

Pedro Madail Marques e Silva

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Elmano Ramalheira e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Mestrado em Análises Clínicas

2014/2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estagiário:

Nome: Pedro Madail Marques e Silva

Curso: Mestrado em Análises Clínicas

Instituição: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Orientadores:

Dr. Elmano Ramalheira

Médico Especialista em Patologia Clínica

Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga

Doutora Gabriela Jorge da Silva

Professora Auxiliar do Grupo de Biociências Clínicas e Aplicadas

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Informações do Estágio:

Local: Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga

Serviço de Imunohemoterapia do Centro Hospitalar do Baixo Vouga

Áreas: Química Clínica/Imunoquímica, Imunologia, Hematologia, Microbiologia e Imunohemoterapia

Período: Dezembro de 2014 a Maio de 2015

Duração: 840 horas

ÍNDICE

ABREVIATURAS	vi
RESUMO	ix
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	I
CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	I
ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	4
I. HEMATOLOGIA	4
A. Descrição da Seção	4
A.1. Controlo de Qualidade	4
B. Hemograma	5
B.1. Horiba Medical ABX Pentra® DX Nexus	6
B.2. Estudo dos Eritrócitos	6
B.2.1. Contagem de Eritrócitos	6
B.2.2. Hemoglobina	7
B.2.3. Hematócrito	8
B.2.4. Volume Globular Médio	8
B.2.5. Hemoglobina Globular Média	9
B.2.6. Hemoglobina de Hemoglobina Corpuscular Média	9
B.2.7. Distribuição do volume dos eritrócitos	10
B.3. Contagem de Leucócitos	10
B.3.1. Contagem de Leucócitos Totais	10
B.3.2. Diferencial Leucocitário	11
B.3.2.1. Neutrófilos	11
B.3.2.2. Linfócitos	12
B.3.2.3. Monócitos	13
B.3.2.4. Eosinófilos	13
B.3.2.5. Basófilos	14

B.4. Contagem de Plaquetas	14
B.5. Contagem de Reticulócitos	16
B.6. Esfregaço de Sangue Periférico	17
C. Determinação das Populações Linfocitárias	18
C.1. <i>Beckman Coulter Cytomics® FC500</i>	19
C.2. Avaliação dos Linfócitos T na infecção pelo HIV	20
D. Coagulação Sanguínea	20
D.1. <i>Siemens BCS®</i>	21
D.2. Tempo de Protrombina	22
D.3. Tempo de Tromboplastina Parcial ativada	23
D.4. Fibrinogénio	23
D.5. D-dímeros	24
D.6. Proteína C e Proteína S	25
D.7. Anti-trombina	26
E. Velocidade de Sedimentação	26
E.1. <i>Sarstedt Sediplus® S2000</i>	26
E.2. Interpretação da Velocidade de Sedimentação	27
F. Determinação de Hemoglobinas Específicas	27
F.1. <i>Bio-Rad D-10®</i>	28
F.2. Hemoglobina A _{1c}	29
F.3. Hemoglobina A ₂ e Hemoglobina F	29
F.4. Hemoglobina S	30
II. IMUNOLOGIA	31
A. Descrição da Seção	31
A.1. Controlo de Qualidade	31
B. Eletroforese de Proteínas	32
B.1. <i>Sebia MINICAP®</i>	33
B.2. Albumina	34

B.3. Fração α I	34
B.4. Fração α 2.....	34
B.5. Fração β	35
B.6. Fração γ	36
B.7. Eletroforese de proteínas da urina	37
B.8. Imunosubtração	38
C. Doseamento de Proteínas Específicas	39
C.1. Siemens BN ProSpec®	39
C.2. α I-Antitripsina	40
C.3. β 2-Microglobulina	40
C.4. Cistatina C	41
C.5. Haptoglobina	41
C.6. Fatores C3 e C4 do Sistema Complemento	42
C.7. Imunoglobulinas	43
C.7.1. Quantificação de IgG, IgA e IgM	43
C.7.2. Quantificação de cadeias leves	44
D. Imunoalergologia	45
D.1. Phadia UniCAP® I00	46
D.2. Anticorpos IgE específicos	46
E. Autoimunidade	47
E.1. Determinação de Autoanticorpos	48
E.2. Anticorpos Antinucleares	49
E.2.1. Principais padrões em células HEp-2	50
E.2.2. Doseamento de Anticorpos Antinucleares específicos	51
E.3. Anticorpos anti-dsDNA	52
E.4. Anticorpos Anti-Citoplasma dos Neutrófilos	53
E.5. Anticorpos anti-Membrana Basal Glomerular	55
E.6. Anticorpos Antimitocondriais	55

E.7. Anticorpos Anti-Músculo Liso	56
E.8. Anticorpos anti-Fração Microsomal de Fígado e Rim	57
E.9. Anticorpos Anti-Célula Parietal Gástrica	57
E.10. Anticorpos Anti-Endomísio	58
E.11. Fator reumatoide e anticorpos anti-citrulina	59
III. OUTRAS SEÇÕES	59
IV. SERVIÇO DE IMUNOHEMOTERAPIA	60
CONCLUSÃO	61
BIBLIOGRAFIA	62
ANEXOS	64
ANEXO A. Valores de referência para os parâmetros dos hemogramas	64
ANEXO B. Esfregaço de Sangue Periférico	65
ANEXO C. Coloração de Wright	66
ANEXO D. Coloração de May-Grünwald-Giemsa	67
ANEXO E. Coloração de Perls	68
ANEXO F. Valores de referência para as provas da coagulação	69
ANEXO G. Valores de referência para as hemoglobinas específicas	69
ANEXO H. Valores de referência e principais proteínas das frações obtidas por separação eletroforética de amostras de soro	69
ANEXO I. Eletroforese em amostras de urina	70
ANEXO J. Valores de referência nos doseamentos de proteínas específicas	71
ANEXO K. Valores de referência das imunoglobulinas	71
ANEXO L. Anticorpos IgE específicos quantificados por EIA	72
ANEXO M. Imunofluorescência indireta	73
ANEXO N. Autoanticorpos avaliados e respectivos valores de referência utilizados nos ensaios de IFI e na quantificação de autoanticorpos específicos	79

ABREVIATURAS

- AAE** – Anticorpos Anti-Endomísio
- AAT** – α 1-antitripsina
- Ac** – Anticorpo
- AINE** – Anti-inflamatório não esteroide
- AMBG** – Anticorpos anti-Membrana Basal Glomerular
- AMA** – Anticorpos Antimitocondriais
- ANA** – Anticorpos Antinucleares
- ANCA** – Anticorpos Anti-Citoplasma dos Neutrófilos
- APCA** – Anticorpos Anti-Célula Parietal Gástrica
- API** – *Analytical Profile Index*
- AR** – Artrite Reumatoide
- ASIS** – Aplicação de Sistema de Informação de Sangue
- ASMA** – Anticorpos Anti-Músculo Liso
- AT** – Anti-trombina
- B2M** – β 2-microglobulina
- BASO** – Basófilos (Câmara de Contagem)
- CBP** – Cirrose Biliar Primária
- CCP** – Peptídeo Citrulinado Cíclico
- CENP** – Proteína do Centrômero
- CHBV** – Centro Hospitalar do Baixo Vouga
- CHCM** – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
- CMV** – Citomegalovírus
- CQE** – Controlo de Qualidade Externo
- CQI** – Controlo de Qualidade Interno
- DMTC** – Doença Mista do Tecido Conjuntivo
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- DPOC** – Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
- dsDNA** – DNA de cadeia dupla
- EBV** – Vírus Epstein-Barr
- EDTA** – Ácido Etilenodiaminotetracético
- EIA** – Ensaio Imunoenzimático
- ENA** – Antígenos Nucleares Extraíveis
- EPO** – Eritropoietina

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
FITC – Isotiocianato de Fluoresceína
FR – Fator Reumatoide
FS – *Forward Scatter* (Dispersão Frontal)
GMRP – Glomerulonefrite Rapidamente Progressiva
HAART – *Highly Active Antiretroviral Therapy*
Hb – Hemoglobina
Hb A_{1c} – Hemoglobina glicada, fração A_{1c}
HEp-2 – *Human Epithelial type 2*
HGB – Hemoglobina (Câmara de Quantificação)
HGM – Hemoglobina Globular Média
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
Ht – Hematócrito
HPT – Haptoglobina
IFI – Imunofluorescência Indireta
Ig – Imunoglobulina
INR – *International Normalized Ratio* (Índice internacional normalizado)
INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
ISI – Índice de Sensibilidade Internacional
LES – Lupus Eritematoso Sistémico
LIS – Sistema de Informação Laboratorial
LKM – Fração Microssomal de Fígado e Rim
LMNE – Linfócito-Monócito-Neutrófilo-Eosinófilo (Matriz)
MGUS – Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado
MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade
MPO – Mieloperoxidase
PAI – Pesquisa de Anticorpos Irregulares
PBS – Tampão Fosfato Salino
PC – Proteína C
PES – Polietersulfona
PGAS – Síndrome Poliglandular Autoimune
PLT – Plaquetas (Câmara de Contagem)
PNAEQ – Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade
PR3 – Serina Protease 3

PS – Proteína S

PT – Proteínas Totais

RBC – *Red Blood Cells* (Câmara de Contagem)

RDW – *Red cell Distribution Width* (Distribuição do volume dos eritrócitos)

RET – Reticulócitos (Câmara de Contagem)

RIQAS – *Randox International Quality Assessment Scheme*

RNA – Ácido Ribonucleico

Scl-70 – *Scleroderma 70 kDa* (antigénio)

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Humana

Sm – Smith (antigénio)

snRNP – Ribonucleoproteínas nucleares de pequena dimensão

SS – *Side Scatter* (Dispersão Lateral)

SSA – *Sjögren's-Syndrome-related Antigen A*

SSB – *Sjögren's-Syndrome-related Antigen B*

ssDNA – DNA de cadeia simples

TAD – Teste Antiglobulina Direto

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

TP – Tempo de Protrombina

TPPa – Tempo de Tromboplastina Parcial ativada

tTG – Transglutaminase tecidual

VS – Velocidade de Sedimentação

WBC – *White Blood Cells* (Câmara de Contagem)

RESUMO

O presente relatório pretende descrever as atividades realizadas durante o decurso do estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas da FFUC, realizado principalmente no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga (CHBV). Inicialmente é apresentada uma abordagem geral do local de estágio, relativamente à sua organização, áreas analíticas e tecnologia disponível, seguida pelo aprofundamento das seções da Hematologia e da Imunologia, enfatizando a sua estruturação, os procedimentos de garantia de qualidade, os princípios de funcionamento dos equipamentos e o fundamento dos parâmetros analíticos avaliados. As restantes áreas analíticas são descritas brevemente no contexto da sua importância no laboratório e da sua incorporação no plano de estágio. Este relatório fornece também um breve comentário das atividades realizadas nos Serviços de Imunohemoterapia do CHBV.

ABSTRACT

The following report describes the activities performed during the course of the internship of the curricular program of the Master's Degree in Clinical Analysis of FFUP, held mainly in the Clinical Pathology Services of Centro Hospitalar do Baixo Vouga (CHBV). Initially it presents an overall approach of the facilities, regarding its organization, analytical areas and available equipment, followed by the detailed description of the Hematology and Immunology sectors, emphasizing its structure, quality assurance procedures, operating principles of the analyzers and the fundamentals of the evaluated analytical parameters. The remaining analytical sectors are briefly described in terms of their importance in the clinical laboratory and its integration in the internship. This report also presents a brief commentary on the activities performed on the Immunohematology Services of CHBV.

INTRODUÇÃO

Atualmente, os laboratórios de Análises Clínicas representam um elemento fundamental a nível dos serviços de saúde. A sua contribuição na medicina assenta essencialmente na avaliação de numerosos marcadores clínicos como complemento ao diagnóstico e à monitorização da doença. Na avaliação destes parâmetros os laboratórios de Análises Clínicas recorrem a diversos métodos analíticos, distribuídos por varias áreas disciplinares, nomeadamente a Química Clínica, a Imunologia, a Hematologia, a Microbiologia, a Endocrinologia, a Biologia Molecular, entre outras. É da responsabilidade do profissional de saúde não só o fornecimento da informação clínica requisitada mas também a garantia da qualidade dos serviços prestados e a detenção do conhecimento relativo aos fundamentos metodológicos na interpretação crítica da informação gerada a nível laboratorial.

Enquanto etapa vital do Mestrado em Análises Clínicas da FFUC, o estágio no Laboratório de Análises Clínicas estabelece o contato inicial com a realidade associada à rotina em laboratório e permite a aquisição de competências teóricas e práticas relativas às técnicas analíticas e equipamentos utilizados, bem como a aplicação dos fundamentos teóricos lecionados nas diferentes disciplinas ao longo do Mestrado e a sua consolidação com a atividade profissional. O estágio descrito neste relatório decorreu no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga (CHBV) e englobou as valências da Química Clínica/Imunoquímica, da Imunologia, da Hematologia e da Microbiologia. Dentro das áreas laboratoriais mencionadas, as seções da Hematologia e da Imunologia encontram-se descritas em maior detalhe relativamente à sua estruturação e aos ensaios realizados nestes setores. Em conjunto com os setores da Química Clínica/Imunoquímica e da Microbiologia, o presente relatório inclui ainda uma breve descrição das atividades desenvolvidas durante o decurso do estágio nos Serviços de Imunohemoterapia do CHBV.

CARATERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O CHBV é um Centro Hospitalar constituído pela fusão de três Unidades: o Hospital Infante D. Pedro (Hospital Distrital de Aveiro), o Hospital Distrital de Águeda e o Hospital Visconde de Salreu de Estarreja. O Serviço de Patologia Clínica encontra-se localizado no Hospital Infante D. Pedro (Sede Social do CHBV), situado na Avenida Artur Ravara, 3814-501 Aveiro. O Serviço de Patologia Clínica encontra-se sob a responsabilidade do Dr. Elmano Ramalheira, Médico Especialista e Diretor do Serviço de Patologia Clínica, sendo as tarefas da rotina laboratorial asseguradas por uma equipa constituída por Médicos Especialistas em

Patologia Clínica, Técnicos Superiores de Saúde, Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública e Técnicos Auxiliares de Laboratório.

A nível estrutural, o Serviço de Patologia Clínica é principalmente constituído pelos laboratórios em si, os quais são compostos por duas divisões: uma divisão de grande área reservada às seções da Química Clínica/Imunoquímica, da Imunologia e da Hematologia, em conjunto com o espaço destinado à receção e triagem das amostras; e uma divisão reservada à seção da Microbiologia, que se encontra isolada das restantes seções. Para além do espaço laboratorial, o Serviço de Patologia Clínica é também constituído pelo gabinete do Diretor do Serviço, um gabinete médico, uma sala reservada aos funcionários do laboratório, uma sala de lavagem, um armazém e um espaço para o armazenamento de reagentes.

As amostras recebidas no Serviço de Patologia Clínica provêm principalmente da Sala de Colheitas ou a partir de determinados Serviços a nível do Hospital. A porção restante das amostras é proveniente das outras Unidades Hospitalares do CHBV, dado que a frequência reduzida da determinação dos parâmetros analíticos não justifica que os laboratórios destes hospitais possuam os equipamentos ou os reagentes necessários para efetuar os ensaios. Após a entrada no sistema informático por leitura dos códigos de barras, as amostras recebidas são devidamente separadas e distribuídas pelas diferentes seções, uma vez que cada uma trabalha quase exclusivamente com as suas próprias amostras. A maior parte das amostras recebidas está destinada aos ensaios da Química Clínica, seguidos pelos ensaios da Hematologia, da Microbiologia e, por fim, da Imunologia/Endocrinologia (Figura 1 e Tabela 1).

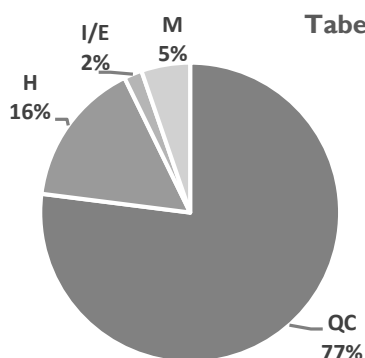


Figura 1 – Distribuição das análises, por área laboratorial, requisitadas no ano de 2014 (QC: Química Clínica; H: Hematologia; I/E: Imunologia/Endocrinologia; M: Microbiologia).

Tabela 1 – Número de doentes e análises totais e por área laboratorial relativas aos anos de 2012, 2013 e 2014 (QC: Química Clínica; H: Hematologia; I/E: Imunologia/Endocrinologia; M: Microbiologia).

		2012	2013	2014
Nº de Análises	QC	917283	1011423	1002453
	H	189089	212317	205428
	I/E	23772	26604	25339
	M	53397	63254	68627
Total de Análises		1183541	1313598	1301847
Nº de Doentes		144594	161829	161930

O Serviço de Patologia Clínica encontra-se devidamente equipado com um conjunto de diversos analisadores destinados à execução automatizada dos ensaios requisitados na rotina (Tabela 2). Devido à elevada exigência na gestão de trabalho, associada com o número de amostras recebidas e de análises requisitadas, a seção da Química Clínica/Imunoquímica é a

que apresenta o maior grau de automação, sendo constituída por um sistema de automação laboratorial (Siemens ADVIA Labcell[®]), acoplado aos auto-analisadores ADVIA[®] 1800 e ADVIA Centaur[®] XP, que permite a gestão automatizada das amostras principalmente a nível da sua descapsulação, distribuição pelos equipamentos e organização de acordo com o estado de finalização dos ensaios ou da ocorrência de possíveis problemas durante o processo.

Tabela 2 – Auto-analisadores, e respetivos parâmetros avaliados, do Serviço de Patologia Clínica.

Auto-Analisador	Parâmetros avaliados
Seção da Química Clínica/Imunoquímica	
Siemens ADVIA [®] 1800	Parâmetros da Química Clínica; Drogas de abuso e fármacos; Proteínas específicas; Ionograma.
Siemens ADVIA Centaur [®] XP	Marcadores endócrinos, tumorais, cardíacos, da anemia e da infeciologia.
Siemens Immulite [®] 2000	Rastreios pré-natais; Marcadores endócrinos e virais.
Siemens RAPIDLab [®] 1200	Gases sanguíneos, eletrólitos, metabolitos e parâmetros da co-oximetria.
Seção da Imunologia	
Siemens BN ProSpec [®]	Proteínas específicas.
Sebia MINICAP [®]	Perfis eletroforéticos; Imunotipagem de bandas monoclonais.
Pharmacia Diagnostics UNICAP [®] 100 ^E	Autoanticorpos específicos; Anticorpos IgE específicos.
Seção da Hematologia	
Horiba ABX Pentra [®] DX Nexus	Hemograma com diferencial leucocitário e contagem de reticulócitos.
Siemens BCS [®]	Provas da hemóstase e coagulação sanguínea.
Bio-Rad D-10 [®]	Hemoglobinas específicas.
Sarstedt Sediplus [®] S2000	Velocidade de sedimentação.
Beckman Coulter Cytomics [®] FC500	Classificação das populações linfocitárias.
Seção da Microbiologia	
ARKRAY Aution Max [®] AX-4280	Análise sumária de urina tipo II.
bioMérieux BacT/ALERT [®] 3D	Deteção de crescimento bacteriano em hemoculturas.
bioMérieux Mini API [®]	Análise de galerias de identificação e de TSA.
bioMérieux Vitek [®] 2	Identificação de microrganismos e TSA.
Thermo Scientific VersaTREK [®]	Deteção do crescimento microbiano no isolamento e TSA para <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
Abbott m24sp [®]	Extração e purificação de DNA/RNA viral e bacteriano.
QIAGEN EZ1 [®] Advanced	
Abbott m2000rt [®]	Determinação quantitativa de cargas virais de HIV, HBV e HCV.
Cepheid SmartCycler [®]	Pesquisa de DNA/RNA viral ou bacteriano.

O Sistema de Informação Laboratorial (LIS) empregado no Serviço de Patologia Clínica é o software Apollo (versão 2.0), o qual estabelece ligação com o SONHO, o sistema de gestão da informação a nível hospitalar. O sistema Apollo é responsável pelo processamento dos dados analíticos gerados a nível laboratorial através da sua comunicação com os auto-analisadores do laboratório e permite a intervenção dos funcionários a nível das diversas tarefas de rotina, nomeadamente a entrada de amostras no sistema, a elaboração de listas de trabalho com os ensaios a efetuar, a obtenção de listas com os ensaios pendentes e a visualização dos resultados obtidos para posterior validação, repetição ou rejeição. Este sistema possibilita ainda o acesso rápido e simplificado ao historial dos parâmetros avaliados no Hospital para cada doente, atuando deste modo como uma extensa base de dados disponível ao operador para consulta.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

I. HEMATOLOGIA

A. Descrição da Seção

A Hematologia é a seção do laboratório responsável pelo estudo e avaliação clínica das células sanguíneas, dos mecanismos de hemóstase e coagulação, das hemoglobinas específicas e da velocidade de sedimentação. A nível estrutural, esta seção apresenta uma área destinada ao estudo dos hemogramas, a qual dispõe de dois contadores de células, uma bancada para a realização das provas da coagulação, que dispõe também dois analisadores para esta finalidade, uma bancada com os microscópios óticos e os equipamentos utilizados para a determinação de hemoglobinas específicas e da velocidade de sedimentação e uma bancada utilizada na preparação manual de esfregaços de sangue periférico e de medula óssea, bem como a sua coloração. A seção da Hematologia apresenta ainda um espaço reservado ao citómetro de fluxo utilizado no estudo das populações linfocitárias.

As amostras avaliadas nesta seção são de sangue total, colhido com um anticoagulante na proporção específica do ensaio a realizar, com exceção das amostras destinadas às provas da hemóstase, as quais são previamente centrifugadas de modo a obter a fração de plasma. A centrifugação é essencial para estes ensaios pois elimina a interferência das células suspensas no plasma, em particular as plaquetas. Os anticoagulantes contidos nas amostras incluem o EDTA (sal tripotássico), utilizado para a maior parte dos ensaios, e o citrato de sódio, utilizado para as provas da hemóstase (proporção de 1:10) e para a determinação velocidade de sedimentação (proporção de 1:5). Os dois anticoagulantes atuam por ligação com os iões de cálcio (Ca^{2+}) impedindo a sua disponibilidade para a ativação da cascata da coagulação (1). A utilização do EDTA permite a formação de complexos mais estáveis com o Ca^{2+} e é particularmente vantajosa nos hemogramas e na observação de esfregaços de sangue periférico pois está associada a menores alterações morfológicas das células nas concentrações utilizadas (1,6 mg de EDTA/mL de sangue).

