulatório são transportadas por proteínas plasmáticas, 70-75% ligadas à proteína transportadora da tiroxina (TBG) e 20%-30% ligadas à albumina, a tri-iodotironina livre ( $FT_3$ ) e a tiroxina livre ( $FT_4$ ) são as frações livres metabolicamente ativas das hormonas que circulam na corrente sanguínea.

Existem situações que interferem nos doseamentos bioquímicos de  $T_3$  e  $T_4$ , como sejam a toma de anovulatórios (estrogénios) e a gravidez, que aumentando a globulina de transporte das hormonas tiroideias (TBG), simulam um hipertiroidismo analítico com  $T_3$  e  $T_4$  séricas elevadas. Deste modo é preferível avaliar a  $T_3$  e  $T_4$  livres para o diagnóstico.

Nas células medulares da tiróide, células parafoliculares ou células C é produzida a hormona Calcitonina. A Calcitonina elevada pode ser indicativo de carcinoma medular da tiróide.

Os distúrbios das funções tiroideias podem envolver um acréscimo da função que caracteriza o hipertiroidismo ou uma hipofunção que caracteriza o hipotiroidismo.

**Tabela 16** - Diagnóstico laboratorial de alguns tipos de hipertiroidismo e de hipotiroidismo.

		<b>TSH</b>	<b><math>T_4/ FT_4</math></b>	<b><math>T_3/FT_3</math></b>
Hipotiroidismo	Primário	↑	↓	↓
	Secundário	N ou ↓	↓	—
	Subclínico	N ou lig. ↑	N	N
Hipertiroidismo	Primário	↓	↑	↑
	Secundário	N ou ↑	↑	↑

## 4.2 Amostras em Imunologia/Endocrinologia

As instruções de colheita e manuseamento das amostras estão devidamente documentadas no manual de colheitas do laboratório.

As determinações das concentrações dos parâmetros imunológicos são preferencialmente efetuadas em soro, sendo as amostras colhidas para tubos de gel, contudo, existem determinações que podem ser efetuadas em amostra no plasma com EDTA K<sub>3</sub>. As amostras são centrifugadas a 3500/rpm durante quinze minutos. Após a centrifugação procede-se à observação das amostras, já que não podem conter fibrina nem apresentar bolhas, para minimizar as interferências no processo operativo.

## 4.3 Metodologia e Fundamentos do equipamento de ADVIA

O ADVIA Centaur CP é um aparelho de teste de imunoensaio destinado à determinação de diferentes anticorpos com recurso à técnica de quimioluminescência direta.



**Figura 21** - ADVIA Centaur CP Immunoassay System.  
(Fonte: Siemens)

**Tabela 17** - Análises efetuadas no equipamento ADVIA.

Equipamento	Análises
<b>ADVIA Centaur CP</b>	Anticorpos Anti -Tiroglobulina (Anti- TG) Anticorpos Anti- Peroxidase (Anti- TPO) Tri-iodotironina livre (FT <sub>3</sub> ), Tiroxina livre (FT <sub>4</sub> ), Tri-iodotironina (T <sub>3</sub> ), Tiroxina (T <sub>4</sub> ), Tirotropina (TSH) Antigénio de superfície da hepatite B (HBsAg) Anticorpos totais do antigénio nuclear da hepatite B (HBc Total) Anticorpos de I <sub>g</sub> G do vírus da hepatite C (HCV) HIV Ag /Ab Combo (CHIV) Hormona luteinizante (LH) Hormona progesterona (PRGE) Prolactina (PRL) Hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) Hormona estradiol (E <sub>2</sub> ) Hormona foliculoestimulante (FSH) Antigénio específico da próstata (PSA) CA 125 CA 19-9 Antigénio carcinoembrionico (CEA) Ferritina

### 4.3.1 Método da Quimioluminescência Direta

Em um imunoenensaio quimioluminescente, uma molécula quimioluminescente é utilizada como marcador indicador para detetar e quantificar as reações imunológicas.