A.1. Controlo de Qualidade

Na seção da Hematologia o CQI é realizado diariamente antes de iniciar qualquer processo analítico. Para os dois contadores de células são ensaiados 3 níveis de controlo (normal, patológico baixo e patológico alto). Os reticulócitos são determinados com um nível de controlo e em apenas um dos analisadores, visto que as determinações são alternadas entre os dois aparelhos diariamente.

Para as provas da coagulação são analisados dois níveis de controlo (normal e patológico) para apenas um dos analisadores, visto que a utilização dos aparelhos é alternada diariamente. Para as determinações da Proteína C, Proteína S e Anti-trombina os controlos são avaliados quando estes ensaios são realizados (uma vez por semana). Para a determinação da Hb A_{1c} são ensaiados dois níveis de controlo (normal e patológico), à semelhança da Hb A₂ e da Hb F, realizados apenas quando estas provas são requisitadas. Para os equipamentos das provas da coagulação e da determinação das hemoglobinas os controlos são também realizados após a mudança de reagentes. Para os ensaios da citometria de fluxo o controlo consiste numa suspensão celular avaliada em conjunto com as amostras dos doentes (2 vezes por semana).

O CQE é realizado mensalmente ao abrigo do *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS) para a avaliação das determinações dos parâmetros dos hemogramas, das provas de coagulação e das hemoglobinas específicas. O CQE é também realizado de acordo com o Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ) do INSA, para a avaliação dos parâmetros dos hemogramas com contagem de reticulócitos (realizada de 3 em 3 meses) e das provas de coagulação (realizada de 2 em 2 meses).

De modo diminuir a ocorrência de interferências nos resultados obtidos deve também ser avaliada a qualidade das amostras que chegam à seção, nomeadamente a nível do seu volume, visto que o anticoagulante deve estar presente em determinada proporção para assegurar a sua eficácia e evitar a indução de alterações celulares, e da presença de coágulos, responsáveis pela alteração de muitos dos parâmetros determinados, em particular nas contagens de células e nas provas da hemóstase. Deve ainda ser assegurada a homogeneização adequada das amostras, particularmente antes da determinação de hemogramas, velocidade de sedimentação e da preparação dos esfregaços, de modo a conferir a distribuição homogênea das células suspensas nas amostras.

B. Hemograma

O hemograma é o ensaio mais importante e mais requisitado na seção da Hematologia e consiste no estudo qualitativo e quantitativo das células sanguíneas. Os parâmetros analisados durante a realização do hemograma englobam essencialmente a contagem das principais células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas), a quantificação da hemoglobina, a determinação do hematócrito e dos índices eritrocitários (VGM, HGM, CHCM e RDW), o diferencial leucocitário e a contagem de reticulócitos.

Embora o hemograma não seja um teste definitivo, a sua execução é extremamente útil na avaliação de patologias associadas às células do sangue, devendo os valores anormais ser

posteriormente estudados através de testes adicionais, adaptados aos resultados obtidos. Para além deste aspeto, nenhum dos parâmetros no hemograma deve ser avaliado isoladamente mas sim no seu conjunto, obtendo assim uma interpretação mais completa dos resultados obtidos. Os valores de referência utilizados na interpretação de hemogramas na seção da Hematologia encontram-se disponíveis no Anexo A.

B.1. Horiba Medical ABX Pentra® DX Nexus

O ABX Pentra® é o equipamento utilizado para a contagem das células sanguíneas, com diferencial leucocitário e contagem de reticulócitos. Para o seu funcionamento este analisador recorre principalmente ao princípio da impedância elétrica, que permite tanto a contagem das células como a determinação do volume celular.

Uma vez aspiradas pelo equipamento, as amostras são diluídas em solução eletrolítica (fluido condutor de corrente elétrica) e distribuídas pelas múltiplas câmaras de contagem. As câmaras apresentam uma micro-abertura calibrada onde é aplicado um campo elétrico entre dois eléctrodos posicionados de cada lado. A passagem das células sanguíneas pela abertura cria uma resistência (impedância) no campo elétrico entre os dois eléctrodos. Quanto maior for o volume da célula que passa pela micro-abertura, maior é a resistência ao campo elétrico e, conseqüentemente, maior é a altura e a duração do pulso elétrico gerado. Estes pulsos são posteriormente amplificados e a informação processada de modo a produzir, através dos coeficientes de calibração, os valores numéricos finais para as células quantificadas.

A diferenciação entre os diferentes tipos de células é assegurada pela distribuição das amostras nas diferentes câmaras de contagem, em conjunto com a adição de reagentes específicos. As câmaras de contagem disponíveis neste sistema são a RBC/PLT, para contagem de eritrócitos e plaquetas, a WBC/HGB, para a contagem de leucócitos e determinação da hemoglobina, a BASO, para a contagem de basófilos e a LMNE/RET, para o diferencial leucocitário e determinação de reticulócitos.

B.2. Estudo dos Eritrócitos

B.2.1. Contagem de Eritrócitos

Os eritrócitos são as células sanguíneas responsáveis pelo transporte do oxigénio, ligado à hemoglobina, para os vários tecidos do corpo e, a partir destes, do dióxido de carbono para os pulmões. Apresentam forma de disco bicôncavo, e são despromovidos de núcleo, mitocôndrias e ribossomas, o que lhes permite armazenar uma quantidade superior de hemoglobina. São também células com enorme plasticidade, que lhes permite uma maior mobilidade na circulação sanguínea (2).

Nos equipamentos utilizados, a contagem dos eritrócitos é realizada exclusivamente através medição da impedância elétrica, sendo os resultados expressos por número de células por litro ($n \times 10^{12}/L$). A aplicação de valores limite para o volume celular (entre 30 a 300 fL) permite a diferenciação entre os eritrócitos e as plaquetas, determinadas na mesma câmara de contagem.

A diminuição significativa do número de eritrócitos (anemia) está muitas vezes associada à deficiência na síntese da hemoglobina, e às suas causas subjacentes, mas pode também resultar da síntese diminuída a nível da medula óssea (lesão por ação de fármacos, substâncias tóxicas e neoplasias ou estimulação diminuída por déficit de EPO na insuficiência renal crónica) ou do aumento da sua destruição/perda (doenças hemolíticas e hemorragias) (2,3). Os valores aumentados para a contagem de eritrócitos podem resultar da estimulação da eritropoiese como mecanismo de compensação face a condições de hipoxia (insuficiência cardíaca/pulmonar e altitudes elevadas), mas pode também resultar de uma disfunção medular com aumento da sua produção (policitemia vera), da administração de EPO ou da ocorrência de desidratação, por depleção do volume de plasma (2,3).

B.2.2. Hemoglobina

A hemoglobina é a proteína dos eritrócitos especializada para o transporte de O_2 e CO_2 entre os pulmões e os diferentes tecidos do organismo. A sua síntese é dependente da EPO e ocorre principalmente a nível mitocondrial através da formação das moléculas de heme, constituídas pela protoporfirina e pelo ferro no estado ferroso (Fe^{2+}), importante para a ligação com os gases a serem transportados. Cada molécula de heme é combinada com uma das quatro cadeias de globina que compõem a hemoglobina. A principal hemoglobina nas crianças e dos adultos é a Hb A, formada por um par de cadeias α e um par de cadeias β , embora a Hb A₂ e a Hb F estejam também presentes em pequenas quantidades (3).

No equipamento utilizado a hemoglobina é quantificada na mesma câmara de contagem dos leucócitos totais (WBC/HGB) após a adição de um reagente (isento de cianeto) responsável pela lise membranar dos eritrócitos, que permite a libertação do conteúdo em hemoglobina para o espaço extracelular, e pela oxidação do grupo heme da hemoglobina libertada. A concentração dos complexos resultantes da reação é proporcional à absorvância medida no comprimento de onda de 550 nm e é expressa em gramas por decilitro (g/dL).

A diminuição significativa dos níveis de hemoglobina está associada por definição às anemias, sendo a sua etiologia variável de acordo com a fase da síntese que se encontra alterada. O desenvolvimento de anemia está normalmente associado a deficiência/indisponibilidade de determinados nutrientes essenciais à eritropoiese, nomeadamente o ferro (anemia ferropénica

e anemia sideroblástica) e o ácido fólico e a vitamina B12 (anemia megaloblástica), mas pode também estar associada a um déficit na produção EPO pelo tecido renal endócrino (anemia das doenças crônicas) ou às deficiências congênitas na síntese de cadeias de globinas (talassemias) (2,3). Por associação, as condições mencionadas anteriormente para a diminuição e o aumento da contagem de eritrócitos podem resultar também na perda ou elevação dos níveis de hemoglobina, respetivamente.

B.2.3. Hematócrito

O hematócrito corresponde à proporção do volume total de eritrócitos em relação ao volume total sangue. No equipamento utilizado este parâmetro é calculado a partir dos valores obtidos para o VGM e para a contagem de eritrócitos, de acordo com a fórmula:

$$Ht (\%) = N^{\circ} \text{ eritrócitos} \times VGM$$

Deste modo, os valores obtidos são variáveis de acordo com os fatores que influenciam tanto a concentração de eritrócitos no sangue como o seu volume médio. Um hematócrito baixo pode estar associado à perda de eritrócitos (hemorragia ou hemólise) ou à eritropoiese ineficaz, que resulta na diminuição de eritrócitos produzidos e/ou do seu volume celular (3). Um valor alto pode dever-se à eritrocitose ou à diminuição do volume de plasma (desidratação) (1,4).

B.2.4. Volume Globular Médio

O VGM é a medida do tamanho médio dos eritrócitos presentes na amostra. No equipamento utilizado este parâmetro é calculado a partir dos histogramas relativos à distribuição dos eritrócitos contados entre 30 e 300 fL (Figura 2) e é expresso

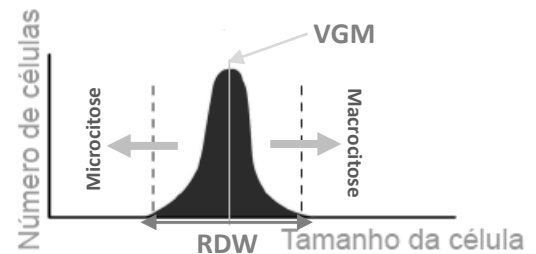


Figura 2 – Histograma dos eritrócitos

em fentolitros (fL). Tanto o valor do VGM como o deslocamento do histograma permitem caracterizar a distribuição dos eritrócitos em normocitose (volume médio normal), microcitose (volume médio baixo) e em macrocitose (volume médio alto). As variações significativas do VGM são uma indicação da eritropoiese ineficaz e são particularmente úteis na classificação de anemias (Tabela 4).

Tabela 4 – Classificação das anemias segundo os valores do VGM e da HGM e respetivas associações com algumas condições patológicas (3).

Anemia microcítica, hipocrômica	Anemia normocítica, normocrômica	Anemia macrocítica
VGM < 76 fL; HGM < 27 pg	VGM = 76-96 fL; HGM = 27-32 pg	VGM > 96 fL
<ul style="list-style-type: none"> ○ Deficiência de ferro ○ Talassemias ○ Anemia da doença crónica ○ Intoxicação por chumbo ○ Anemia sideroblástica 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Anemias hemolíticas ○ Anemia da doença crónica ○ Anemia pós-hemorragica aguda ○ Nefropatias ○ Deficiências mistas ○ Insuficiência da medula óssea 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Anemia megaloblástica (deficiência de vitamina B12 e folato) ○ Anemias não megaloblásticas (alcooolismo, hepatopatias, mielodisplasias, anemia aplástica, etc.)

B.2.5. Hemoglobina Globular Média

A HGM é uma medida que define a distribuição média da hemoglobina pelo número total de eritrócitos na amostra. Os seus valores são calculados automaticamente pelo equipamento através da seguinte fórmula:

$$HGM (pg) = \frac{Hb}{N^{\circ} \text{eritrócitos}} \times 10$$

Este parâmetro permite a classificação geral da população eritrocitária segundo a distribuição média da hemoglobina e, conseqüentemente, segundo a saturação da coloração das células. Deste modo surge a classificação de normocromia (HGM normal), hipocromia (HGM baixa) e hiperchromia (HGM elevada). Embora as variações significativas da HGM estejam associadas a anemia, tanto o seu valor como o da CHCM não fornecem informações adicionais relativamente à determinação do VGM para a classificação de casos de anemia (2). Nas anemias microcíticas os seus valores encontram-se normalmente diminuídos, enquanto nas anemias macrocíticas a HGM encontra-se elevada (2).

B.2.6. Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

A CHCM é um parâmetro que fornece a indicação da proporção média de hemoglobina dentro de cada eritrócito. O seu valor é calculado automaticamente pelo equipamento através da seguinte fórmula:

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

À semelhança da HGM, os valores baixos de CHCM estão associados a hipocromia, normalmente observada nas anemias microcíticas. Os valores significativamente elevados da CHCM podem estar associados à anemia falciforme ou à esferocitose hereditária (2). Nas

anemias macrocíticas os seus valores são normais devido ao aumento da HGM em paralelo com o aumento do VGM (2).

B.2.7. Distribuição do volume dos eritrócitos

A distribuição do volume dos eritrócitos (RDW) corresponde à amplitude da variação do volume celular dos eritrócitos. O RDW é calculado automaticamente pelo equipamento através da base da curva de distribuição dos eritrócitos (Figura 2) e é expresso em percentagem. Um valor elevado de RDW pode ser observado quando a base do histograma se encontra aumentada e está associado à variação elevada do volume eritrocitário (anisocitose), normalmente observado nos diferentes tipos de anemia (3). Os valores mais baixos de RDW estão associados a uma distribuição mais uniforme de volume entre os eritrócitos e não fornecem informação clinicamente relevante.

B.3. Contagem de Leucócitos

B.3.1. Contagem de Leucócitos Totais

A contagem dos leucócitos totais é realizada na câmara WBC/HGB através da medição da impedância elétrica e da adição de um reagente responsável pela lise dos eritrócitos, permitindo deste modo a diferenciação com estas células. A aplicação de um valor limite para o volume celular permite a diferenciação dos leucócitos com as plaquetas e com os eritrócitos lisados. Os resultados obtidos para os leucócitos totais e para os seus diferentes tipos são expressos por número de células por litro ($n \times 10^9/L$).

De um modo geral, os leucócitos encontram-se aumentados na resposta a processos infecciosos e inflamatórios, mas este aumento pode também estar associado à disfunção da medula óssea (doenças mieloproliferativas), a reações resultantes da administração de determinados fármacos e de desordens de natureza imunológica (alergias e doenças autoimunes) (2,5). Com a estimulação anormal da medula óssea pode verificar-se o aumento dos precursores mielóides/linfóides nas contagens automáticas de células e na observação de esfregaços de sangue periférico (desvio esquerdo). Os leucócitos totais também se encontram aumentados nas anemias hemolíticas e pós-hemorragicas (3).

A contagem de leucócitos encontra-se diminuída com a perda da função da medula óssea, que poderá estar associada a determinadas infeções virais, doenças congénitas (síndromes mielodisplásicas), neoplasias (leucemias), doenças autoimunes e administração de fármacos (radioterapia e quimioterapia) (2,3). A diminuição dos leucócitos totais pode também estar associada à sua destruição a um ritmo superior a que são produzidos (infeções severas, doenças autoimunes, esplenomegalia e ação de determinados fármacos) (2).

B.3.2. Diferencial Leucocitário

O diferencial leucocitário consiste na classificação de uma população de leucócitos nos seus diferentes tipos de células. No equipamento utilizado, esta classificação é feita com base em duas características: o volume e a complexidade celular. À semelhança das restantes contagens, o volume celular e o número de células são obtidos a partir da medição da impedância elétrica. Para a determinação da complexidade celular é adicionado um reagente responsável pela lise dos eritrócitos, estabilização dos leucócitos nas suas formas nativas e pela sua coloração citoquímica diferencial. A intensidade da coloração citoquímica é proporcional à composição em grânulos e de núcleos nas células (complexidade celular) e é medida através da leitura da absorvância.

O conjunto dos dados obtidos permite a distribuição das células na matriz LMNE (Figura 3) segundo o seu volume celular (eixo dos XX) e a sua complexidade celular (eixo dos YY), sendo a classificação atribuída com base nas regiões da matriz. As contagens nas câmaras LMNE e BASO são comparadas com a contagem de leucócitos totais de forma a produzir a diferenciação completa em números absolutos e em percentagens.

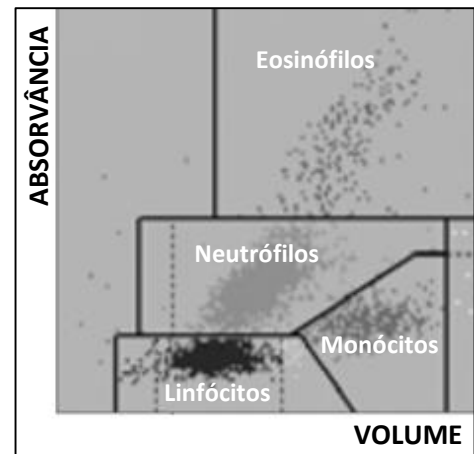


Figura 3 – Matriz LMNE

B.3.2.1. Neutrófilos

Os neutrófilos (Figura 4) são os leucócitos que, em conjunto com os eosinófilos e os basófilos, formam o grupo dos granulócitos. São células com núcleo denso característico, com dois a cinco lóbulos, e citoplasma pálido com contorno irregular e grânulos finos azulados (azurófilos) (1,4). A sua principal função é de defesa contra infeções bacterianas através da fagocitose e da libertação de substâncias citotóxicas (3). Em doenças infecciosas e inflamatórias, bem como reação a determinados fármacos, demonstram granulações citoplasmáticas grosseiras (granulações tóxicas) em esfregaços de sangue periférico (1).

Uma vez que os neutrófilos representam a maior porção dos leucócitos, a sua contagem elevada (neutrofilia) e diminuída (neutropenia) está muitas vezes associada às causas mencionadas anteriormente para as alterações dos leucócitos totais. Nos casos em que ocorre uma elevação extrema do número de leucócitos em conjunto com o aumento significativo dos neutrófilos imaturos verifica-se a ocorrência de uma reação leucemóide, normalmente

associada a infecção (particularmente em crianças) e hemólise severa (2,3). A reação leucoeritroblástica consiste numa reação leucemóide com presença de precursores eritroides e está associada principalmente com invasão medular (fibrose e neoplasias), podendo ocorrer nas hemorragias e condições hemolíticas em casos mais raros (2,3).

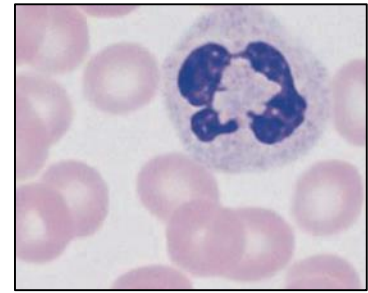


Figura 4 – Neutrófilo (4).

B.3.2.2. Linfócitos

Os linfócitos são divididos em três grupos diferentes, dependendo da sua função. Os linfócitos T são os mais predominantes (cerca de 70%), maturam no timo e são importantes na eliminação de antígenos estranhos ao organismo (imunidade celular) (3). Os linfócitos B sofrem maturação na medula óssea e são importantes na resposta humoral contra agentes estranhos através da sua maturação em plasmócitos e da produção de imunoglobulinas. Os linfócitos NK (*natural killer*) são semelhantes aos linfócitos T citotóxicos e são importantes na destruição celular de vírus e células neoplásicas.

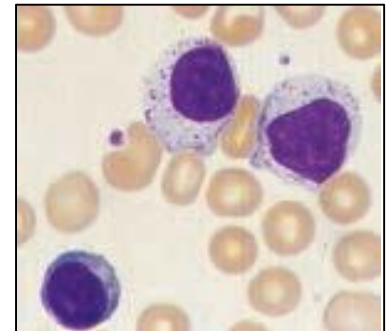


Figura 5 – Linfócitos (1).

A nível microscópico, os diferentes tipos de linfócitos são indistinguíveis uns dos outros. A maioria destas células apresenta baixo volume celular, com um rebordo fino de citoplasma, e contém ocasionalmente na sua composição grânulos azurófilos pequenos e escassos (Figura 5). Os núcleos são normalmente uniformes em tamanho e são compostos por cromatina

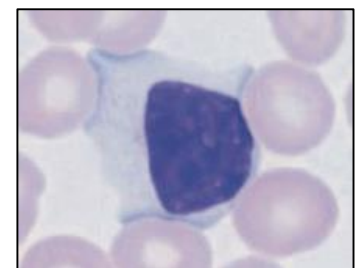


Figura 6 – Linfócito Atípico (4).

homogénea com alguma aglomeração na periferia celular. Alguns dos linfócitos circulantes apresentam dimensões superiores, com citoplasma azul pálido mais abundante e grânulos azurófilos mais predominantes. Os plasmócitos estão normalmente presentes na medula óssea e são raros no sangue periférico. A sua presença no sangue periférico pode estar associada a infecções severas ou mieloma múltiplo (1,4).

O aumento da contagem de linfócitos (linfocitose) é mais frequente em lactentes e em crianças jovens e está associada a infecções que produzem reação neutrófila em adultos. As infecções virais são as mais comuns, particularmente as infecções pelo EBV (mononucleose infecciosa) e pelo CMV (1,5). Nestas infecções verifica-se a presença de numerosos linfócitos atípicos (Figura 6), caracterizados por núcleos ligeiramente maiores e irregulares, com cromatina menos uniforme, e citoplasma muito abundante e basófilo na periferia, que tende a

espalhar-se em torno dos eritrócitos nos esfregaços de sangue periférico (1). A ocorrência dos linfócitos atípicos pode também estar associada à administração de determinados fármacos. Para além de infeções, níveis elevados de linfócitos também são encontrados em leucemias linfoides crónicas, leucemias linfoblásticas agudas e em alguns linfomas (5). A deficiência em linfócitos (linfopenia) pode ocorrer em insuficiências graves da medula óssea, no tratamento com glucocorticoides ou outros imunossupressores, em linfomas (linfoma de Hodgkin avançado), em síndromes de imunodeficiência (infeção pelo HIV) e após irradiação sistémica (3).

B.3.2.3. Monócitos

Os monócitos (Figura 7) são, em média, os leucócitos com maior volume celular presentes no sangue periférico. Estas células apresentam núcleos grandes, centrais, ovais ou endentados, e com cromatina aglomerada. O citoplasma é abundante, com cor azulada, e contém pequenos vacúolos. Os grânulos citoplasmáticos estão também normalmente presentes (1,4). A principal função destas células é a defesa contra microrganismos e outras partículas



Figura 7 – Monócito (1).

estranhas, sendo o mecanismo mais utilizado a fagocitose (3). Nos tecidos estas células transformam-se em macrófagos, um dos principais fagócitos do organismo.

O aumento da contagem de monócitos (monocitose) está associado a determinadas doenças infecciosas e inflamatórias crónicas, incluindo doenças autoimunes do tecido conjuntivo, e a neutropenia crónica (3). A monocitose pode também estar associada a leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocítica crónica e a outras neoplasias malignas (1,5). Os níveis baixos de monócitos (monopenia) podem resultar da ação imunossupressora dos glucocorticoides, de agentes quimioterápicos, certos tipos de leucemia e síndromes mielodisplásicas (2).

B.3.2.4. Eosinófilos

Os eosinófilos (Figura 8) são morfológicamente semelhantes aos neutrófilos mas apresentam grânulos citoplasmáticos maiores (maior intensidade na coloração citoquímica), que demonstram coloração vermelho-alaranjada intensa devido à sua afinidade para corantes ácidos como a eosina, e têm normalmente três ou menos lóbulos nucleares. A sua principal função consiste na regulação das respostas alérgicas e na sua ação citotóxica contra parasitas (3,4).

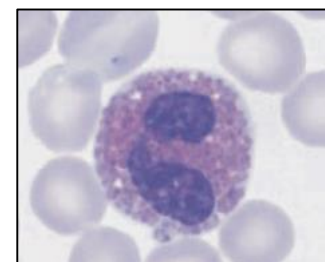


Figura 8 – Eosinófilo (4).

O aumento significativo na contagem de eosinófilos (eosinofilia) está principalmente associado à ocorrência de infecções parasitárias e de reações alérgicas (incluindo hipersensibilidade a fármacos), mas pode também resultar de determinadas doenças autoimunes, leucemia mieloide aguda/crônica e síndrome hipereosinofílica (eosinofilia crônica idiopática) (4,5). A diminuição do número de eosinófilos (eosinopenia) ocorre por ação imunossupressora prolongada dos glucocorticoides (1,2).

B.3.2.5. Basófilos

Os basófilos (Figura 9) são os leucócitos presentes em menor quantidade no sangue periférico. O seu citoplasma apresenta numerosos grânulos grosseiros, com cor azulada devido à sua afinidade com corantes básicos, que cobrem o núcleo multissegmentado da célula (3,4). A principal função dos basófilos e dos seus equivalentes a nível dos tecidos (mastócitos) consiste na

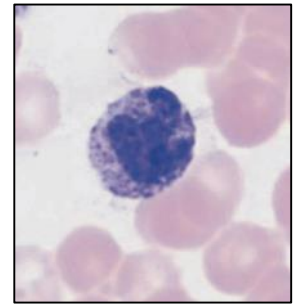


Figura 9 – Basófilo (4).

regulação das reações alérgicas e inflamatórias através da sua desgranulação, com libertação de histamina e heparina, principalmente (3).

De modo a aumentar a sensibilidade na determinação dos basófilos, a sua contagem é realizada na câmara BASO com a adição de um reagente responsável pela lise das membranas dos restantes leucócitos. Após adição do reagente, a contagem é feita com base na

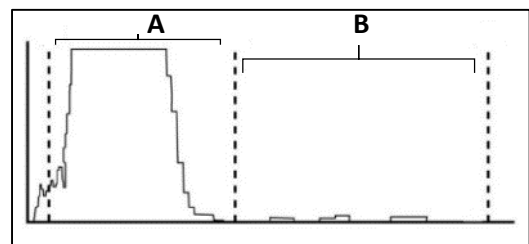


Figura 10 – Histograma dos basófilos (A: núcleos dos leucócitos lisados; B: Basófilos)

impedância elétrica com limiares estabelecidos para o volume celular (Figura 10). Os limiares permitem a diferenciação dos basófilos com os núcleos dos leucócitos lisados, os quais são também contados nesta câmara para o cálculo da percentagem de basófilos na amostra.

O aumento significativo da contagem de basófilos (basofilia) é muito raro e está associado a doenças mieloproliferativas, em particular a leucemia mieloide crônica (3,4). Apesar do seu papel nas reações alérgicas, não se verifica uma correlação entre a sua ocorrência e o aumento do número destas células (4).

B.4. Contagem de Plaquetas

As plaquetas são os elementos de menor volume no sangue. São produzidas na medula óssea por fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, um precursor hematopoiético que atinge volumes celulares elevados através da replicação do DNA sem ocorrência de divisão nuclear ou citoplasmática (3). Estruturalmente apresentam vários tipos de grânulos

citoplasmáticos (densos, α e lisossomáticos), responsáveis pelo armazenamento de diversas proteínas e outros compostos importantes na vasoconstrição, amplificação da agregação plaquetária, estimulação da cascata de coagulação e cicatrização das lesões vasculares (3).

A contagem das plaquetas é realizada na mesma câmara dos eritrócitos através do princípio da impedância elétrica, sendo a diferenciação realizada com base num valor limite para o volume celular, que varia em função da população de micrócitos presentes na amostra (25 fL como padrão). Os resultados obtidos são expressos por número de células por litro ($n \times 10^9/L$). Este sistema permite ainda a obtenção de um histograma com a distribuição das plaquetas segundo o seu volume celular entre 2 fL e o valor limite (Figura 11).

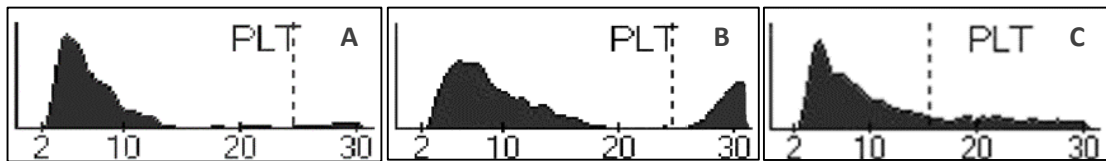


Figura 11 – Histogramas relativos à distribuição de plaquetas segundo o seu volume celular (A), na presença de micrócitos acima do limiar de volume celular (B) e na presença de agregados plaquetários distribuídos acima do limiar aplicado (C).

A contagem de plaquetas diminuída (trombocitopenia) está associada ao aumento de risco de sangramento anormal e prolongado. A principal causa da trombocitopenia é a diminuição da produção de plaquetas resultante de insuficiência da medula óssea (fármacos, infeções virais e, menos frequentemente, leucemias) (2,6). A trombocitopenia pode também resultar do aumento do consumo/destruição de plaquetas por processos autoimunes (purpura trombocitopénica idiopática), determinados fármacos ou infeções (síndrome hemolítico-urémico por *E. coli*), púrpura pós-transfusional, coagulação intravascular disseminada, purpura trombocitopénica trombótica e esplenomegalia (2,6). Nos casos de trombocitopenia é importante a preparação de um esfregaço de sangue periférico para distinguir uma verdadeira trombocitopenia com o consumo de plaquetas por formação de agregados plaquetários, os quais podem ser evidenciados pelos histogramas produzidos pelo equipamento (Figura 11).

O aumento da contagem de plaquetas (trombocitose) está associado ao aumento do risco de formação de trombos no interior dos vasos sanguíneos, podendo levar à obstrução do fluxo do sangue (trombose isquémica). A trombocitose resulta do aumento da produção de plaquetas na medula óssea e pode ser de origem primária, como na disfunção da medula óssea observada na trombocitemia essencial e em outras doenças mieloproliferativas, ou de origem secundária (trombocitose reativa), que pode estar associada a hemorragia, infeção, inflamação, cirurgia, trauma, esplenectomia, diminuição da função do baço, entre outras causas (7).

B.5. Contagem de Reticulócitos

Os reticulócitos são as formas imaturas dos eritrócitos formadas na medula óssea durante o processo de maturação eritropoética. A sua produção é estimulada pela eritropoietina, sintetizada pelo tecido renal, e é essencial para a reposição fisiológica dos eritrócitos a partir dos seus precursores mielóides.

Os reticulócitos são células anucleadas com RNA ribossômico citoplasmático e capacidade de síntese da hemoglobina. Embora normalmente presentes na medula óssea, estas células podem também circular em pequena quantidade no sangue. Nos esfregaços de sangue periférico são distinguidos dos eritrócitos pela presença de granulações basófilas citoplasmáticas típicas (RNA ribossômico) através da coloração supravital com o azul brilhante de Cresil ou com o azul-de-metileno novo (Figura 12)

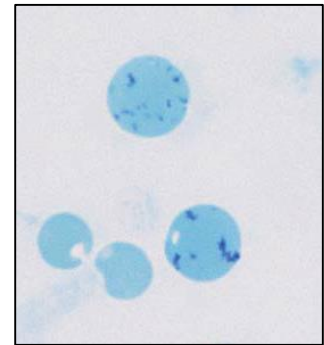


Figura 12 – Reticulócitos na coloração supravital (4).

(4). Em média apresentam volume celular ligeiramente superior ao dos eritrócitos, podendo evidenciar macrocitose e aumento do RDW quando aumentados na circulação sanguínea. Em colorações do tipo Romanowsky, a presença de reticulócitos permite a observação de várias colorações a nível das células (policromasia) (3).

No equipamento utilizado, a contagem de reticulócitos é iniciada na câmara LMNE/RET onde é adicionado um reagente constituído por um corante fluorescente capaz de atravessar as membranas celulares e fixar as moléculas de ácido ribonucleico. A amostra é transferida posteriormente para o sistema ótico do equipamento, por onde há emissão de um laser. A classificação das células é feita com base na quantidade de ácido ribonucleico presente no seu citoplasma, que é proporcional à dispersão da luz do laser e à emissão da fluorescência a determinado comprimento de onda. À semelhança dos restantes elementos da amostra, a contagem das células e a determinação do volume celular é realizada por medição da impedância elétrica.

A matriz dos reticulócitos (Figura 13) é gerada a partir dos dados relativos à impedância elétrica (eixo dos XX) e à emissão de fluorescência (eixo dos YY). As células maduras sem RNA (eritrócitos) demonstram pouco ou nenhum sinal fluorescente, ficando localizadas na seção inferior da matriz. Os reticulócitos diferenciam-se pela emissão de fluorescência acima dos limites estabelecidos pelo equipamento. No topo da matriz encontram-se situadas as células mais imaturas e com maior

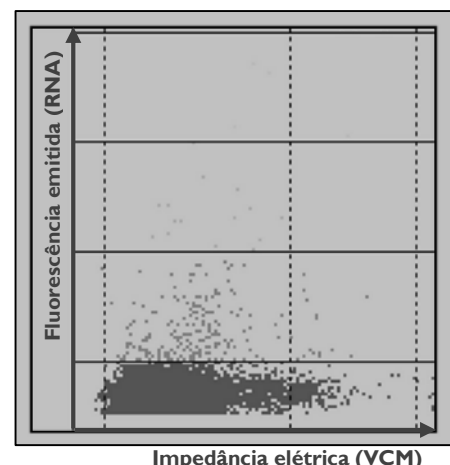


Figura 13 – Matriz dos reticulócitos

quantidade de RNA (maior fluorescência emitida), que podem incluir os precursores eritroides nucleados. Os resultados da contagem de reticulócitos são fornecidos em percentagem relativamente ao número de eritrócitos maduros.

O número de reticulócitos no sangue periférico é indicador da capacidade da medula óssea tanto na reposição fisiológica contínua dos níveis de eritrócitos como na compensação da sua perda resultante de determinadas condições fisiológicas. Deste modo, a diminuição do número de reticulócitos (reticulocitopenia) está associada à diminuição na eficácia da eritropoiese e pode resultar de aplasia medular, anemias por deficiência em nutrientes essenciais à eritropoiese e anemia das doenças crónicas (deficiência em eritropoietina) (2,3). O aumento da contagem de reticulócitos (reticulocitose) verifica-se quando a eritropoiese é eficaz na resposta a diversas condições patológicas, incluindo anemias hemolíticas, anemia pós-hemorragica, início das anemias por deficiência em nutrientes essenciais à eritropoiese e infiltração da medula óssea (2,3). A reticulocitose é também observada durante a gravidez e no recém-nascido.

B.6. Esfregaço de sangue periférico

Na seção da Hematologia, as técnicas manuais realizadas mais frequentemente na rotina resumem-se à preparação de esfregaços de sangue periférico, os quais são posteriormente corados pela técnica de Wright (Anexo C). Para além destas preparações, é também realizada a preparação de esfregaços de medula óssea, sendo a sua coloração executada pela técnica de May-Grünwald Giemsa (Anexo D) e de Perls (Anexo E). A preparação de um esfregaço de sangue periférico é realizada sempre que requisitada pelo clínico ou em situações em que os resultados fornecidos pelos contadores de células sejam questionáveis ou incompatíveis com a informação clínica disponível. De um modo geral, a observação de um esfregaço de sangue periférico consiste na avaliação dos três grandes grupos de células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) em termos qualitativos e quantitativos.

O estudo dos eritrócitos incide principalmente na sua classificação qualitativa, incluindo as variações de volume (macrocitose, microcitose e anisocitose), cor (hipocromia, policromasia) e a presença de células com morfologia anormal (poiquilócitos) ou de inclusões eritrocitárias. A observação do volume e cor dos eritrócitos permite avaliar os índices eritrocitários calculados pelos analisadores e é particularmente útil no estudo das anemias. A presença de células morfológicamente anormais ou de inclusões eritrocitárias pode ser sugestiva de determinadas patologias associadas a estas alterações celulares.

O estudo das plaquetas consiste na avaliação de alterações morfológicas e numéricas e é particularmente útil nos casos em que é necessário distinguir entre uma verdadeira trombocitopenia e a presença de agregados plaquetários (Figura 14).

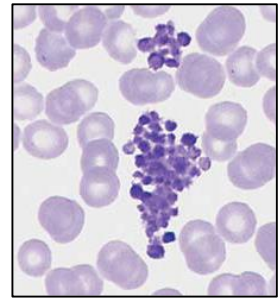


Figura 14 – Agregados plaquetários (4).

Para além do estudo morfológico, a observação dos leucócitos incide na sua avaliação quantitativa, realizada nas situações em que os contadores de células são incapazes de determinar corretamente o diferencial leucocitário. Nestes casos é feita a contagem manual de 100 leucócitos presentes no esfregaço, é calculada a percentagem de cada tipo de célula e é obtida a sua contagem absoluta a partir do valor de leucócitos totais fornecido pelo auto-analisador e das percentagens calculadas através da contagem manual.

Ocasionalmente, os equipamentos poderão acusar a presença de leucócitos imaturos, devendo a sua presença ser confirmada e referida no relatório de resultados, em conjunto com a sua identificação possível. Inclusivamente, a presença de precursores eritroides poderá ser um elemento interferente na determinação do diferencial leucocitário, em particular dos linfócitos. Nestes casos deve ser efetuada a correção do valor total e diferencial destas células através da contagem de 100 leucócitos, em simultâneo com a contagem de eritroblastos. A proporção de leucócitos em função de eritroblastos permite a correção do valor de leucócitos totais fornecido pelo equipamento, que corresponde na realidade ao total de células nucleadas. O diferencial leucocitário é calculado a partir do valor total corrigido e das percentagens para cada tipo de célula obtidas através da contagem manual dos leucócitos.

C. Determinação das Populações Linfocitárias

A imunofenotipagem engloba o conjunto de técnicas que permitem a caracterização de populações celulares através da utilização de anticorpos monoclonais na deteção de proteínas expressas especificamente por diferentes tipos de células (1). A técnica normalmente utilizada para esta finalidade é a citometria de fluxo, cuja principal aplicação na área da hematologia é a classificação das populações leucocitárias, e dos seus precursores hematopoiéticos, no diagnóstico e monitorização de leucemias agudas e crónicas.

Na seção de Hematologia, a citometria de fluxo é utilizada exclusivamente na avaliação da progressão da infeção pelo HIV, e na monitorização do seu tratamento, através da determinação qualitativa e quantitativa dos diferentes linfócitos no sangue periférico, em particular dos linfócitos T de ajuda (CD4+) e os linfócitos T citotóxicos (CD8+).

C.1. Beckman Coulter Cytomics® FC500

O Cytomics FC500® permite a classificação dos diferentes tipos de linfócitos através da informação obtida por dois métodos: a detecção da luz dispersada pela passagem das células em suspensão alinhadas uma a uma num fluxo laminar, e a detecção da fluorescência emitida por fluorocromos conjugados com anticorpos monoclonais específicos para diferentes marcadores celulares.

O sistema ótico do equipamento é constituído por um laser de árgon azul, emitido a um comprimento de onda específico (488 nm), que sofre dois tipos de dispersão ao atravessar as células em suspensão na câmara de fluxo: a dispersão frontal (FS) e a dispersão lateral (SS). A FS e a SS fornecem a informação relativa ao volume e à complexidade das partículas, respetivamente, permitindo a classificação das células com base na sua distribuição numa matriz com regiões pré-programadas a partir de valores limite para a FS e a SS (Figura 15). A luz dispersa é captada por dois detetores diferentes que convertem o sinal luminoso em sinal elétrico: o detetor frontal para a FS e o detetor lateral (a 90° do feixe emitido) para a SS.

Para a classificação dos linfócitos nos seus diferentes subtipos, o equipamento recorre à captação da fluorescência emitida por fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais específicos para marcadores celulares dos linfócitos (Tabela 5). Os vários marcadores celulares estudados são identificados através da utilização de quatro fluorocromos diferentes. A fluorescência emitida é captada a 90° do feixe luminoso emitido e os sinais dos fluorocromos diferenciados por um sistema de filtros que refletem a luz a comprimentos de onda específicos para os detetores indicados. Cada amostra é ensaiada em duplicado com diferentes combinações anticorpos conjugados com os quatro fluorocromos utilizados, de modo a permitir a pesquisa de todos os marcadores celulares (Tabela 5).

Tabela 5 – Marcadores celulares e valores de referência utilizados na determinação das populações linfocitárias.

Células determinadas	Marcadores celulares	Valores de referência	
		(%)	(Células/ μ L)
Linfócitos T	CD3+	55-84	690-2540
Linfócitos T de ajuda (CD4)	CD3+ CD8+	13-41	190-1140
Linfócitos T citotóxicos (CD8)	CD3+ CD4+	31-60	410-1590
Células NK	CD16+ CD56+	5-27	90-590
Linfócitos B	CD19+	6-25	90-660

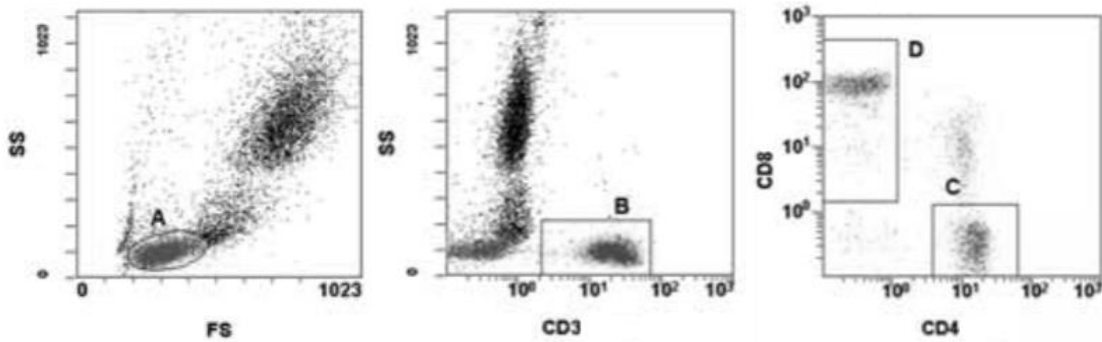


Figura 15 – Matrizes obtidas por citometria de fluxo na contagem de (A) linfócitos totais, recorrendo a valores limite estabelecidos para a FS e a SS, (B) linfócitos T, recorrendo a valores limite para a SS e o final de fluorescência relativo ao CD3 e (C) linfócitos T de ajuda e (D) citotóxicos, recorrendo a valores limite para os sinais de fluorescência para o CD4 e o CD8.

C.2. Avaliação dos Linfócitos T na infecção pelo HIV

Durante a infecção aguda pelo HIV o vírus replica-se a uma taxa elevada, persistindo a nível dos órgãos linfoides apesar da indução da proliferação de linfócitos T de ajuda e linfócitos T citotóxicos. Como resultado, verifica-se o aumento inicial da contagem de linfócitos T associada à persistência do vírus e à indução do sistema imunológico.

Na fase crónica e assintomática da doença, embora o sistema imunitário esteja continuamente a ser estimulado face à exposição repetitiva aos antígenos virais, a presença de um ambiente de citocinas alterado induz a expressão de ativadores da morte celular programada dos linfócitos T como mecanismo de defesa à infecção viral (8). Consequentemente verifica-se a diminuição gradual das contagens de linfócitos T com progressão para o estado de imunodeficiência crónica e estabelecimento da SIDA na fase tardia da infecção.

Na terapia antirretroviral de elevada eficácia (HAART), a replicação viral é suprimida, resultando na diminuição da indução do sistema imunitário e no aumento da sobrevivência dos linfócitos T (8). Deste modo, a contagem dos linfócitos T, associada à determinação da carga viral do HIV pelos métodos de biologia molecular, é útil na monitorização da infecção pelo vírus e na avaliação periódica da eficácia da terapêutica.

D. Coagulação Sanguínea

A hemóstase engloba os processos envolvidos na manutenção do sangue no estado fluido e confinado ao sistema vascular, sendo particularmente importante nas lesões vasculares através da paragem rápida da hemorragia, limitação da resposta hemostática ao local da lesão e paragem do processo quando este já não é necessário. De um modo geral, a hemóstase pode ser resumida no equilíbrio entre fatores anticoagulantes e fatores pro-coagulantes, estando as patológicas da hemóstase associadas ao desequilíbrio no sentido dos fatores

anticoagulantes (tendência hemorrágica) ou dos fatores pró-coagulantes (tendência trombótica). Os principais componentes envolvidos na hemóstase são as plaquetas, os fatores da coagulação, os inibidores da coagulação, os componentes do mecanismo fibrinolítico e os vasos sanguíneos. Na seção da Hematologia, a avaliação das disfunções da hemóstase incidem na contagem das plaquetas nos hemogramas, e à sua observação nos esfregaços de sangue periférico, e nas provas que avaliam a cascata da coagulação.