O analisador, ADVIA Centaur CP, mede a quantidade de luz emitida durante a reação quimioluminescente desencadeada pela alteração de pH pela adição de um ácido e uma base no final da reação. A tecnologia de imunoenensaio utiliza o éster de acridínio, estrutura orgânica com 3 anéis facilmente oxidável, como um marcador direto da quimioluminescência, tem uma emissão rápida e intensa de luz, e partículas paramagnéticas como fase sólida, que são constituídas por cristais de óxido de ferro que são atraídos por um campo magnético. Este sistema aplica três métodos de reação dos ensaios:

- **Método Sandwich.** Anticorpos ligados a Ester de Acridínio (EA) adicionam-se à amostra, unindo-se ao antígeno que queremos quantificar, segue-se a adição das partículas paramagnéticas (PMP) unidas a anticorpos específicos e após incubação forma-se o complexo PMP-anticorpo com o complexo antígeno-anticorpo marcado com EA. Finalmente o ácido e a base são adicionados para iniciar a reação quimioluminescente. A concentração do parâmetro a determinar presente na amostra é diretamente proporcional à emissão de luz.
- **Método Competitivo - antígeno marcado.** O antígeno marcado com éster de acridínio compete com o antígeno da amostra para os mesmos locais de ligação ao anticorpo que está ligado covalentemente às partículas paramagnéticas. Após a incubação a mistura da reação é exposta a um campo magnético e o complexo com éster de acridínio não ligado é separado e retirado. O ácido e base são adicionados para iniciar a reação quimioluminescente. A concentração do parâmetro a determinar e a emissão de luz têm uma relação inversa.
- **Método Competitivo - anticorpo marcado.** Antígeno unido às partículas paramagnéticas competem com o antígeno da amostra para os mesmos locais de ligação no anticorpo marcado com éster de acridínio. Após incubação, a mistura da reação é exposta a um campo magnético e o complexo anticorpo- éster de acridínio não ligado é separado e retirado. A reação quimioluminescente é iniciada pela adição do ácido e da base. A concentração do parâmetro a determinar e a emissão de luz têm uma relação inversa.

Parâmetros determinados por este ensaio:

- Anticorpos anti-tiroglobulina (Ac. anti-TG). A determinação quantitativa de anticorpos anti-tiroglobulina no soro ou plasma com EDTA K<sub>3</sub>, é prescrita pelos clínicos como meio auxiliar de diagnóstico das de Hashimoto e de Graves, que são doenças auto- imunes que afetam a glândula tiroideia. Devido a heterogeneidade da tiroglobulina, os níveis de ac. anti-TG aumentam noutros estados de doença em doentes idosos e em doentes eutiroides, clinicamente normais. O resultado do ac anti- TG é expresso em UI/mL.
- Anticorpos anti-peroxidase (Ac. anti-TPO). A determinação quantitativa de ac. anti peroxidase no soro ou plasma com EDTA K<sub>3</sub>, é útil como meio auxiliar de diagnóstico de doentes com doença auto-imune da tiroide. A peroxidase da tiroide (TPO) é uma proteína glicosilada que se encontra igualmente nas células foliculares da tiroide. A TPO catalisa a iodização dos grupos tirosil na tiroglobulina, resultando na síntese de hormonas tiroideas, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>. A concentração do anticorpo anti-TPO aumenta em mais de 90% nos doentes com tiroidite auto-imune ativa. Também se encontram aumentados na doença de Graves materna e de Hashimoto. O resultado do ac. anti-TPO é expresso em UI/mL.
- Tri-iodotironina livre (FT<sub>3</sub>) e Tiroxina livre (FT<sub>4</sub>). A determinação quantitativa de FT<sub>3</sub> e de FT<sub>4</sub>, no soro, é útil para diagnosticar situações de hipotiroidismo e de hipertiroidismo. São doseadas pelo método imunoensaio competitivo em que existe uma relação inversa entre a concentração de FT<sub>3</sub> e a concentração de FT<sub>4</sub> presente na amostra do doente com a quantidade de luz emitida. O resultado de FT<sub>3</sub> é expresso em pg/mL e o resultado de FT<sub>4</sub> é expresso em ng/dL.
- Tri-iodotironina (T<sub>3</sub>) e Tiroxina ou tetra-iodotironina (T<sub>4</sub>). No diagnóstico clínico os seus doseamentos além de serem uteis para a disfunção primária da glândula tiroidea são indicadores importantes para a disfunção da pituitária ou do hipotálamo dado que a libertação destas hormonas é diretamente afetado pela TSH. A determinação quantitativa de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> é um imunoensaio competitivo que recorre à tecnologia quimioluminescente direta onde existe uma relação inversa entre a

quantidade de cada uma destas hormonas presentes na amostra do doente e a quantidade de luz emitida. O resultado de  $T_3$  é expresso em ng/mL e o resultado de  $T_4$  é expresso em  $\mu\text{g/mL}$ .

- **Captura de anticorpos.** Captura de anticorpos presentes na amostra através de um anticorpo específico de IgM humana (anticorpo anti IgM humana) que se encontra ligado às partículas paramagnéticas, complexo que reveste a fase sólida. Posteriormente adiciona-se o antigénio marcado com o composto éster de acridina que tem afinidade para os anticorpos da amostra. A concentração tem uma relação direta com a emissão de luz.