De um modo geral, a cascata de coagulação consiste na sequência de reações enzimáticas que resultam na formação do coágulo de fibrina (hemóstase secundária) responsável pela estabilização dos agregados plaquetários formados durante a hemóstase primária. Embora a este processo seja muito complexo, *in vitro* a cascata da coagulação pode ser iniciada pela adição, em conjunto com fosfolípidos e Ca^{2+} , do fator tecidual ou de uma superfície de contacto (originalmente o caulino), que provocam a ativação da via extrínseca e da via intrínseca, respetivamente (1). Posteriormente, ocorre a ativação sucessiva de fatores da coagulação, que culmina numa via comum da cascata e na geração da trombina a partir da protrombina. A trombina é responsável pela conversão do fibrinogénio solúvel em moléculas de fibrina que insolubilizam com a sua polimerização nos agregados de plaquetas. Todo este processo é controlado principalmente pelos inibidores da cascata de coagulação, que atuam através da inibição/degradação dos fatores da coagulação, e o pelo sistema fibrinolítico, através da degradação da fibrina (3).

Na seção da Hematologia as provas da coagulação consistem na determinação dos tempos de coagulação, que avaliam a eficácia da via extrínseca e da via intrínseca, e na quantificação do fibrinogénio, de produtos de degradação da fibrina e de inibidores da cascata da coagulação. Os valores de referência utilizados na interpretação dos resultados encontram-se disponíveis no Anexo F. Os valores para a Proteína C, Proteína S e Anti-trombina encontram-se expressos em percentagem em relação à calibração com plasma humano de referência para estes ensaios.

D.1. Siemens BCS®

O BCS® é o analisador responsável pela realização das provas da coagulação na seção da Hematologia. Este equipamento permite a automatização de todos os passos envolvidos para cada ensaio específico, incluindo a pipetagem das amostras e dos reagentes para rotores próprios que contêm as cuvetes onde se processam as reações, incubação das misturas de reação a 37°C e de acordo com o ensaio a realizar e a leitura dos resultados por turbidimetria ou fotometria, dependendo do método.

O equipamento efetua as determinações através de três princípios diferentes. Nas reações que envolvem a determinação de tempos de coagulação, o aparelho mede o tempo que

decorre até à formação do coágulo de fibrina, o qual é detetado através do aumento da turvação, que por sua vez é quantificado pela diminuição da luz emitida através da mistura de reação até um detetor (fotómetro). Este método é aplicado à determinação do TP, do TPPa e do Fibrinogénio Clauss.

Os métodos cromogénicos consistem na adição de substratos que reagem especificamente com os analitos em estudo de modo a formarem produtos corados. A formação destes produtos resulta no aumento da absorvância a determinado comprimento de onda (405 nm), o qual é lido e correlacionado com as curvas de calibração de modo a extrapolar a quantidade do analito na amostra. Estes métodos são utilizados na determinação da Proteína C e da AT.

Os métodos imunoturbidimétricos recorrem a reagentes com anticorpos monoclonais específicos aos analitos em estudo e ligados a partículas de látex. As ligações específicas antígeno-anticorpo formadas originam agregados que conferem o aumento da turvação da mistura de reação, a qual é quantificada pelo método turbidimétrico semelhante ao descrito anteriormente. Estes métodos são aplicados na determinação dos D-dímeros e da Proteína S.

D.2. Tempo de Protrombina

O ensaio do TP consiste na medição do tempo de formação do coágulo de fibrina após a adição de concentrações ótimas de cálcio (CaCl_2) e de tromboplastina (fator tecidual e fosfolípidos). O TP avalia a eficácia global da via extrínseca da coagulação e está dependente dos fatores II (protrombina), V, VII e X e da concentração de fibrinogénio no plasma (I). Uma vez que a aplicação de tromboplastinas de diferentes sensibilidades está associada a uma grande variabilidade nos resultados obtidos entre laboratórios, o TP é normalmente interpretado em conjunto com o cálculo do INR:

$$INR = \left(\frac{TP (doente)}{TP (controlo)} \right)^{ISI}$$

No cálculo do INR, o TP controlo corresponde ao valor médio calculado para uma população não sujeita a terapia com anticoagulantes orais. O ISI é um valor associado à tromboplastina utilizada e é obtido através da calibração do reagente com a tromboplastina de referência internacional. A utilização do INR permite a uniformização dos resultados para o TP entre qualquer laboratório no mundo, independentemente dos reagentes utilizados para a sua determinação.

A principal utilidade da determinação do TP e do INR incide na monitorização da terapia com anticoagulantes orais (antagonistas da vitamina K), uma vez que se verifica o prolongamento do tempo de coagulação com a toma destes fármacos (I). Os valores do TP encontram-se também aumentados na doença hepática e deficiência em vitamina K (diminuição

da síntese dos fatores da coagulação), coagulação intravascular disseminada e deficiência congénita ou adquirida dos fatores II, V, VII e X. O aumento isolado do TP implica uma deficiência só do fator VII, visto que nas deficiências dos restantes fatores também se verifica o aumento da TTPa (1,9).

D.3. Tempo de Tromboplastina Parcial ativado

O TTPa é determinado através da medição do tempo de formação do coágulo de fibrina após a ativação da cascata da coagulação por adição de um ativador de superfície (ácido elágico), fosfolípidos (tromboplastina parcial) e cálcio (CaCl_2). Este teste é indicador da eficácia global da via intrínseca da coagulação, uma vez que esta é ativada na ausência do fator tecidual e por uma superfície de contacto, e está dependente dos fatores II, V, VIII, IX e X e da concentração de fibrinogénio no plasma (1).

A determinação do TTPa é útil na monitorização de doentes sujeitos à terapia com heparina clássica (não fracionada), visto que se verifica o aumento dos valores com a sua administração (1). Os valores aumentados para o TTPa estão também associados a coagulação intravascular disseminada, doença hepática, presença de anticoagulantes circundantes (imunoglobulinas) e deficiência em fatores da coagulação para além do fator VII (1,9). Os seus valores podem estar moderadamente elevados em doentes sujeitos à terapia com anticoagulantes orais e na deficiência em vitamina K. A determinação do TTPa é também útil na pesquisa do anticoagulante lúpico, um autoanticorpo com ação pro-trombótica no organismo que é responsável pela inibição da coagulação *in vitro* (1,9).

D.4. Fibrinogénio

A determinação do fibrinogénio pode ser efetuada por dois métodos diferentes. O fibrinogénio derivado corresponde a uma estimativa fornecida pelo equipamento relativamente à concentração de fibrinogénio calculada a partir do TP. Este método tem menor exatidão na presença de determinadas condições patológicas e em doentes com tempos de coagulação prolongados, sendo utilizado o método de Clauss modificado para estes casos. O método de Clauss modificado permite a determinação do fibrinogénio através da medição do tempo de coagulação corrigido por adição de trombina em excesso, de modo a garantir que o tempo de coagulação seja independente da sua presença na amostra, e da diluição do plasma, para evitar a interferência de potenciais inibidores da coagulação presentes (produtos de degradação da fibrina e heparina).

As concentrações baixas de fibrinogénio estão associadas às deficiências congénitas e adquiridas, à terapia com fibrinolíticos e à presença de produtos de degradação do fibrinogénio

(1). As causas mais comuns das deficiências adquiridas incluem o consumo aumentado do fibrinogénio (coagulação intravascular disseminada) e a diminuição da sua síntese nas doenças hepáticas agudas e crónicas (2). Os valores elevados de fibrinogénio são geralmente resultado do seu papel como proteína de fase aguda, podendo o seu aumento ser transitório (infecções, trauma, cirurgias e enfarte do miocárdio) ou persistente (neoplasias e doenças inflamatórias crónicas). As concentrações elevadas de fibrinogénio observam-se também com o aumento da idade e são consideradas um fator de risco de doença cardiovascular.

D.5. D-dímeros

A ativação do sistema fibrinolítico é uma resposta hemostática fisiológica à lesão vascular e ocorre em paralelo com a ativação da cascata da coagulação. Embora este sistema envolva a interação entre diversos componentes, tanto ativadores como inibidores, a fibrinólise está principalmente centrada na ação da plasmina (3). A plasmina é uma enzima plasmática ativada por proteólise a partir do seu precursor inativo, o plasminogénio, e é responsável pela clivagem da fibrina em vários fragmentos de degradação, sendo os de menores dimensões designados como domínios D e E. Os D-dímeros correspondem aos menores fragmentos obtidos após a degradação da fibrina nos quais foi conservada a ligação transversal que ocorre entre os domínios D da estrutura do coágulo (2).

Para a determinação dos D-dímeros é utilizado o método imunoturbidimétrico. Neste ensaio o reagente adicionado é composto por partículas de polistireno revestidas com anticorpos monoclonais específicos para os D-dímeros. A formação de imunocomplexos entre os anticorpos e o analito é facilitada pela ocorrência em duplicado dos epítomos antigénicos (conferida pela simetria estrutural da molécula a nível das ligações transversais), o que implica que apenas seja necessário um anticorpo para que ocorra agregação. A extensão da formação de imunocomplexos é determinada através do aumento da turvação e é diretamente proporcional à concentração de D-dímeros na amostra.

A concentração de D-dímeros é considerada um indicador da atividade da coagulação e da fibrinólise, verificando-se o seu aumento em condições associadas com a ativação da cascata, incluindo tromboembolismo venoso, coagulação intravascular disseminada, enfarte do miocárdio, neoplasias malignas, intervenções cirúrgicas e trauma (1,2). A determinação dos D-dímeros é particularmente útil na exclusão de fenómenos tromboembólicos, embora não seja considerado um teste específico para estes casos (1).

D.6. Proteína C e Proteína S

A Proteína C e a Proteína S são proteínas plasmáticas produzidas pelo fígado, através de mecanismos dependentes da vitamina K, que atuam a nível da inibição da cascata da coagulação. A PC é sintetizada como zimogénio, sendo convertida na sua forma ativa por ação da trombina por um processo catalisado pela trombomodulina do endotélio vascular. Na presença de Ca^{2+} , a PS forma um complexo com a PC, que se liga posteriormente a superfícies fosfolipídicas e inibe a cascata da coagulação por degradação dos fatores Va e VIIIa (3,10).

No ensaio utilizado, a PC é determinada na sua forma ativa através de um método cromogénico. Por este método, a PC é inicialmente ativada por um ativador específico de veneno da serpente *Agkistrodon contortrix*. A proteína ativada é quantificada por adição de um substrato cromogénico (ácido piroglutâmico-prolina-arginina-metoxi-nitroanilida), que induz o aumento da absorvância a 405 nm, proporcional à quantidade de PC ativada na amostra.

A quantificação da PC é utilizada no rastreio de deficiências hereditárias e adquiridas desta proteína, as quais estão associadas a risco aumentado de tromboembolismo. As deficiências congénitas podem resultar em doença heterozigótica, caracterizada pela incidência de tromboes venosas dependente da idade, ou em doença homozigótica, associada a manifestações trombóticas graves após o nascimento. As deficiências adquiridas estão associadas à deficiência em vitamina K (absorção diminuída e terapia com anticoagulantes orais), coagulação intravascular disseminada, septicémia, doença hepática, doença das células falciformes e período pós-operatório (1,10).

Para a determinação da PS o método utilizado é baseado no princípio imunoturbidimétrico, que quantifica a fração livre da proteína na amostra. Ao dosear apenas a fração livre são eliminadas as interferências associadas às variações na proteína de transporte da PS (C4bBP). O método consiste na adição de partículas de polistireno revestidas com dois tipos de anticorpos monoclonais específicos para a PS. O grau de formação de imunocomplexos entre o reagente e a PS é diretamente proporcional à concentração de PS livre na amostra, e é detetado pelo aumento da turvação da amostra.

À semelhança da PC, a determinação da PS é utilizada no rastreio de deficiências congénitas ou adquiridas, as quais estão associadas a risco aumentado de tromboembolismo venoso. As deficiências homozigóticas são as mais raras e estão associadas a púrpura fulminante em recém-nascidos. As deficiências adquiridas são mais comuns do que as congénitas e estão principalmente associadas à diminuição da produção da PS na doença hepática e na terapia com anticoagulantes orais (1,2). As deficiências adquiridas podem também estar presentes na síndrome nefrótica, gravidez, toma de contraceptivos orais, infeções virais e coagulação intravascular disseminada (2).

D.7. Anti-trombina

A AT é o principal inibidor fisiológico da trombina e dos fatores IXa, Xa e XIa, através da formação irreversível de complexos inativos com estas enzimas por um processo fortemente catalisado pela heparina (3,11).

A determinação da AT é realizada pelo método cromogénico. No ensaio utilizado, a AT da amostra reage com a trombina adicionada em excesso e na presença da heparina para catalisar a reação. A fração da trombina do reagente que não foi inativada pela AT da amostra é determinada através da adição de um substrato cromogénico, o Tosilglicil-L-prolil-L-arginil-5-amino-2-ácido nitrobenzóico-isopropilamido. O produto corado formado é medido por leitura do aumento da absorvância a 408 nm e é proporcional à concentração de trombina não inativada após a reação anterior, que por sua vez permite o cálculo da concentração da AT presente na amostra.

A determinação da AT é utilizada no rastreio de deficiências hereditárias e adquiridas desta proteína, as quais estão associadas a risco aumentado de trombose venosa. As deficiências adquiridas são mais comuns e ocorrem principalmente no consumo aumentado da AT (processos trombóticos, cirurgias e doença intravascular disseminada), na diminuição da sua síntese após lesão hepática (hepatite, intoxicação por fármacos e alcoolismo), na síndrome nefrótica e na toma de contraceptivos orais (2,11).

E. Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) é um parâmetro que permite caracterizar a velocidade a que os eritrócitos sedimentam no plasma sanguíneo e é realizado através da medição da altura do sedimento eritrocitário, em relação à do plasma, após a incubação das amostras, previamente homogeneizadas, durante uma hora à temperatura ambiente e numa superfície estável.

E.1. Sarstedt Sediplus® S2000

O Sediplus® S2000 é o equipamento utilizado na determinação automatizada da VS. Este analisador recorre ao método de *Westergren* modificado através da utilização de tubos de colheita com formato alterado em relação ao método clássico. Após a homogeneização adequada das amostras, os tubos são colocados no equipamento, que os mantém estabilizados numa superfície plana, na posição vertical e à temperatura ambiente. O nível do sedimento eritrocitário é lido no início do ensaio e após 30 e 60 minutos, através do movimento de um sensor ótico (infravermelhos) ao longo dos tubos. A leitura dos resultados é realizada

manualmente nos casos em que o equipamento é incapaz de efetuar uma leitura adequada (interferência das etiquetas dos tubos na leitura ótica), recorrendo a um suporte com uma graduação específica para os tubos utilizados. Quando o volume da amostra é reduzido são utilizados tubos graduados de *Westergren*, que requerem menor quantidade de amostra, sendo o ensaio realizado manualmente nas condições adequadas.

E.2. Interpretação da Velocidade de Sedimentação

A VS é principalmente afetada pela extensão da formação de *rouleaux* eritrocitário, que sedimenta mais facilmente do que as células isoladas (1). O aumento da formação de *rouleaux* está principalmente associado com a elevação da concentração plasmática das proteínas de fase aguda, em particular o fibrinogénio e as imunoglobulinas (2). O aumento destas proteínas é responsável pela diminuição das forças de repulsão entre os eritrócitos, conferidas pelas cargas negativas das membranas eritrocitárias. Ao contrário destas proteínas, o aumento da concentração plasmática da albumina resulta na diminuição da VS (1).

A determinação da VS é um ensaio muito inespecífico, uma vez que o seu aumento pode estar associado a diversas doenças inflamatórias sistémicas, incluindo doenças autoimunes como a artrite reumatoide e o lúpus eritematoso sistémico, nas quais se verifica um aumento das proteínas de fase aguda (1,2). A principal utilidade da avaliação da VS consiste na monitorização da progressão de doenças inflamatórias e do seu tratamento.

Para além das doenças inflamatórias, a VS encontra-se aumentada na tuberculose, bem como em outras doenças de natureza infecciosa, no linfoma de Hodgkin, no mieloma múltiplo e em diversas neoplasias (1,2). Na ausência de inflamação, a VS é também influenciada pela concentração de eritrócitos no plasma, encontrando-se diminuída em concentrações altas (eritrocitose) e aumentada em concentrações baixas (anemias graves) (1). Fisiologicamente, as elevações da VS podem ser observadas na gravidez e com o aumento da idade. Os limites de referência utilizados na seção da Hematologia para a interpretação da VS após uma hora são 15 e 20 mm para o sexo masculino e feminino, respetivamente.

F. Determinação de Hemoglobinas Específicas

A hemoglobina humana é formada por dois pares de cadeias proteicas, cada uma delas ligada a um grupo heme. No início da fase embrionária, as principais cadeias de globina da fase adulta não são expressas, sendo produzidas as hemoglobinas transitórias Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Portland ($\zeta_2\gamma_2$) e, posteriormente, a Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$), após a ativação da expressão da α -globina. No feto, a forma predominante é a Hb F ($\alpha_2\gamma_2$), mantendo-se até cerca de 3-6 meses após o

nascimento, altura em que a expressão da γ -globina é substituída pela δ -globina e posteriormente pela β -globina, para a síntese da Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) e da Hb A ($\alpha_2\beta_2$), respetivamente (3). Nas crianças e nos adultos a principal hemoglobina produzida é a Hb A, sendo a Hb A₂ e a Hb F expressas em quantidades muito baixas (cerca de 2-3,3% e 0,2-1,0%, respetivamente). Esta proporção é normalmente atingida aos 6-12 meses de idade (3).

A determinação de hemoglobinas específicas é útil nos casos em que se suspeita de uma hemoglobinopatia, que pode estar associada à síntese das cadeias de globina a uma extensão inferior a que são necessárias (talassemias) ou à expressão de variantes estruturais da Hb A como resultado de mutações nos genes das globinas. Por outro lado, a determinação mais requisitada na seção da Hematologia é da Hb A_{1c}, utilizada na monitorização de doentes com diabetes. Para além deste ensaio é também realizada a determinação da Hb A₂ e da Hb F, para o rastreio de β -talassémia, e da Hb S, para o rastreio de anemia falciforme. Os valores de referência utilizados encontram-se disponíveis no Anexo G.

F.1. Bio-Rad D-10[®]

O D-10[®] é o equipamento utilizado na separação e quantificação de hemoglobinas específicas. Para a separação das hemoglobinas nas suas diferentes frações, o sistema recorre à HPLC por troca iónica, após a lise dos eritrócitos para libertar o conteúdo em hemoglobina intracelular. O analisador é composto por uma coluna cromatográfica revestida internamente por uma resina carregada negativamente que atua como fase estacionária na separação cromatográfica (troca catiónica). A carga negativa da coluna permite que, ao ser injetada a amostra, previamente diluída pelo equipamento, as moléculas carregadas positivamente fiquem retidas, sendo a interação mais forte quanto maior for a carga positiva.

Ao aplicar um gradiente crescente de solução salina, criado por duas soluções tampão de diferentes concentrações, as moléculas retidas perdem a sua interação com a coluna e são eluídas em função da sua afinidade para a resina. Com a injeção de eluente de baixa concentração, apenas as moléculas com baixa afinidade para a resina são eluídas, sendo as de alta afinidade eluídas posteriormente com o aumento da concentração da solução salina. A deteção das frações isoladas das hemoglobinas é realizada através da leitura da absorvância a 215 nm pelo

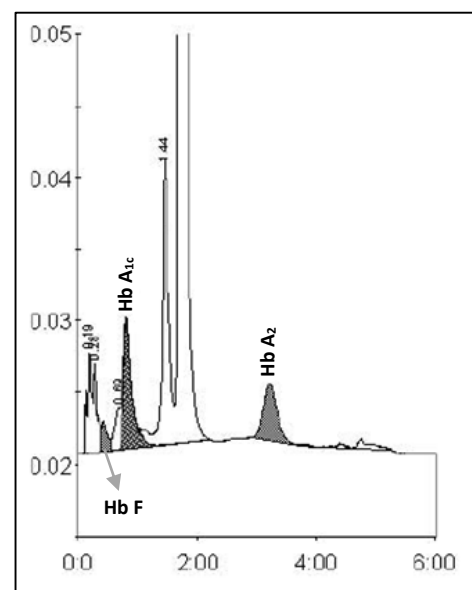


Figura 16 – Cromatograma das frações de hemoglobinas separadas (tempo de retenção vs. leitura da absorvância)

fotômetro do equipamento (Figura 16). Os resultados são expressos em porcentagem relativamente ao total de hemoglobina quantificada (Anexo G).

F.2. Hemoglobina A_{1c}

A Hb A_{1c} (hemoglobina glicada) é uma variante estrutural da Hb A formada através de uma reação não enzimática na qual a glucose se liga aos resíduos de valina N-terminais das β -globinas. Uma vez que a formação da Hb A_{1c} é irreversível, a sua concentração correlaciona-se com a concentração plasmática de glucose no sangue e, devido ao tempo de semi-vida longo dos eritrócitos (cerca de 120 dias), permite a sua avaliação a longo prazo (12). Na interpretação de resultados é importante a valorização da ocorrência de patologias associadas com a diminuição do tempo de semi-vida dos eritrócitos (anemias) visto que os valores da Hb A_{1c} serão mais baixos nestes casos.

A determinação da Hb A_{1c} é uma mais-valia tanto no diagnóstico como na monitorização da concentração plasmática da glucose em doentes diabéticos. Ao contrário das medições isoladas da glucose plasmática, a quantificação Hb A_{1c} fornece informações relativas ao controlo da glicémia e à eficácia do tratamento da diabetes dentro de um longo período de tempo antes do ensaio (cerca de 6-8 semanas), e é independente de fatores como a ingestão de alimentos, a prática de exercício físico ou mesmo das flutuações dos níveis de glucose que ocorrem durante o dia (12). A Hb A_{1c} é também um bom parâmetro na avaliação das complicações da diabetes visto que a sua formação reflete o processo de glicosilação das proteínas associado aos efeitos nefastos a nível vascular do excesso de glucose no organismo (13).

F.3. Hemoglobina A₂ e Hemoglobina F

Em condições normais, a Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) e a Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) são expressas em quantidades muito reduzidas nos adultos e em crianças após os 6-12 meses. O aumento da produção destas hemoglobinas é normalmente detetado nas β -talassemias e está associado a um mecanismo destinado a evitar a acumulação de cadeias α resultante do défice na síntese das β -globinas necessárias à produção da Hb A (3). Nas α -talassemias o défice na síntese das α -globinas afeta também a produção da Hb A₂ e da Hb F, resultando na diminuição destas hemoglobinas. Deste modo, a determinação da Hb A₂ e da Hb F é exclusivamente útil na avaliação das β -talassemias.

Devido à sua elevada heterogeneidade, a quantificação da Hb A₂ e da Hb F não permite a caracterização das β -talassémias, normalmente classificadas em menor (traço β -talassémico), intermédia e maior, de acordo com a severidade da doença e os defeitos genéticos primários envolvidos. As manifestações clínicas são extremamente variáveis, podendo demonstrar

anemia ligeira assintomática a anemia hemolítica severa dependente das transfusões, e surgem como resultado da produção inadequada da hemoglobina (anemia microcítica hipocrômica) e da acumulação desequilibrada das α -globinas (eritropoiese ineficaz com hemólise e aumento do número de reticulócitos e eritroblastos) (3). O aumento mais significativo da Hb F é normalmente observado nas formas mais graves de β -talassémia, visto que a síntese das cadeias γ favorece a eliminação do excesso de α -globinas, embora esteja dependente da capacidade do organismo em sintetizar estas cadeias (3). Nas formas mais ligeiras de β -talassémia, os níveis de Hb F estão normalmente dentro dos limites de referência ou ligeiramente aumentados.

F.4. Hemoglobina S

A Hb S é a variante estrutural resultante de mutações nos genes das globinas mais comum. A sua produção está associada à ocorrência de mutações que provocam a substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 das β -globinas (3). A Hb S apresenta baixa solubilidade na presença de baixas pressões de oxigénio, podendo polimerizar no interior dos eritrócitos e originar alterações morfológicas que tornam estas células mais rígidas e distorcidas (forma de foice). A formação de polímeros resulta ainda em alterações da membrana celular, na produção de substâncias oxidantes e adesão anormal dos eritrócitos ao endotélio vascular (1).

A deteção da presença da Hb S está associada às síndromes falciformes, que ocorrem em dois genótipos diferentes. A doença homocigótica (genótipo Hb SS) é designada por anemia falciforme e resulta em anemia moderada resultante tanto da hemólise como da afinidade diminuída da Hb S para o oxigénio. O principal aspeto clínico da anemia falciforme surge através da oclusão vascular pelas células em foice (drepanócitos) e resulta em crises agudas com eventual lesão dos órgãos afetados. Na anemia falciforme a Hb A não é detetável e a Hb F é variável (5-15%) de acordo com a severidade da doença (quantidades maiores são detetadas em doença menos severa) (3). Em doentes com anemia falciforme os esfregaços sanguíneos demonstram essencialmente a presença de eritrócitos em forma de foice, células em alvo e policromasia (Figura 17).

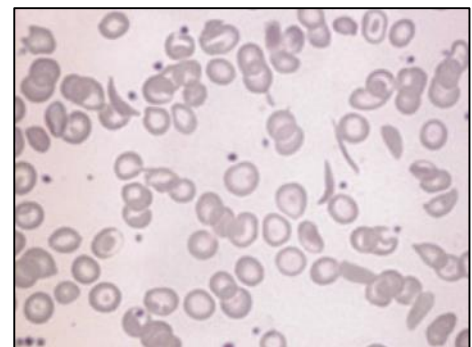


Figura 17 – Esfregaço de sangue periférico de um doente com anemia falciforme (3).

A doença heterocigótica (genótipo Hb AS), designada por traço falciforme, é benigna e não demonstra anormalidades hematológicas, embora em condições de baixa pressão de oxigénio (altitudes elevadas) se verifique a deformação dos eritrócitos em drepanócitos, com o desenvolvimento das complicações associadas (1,3). No traço de células falciformes a Hb S varia entre 25 a 45% da hemoglobina total (3).

V. IMUNOLOGIA

A. Descrição da Seção

A Imunologia é a seção do laboratório destinada principalmente a dois tipos de ensaio: a análise de proteínas no soro e na urina por eletroforese e por doseamentos específicos; e o estudo de autoanticorpos e anticorpos IgE específicos na avaliação de doenças autoimunes e reações alérgicas, respetivamente. A nível estrutural, esta seção dispõe principalmente de uma bancada com os auto-analisadores responsáveis pela eletroforese de proteínas e pela sua quantificação no soro e na urina. Esta área está também reservada à interpretação e correção dos perfis eletroforéticos, à interpretação e validação dos resultados obtidos em toda a seção e à preparação das amostras de urina destinadas aos ensaios eletroforéticos. A seção da Imunologia apresenta ainda uma área com o auto-analisador responsável pela quantificação dos autoanticorpos e anticorpos IgE específicos e uma bancada destinada à preparação manual das lâminas para os ensaios da imunofluorescência, as quais são observadas num microscópio de fluorescência localizado num compartimento isolado do resto da seção.

Para a maior parte dos ensaios realizados a amostra utilizada é o soro, obtido por colheita de sangue em tubos sem anticoagulante. Estes tubos contêm pequenas esferas, que fornecem uma elevada superfície de contacto para a ativação da coagulação, e um gel de éster poliacrílico que, dada a sua densidade, forma uma camada estável de separação entre o coágulo e o soro durante a centrifugação, permitindo desta forma a presença de uma barreira para o transporte e conservação das amostras. Para além de amostras de soro, são também utilizadas amostras de urina de 24h, destinadas aos ensaios eletroforéticos e aos doseamentos específicos de proteínas. Dada a menor periodicidade na realização de alguns ensaios, nomeadamente a pesquisa de autoanticorpos por imunofluorescência, o doseamento de autoanticorpos e anticorpos IgE específicos e a eletroforese de proteínas da urina, as amostras desta seção são frequentemente conservadas por refrigeração a 3°C até ao momento em que são utilizadas.

A.1. Controlo de Qualidade

Na seção da Imunologia o CQI é realizado apenas para os equipamentos destinados à quantificação de proteínas específicas e à quantificação de autoanticorpos e de anticorpos IgE específicos. No primeiro caso, os controlos são normalmente realizados após a mudança de um reagente do equipamento ou nas situações em que os resultados obtidos pelos ensaios sejam questionáveis. No aparelho destinado à quantificação de anticorpos, o CQI é realizado sempre em paralelo com os ensaios, estando a validação dos resultados obtidos dependente da aceitação dos resultados dos controlos. Para os dois tipos de ensaio realizados neste

analisador (autoimunidade e alergologia) é ensaiado um controlo de curva de calibração, através de sucessivas diluições da solução controlo e da comparação dos resultados obtidos para cada diluição com a informação armazenada no equipamento relativamente à curva de calibração. De modo a assegurar melhor qualidade dos ensaios da autoimunidade, os quais estão associados a maior número de interferentes, é ainda realizado um controlo positivo adicional para os anticorpos antinucleares. Para as técnicas manuais destinadas à pesquisa de autoanticorpos por imunofluorescência o CQI é realizado através de soros controlo (positivo e negativo) para os autoanticorpos pesquisados em cada ensaio específico. O CQE é realizado ao abrigo do RIQAS para a avaliação do auto-analisador utilizado nos doseamentos de proteínas específicas, sendo os ensaios realizados de 2 em 2 semanas.

Para a garantia da qualidade dos resultados obtidos é ainda importante a avaliação das amostras recebidas nesta seção. As amostras turvas, lipémicas, ictéricas, hemolisadas, indevidamente coaguladas ou com coágulos em suspensão podem interferir com os métodos utilizados e originar resultados incorretos ou dificultar a sua interpretação, particularmente na visualização dos perfis eletroforéticos e na observação microscópica das lâminas de imunofluorescência.

B. Eletroforese de Proteínas

A eletroforese de proteínas é um método que permite a separação de proteínas de acordo com a sua migração em meio líquido, ao qual é aplicado um campo elétrico. A mobilidade das proteínas no meio está dependente da sua carga e peso molecular, que por sua vez são influenciados pela sua composição qualitativa e quantitativa em aminoácidos proteicos (14,15). A aplicação de um campo elétrico permite que estas macromoléculas sejam separadas em cinco

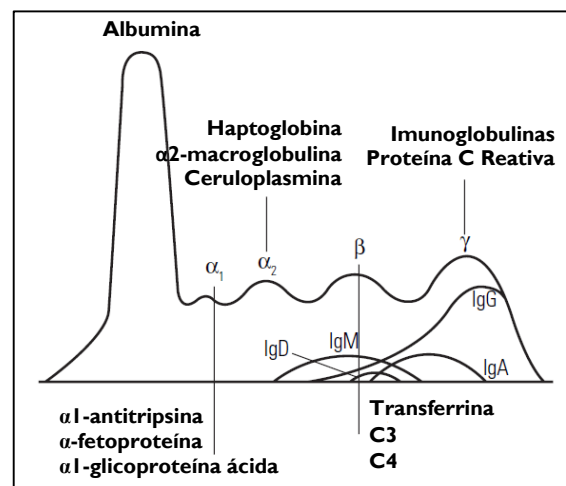


Figura 18 – Frações obtidas por separação eletroforética e principais proteínas (15).

frações principais (albumina, α_1 , α_2 , β e γ), de acordo com a sua migração no meio desde o polo negativo até ao polo positivo (Figura 18). Deste modo, as proteínas com maior mobilidade, como a albumina, são as de menor peso molecular e as mais eletronegativas.

Na seção da Imunologia, a separação das proteínas é realizada através da técnica da eletroforese capilar que, ao contrário dos métodos clássicos, recorre a um meio composto

apenas por solução tampão alcalina e não utiliza um material poroso para auxiliar a separação. Comparativamente aos ensaios tradicionais, esta técnica permite trabalhar com voltagens superiores, que reduzem o tempo necessário para cada ensaio e melhoram a resolução da separação (14), aumentando a eficácia da separação da fração β nas bandas β_1 e β_2 .

Sendo um ensaio semi-quantitativo, a eletroforese por si só não permite a quantificação absoluta das frações obtidas, sendo necessária a concentração de proteínas totais (determinada na seção da Química Clínica/Imunoquímica) para efetuar este cálculo. Estes ensaios também não permitem efetuar a avaliação de proteínas específicas, visto que cada fração, com exceção da fração da albumina, apresenta um conjunto extenso de macromoléculas. Por outro lado, o conhecimento dos principais componentes de cada fração é valioso pois facilita a interpretação analítica das variações associadas a cada fração e auxilia a identificação de padrões eletroforéticos característicos de algumas patologias. A nível laboratorial a interpretação dos perfis eletroforéticos em amostras de soro é particularmente útil na avaliação de padrões anormais observados nas reações de fase aguda, gamapatias monoclonais, doenças hepáticas e na insuficiência renal, embora as alterações do perfil eletroforético possam ser observadas em outras circunstâncias (deficiência de ferro, doenças hemolíticas e patologias autoimunes). Os valores de referência utilizados para a avaliação das frações eletroforéticas encontram-se disponíveis no Anexo H.

B.1. Sebia MINICAP®

O MINICAP® é o equipamento utilizado para a separação das proteínas do soro e da urina através do princípio da eletroforese capilar. Este sistema permite também a caracterização de bandas monoclonais através da técnica de imunosubtração. A separação eletroforética é realizada em tubos capilares de sílica, com diâmetro interno de 100 μm , utilizando como meio uma solução tampão alcalina ($\text{pH}=9,9$). O procedimento é iniciado pela diluição automática da amostra com solução tampão, a qual pode ser ajustada em função da concentração de proteínas totais. A amostra diluída é posteriormente injetada no terminal anódico do capilar. A aplicação de uma voltagem elevada permite a separação das proteínas nas suas diferentes frações, as quais são detetadas no terminal catódico por leitura da absorvância a 200 nm. No final da análise, os sinais captados para cada fração são processados de modo a produzir o perfil eletroforético e a calcular a quantidade relativa (percentual) de cada uma das frações individuais, a qual é convertida automaticamente na sua respetiva concentração recorrendo à concentração de proteínas totais. O equipamento permite também a correção e o ajuste dos limites de cada fração pelo operador, caso estes sejam necessários.

B.2. Albumina

A albumina (69 kDa) é a proteína mais abundante no plasma, correspondendo a cerca de 60% das proteínas totais (15). É sintetizada exclusivamente no fígado e é importante para a manutenção da pressão oncótica e para o transporte de diversas substâncias na corrente sanguínea. A diminuição da albumina (hipoalbuminemia) é muito inespecífica e pode estar associada à diminuição da sua síntese (doença hepática), ao aumento do seu catabolismo (infecções bacterianas graves, neoplasias malignas, insuficiência cardíaca congestiva e doenças inflamatórias e infecciosas graves), à perda de proteínas (síndrome nefrótica, enteropatas e queimaduras) e à desnutrição (16,17,18). As deficiências congênitas são extremamente raras e demonstram a ausência da fração da albumina (17). O aumento da albumina está principalmente associado a casos de desidratação, dado o papel das proteínas como indicadores do estado de hidratação do organismo. Embora não esteja relacionada com condições patológicas, a expressão da albumina em indivíduos com mutações genéticas ou a tomar determinados fármacos, como a varfarina, pode resultar na expressão da proteína em duas formas com mobilidades eletroforéticas distintas, sendo observados dois picos para esta fração (bis-albuminemia) (17). A presença de uma pequena banda junto a esta fração pode ser conferida por elementos interferentes na amostra, nomeadamente lipoproteínas e pigmentos biliares.

B.3. Fração $\alpha 1$

A fração $\alpha 1$ é principalmente constituída pela $\alpha 1$ -antitripsina, que corresponde a 90% das proteínas desta fração (15). O aumento desta fração está principalmente associado à ocorrência de processos inflamatórios, devido à composição desta fração em proteínas de fase aguda, embora o seu aumento possa também ocorrer por ação dos estrogénios (gravidez e toma de contraceptivos) (17,18). A diminuição da fração $\alpha 1$ é principalmente observada nas deficiências da $\alpha 1$ -antitripsina, as quais apresentam etiologia genética e estão associadas a doença hepática e pulmonar (16,17).

B.4. Fração $\alpha 2$

A fração $\alpha 2$ é principalmente constituída pela haptoglobina e pela $\alpha 2$ -macroglobulina. A $\alpha 2$ -macroglobulina é uma das proteínas plasmáticas com maior peso molecular (720 kDa) e atua como inibidor das proteases. Na síndrome nefrótica, a retenção desta proteína no plasma, devido ao seu elevado peso molecular e à sua síntese aumentada, levam à elevação da fração $\alpha 2$, enquanto as outras frações diminuem devido à perda de proteínas na urina (17). A $\alpha 2$ -macroglobulina encontra-se também aumentada em recém-nascidos, idosos, diabéticos e em

doentes com níveis de estrogénios aumentados (17). À semelhança da fração anterior, o aumento da fração α_2 pode ser também observado nos processos inflamatórios, devido à composição desta fração em proteínas de fase aguda, em particular a haptoglobina, embora esta proteína sofra apenas aumentos tardios nestas condições (16).

A diminuição da fração α_2 está principalmente associada à diminuição da concentração plasmática da haptoglobina, que por sua vez resulta principalmente da ocorrência de hemólise intravascular (15). A diminuição da fração α_2 pode também ser observada na desnutrição proteica, nas enteropatias com perda de proteínas e nas doenças hepáticas severas (18). A colheita e manuseamento inadequado das amostras, com resultante hemólise *in vitro*, podem ser evidenciados através do aparecimento de uma banda nesta fração, correspondente aos complexos hemoglobina-haptoglobina, em conjunto com uma banda na fração β , correspondente à hemoglobina livre.

B.5. Fração β

A fração β é principalmente constituída pela transferrina e pelo fator C3 do complemento. A transferrina é uma proteína com elevada mobilidade eletroforética dentro desta fração e representa a maior porção da fração β_1 . Esta proteína é o principal transportador do ferro no plasma e encontra-se principalmente aumentada nas anemias provocadas por deficiência deste nutriente, embora a sua saturação com ferro seja inferior. A transferrina aumenta também por ação dos estrogénios (16) e, ao contrário das proteínas de fase aguda, encontra-se diminuída nos processos inflamatórios. A sua concentração plasmática encontra-se também diminuída nas doenças hepáticas, nas condições com perda de proteínas e, mais raramente, na desnutrição e nas deficiências congénitas desta proteína, as quais estão associadas a acumulação de ferro e a anemia hipocrómica severa resistente à terapêutica com suplementação de ferro (17). As variantes genéticas da transferrina estão associadas à ocorrência desta proteína em formas com mobilidades eletroforéticas distintas, evidenciadas pela observação de duas bandas discretas nos perfis eletroforéticos (17).

O fator C3 do complemento apresenta menor mobilidade eletroforética dentro das proteínas da fração β e corresponde à maior porção da fração β_2 . À semelhança da haptoglobina, as suas concentrações plasmáticas aumentam tardiamente nas reações de fase aguda (16). A diminuição do C3 pode estar associada à sua deficiência primária ou à deficiência secundária ao seu consumo por ativação das vias do complemento. O fator C4 encontra-se presente em menor quantidade na fração β e a sua presença é apenas evidente com o aumento da sua concentração plasmática nas fases tardias das reações de fase aguda.

As condições associadas com o aumento do colesterol plasmático, nomeadamente hipercolesterolemia, icterícia obstrutiva, hipotireoidismo, síndrome nefrótica e alguns casos de diabetes mellitus, resultam no aumento das β -lipoproteínas, cuja migração é variável no perfil eletroforético e pode induzir o aparecimento de uma banda na fração β (15,17). O aumento da fração β_2 pode também dever-se à presença de fibrinogénio não esgotado durante a formação do coágulo para a obtenção das amostras de soro.

B.6. Fração γ

A fração γ é constituída pelas imunoglobulinas, ou anticorpos, produzidos pelos plasmócitos em resposta à exposição a antígenos ou devido a neoplasias malignas destas células. Dependendo da estrutura das suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser classificadas, por ordem decrescente da sua concentração plasmática, em IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. A IgG é a única imunoglobulina que migra em toda a fração γ e representa cerca de 73% das imunoglobulinas normais (15). As IgA e IgM apresentam migração variável entre a fração β e a fração γ e representam cerca de 19% e 5% das imunoglobulinas normais, respetivamente (15).

O aumento da fração γ pode ser do tipo policlonal ou monoclonal. As bandas policlonais demonstram um aumento difuso da fração γ (Figura 19A) e representam uma resposta imunológica normal à exposição a antígenos, sendo caracterizadas pela produção de imunoglobulinas por vários clones de plasmócitos. Os aumentos monoclonais estão associados a uma banda estreita e homogénea na fração γ (Figura 19B), que representa a produção de uma classe específica de imunoglobulina (paraproteína) por clones idênticos de plasmócitos. Estas bandas estão associadas às gamopatias monoclonais, caracterizadas pela produção exacerbada da paraproteína, à custa da produção de outras proteínas plasmáticas, que é responsável pelos danos orgânicos verificados nestas patologias. A gamapatia monoclonal mais frequente é o mieloma múltiplo, embora as bandas monoclonais possam também ser detetadas nas gamopatias monoclonais de significado indeterminado (MGUS), na macroglobulinemia de Waldenström e nos plasmocitomas (16), sendo necessário o estudo clínico posterior destes casos de modo a efetuar o diagnóstico adequado. Devido à mobilidade eletroforética da IgA e da IgM, as gamopatias monoclonais com paraproteínas destas classes, em particular a macroglobulinemia de Waldenström, podem demonstrar uma banda monoclonal na fração β .

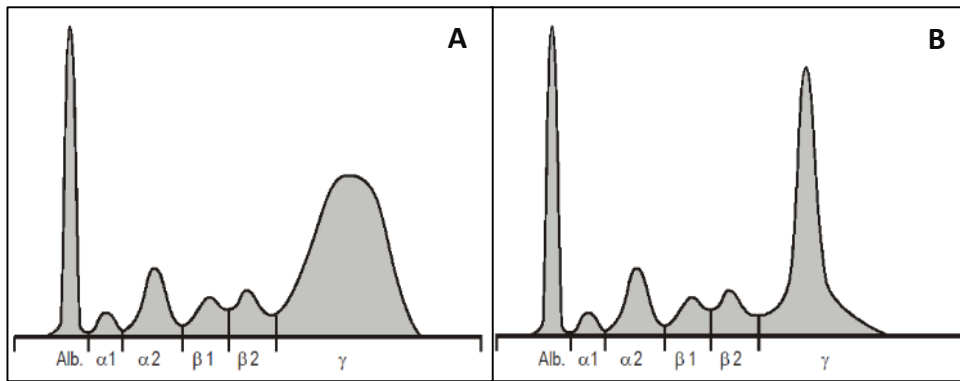


Figura 19 – Perfis eletroforéticos correspondentes a (A) aumento policlonal e (B) aumento monoclonal da fração γ .

A diminuição da fração γ é observada na hipogamaglobulinemia, associada às deficiências congénitas e secundárias das imunoglobulinas. Este padrão pode ser observado nos casos de mieloma múltiplo por cadeias leves livres nos quais, devido à perda das cadeias leves pela urina, o pico monoclonal só pode ser detetado por eletroforese urinária (16).

Devido à migração da proteína C reativa na fração γ , as elevações desta proteína nas reações de fase aguda resultam no aparecimento de uma banda a nível desta fração. Nas doenças hepáticas, em particular na cirrose hepática, o aumento das IgA resulta no aparecimento de uma junção característica entre a fração $\beta 2$ e a fração γ (ponte β - γ).

B.7. Eletroforese de proteínas na urina

A eletroforese de proteínas na urina é um processo semelhante ao descrito anteriormente, embora as amostras sejam previamente sujeitas a um procedimento manual para a sua filtração por diálise, destinada a concentrar as proteínas na amostra e a remover elementos interferentes (Anexo I). Em condições normais, a filtração glomerular e a reabsorção tubular impedem a perda de proteínas na urina, resultando em bandas muito ligeiras ou praticamente inexistentes para cada fração dos perfis eletroforéticos. Na insuficiência renal, a falência destes mecanismos resulta na perda de proteínas na urina (proteinúria), demonstrada através do aumento das frações obtidas por eletroforese.