Parâmetro determinado por este ensaio:

- **Hormona Tiro-estimulante (TSH).** A quantificação da TSH é particularmente útil no diagnóstico diferencial entre o hipotiroidismo primário (devido à hipofunção da tiroide) em que se verifica o aumento significativo da TSH, do hipotiroidismo secundário (disfunção da hipófise) e do hipotiroidismo terciário (hipotálamo) em que as concentrações de TSH são baixos. Através da observação de alteração da concentração de TSH do doente após a estimulação da hormona libertadora da tirotropina (TRH) permite diferenciar o hipotiroidismo secundário do terciário.

A determinação quantitativa da TSH é um ensaio de 3ª geração em que a reação ocorre entre um anticorpo monoclonal anti- FITC ligado ao complexo que reveste a fase sólida, um anticorpo monoclonal de captura anti- TSH marcado com FITC e um traçador composto por um éster de acridina próprio e um anticorpo mAb anti- TSH conjugado com albumina de soro bovino para deteção quimioluminescente. A concentração da TSH presente na amostra tem uma relação direta com a emissão de luz. O resultado da TSH é expresso em  $\mu\text{UI/mL}$ .

A gestão da qualidade no setor de Imunologia/Endocrinologia é avaliado no CQI pelo programa da Bio Rad – *Lyphochek Immunoassay Plus Control* nível 1,2,3 que é um soro controlo da qualidade ensaiado para controlar a precisão dos resultados e consequentemente dos procedimentos laboratoriais de análise para os diferentes parâmetros. A periodicidade do CQI é diária e é efetuado um controlo para cada parâmetro sempre que a técnica é utilizada.

Na avaliação externa de qualidade participa nos programas de CQE do RIQAS e do INSA.

#### 4.4 Casos Clínicos

Reporto alguns casos clínicos de disfunções tiroideias que tive oportunidade de analisar durante este período de estágio.

##### 4.4.1 Caso clínico 1

Uma mulher com 38 anos consultou o médico por ter verificado aumento de peso, com edemas e irritabilidade.

O clínico prescreveu as seguintes análises:

**Tabela 18** - Resultados laboratoriais das análises do caso clínico 1.

Análises	Resultado/Unidades	Valores de referência
T <sub>3</sub> total	0.80 ng/mL	0.60 - 1.81
T <sub>4</sub> total	4.3 µg/mL	4.5 - 10.9
FT <sub>3</sub>	2.1 pg/mL	2.3 - 4.2
FT <sub>4</sub>	0.54 ng/dL	0.89 - 1.76
TSH	149.91 µUI/mL	0.55 - 4.78
Ac anti TG	216.70 UI/mL	< 60.00

A presença de baixas concentrações na FT<sub>3</sub>, FT<sub>4</sub> e T<sub>4</sub>total e a concentração elevada de TSH, são marcadores do hipotireoidismo primário. A positividade do Ac anti-TG poderá indicar para o diagnóstico de hipotireoidismo auto-imune.

##### 4.4.2 Caso clínico 2

Uma mulher com 32 anos apresentava queixas de perda de peso, arritmias, ansiedade e nervosismo e irritabilidade.

O clínico prescreveu as seguintes análises:

**Tabela 19** - Resultados laboratoriais das análises do caso clínico 2.

Análises	Resultado/Unidades	Valores de referência
T <sub>3</sub> total	1.78 ng/mL	0.60 - 1.81
T <sub>4</sub> total	12.3 µg/mL	4.5 - 10.9
FT <sub>3</sub>	4.8 pg/mL	2.3 - 4.2
FT <sub>4</sub>	2.25 ng/dL	0.89 - 1.76
TSH	0.008 µUI/mL	0.55 - 4.78

Ao analisarmos os resultados verifica-se a existência de concentrações elevadas para os parâmetros  $T_4$ total,  $FT_3$  e  $FT_4$  e a concentração de TSH muito inferior ao valor mínimo de referência são marcadores indicativos de hipertiroidismo primário.

No hipertiroidismo o doente apresenta um conjunto de sintomas e sinais clínicos que resultam da exposição dos tecidos a concentrações excessivas de hormonas tiroideias. A prevalência é de 0.2% nos homens e 2% nas mulheres.

#### 4.4.3 Caso clínico 3

Um jovem de 17 anos, consultou o médico por fadiga, irritabilidade, hiperatividade, palpitações e perda de peso. Perante o quadro clínico o médico prescreveu as análises hemograma com plaquetas, glicémia, ureia, creatinina, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicerídeos,  $FT_3$ ,  $FT_4$ , TSH, anticorpos anti -TG, anticorpos anti -TPO.