A principal aplicação da eletroforese de amostras de urina é a deteção da presença de cadeias leves livres das imunoglobulinas (proteína de Bence-Jones), demonstrada pelo aparecimento de uma banda monoclonal na fração γ (Figura 20). Em condições normais, as cadeias leves livres podem ser filtradas nos glomérulos e reabsorvidas nos túbulos renais, ao contrário das imunoglobulinas completas, que não

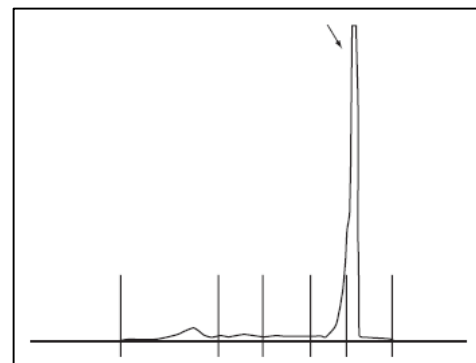


Figura 20 – Banda monoclonal em eletroforese de urina (17).

conseguem passar a barreira de filtração glomerular intacta. Com o aumento da concentração sérica de cadeias leves livres, resultantes da sua produção exacerbada, a capacidade de reabsorção renal é excedida, verificando-se a sua excreção na urina (16). Eventualmente, o excesso de cadeias leves livres resulta também na sua deposição a nível tubular, com subsequente lesão renal e perda de outras proteínas na urina, demonstrada pelo aumento das restantes frações eletroforéticas.

A deteção da proteína de Bence-Jones é um importante indicador de uma gamapatia por cadeias leves, e pode ser utilizada tanto para fins diagnósticos como para a monitorização da doença. Na seção da Imunologia, a deteção de uma banda monoclonal, tanto em amostras de urina como amostras de soro, é sempre complementada com a sua caracterização por imunossobstração e, em alguns casos, com a quantificação nefelométrica das cadeias das imunoglobulinas e da β 2-microglobulina urinária.

B.8. Imunossobstração

A imunossobstração é o método utilizado para a caracterização de bandas monoclonais em amostras de soro e de urina. Este ensaio é também particularmente útil para a confirmação dos casos sugestivos de uma gamapatia monoclonal em que o perfil eletroforético não permite a identificação clara de uma banda monoclonal. A nível metodológico, a imunossobstração consiste na incubação de várias alíquotas da amostra, diluída em solução tampão, com diferentes anticorpos específicos para cada uma das diferentes cadeias pesadas das IgG, IgA e IgM e para as cadeias leves κ e λ . Na presença das cadeias específicas para os anticorpos adicionados, verifica-se a formação de imunocomplexos que alteram a mobilidade eletroforética das imunoglobulinas, resultando na eliminação da banda monoclonal (Figura 21).

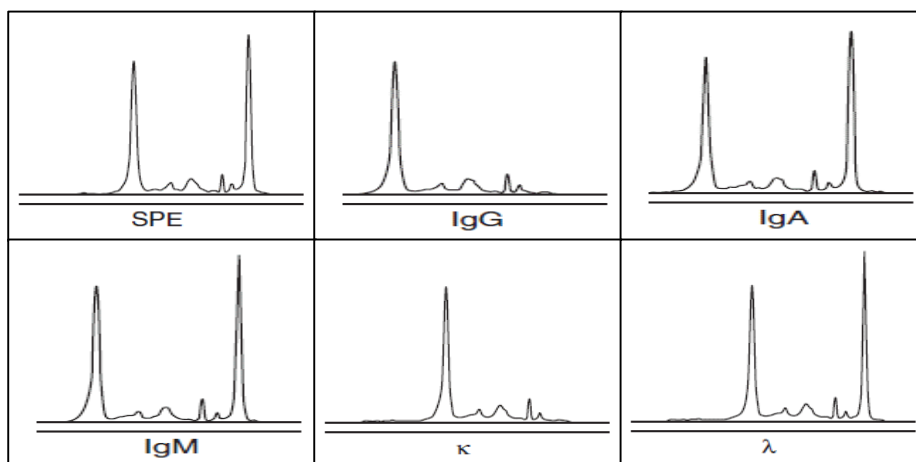


Figura 21 – Imunossobstração de uma gamapatia monoclonal IgG- κ (SPE: eletroforese das proteínas do soro) (17).

Deste modo, a caracterização de uma banda monoclonal através do ensaio de imunoeletróforese permite a identificação da paraproteína produzida em excesso nas gamopatias monoclonais e auxilia o diagnóstico de patologias como o mieloma múltiplo (principalmente associado a paraproteína do tipo IgG), a macroglobulinemia de Waldenström (principalmente associada a paraproteína do tipo IgM) e as gamopatias por cadeias pesadas e cadeias leves livres (16,17).

C. Doseamento de Proteínas Específicas

As proteínas plasmáticas correspondem a um conjunto extenso de diferentes proteínas que circulam no plasma sanguíneo. Estas macromoléculas são principalmente sintetizadas e catabolizadas a nível hepático e são libertadas para a corrente sanguínea através dos sinusoides e das veias centrais do fígado. As proteínas plasmáticas desempenham diversas funções no organismo, nomeadamente a manutenção da pressão oncótica, o transporte de hormonas, vitaminas, metais e fármacos, a defesa contra agentes invasores, a ativação da coagulação e da fibrinólise e a manutenção do pH sanguíneo (16). A quantificação de proteínas específicas é importante em patologia clínica uma vez que as características inerentes a cada uma destas macromoléculas permitem a sua aplicação como marcadores de diagnóstico e monitorização para determinadas patologias. Na seção da Imunologia, para além das proteínas plasmáticas, são também quantificadas as cadeias leves das imunoglobulinas e a β 2-microglobulina em amostras de urina. Os valores de referência utilizados nos doseamentos de proteínas específicas encontram-se disponíveis nos Anexos J e K.

C.1. Siemens BN ProSpec®

O BN ProSpec® é o equipamento utilizado no doseamento de proteínas específicas no soro e na urina, recorrendo ao princípio da imunonefelometria. Os ensaios são realizados através da incubação das amostras, previamente diluídas pelo equipamento, a 37°C, com os anticorpos específicos para os analitos em estudo. A quantidade de imunocomplexos formados é proporcional à concentração de analito na amostra e é determinada ao incidir um feixe luminoso nas cuvetes de reação. A quantidade de luz dispersa pelos imunocomplexos é proporcional à concentração de analito na amostra e é determinada através da captação da luz pelos detetores do equipamento (posicionados a 30-90° relativamente à fonte do feixe luminoso) e pela correlação do sinal obtido com as calibrações armazenadas para cada parâmetro. Para as proteínas associadas a concentrações muito baixas nas amostras utilizadas, nomeadamente a cistatina C, o fator reumatoide e a β 2-microglobulina, a sensibilidade do

método é melhorada recorrendo a reagentes com partículas de látex revestidas com os anticorpos específicos para o analito em estudo, que permitem um acréscimo na quantidade de luz dispersa pelos imunocomplexos formados e aumentam o sinal captado pelo equipamento.

C.2. α 1-Antitripsina

A AAT (52 kDa) é uma glicoproteína produzida a nível hepático e um importante inibidor das proteases pertencente à família das serpinas, uma família de proteínas que reagem com enzimas proteolíticas que apresentam grupos serina nos seus locais ativos. A AAT é uma proteína de fase aguda, verificando-se o seu aumento nos processos inflamatórios. A concentração plasmática de AAT aumenta também por ação dos estrogénios (16).

A quantificação da AAT é particularmente útil no rastreio de deficiências congénitas desta proteína. A AAT é expressa por dois alelos co-dominantes, que podem ser alelos M, associados à expressão normal da proteína, ou alelos mutados S e Z, estando este último associado a menor produção da proteína (15,17). Os indivíduos com o genótipo ZZ demonstram o grau mais severo de deficiência em AAT, a qual está associada ao desenvolvimento de doença pulmonar (DPOC e enfisema pulmonar) e, em menor frequência, doença hepática (15).

O desenvolvimento de doença pulmonar está associado com a função da AAT na inibição da elastase libertada pelos leucócitos polimorfonucleares durante os processos inflamatórios, impedindo desta forma a degradação do tecido elástico (elastina) presente a nível das ramificações traqueobrônquicas e do endotélio vascular (16). As patologias pulmonares são mais comuns nos adultos e são agravadas por fatores ambientais como o fumo do tabaco e a poluição atmosférica. O desenvolvimento de doença hepática está relacionado com a acumulação e polimerização das formas mutantes e instáveis da proteína nos hepatócitos, com subsequente indução de lesão celular (19). A sua ocorrência é superior em crianças e incluem colestase, cirrose e carcinoma hepatocelular neonatal (16).

C.3. β 2-Microglobulina

A B2M é uma proteína de baixo peso molecular (11,8 kDa) que constitui a subunidade β das moléculas de MHC-I presentes na superfície celular de todas as células nucleadas (20). As moléculas de MHC-I são importantes na resposta imunitária às infeções virais através da apresentação de antígenos intracelulares às células citotóxicas do sistema imunitário, que por sua vez respondem com a destruição da célula apresentadora. A B2M é libertada em pequenas quantidades para a circulação sanguínea a uma taxa constante, sendo filtrada livremente nos

glomérulos renais e reabsorvida pelas células tubulares proximais. Em indivíduos saudáveis, a concentração de B2M é mantida a valores baixos no plasma e praticamente inexistentes na urina (20). A elevação da concentração plasmática da B2M pode resultar tanto da sua libertação aumentada por morte celular e ação do sistema imunitário (infecções e doenças autoimunes), como da diminuição da sua excreção a nível renal.

A B2M é um marcador sensível da taxa de filtração glomerular (TFG), devido à elevada correlação entre o aumento da sua concentração plasmática e a diminuição da capacidade de excreção renal. Na ausência de disfunção glomerular, a quantificação desta proteína na urina permite avaliar a função tubular renal pois a sua concentração urinária é dependente da capacidade de reabsorção tubular, sendo um parâmetro útil na monitorização de doença tubulointersticial renal. Uma vez que a sua concentração plasmática está dependente de outros fatores para além da sua excreção renal, a avaliação da TFG a partir desta proteína deve ser realizada em conjunto com a restante informação clínica. Como marcador tumoral, a quantificação da B2M no plasma e na urina é útil na monitorização de gamopatias monoclonais malignas (em particular o mieloma múltiplo) e de neoplasias linfocitárias, devido ao agravamento da função renal associada com a progressão destas patologias.

C.4. Cistatina C

A cistatina C é uma proteína não glicosilada de baixo peso molecular (13 kDa) e um importante inibidor das proteases da cisteína. É sintetizada por todas as células nucleadas e libertada em pequenas quantidades para a circulação sanguínea a uma taxa constante, independentemente do sexo, idade ou massa muscular (20). A quantificação da cistatina C no soro é utilizada na avaliação da função renal, uma vez que esta proteína é filtrada livremente nos glomérulos e o aumento da sua concentração sérica está quase exclusivamente associado com a diminuição da sua excreção renal e da TFG. Relativamente à creatinina, a concentração de cistatina C no soro não é afetada por fatores como a alimentação ou a massa muscular e os seus valores sofrem aumentos mais sensíveis em fases mais precoces do decaimento da TFG, enquanto as variações da creatinina só se tornam evidentes quando a TFG é inferior a cerca de 50% do valor normal.

C.5. Haptoglobina

A HPT é uma glicoproteína (100 kDa) sintetizada pelos hepatócitos e em pequena quantidade pelas células do sistema reticuloendotelial. Estruturalmente, é constituída por um par de cadeias α e cadeias β com capacidade de estabelecer a ligação com as subunidades proteicas da hemoglobina. Ao contrário das restantes proteínas de fase aguda, a HPT sofre

apenas ligeiros aumentos nas fases tardias dos processos inflamatórios (17). A HPT encontra-se também aumentada por ação dos glucocorticoides e dos AINEs (16).

A HPT é principalmente útil na avaliação de anemia hemolítica intravascular. Nestas condições a HPT atua através da sua ligação irreversível com a Hb libertada pelos eritrócitos lisados, levando à formação de complexos que são captados e degradados pelo sistema reticuloendotelial. Este mecanismo evita a perda do ferro da Hb na urina e permite a sua reutilização, em conjunto com os restantes componentes desta proteína. Na anemia hemolítica intravascular a concentração plasmática de HPT diminui como resultado da sua degradação pelo sistema reticuloendotelial, em conjunto com a Hb, e da incapacidade do organismo na sua reposição por síntese hepática (17). As concentrações plasmáticas da HPT encontram-se também diminuídas nas doenças hepatocelulares crónicas, devido à diminuição da sua síntese e ao metabolismo alterado dos estrogénios, que têm uma ação inibitória na síntese da HPT (16). A deficiência em HPT pode ainda ser de origem genética e está associada a diferentes genótipos para os dois alelos co-dominantes que codificam a proteína. O genótipo Hp0-0 está associado à forma da doença mais grave e é caracterizado por uma produção muito baixa ou praticamente nula de HPT (16).

C.6. Fatores C3 e C4 do Sistema Complemento

O sistema complemento é um componente integrante do sistema imunitário na defesa não específica contra antígenos (sistema imunitário inato). Este sistema engloba um conjunto de proteínas que reagem entre si, com as membranas celulares e com os complexos antígeno-anticorpo de modo a promover a eliminação de agentes estranhos ao organismo e a modular as respostas inflamatórias. Os fatores do complemento são principalmente produzidos pelo fígado, mas também em quantidades baixas pelos monócitos e outros tipos de células.

O sistema complemento é ativado principalmente por duas vias distintas: a via clássica, por ação dos complexos antígeno-anticorpo; e a via alternativa, por exposição a polissacarídeos antígenos e ação de proteases celulares (17). O fator do complemento C3 é uma proteína chave das duas vias, enquanto o C4 está envolvido exclusivamente na via clássica. Devido ao papel importante dos fatores do complemento como reguladores dos processos inflamatórios, as concentrações aumentadas de C3 e C4 no soro são normalmente observadas nas reações de fase aguda, embora estas elevações ocorram em fases mais tardias destas condições (17).

As deficiências em C3 e C4 podem ser de origem genética ou secundária a diversas patologias. A deficiência primária em C3 resulta principalmente na ocorrência de infeções recorrentes e persistentes, enquanto a deficiência primária em C4 resulta principalmente no desenvolvimento de patologias caracterizadas pela formação de imunocomplexos (LES,

vasculite e glomerulonefrite) (16,21). As deficiências secundárias de C3 e C4 ocorrem principalmente como resultado do seu consumo na ativação das vias do complemento. O consumo aumentado em C3 e C4 pode ser observado com a ocorrência de processos infecciosos severos e na presença elevada de imunocomplexos, observada em patologias como LES e glomerulonefrite membranoproliferativa (16,21). As concentrações diminuídas de C3 podem ocorrer particularmente na glomerulonefrite aguda e na glomerulonefrite membranoproliferativa, enquanto os níveis diminuídos de C4 estão associados ao angioedema hereditário e à anemia hemolítica autoimune (16,21). A deficiência em fatores do complemento pode também estar associada à diminuição da sua produção, em particular nos casos de deficiências nutricionais e nas lesões hepáticas.

C.7. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas, ou anticorpos, são proteínas utilizadas pelas células do sistema imunitário para o reconhecimento de moléculas estranhas ao organismo e para a iniciação dos processos necessários à sua destruição e eliminação. A nível estrutural, são compostas por uma ou mais unidades básicas (Figura 22) constituídas por um par idêntico de cadeias pesadas e um par idêntico de cadeias leves, sintetizadas de forma independente. Cada uma das cadeias apresenta uma região constante e uma região

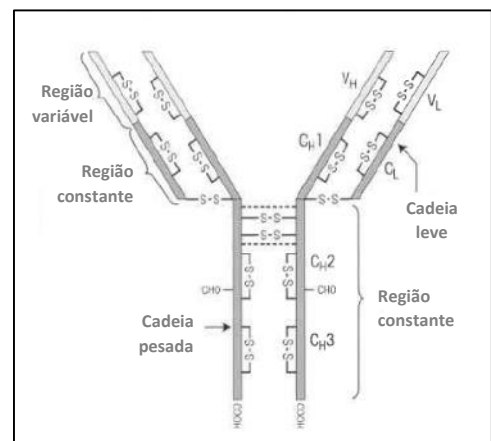


Figura 22 – Estrutura da unidade básica de uma imunoglobulina (21).

variável. A região variável é a fração envolvida no reconhecimento e ligação a antígenos e apresenta sequências terminais altamente polimórficas, que conferem a sua especificidade na ligação a antígenos. As regiões constantes das cadeias pesadas são os locais efetores que interagem com diversos recetores celulares e com os fatores do complemento. Estas regiões variam entre as diferentes classes de imunoglobulinas, conferindo a sua classificação em IgM, IgG, IgA, IgE e IgD, conforme as cadeias pesadas sejam do tipo μ , γ , α , ϵ ou δ , respetivamente. Nas cadeias leves, a estrutura das regiões constantes leva à sua classificação em κ e λ . Cada imunoglobulina é constituída apenas por um tipo de cadeia leve, as quais ocorrem, em condições normais, na proporção de κ : λ = 2:1.

C.7.1. Quantificação de IgG, IgA e IgM

Ao contrário da maioria das proteínas plasmáticas, as imunoglobulinas são produzidas pelos plasmócitos e constituem a resposta imunológica humoral à exposição antigénica. Cada

conjunto de clones idênticos de plasmócitos produz imunoglobulinas dirigidas a apenas um antígeno específico. A reação primária após o contato inicial com o antígeno é a formação de anticorpos da classe IgM, que ocorre na forma de pentâmero, corresponde à menos especializada de todas as imunoglobulinas e é um potente ativador do sistema complemento (15,16). Posteriormente, a produção é deslocada no sentido do aumento de IgG e IgA por um processo designado por *switching* de classe. A IgG é particularmente importante no combate a infecções bacterianas, enquanto a IgA pode ocorrer na forma de dímero e atua principalmente através da proteção das mucosas e fluídos corporais (15,16).

A determinação quantitativa das imunoglobulinas pode fornecer informações importantes relativamente ao estado da resposta imunitária humoral. A diminuição da concentração sérica das imunoglobulinas ocorre nas imunodeficiências primárias e nas imunodeficiências secundárias, as quais podem estar associadas a infecções crônicas (infecção pelo HIV), neoplasias malignas (leucemias, linfomas e gamopatias monoclonais), desnutrição e administração de fármacos imunossupressores (glucocorticoides e agentes quimioterápicos) (16,21). O aumento das imunoglobulinas ocorre devido à sua proliferação policlonal e oligoclonal, observada nas doenças hepáticas (hepatite e cirrose hepática), infecções agudas e crônicas, doenças autoimunes e infecções intrauterinas (16,21). A proliferação monoclonal pode ser observada no mieloma múltiplo, MGUS, plasmocitomas, macroglobulinemia de Waldenström e doença das cadeias pesadas (16).

C.7.2. Quantificação de cadeias leves

Em condições normais, as concentrações séricas das cadeias leves das imunoglobulinas podem ser determinadas a partir das concentrações das moléculas intactas das imunoglobulinas. Os desvios a esta relação verificam-se com a ocorrência de cadeias leves e cadeias pesadas livres presentes no soro. Independentemente destes casos, as concentrações elevadas e diminuídas das cadeias leves estão associadas à proliferação (policlonal ou monoclonal) e às insuficiências imunológicas, respetivamente. Enquanto a proliferação policlonal demonstra o aumento das cadeias κ e das cadeias λ na proporção aproximada de 2:1, a proliferação monoclonal de imunoglobulinas ou de cadeias leves exhibe o aumento de apenas um tipo de cadeias, com alteração do quociente κ/λ . Um valor de κ/λ fora dos limites de referência é portanto um indicador da presença de uma gamapatia monoclonal.

Conforme referido anteriormente, a presença de cadeias leves livres na urina reflete o aumento da sua concentração no soro, que por sua vez é sugestivo da sua produção monoclonal pelos plasmócitos. O excesso de cadeias leves livres ultrapassa a capacidade de reabsorção tubular e verifica-se o aumento da sua concentração na urina (proteína de Bence-

Jones). Assim, a detecção de cadeias leves na urina é um importante indicador da presença de gamopatias monoclonais por cadeias leves, e pode ser utilizada tanto para fins diagnósticos como para a monitorização da doença. Estes doseamentos são muitas vezes complementados com a quantificação da β 2-microglobulina, dado a sua utilidade na monitorização da progressão de gamopatias monoclonais.

D. Imunoalergologia

As reações de hipersensibilidade alérgica são respostas de natureza imunológica que ocorrem de forma exacerbada e não controlada à exposição a determinados antígenos específicos (alergénios), em doses toleradas por indivíduos normais. Estas reações podem ser classificadas, de acordo com os mecanismos envolvidos, em reações alérgicas mediadas por IgE, que podem ser atópicas ou não atópicas, e não mediadas por IgE (mediadas por IgG ou células T, entre outros mecanismos) (22). As reações atópicas correspondem à tendência pessoal ou familiar ao desenvolvimento de reações alérgicas mediadas por IgE com a sintomatologia típica (asma, rinite e eczema), embora também sejam vulgarmente utilizadas para definir qualquer reação alérgica mediada por IgE. As reações não atópicas são relativamente comuns e podem resultar da ocorrência de estímulos como picadas de insetos, infeções por helmintas e reações adversas a fármacos (22).

Na avaliação laboratorial de reações alérgicas o primeiro passo muitas vezes consiste na quantificação dos anticorpos IgE totais, uma vez que permite identificar as reações alérgicas mediadas por esta imunoglobulina. A concentração sérica de IgE está dependente da idade do indivíduo e o seu aumento está associado à produção pelos linfócitos B, quando estimulados pelas células apresentadoras de antígeno que capturam os alergénios. As IgE libertadas são específicas para o alergénio ao qual houve exposição e são responsáveis pela sensibilização dos mastócitos e dos eosinófilos, através da sua ligação aos recetores membranares FC ϵ RI de alta afinidade (21). A sensibilização destas células resulta na sua desgranulação e libertação de proteínas, em particular a histamina, responsáveis pelos sintomas normalmente observados nas reações alérgicas (vasodilatação, edema e sensibilização dos nervos sensoriais) (21). Na presença de uma reação alérgica mediada por IgE, o próximo passo a nível laboratorial consiste na identificação dos alergénios envolvidos, através da quantificação de anticorpos IgE específicos. Na seção da Imunologia são apenas realizados os ensaios de determinação de anticorpos IgE específicos, estando os doseamentos da IgE total reservados à seção da Química Clínica/Imunoquímica.