**Tabela 20** - Resultados laboratoriais das análises do caso clínico 3.

Análises	Resultado/Unidades	Valores de referência
$FT_3$	> 20.0 pg/mL	2.3 - 4.2
$FT_4$	5.00 ng/dL	0.89 - 1.76
TSH	0.008 $\mu$ UI/ mL	0.55 - 4.78
Ac anti TG	112.40 UI/mL	< 60.00
Ac anti TPO	> 1300.00 UI/mL	< 60.00

Perante estes resultados, em que as concentrações de  $FT_3$  e  $FT_4$  estão elevadas e a concentração de TSH baixa e com os anticorpos anti-TG e anti-TPO positivos, o clínico prescreveu a análise anticorpos anti receptor TSH (TRAbs).

Os resultados de todos os outros parâmetros estavam dentro dos limites dos valores de referência.

**Tabela 21** - Resultado laboratorial da análise do caso clínico 3.

Análise	Resultado/Unidade	Valores de referência
TRAbs	117.15	< 1.00

Os resultados elevados de hormonas tiroideas ( $FT_3$  e  $FT_4$ ) e TSH suprimida são os marcadores bioquímicos do hipertiroidismo. A positividade dos anticorpos anti-TG e anticorpos anti-TPO surgem na patologia auto-imune tiroideia, a positividade dos TRAbs é um marcador da doença de Graves.



A causa mais frequente de hipertiroidismo primário é a doença de Graves-Basedow, responsável por 85% dos casos, seguida de Bócio Multinodular.

#### 4.4.4 Caso clínico 4

Uma mulher de 45 anos numa consulta de rotina apresentava hipertensão e o médico prescreveu as análises, consideradas de rotina e as análises para avaliar a função tiroideia.

**Tabela 22** - Resultados laboratoriais das análises do caso clínico 4.

Análises	Resultado/Unidades	Valores de referência
T <sub>3</sub> total	0.72 ng/mL	0.60 - 1.81
T <sub>4</sub> total	7.2 µg/mL	4.5 - 10.9
FT <sub>3</sub>	2.8 pg/mL	2.3 - 4.2
FT <sub>4</sub>	1.34 ng/dL	0.89 - 1.76
TSH	6.87 µUI/mL	0.55 - 4.78
Ac anti TG	< 20 UI/mL	< 60.00
Ac anti TPO	< 10 UI/mL	< 60.00

Ao analisar os resultados verifica-se que as concentrações de T<sub>3</sub>total, T<sub>4</sub>total, FT<sub>3</sub>, FT<sub>4</sub> se encontram dentro dos valores de referência e os anticorpos anti-TG e anti-TPO são negativos. Como as concentrações das hormonas tiroideias circulantes são normais e a concentração de TSH está ligeiramente elevada pode sugerir hipotiroidismo subclínico, em que os doentes apresentam poucos ou nenhuns sinais clínicos de hipotiroidismo.



## CAPITULO 5. CONCLUSÃO

Finalizo realçando a importância da experiência pessoal vivida com a realização deste mestrado e como enriqueceu a minha formação, particularmente na atualização de conceitos e técnicas laboratoriais em Métodos Moleculares: Hibridização e Amplificação nas áreas de Hematologia, Imunologia, Parasitologia e Virologia e Métodos Analíticos de Imunofluorescência Polarizada na área de Toxicologia.

Para além de consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo dos dois anos de formação, o estágio permitiu desenvolver capacidades de pesquisa, organização e estruturação dos dados com base na prática laboratorial e na análise da vasta bibliografia na área da saúde e bioquímica.

Esta abordagem contribuiu para desenvolver capacidades no sentido da interação entre os dados laboratoriais, a informação clínica e o utente, que considero fundamental na minha prática profissional.

Reitero a certeza de que este mestrado foi enriquecedor, quer a nível pessoal como profissional de saúde.



## CAPITULO 6. BIBLIOGRAFIA

BAIN, Barbara J. – **Células sanguíneas – Um Guia Prático**. 4ª Ed. Porto Alegre; Artemed, 2007. ISBN 978-85-363-0922-4.

BURTIS, et al. – **Tietz: Fundamentals of Clinical Chemistry**. 6ª Ed. Missouri: Saunders, 2008. ISBN 978-1-4557-4165-1.

BAIN, Barbara et al. – **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 11ª Ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2012. ISBN 9780702034084.

CREAGER, Mark A. – **Atlas De Doenças Vasculares**. 3ªEd. Lisboa: Euromédica 2008. ISBN 978-972-8749-68-2.