D.1. Phadia UniCAP® I00

O UniCAP® é o equipamento utilizado na quantificação de autoanticorpos e de anticorpos IgE específicos, utilizados na avaliação de doenças autoimunes e de doenças alérgicas, respetivamente. De modo a realizar estas determinações, este sistema recorre ao princípio dos ensaios imunoenzimáticos (EIA) associados com a utilização de um substrato fluorescente, combinando desta forma a especificidade dos ensaios imunológicos com a sensibilidade de um ensaio fluoroenzimático (Figura 23).

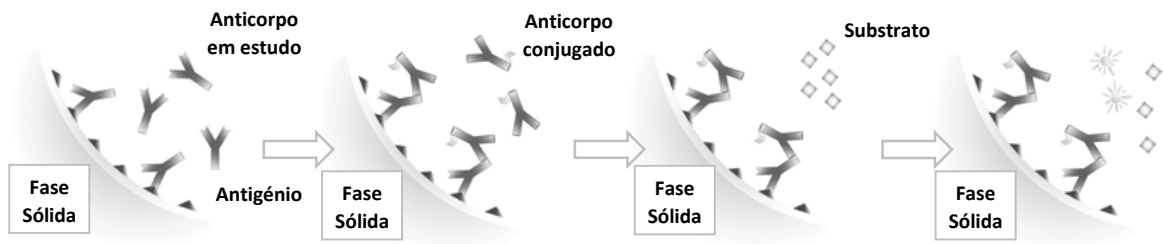


Figura 23 – Representação do ensaio imunoenzimático associado com a aplicação de um substrato responsável pelo desenvolvimento de fluorescência.

As amostras de soro são inicialmente incubadas a 37°C em cápsulas (fase sólida) revestidas no interior com antígenos específicos para os anticorpos alvo em estudo. Caso estes anticorpos estejam presentes na amostra haverá formação de ligações com os antígenos da fase sólida, sendo os anticorpos em excesso removidos posteriormente por lavagem das cápsulas. No passo seguinte do método, as cápsulas são incubadas a 37°C com anticorpos anti-imunoglobulina humana conjugados com uma enzima, que se ligam aos complexos antígeno-anticorpo previamente formados. As cápsulas são novamente lavadas para remover o excesso do segundo reagente e é adicionado um substrato que emite fluorescência a determinado comprimento de onda após a reação com a enzima dos anticorpos conjugados. A concentração do analito em estudo é proporcional à intensidade da fluorescência emitida e é obtida através da sua extrapolação a partir das curvas de calibração armazenadas no equipamento.

D.2. Anticorpos IgE específicos

Na imunoalergologia, o principal interesse clínico incide na identificação ou na diferenciação da fonte da reação alérgica. A quantificação dos anticorpos IgE dirigidos para determinado alérgeno permite ir ao encontro deste objetivo uma vez o seu aumento da sua concentração sérica correlaciona-se com o desenvolvimento de uma reação alérgica resultante da exposição a essa fonte alérgica. A identificação do alérgeno ou dos alérgenos envolvidos é extremamente importante uma vez que permite o aconselhamento adequado de modo a evitar

a exposição a determinadas substâncias (evicção alérgica) e para o estabelecimento do tratamento farmacológico e da imunoterapia.

Nos ensaios realizados na seção da Imunologia, a quantificação de anticorpos IgE específicos é realizada recorrendo às cápsulas ImmunoCAP[®], obtidas através da extração dos componentes de diversas fontes alérgicas ou da produção de alérgenos recombinantes após extração de material genético das fontes alérgicas. As cápsulas ImmunoCAP[®] utilizadas nestes ensaios, e a sua respetiva composição, encontram-se descritas no Anexo L. Dependendo da sua composição, a identificação da fonte da reação alérgica pode ser realizada a vários níveis: as cápsulas Phadiatop[®] e Phadiatop Infant[®] apresentam uma composição extensa de alérgenos alimentares e inalantes e são utilizadas para a pesquisa de IgE específica a alérgenos de vários grupos; os painéis *Multi-Rast* (painéis de alérgenos alimentares, animais, de ervas daninhas e gramíneas) permitem o rastreio mais restrito de alérgenos dentro de um determinado grupo; as cápsulas com alérgenos de uma única fonte permitem a identificação da origem específica da reação alérgica; e a alergologia molecular permite a identificação das moléculas específicas envolvidas no desencadeamento da resposta alérgica.

Os resultados acima de 0,35 KUA/L são indicadores da ocorrência de sensibilização ao alérgeno ou conjunto de alérgenos testados. No entanto, estes resultados devem ser avaliados em conjunto com a restante informação clínica disponível. Na ausência de sintomatologia pode ser excluída uma reação alérgica aos componentes avaliados no ensaio, embora deva ser realizado o seguimento clínico do doente, dado o risco de desenvolvimento de uma reação alérgica no futuro. Na presença de sintomatologia, é confirmada a ocorrência de uma reação alérgica mediada por IgE específica aos componentes testados, devendo ser estabelecidas as medidas adequadas de tratamento e seguimento do doente.

E. Autoimunidade

A autoimunidade engloba um conjunto extenso de patologias cuja patogenicidade assenta na ativação da resposta imunológica celular contra estruturas do próprio organismo, designadas por autoantígenos. A sua etiologia é muito complexa e está principalmente associada com a ocorrência de vários fatores genéticos e ambientais, nomeadamente fatores hormonais, dietéticos, terapêuticos, infecciosos e a exposição a tóxicos, e da sua influência na eficácia dos mecanismos de auto-tolerância do sistema imunitário responsáveis pela eliminação e inativação de células auto-reativas, as quais são formadas durante a resposta fisiológica à exposição a antígenos (23). Embora as doenças autoimunes sejam relativamente incomuns, a sua natureza crónica confere-lhes uma prevalência de aproximadamente 5-8% da população

mundial (23). A sua classificação pode ser realizada principalmente em doenças limitadas a um órgão, que incluem algumas patologias que afetam os órgãos endócrinos (Tiroidites Autoimunes), e em doenças sistêmicas, como as patologias que afetam o tecido conjuntivo e as articulações (Lupus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatoide).

A característica comum destas patologias é a ocorrência de autoanticorpos no soro, os quais podem ser naturais ou patogênicos. Os autoanticorpos naturais estão presentes em baixas concentrações no soro e são principalmente do tipo IgM. A sua presença contribui provavelmente para a prevenção da ativação de vias de sinalização da autoimunidade, através da eliminação de células senescentes e de autoantígenos (23,24). Os autoanticorpos patogênicos estão presentes em elevadas concentrações no soro e são principalmente do tipo IgG. Estes autoanticorpos induzem danos no organismo através da sua ligação aos tecidos, ativação da cascata do complemento ou da indução da destruição de células (Doença Hemolítica Autoimune). Estas imunoglobulinas podem também modular a atividade dos recetores à superfície das células, bloqueando a sua função (Miastenia Gravis) ou induzindo a sua estimulação (Doença de Graves), e podem ainda formar imunocomplexos com autoantígenos ou fatores do complemento e depositar nos vasos e articulações, com indução de resposta inflamatória (LES e Artrite Reumatoide) (23,24).

E.1. Determinação de Autoanticorpos

A ocorrência de autoanticorpos em todas as doenças autoimunes contribui para a sua aplicação como marcadores auxiliares ao diagnóstico e monitorização destas patologias. Os autoanticorpos podem também ser detetados antes do aparecimento dos sintomas clínicos, proporcionando um bom marcador preditivo para o desenvolvimento das doenças autoimunes, particularmente quando mais do que um autoanticorpo é detetado (24). A principal limitação da sua utilização assenta na dificuldade em obter resultados sensíveis e específicos para o diagnóstico de uma determinada doença autoimune. A maior parte dos autoanticorpos são inespecíficos para apenas uma patologia e nem sempre são detetados nas principais doenças a que estão associados. A sua ocorrência em títulos baixos pode também verificar-se em condições fisiológicas e ao mesmo tempo não permite excluir a presença de uma patologia autoimune. Para além destes aspetos, muitos dos autoantígenos são ainda desconhecidos, especialmente considerando que qualquer molécula no organismo se pode comportar como autoantígeno.

Na seção da Imunologia, o estudo de autoanticorpos pode ser realizado por método qualitativo/semi-quantitativo, através dos ensaios de imunofluorescência indireta (descritos no Anexo M), ou por método quantitativo, através dos ensaios imunoenzimáticos previamente

descritos para o doseamento de anticorpos IgE específicos. Os ensaios de IFI permitem o rastreio mais completo de autoanticorpos, uma vez que detetam qualquer componente que reaja com os autoantígenos presentes nos substratos. A interpretação dos resultados é feita com base na intensidade e nos padrões de fluorescência visualizados a partir de uma determinada diluição limite da amostra, que depende principalmente do ensaio realizado. Os resultados positivos são posteriormente avaliados semi-quantitativamente através da realização de uma série de diluições de 1:2 da amostra até uma diluição máxima de 1:1024. Os EIA são utilizados na quantificação de autoanticorpos específicos, permitindo a sua identificação definitiva. No entanto, estes ensaios abrangem um conjunto mais restrito de autoanticorpos, sendo os resultados negativos insuficientes para excluir a presença de um determinado grupo de autoanticorpos. Os valores de referência utilizados para os dois tipos de ensaio encontram-se disponíveis no Anexo N.

E.2. Anticorpos Antinucleares

Os ANA são autoanticorpos específicos para os componentes do núcleo celular, incluindo DNA, RNA e diversas proteínas e ribonucleoproteínas. Estes autoanticorpos são frequentemente utilizados como marcador sensível para o diagnóstico e monitorização de Lupus Eritematoso Sistémico (LES), devido à sua elevada ocorrência no soro em doentes com esta patologia (25). Por outro lado, são também muito inespecíficos e estão associados a diversas doenças do tecido conjuntivo e articulações, incluindo Esclerodermia, Síndrome de Sjögren, Polimiosite-Dermatomiosite, Doença Mista do Tecido Conjuntivo (DMTC), Síndrome de CREST e Artrite Reumatoide (AR) (25). Estes autoanticorpos estão também associados a queimaduras graves e infeções virais e podem ainda ser detetados em indivíduos saudáveis, particularmente na população idosa (25).

Nos ensaios de IFI recorrendo às células HEp-2, os padrões de fluorescência associados aos ANA são variáveis de acordo com os autoanticorpos envolvidos e os seus autoantígenos alvo. A visualização destes padrões é facilitada pelas características do substrato utilizado (Anexo M) e a sua interpretação permite obter uma indicação dos autoantígenos alvo envolvidos, que por sua vez estão associados a determinadas patologias. No entanto, estas correlações não são exatas e não podem ser realizadas no sentido da identificação de autoanticorpos ou de patologias autoimunes específicas. A identificação de autoanticorpos específicos deve ser realizada recorrendo aos EIA destinados à sua quantificação. A interpretação dos padrões de fluorescência é também particularmente complicada nos casos em que há ocorrência mista de autoanticorpos, verificando-se a sobreposição dos padrões. Nestes casos, a distinção entre os padrões pode ser auxiliada com a preparação de várias

diluições da amostra, que permitem a sua discriminação com base nas diferenças de intensidade de fluorescência entre padrões diferentes.

E.2.1. Principais padrões em células HEp-2 (25)

Nuclear Homogéneo

Descrição: Marcação uniforme e completa do núcleo das células em interfase (Figura 24); Marcação pronunciada da cromatina condensada nas várias fases da divisão mitótica, sem marcação citoplasmática.

Principais Antígenos: dsDNA e Histonas.

Patologias associadas: LES, AR, Lúpus induzido por fármacos, Artrite juvenil crónica e Esclerodermia.

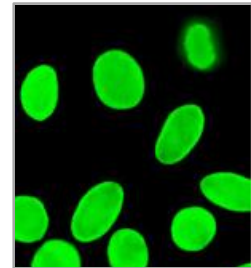


Figura 24 – Padrão Nuclear Homogéneo.

Nuclear Mosqueado Grosso

Descrição: Partículas de densidade e tamanho variável nos núcleos das células em interfase (Figura 25); Células em mitose não apresentam marcação da cromatina condensada, mas a associação com outros ANA pode converter este padrão em nuclear homogéneo.

Principais Antígenos: Sm e UI-snRNP.

Patologias associadas: LES, DMTC e Esclerodermia.

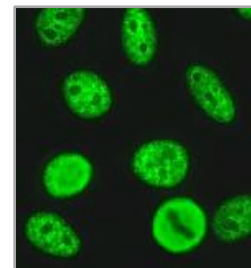


Figura 25 – Padrão Nuclear Mosqueado Grosso.

Nuclear Mosqueado Fino

Descrição: Partículas finas ou discretas com distribuição uniforme nos núcleos das células em interfase (Figura 26); Células em mitose não apresentam marcação da cromatina condensada, mas a associação com outros ANA pode converter este padrão em nuclear homogéneo.

Principais Antígenos: SSA (Ro) e SSB (La).

Patologias associadas: LES, Síndrome de Sjögren, Esclerodermia, Miosite e DMTC.

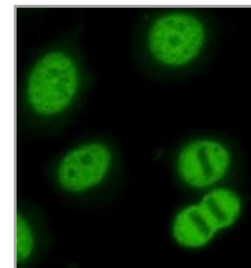


Figura 26 – Padrão Nuclear Mosqueado Fino.

Nucleolar

Descrição: Marcação fluorescente nucleolar de padrão variável (homogéneo, mosqueado ou grumoso) com marcação negativa ou muito fraca do nucleoplasma e do citoplasma (Figura 27); Marcação muito variável da cromatina condensada e do citoplasma das células em mitose.

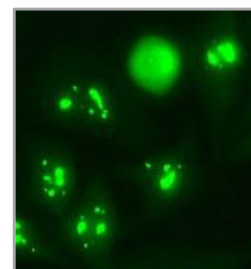


Figura 27 – Padrão Nucleolar (Homogéneo).

Principais Antígenios: Diversas proteínas e ribonucleoproteínas nucleares.

Patologias associadas: Principalmente Esclerodermia, LES e Síndrome de Raynaud, para além de outras patologias do tecido conjuntivo.

Centrómero

Descrição: Diversas partículas fluorescentes discretas distribuídas pelo núcleo das células em interfase (Figura 28); Distribuição característica do mosqueado de acordo com a posição da cromatina condensada nas diferentes fases mitóticas.

Principais Antígenios: Proteínas constituintes do cinetocoro, em particular a CENP-B e a CENP-A.

Patologias associadas: Síndrome de CREST.

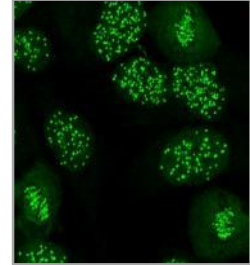


Figura 28 – Padrão Centrómero.

Citoplasmáticos

Embora as células HEp-2 sejam principalmente utilizadas na pesquisa de ANA, a sua composição em autoantígenios citoplasmáticos permite também a deteção de autoanticorpos específicos para estes componentes. Um dos principais grupos de autoanticorpos detetados são os anticorpos antimitocondriais, que demonstram marcação fluorescente granular filamentosa característica em torno do núcleo e ao longo do citoplasma (Figura 29) e estão principalmente associados a cirrose biliar primária. Os anticorpos anti-actina (anticorpos anti-músculo liso mais frequentes) podem também ser detetados com alguma frequência, demonstrando marcação fluorescente com fibras citoplasmáticas finas (Figura 30), e estão principalmente associados a hepatite autoimune. A pesquisa destes dois grupos de autoanticorpos é realizada recorrendo principalmente ao tecido triplo, devido à maior sensibilidade do ensaio na sua deteção.

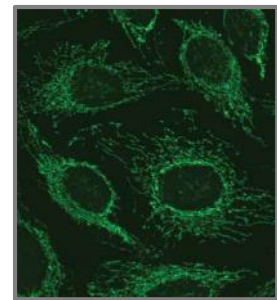


Figura 29 – Anticorpos Antimitocondriais em células HEp-2.

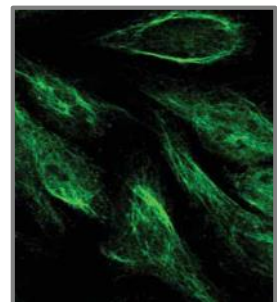


Figura 30 – Anticorpos Anti-actina em células HEp-2.

E.2.2. Doseamento de Anticorpos Antinucleares específicos

Na avaliação de anticorpos antinucleares, apenas os ensaios de quantificação permitem a identificação definitiva de autoanticorpos específicos presentes na amostra. A presença de determinado autoanticorpo permite obter uma indicação das patologias associadas, embora esta correlação seja, na maior parte dos casos, muito inespecífica. Na seção da Imunologia, os

autoantígenos nucleares disponíveis nos ensaios de quantificação incluem seis antígenos nucleares extraíveis (ENA) e a proteína CENP-B (Tabela 6). Em doentes sem informação prévia relativamente a estes ensaios é inicialmente realizado um rastreio com o conjunto dos sete autoantígenos. Para os resultados positivos são posteriormente realizados ensaios para cada autoantígeno específico, de modo a obter a identificação definitiva. Os resultados negativos nos rastreios não permitem excluir a presença de ANA na amostra, visto que estes ensaios recorrem a conjunto restrito de autoantígenos específicos. Neste aspeto, os ensaios de IFI são mais vantajosos pois permitem a deteção de autoanticorpos indisponíveis para quantificação, ou mesmo autoanticorpos desconhecidos.

Tabela 6 – Autoantígenos específicos quantificados na seção Imunologia e as principais patologias associadas (25).

Antígeno	Descrição	Patologias associadas
Sm	Polipeptídeos do complexo Sm-snRNA envolvido no processamento do mRNA	Elevada especificidade para LES
UI-RNP	Ribonucleoproteína do complexo Sm-snRNA	DMTC
SSA (Ro)	Ribonucleoproteínas de função desconhecida	Síndrome de Sjögren
SSB (La)	Ribonucleoproteína envolvida na terminação da transcrição da RNA polimerase III	LES
Scl-70	Produto ativo da degradação da topoisomerase tipo I	Esclerose sistémica, LES, Fenómeno de Raynaud
Jo-1	Local ativo da histidil-tRNA sintetase	Polimiosite, Dermatomiosite
CENP-B	Proteína constituinte dos cinetocoros	Síndrome de CREST

E.3. Anticorpos anti-dsDNA

Os anticorpos anti-dsDNA são autoanticorpos específicos para os nucleótidos emparelhados do DNA de dupla cadeia. A sua deteção no soro é altamente específica de LES, uma vez que estes autoanticorpos ocorrem quase exclusivamente nesta patologia, e apresenta uma sensibilidade acima de 70% para doentes com doença ativa (25). Os níveis de anticorpos anti-dsDNA apresentam também correlação com a atividade da doença, sendo utilizados na monitorização da sua progressão.

Nos ensaios de IFI recorrendo ao protozoário monoflagelado *Crithidia luciliae*, a presença de anticorpos anti-dsDNA é evidenciada pela marcação fluorescente do cinetoplasto (Figura 31), associada ou não com marcação fluorescente do núcleo. No caso de ocorrer exclusivamente marcação fluorescente nuclear, a amostra poderá

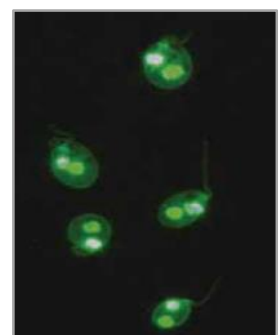


Figura 31 – Marcação fluorescente de cinetoplastos de *Crithidia luciliae* (25).

conter ANA, embora a diluição limite para este ensaio seja muito baixa quando comparada com a diluição utilizada na pesquisa de ANA, o que implica que amostras com estes resultados poderão demonstrar intensidade de fluorescência pouco significativa em células HEp-2.

Devido à menor especificidade das células HEp-2 na detecção de anticorpos anti-dsDNA, associada à ocorrência simultânea de outros autoantígenos nestas células e à presença de menor densidade de dsDNA, a conjugação deste ensaio com a pesquisa de anticorpos anti-dsDNA recorrendo ao substrato *Crithidia luciliae* é vantajosa no rastreio e monitorização de doentes com LES. Na seção da Imunologia, é também realizada a quantificação de anticorpos anti-dsDNA pelos EIA, embora a especificidade destes ensaios seja inferior devido à presença de ssDNA nos reagentes, resultante da degradação do dsDNA.

E.4. Anticorpos anti-Citoplasma dos Neutrófilos

Os ANCA são autoanticorpos específicos para as granulações citoplasmáticas dos neutrófilos, as quais armazenam diversas proteínas importantes para o funcionamento destas células, nomeadamente enzimas proteolíticas, moléculas de adesão, recetores e proteínas antimicrobianas. Dentro destas proteínas, os alvos atualmente descritos para os ANCA incluem a mieloperoxidase (MPO), a serina protease 3 (PR3), a lactoferrina, a elastase, a catepsina G e a proteína catiónica 57 (26). A pesquisa de ANCA é utilizada como auxiliar no diagnóstico e monitorização das vasculites autoimunes, em particular da Granulomatose de Wegener, que está principalmente associada a anticorpos anti-PR3, e da Glomerulonefrite Rapidamente Progressiva (GNRP) e Poliarterite Nodosa, que estão principalmente associadas a anticorpos anti-MPO (26).

Os ANCA podem ser classificados principalmente em dois grupos, de acordo com os padrões observados por IFI em neutrófilos humanos fixados com diferentes soluções. Os c-ANCA demonstram marcação fluorescente granular citoplasmática em células fixadas com etanol (Figura 32) e com formalina e estão principalmente associados ao antígeno PR3. Os p-ANCA demonstram marcação fluorescente granular nuclear/perinuclear em células fixadas com etanol (Figura 32) e citoplasmática em células fixadas com formalina, e estão principalmente associados ao antígeno MPO. Na seção da Imunologia, a pesquisa de ANCA pode ser complementada com os doseamentos dos anticorpos anti-PR3 e anti-MPO. No entanto, uma vez que os c-ANCA e os p-ANCA não estão associados exclusivamente aos antígenos PR3 e MPO, respetivamente, os resultados negativos nos doseamentos não invalidam a presença de ANCA na amostra.