FAUCI et al. – **Harrison – Medicina Interna**. 17ªEd. México: McGraw-Hill Interamericana 2009. ISBN 978-85-7726-050-8 (vol.I). ISBN 978-85-7726-051-5 (vol.II).

GREENSPAN, Francis S.; STREWLE, Gordon J. – **Endocrinologia Básica e Clínica**. 5ªEd. Guanabara. Koogan. S.A, 2000. ISBN 0-8385-0588-0.

HALL, Jonh E., Ph.D. – **Guyton and Hall- Textbook of Medical Physiology**. 12ª Ed. Philadelphia: Saunders, 2011. ISBN 978-1-4160-4574-8.

HENRY, Jonh Bernard M.D. – **Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio**. 9ª Ed. Barcelona: Ediciones Científicas y Técnicas, 1993. ISBN 0-7216-2212-7.

HOFFBRAND, A. Victor; PETTIT, Jonh; MOSS P. – **Fundamentos em Hematologia**. 6ªEd. Porto Alegre: Artmed, 2013. ISBN 978-85-658552-30-2.

HOFFBRAND, A. Victor; PETTIT, Jonh – **Atlas Colorido de Hematologia Clínica**. 3ªEd. São Paulo: Manole, 2001. ISBN 85-204-1167-3.

LAZARUS, Jonh; PIRAGS, Valdis; BUTZ, Sigrid – **The Thyroid and Reproduction**. 1ªEd. Germany: Thieme, 2009. ISBN 978-3-13-146721-8.

MANILA, L et al. – **Dicionário Médico**. 3ªEd. Lisboa: Climepsi Editores, 2004. ISBN 972-736-080-4.

Mindray Medical International Limited – **Especificações Técnicas do Analisador Mindray BC-5800**. 2013. [Acedido em março 2015]. Disponível na internet: <http://www.mindray.com/pt/products/25.html>.

OLIVEIRA, Raimundo – **Hemograma, como fazer e interpretar**. 1ª Ed. LPM Editora, 2007. ISBN 978-85-99305-14-0.

PORTUGAL. Direcção-Geral da Saúde – **Prescrição e determinação do Hemograma**. Lisboa: DGS, 2013.

PORTUGAL. Direcção-Geral da Saúde – **Prescrição de Exames Laboratoriais para Avaliação e Monitorização da Função Tiroideia**. Lisboa: DGS, 2012.

PORTUGAL. Direcção-Geral da Saúde – **Abordagem, Diagnóstico e Tratamento da Ferropénia no Adulto**. Lisboa: DGS, 2015.

PORTUGAL. Direcção-Geral da Saúde – **Nódulo da Tiroide**. Lisboa: DGS, 2013.

RIBEIRO, Isabel Silva – **Hematologia – Da Prática Clínica à Teoria**. 1ª Ed. Lisboa: Lidel, 2015. ISBN 978-9-7275-7915-0.

RICHARD, A.Mc Pherson; MATTHEW R. Pincus – **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 22ª Ed. Saunders: 2011. ISBN 978-1-4377-0974-2.

SEELEY, Rod R et al. – **Anatomia e Fisiologia**. 6ª Ed. Loures: Lusociência, 2005. ISBN 978-972-8930-07-3.

Siemens – **ADVIA Centaur CP Immunoassay System**. Especificações técnicas do aparelho. [Acedido a 20 de maio de 2015 ]. Disponíveis na internet: <http://www.healthcare.siemens.com/immunoassay/systems/advia-centaur-cp-immunoassay-sys>

Sysmex – **Sysmex CA- 540 Coagulation analyser**. Especificações técnicas do aparelho. [Acedido a 10 de Abril de 2015]. Disponível na internet: <http://www.gmi-inc.com/sysmex-ca-540-coagulation-analyzer.html>

Sociedade Portuguesa de Endocrinologia Diabetes e Metabolismo (SPEDM) – **Grupo de Estudo da Tiroide**. Drº Luis Raposo et al. 1998 ( Acedido a 24 de Agosto 2015). Disponível na internet: <http://www.spedm-tiroide.org/website/28.htm#/website>

MANSILHA, Armando – **Diagnóstico e Terapêutica do Tromboembolismo Venoso – Evidências e Recomendações**. 1ªEd. AMMP, 2015. ISBN 978-989-20-5731-6.

VIVES Joan Lluís; AGUILAR Josep Lluís – **Manual de Técnicas de Laboratório em Hematologia**. 6ªEd. Barcelona: Masson-Salvat, 1994. ISBN 84-458-0170-8.