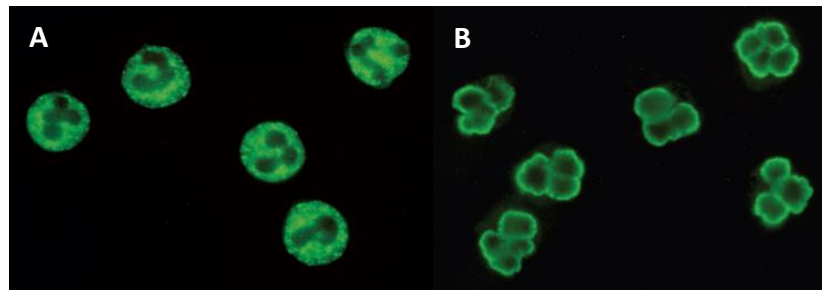


Figura 32 – Neutrófilos humanos fixados com etanol demonstrando (A) padrões de fluorescência citoplasmáticos (c-ANCA) e (B) perinucleares (p-ANCA).

Em alguns casos são produzidos padrões pouco característicos (atípicos) de c-ANCA ou p-ANCA em células fixadas com etanol, que podem ou não permanecer positivos em neutrófilos fixados com formalina. Os p-ANCA atípicos associados a antígenos sensíveis à fixação com formalina resultam na ausência de marcação fluorescente nestas condições, mas podem demonstrar positividade com a execução de um ensaio adicional em células fixadas com metanol. Estes padrões são muitas vezes designados por x-ANCA e estão normalmente associados a doenças inflamatórias intestinais, como a colite ulcerosa (26).

A presença de ANA na amostra resulta na marcação fluorescente nuclear/perinuclear dos neutrófilos fixados com etanol, sendo estes padrões diferenciados dos p-ANCA por visualização da marcação fluorescente dos núcleos dos eosinófilos igualmente fixados nos poços das lâminas. A distinção entre ANA e p-ANCA pode também ser evidenciada em neutrófilos fixados com formalina, visto que os p-ANCA desenvolvem um padrão citoplasmático enquanto os ANA mantêm o padrão nuclear, embora a intensidade de fluorescência seja muito mais baixa devido à sensibilidade dos antígenos nucleares à formalina. Na presença simultânea de ANA e p-ANCA a interpretação dos resultados é mais complicada, sendo necessário recorrer às células HEp-2 para confirmar a presença de ANA (Tabela 7).

Tabela 7 – Classificação de autoanticorpos recorrendo a neutrófilos humanos, fixados com etanol e formalina, e a células HEp-2 (26).

Tipo de Anticorpo	Fixação com Etanol	Fixação com Formalina	HEp-2
c-ANCA	Citoplasmático	Granular/citoplasmático	Negativo
p-ANCA	Nuclear/perinuclear	Granular/citoplasmático	Negativo
ANCA Atípico	Citoplasmático/perinuclear	Citoplasmático/nenhum	Negativo
ANA	Nuclear/perinuclear	Reduzido/nenhum	Nuclear
p-ANCA+ANA	Nuclear/perinuclear	Citoplasmático/reduzido	Nuclear

E.5. Anticorpos anti-Membrana Basal Glomerular

Os AMBG são autoanticorpos específicos para os domínios globulares NCI presentes nas extremidades C-terminais das cadeias α do colagénio tipo IV, um componente das membranas basais dos tecidos dos rins, pulmões, cristalino, cóclea, cérebro e testículos (26).

Os AMBG estão associados ao desenvolvimento de glomerulonefrite rapidamente progressiva, associada ou não a hemorragia pulmonar (Síndrome de Goodpasture) (26). A determinação do seus títulos no soro é útil na monitorização da doença devido à elevada correlação com a sua severidade e progressão. Aproximadamente 31% dos doentes com AMBG são também positivos para p-ANCA (a maioria específicos para a MPO), embora a influência da presença simultânea de AMBG e p-ANCA para a progressão da doença seja desconhecida (26). Os AMBG estão também associados a glomerulopatias após transplante renal (26). A pesquisa de AMBG por IFI recorrendo a tecido renal de macaco demonstra um padrão de fluorescência característico com marcação fluorescente dos glomérulos renais (Figura 33).

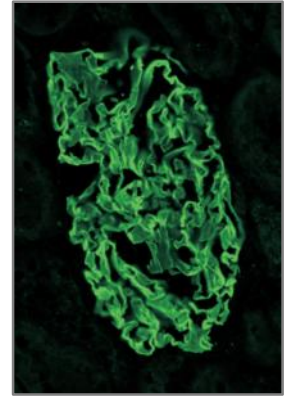


Figura 33 – Marcação fluorescente por AMBG.

E.6. Anticorpos Antimitocondriais

Os AMA são autoanticorpos específicos para diversas enzimas e componentes mitocondriais. Os anticorpos anti-M2 são os mais frequentes e os mais clinicamente relevantes, e são específicos para as subunidades do complexo piruvato desidrogenase, um complexo enzimático localizado na membrana interna mitocondrial importante para o metabolismo energético (26). Os AMA, em particular os anti-M2, estão principalmente associados à cirrose biliar primária (CBP) e são úteis no seu diagnóstico precoce, uma vez que podem ser detetados em indivíduos assintomáticos que vêm posteriormente a desenvolver a doença (26). Os AMA podem também ocorrer raramente em outras patologias, em particular na presença de anticorpos não M2, incluindo LES, lúpus induzido por fármacos, doença hepática crónica, sífilis, anemia hemolítica autoimune, hepatite induzida por fármacos e síndrome de anticorpos anti-fosfolipídicos (26). Os indivíduos saudáveis que não chegam a desenvolver patologia podem também demonstrar a presença destes autoanticorpos.

Nos ensaios de IFI com tecido triplo, a presença de AMA é evidenciada pela observação de marcação fluorescente granular do citoplasma das células hepáticas, dos túbulos proximais e distais renais e das células parietais e principais gástricas (Figura 45). A variabilidade na intensidade e nas zonas marcadas entre amostras poderá dever-se à ocorrência de diferentes tipos de AMA, embora estas diferenças não permitam a sua classificação (26). Conforme

mencionado anteriormente, os AMA podem também ser detetados em células HEp-2, através da observação de um padrão mosqueado citoplasmático grosseiro típico, embora o tecido triplo seja mais sensível e mais específico para a pesquisa destes autoanticorpos.

E.7. Anticorpos Anti-Músculo Liso

Os ASMA são autoanticorpos específicos para diversos autoantígenos presentes nos filamentos do músculo liso e músculo estriado, dentro dos quais o mais frequente e mais clinicamente relevante é a actina, uma molécula importante para a estrutura do citoesqueleto e para os processos de contração e relaxamento muscular. Os ASMA estão principalmente associados a hepatite autoimune do tipo I e a cirrose biliar primária, particularmente quando detetados em títulos elevados no soro (diluições de 1:40 e acima) (26). Os títulos mais baixos de ASMA estão normalmente associados a outras patologias, incluindo hepatite B e C crónica, esteatose não alcoólica, cirrose hepática alcoólica e outras doenças inflamatórias autoimunes, e em indivíduos saudáveis (26).

Nos ensaios de IFI, recorrendo ao tecido triplo, a deteção de ASMA é realizada através da observação da marcação fluorescente da *muscularis mucosae* no tecido gástrico, das células de músculo liso que rodeiam os capilares dos glomérulos renais (células mesangiais) e das células de músculo liso das arteríolas hepáticas (Figura 34). A presença de anticorpos anti-actina é particularmente evidenciada pela marcação fluorescente homogénea das fibras de actina interglandulares no tecido gástrico e das fibrilhas intracelulares das zonas tubulares e peritubulares do tecido renal (padrão espiculado típico) (Figura 34).

Conforme mencionado anteriormente, os anticorpos ASMA podem também ser detetados nas células HEp-2 por observação da marcação fluorescente das fibras que constituem o citoesqueleto celular, embora a sua pesquisa em tecido triplo seja mais específica devido à necessidade na observação de um conjunto de vários padrões de fluorescência em simultâneo para a identificação destes autoanticorpos.

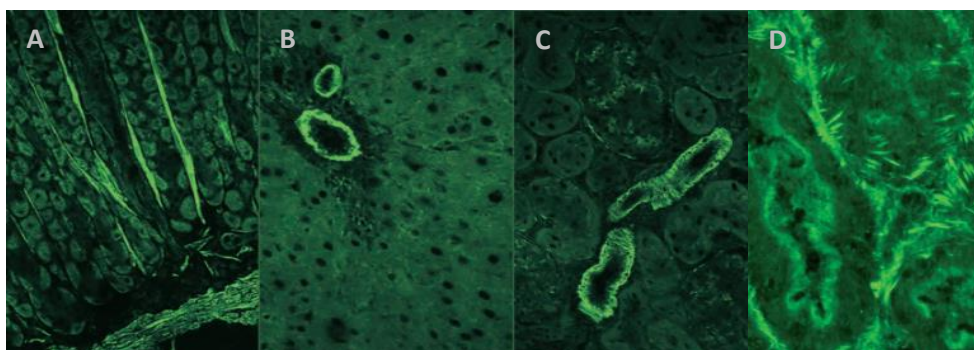


Figura 34 – Anticorpos anti-Músculo Liso em tecido triplo: (A) Marcação das fibras de actina e da *muscularis mucosae* do tecido gástrico; (B) Marcação das células de músculo liso das arteríolas hepáticas; (C) Marcação das células mesangiais renais; (D) Marcação das fibrilhas intracelulares tubulares e peritubulares do rim.

E.8. Anticorpos anti-Fração Microssomal de Fígado e Rim

Os anticorpos anti-LKM são autoanticorpos específicos para as proteínas do citocromo P450, uma superfamília extensa e diversificada de hemoproteínas (citocromos), responsáveis pelos processos metabólicos envolvidos na destoxificação e eliminação de xenobióticos (26). Os anticorpos anti-LKM do tipo I são os mais frequentes e estão principalmente associados a hepatite autoimune do tipo 2 (80-95% dos casos), podendo também ser detetados em alguns casos de hepatite C e hepatite associada à síndrome poliglandular autoimune (PGAS) (26). Os anticorpos anti-LKM-2 e anti-LKM-3 são mais raros e estão associados a hepatite induzida por fármacos e a hepatite autoimune do tipo 2, hepatite C e hepatite D, respetivamente (26).

Nos ensaios de IFI com tecido triplo, a deteção dos anticorpos anti-LKM é realizada através da observação da marcação fluorescente homogénea dos hepatócitos e dos túbulos renais proximais, com marcação fraca ou ausente a nível dos túbulos renais distais (Figura 45). Este aspeto permite que estes anticorpos sejam facilmente diferenciados dos AMA, que marcam tanto os túbulos renais proximais como os distais.

E.9. Anticorpos anti-Célula Parietal Gástrica

Os APCA são autoanticorpos específicos para as subunidades α e β das H^+/K^+ ATPases, as bombas de prótons das membranas intracelulares e apicais das células parietais gástricas responsáveis pela acidificação do suco gástrico. Os APCA estão principalmente associados a gastrite autoimune (gastrite atrófica crónica) e a anemia perniciosa, mas podem também ser detetados em várias doenças endócrinas, incluindo diabetes mellitus tipo I, hipotiroidismo e doença de Addison, e em títulos baixos em indivíduos saudáveis (26).

Na IFI com tecido triplo, a deteção de APCA é realizada através da observação da marcação fluorescente granular fina exclusiva às células parietais gástricas (Figura 45), que permite a sua diferenciação com os AMA, que também marcam o tecido renal e hepático. Neste ensaio, é particularmente importante a exclusão dos anticorpos heterófilos, visto que estes podem mimetizar o padrão dos APCA. No substrato utilizado, os anticorpos heterófilos podem ser detetados por observação da marcação característica da “bordadura em escova” do interior dos túbulos renais (Figura 40). Para excluir a ocorrência de anticorpos heterófilos em conjunto com APCA, os resultados positivos devem ser confirmados com a titulação dos anticorpos da amostra. Na presença de APCA, a fluorescência das células parietais permanecerá dominante com o aumento das diluições, enquanto a marcação associada aos anticorpos heterófilos será consideravelmente mais fraca.

E.10. Anticorpos Anti-Endomísio

Os AAE são autoanticorpos específicos para a camada de tecido conjuntivo que envolve as fibras do músculo liso e estriado (endomísio), composta por colagénio e reticulina, em conjunto com o autoantigénio alvo, a transglutaminase tecidual (tTG) (26). A tTG é uma enzima importante na cicatrização de feridas e na estabilização tanto da matriz extracelular como do espaço intracelular, através da formação de ligações cruzadas entre proteínas estruturais. A tTG é uma enzima inespecífica e está presente em outros tipos de tecido, nomeadamente no tecido gástrico, intestinal, hepático e cardíaco (26).

Os AAE da classe IgA são altamente específicos de doença celíaca e dermatite herpetiforme (26), sendo a sua pesquisa por IFI realizada recorrendo a anticorpos conjugados específicos para as cadeias pesadas α das IgA. Por outro lado, a doença celíaca ocorre frequentemente em conjunto com a deficiência seletiva de IgA, devendo ser considerada a pesquisa de AAE da classe IgG para estes casos, embora a sensibilidade do ensaio seja menor. Em crianças com doença moderada a sensibilidade do teste é muito inferior e pode resultar em falsos negativos, sendo aconselhada a utilização de outros marcadores para estes casos.

Nos ensaios de IFI recorrendo ao tecido esofágico de macaco, a presença de AAE é evidenciada não só pela marcação fluorescente da *muscularis mucosae* mas também por observação de um padrão hexagonal em “colmeia” característico em torno das fibras de músculo liso (Figura 35). Na titulação dos autoanticorpos para as amostras positivas, deve ser avaliada a diminuição da fluorescência entre as diferentes diluições de modo a detetar a possível presença dos ASMA, que também marcam o tecido muscular liso e podem interferir com os resultados deste ensaio.

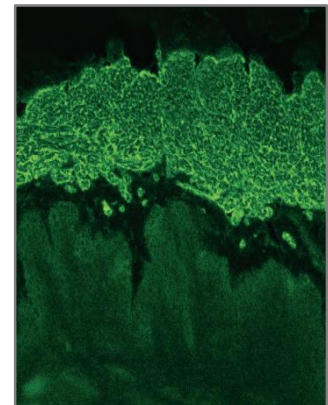


Figura 35 – Marcação fluorescente característica de AEE

E.11. Fator Reumatóide e Anticorpos anti-Peptídeos Citrulinados Cíclicos

O FR é um autoanticorpo específico para as frações Fc das imunoglobulinas humanas da classe IgG e ocorre predominantemente na forma de IgM, para além de IgG e IgA (27). O FR é um marcador sensível para o diagnóstico e monitorização da Artrite Reumatoide, uma vez que é detetado em cerca de 70-90% dos casos e as suas concentrações séricas correlacionam-se com a severidade da doença (27). A principal desvantagem da sua determinação incide na falta de especificidade para a AR, podendo ser detetado com alguma frequência em outras doenças do tecido conjuntivo (LES, DMTC e Esclerodermia), em outros tipos de patologias (hepatite, endocardite e infeções virais/parasitárias) e nos indivíduos saudáveis, sendo a sua ocorrência mais frequente com o aumento da idade (27).

Os anticorpos anti-CCP são autoanticorpos específicos para os resíduos de citrulina presentes em diversas proteínas no organismo (28). A citrulina é um aminoácido neutro formado por um processo enzimático de modificação pós-tradução que consiste na remoção do grupo imina dos resíduos de arginina proteicos. O método de doseamento dos anticorpos anti-CCP utilizado na seção de Imunologia é um método de segunda geração e apresenta sensibilidade equiparável ao ensaio do FR para o diagnóstico da AR, para além de ser um método mais específico para esta finalidade. À semelhança do FR, os anticorpos anti-CCP são também úteis na monitorização da doença, visto que a sua concentração sérica se correlaciona com sua a severidade (27,28). No diagnóstico da AR, a determinação dos anticorpos anti-CCP deve ser valorizada em conjunto com o doseamento do FR, particularmente nos casos em que os anticorpos anti-CCP são negativos e o FR é positivo, devendo ter sempre em consideração a menor especificidade do FR.

III. OUTRAS SEÇÕES

Conforme mencionado anteriormente, o estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica incluiu também a seção da Química Clínica/Imunoquímica e a seção da Microbiologia. A seção da Química Clínica/Imunoquímica engloba os ensaios bioquímicos e imunológicos destinados à determinação de numerosos marcadores utilizados no diagnóstico e monitorização de diversas patologias, nomeadamente hepáticas, renais, cardíacas, tumorais e endócrinas. À semelhança da Hematologia e da Imunologia, esta seção apresenta um grau de automatização elevado, sendo o estágio principalmente direcionado no sentido dos fundamentos teóricos dos ensaios, nos princípios de funcionamento dos equipamentos, na sua manutenção, calibração e controlo interno e externo da qualidade, e da interpretação dos resultados obtidos no contexto clínico e metodológico.

A seção da Microbiologia está principalmente reservada ao isolamento de agentes patogénicos a partir de diversos produtos biológicos, à sua identificação e avaliação da sua suscetibilidade à antibioterapia, dentro do contexto clínico. Esta seção está também destinada à análise de urina tipo II e dos sedimentos urinários e à realização dos testes serológicos e dos ensaios da Biologia Molecular, utilizados no diagnóstico e monitorização de doenças infecciosas. Ao contrário das restantes seções, trata-se de uma área com uma componente prática muito predominante. O estágio nesta seção foi principalmente direcionado para os procedimentos de inoculação dos produtos biológicos em meio de cultura e para as fases envolvidas na identificação bacteriana, nomeadamente a interpretação de resultados obtidos do crescimento bacteriano nos meios de cultura, a realização das colorações de Gram e Ziehl-Neelsen e a

interpretação das preparações coradas através da sua observação ao microscópio ótico, e a execução das provas de identificação manuais (catalase, oxidase, coagulase, antigénios de Lancefield e galerias API) e automatizadas. O estágio realizado nesta seção incidiu também na análise de urina tipo II e de sedimentos urinários e ainda nos fundamentos teóricos, execução e interpretação de ensaios serológicos.

IV. SERVIÇO DE IMUNOHEMOTERAPIA

O Serviço de Imunohemoterapia é completamente independente relativamente ao Serviço da Patologia Clínica e está principalmente destinado à realização das provas de compatibilidade no contexto das transfusões de hemocomponentes realizadas a nível do Hospital. Este Serviço encontra-se sob a responsabilidade da Dr.^a Lúcia Borges, Médica Especialista e Diretora do Serviço de Imunohemoterapia, sendo as tarefas da rotina asseguradas por uma equipa constituída por Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública e Técnicos Auxiliares de Laboratório.

A nível estrutural, o Serviço de Imunohemoterapia é principalmente constituído pelo laboratório em si, que engloba uma divisão destinada aos estudos de compatibilidade e uma segunda divisão destinada às determinações de marcadores séricos da Virologia, para além dos gabinetes médicos e uma sala reservada aos funcionários. Os auto-analisadores utilizados no Serviço de Imunohemoterapia encontram-se descritos na Tabela 8, em conjunto com as suas aplicações.

Para além do sistema Apollo, este Serviço recorre à Aplicação de Sistema de Informação de Sangue (ASIS), que permite a gestão dos registos relativos às provas de compatibilidade. Devido ao curto período de tempo decorrido no Serviço de Imunohemoterapia, o estágio foi focado apenas em alguns aspetos gerais da Imunohematologia, no fundamento dos ensaios realizados e na organização do Serviço para a execução das tarefas de rotina.

Tabela 8 – Auto-analisadores, e respetivos parâmetros avaliados, do Serviço de Imunohemoterapia.

Auto-analisador	Parâmetros avaliados
<i>Immucor Gamma Galileo Echo</i> [®]	Determinação do grupo sanguíneo AB0 e Rh (D); Fenotipagem eritrocitária; Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI).
<i>Grifols WADiana</i> [®] <i>Compact Analyser</i>	Determinação do grupo sanguíneo AB0 e Rh (D); Fenotipagem eritrocitária; Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI); Prova de compatibilidade eritrocitária; Teste antiglobulina direto (TAD).
<i>Siemens ADVIA Centaur</i> [®] <i>XP</i>	Marcadores séricos nas hepatites virais e do HIV.
<i>bioMérieux Mini VIDAS</i> [®]	Ensaio de confirmação dos resultados do Centaur [®] XP.
<i>Fujirebio Auto-LIA</i> [®]	Ensaio de confirmação dos resultados do Centaur [®] XP e do Mini VIDAS [®] .

CONCLUSÃO

Após a finalização de mais uma etapa, considero que a realização do estágio descrito neste relatório, em conjunto com o restante plano de estudos do Mestrado, uma mais-valia para a aquisição de competências teóricas e práticas dentro da área das análises clínicas. O contato tanto com a rotina laboratorial como os profissionais de saúde responsáveis pelos serviços contribuiu para um melhor entendimento da realidade associada ao laboratório clínico, assim como a aquisição de experiência profissional dentro desta área e de conhecimentos fundamentais a nível dos princípios dos métodos analíticos, dos equipamentos utilizados nos ensaios, da interpretação de dados laboratoriais e dos procedimentos empregados para garantir a qualidade dos serviços prestados.

Como Farmacêutico valorizo tudo o que aprendi com o decorrer deste curso pois os tópicos lecionados contribuíram para a reconciliação das competências adquiridas com a minha formação prévia e para a sua adaptação à área das análises clínicas. O estágio em particular permitiu o contato inicial com um mundo completamente diferente do que eu já tinha experienciado dentro das áreas de atividade farmacêutica e provou ser uma oportunidade para aplicar e rever alguns dos conhecimentos que me foram facultados no passado. Uma vez que planeio seguir a carreira farmacêutica em análises clínicas, considero tudo o que aprendi durante este percurso um aspeto positivo a nível da minha formação e espero que um dia os conhecimentos adquiridos sejam aplicados na minha vida profissional.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BAIN, Barbara J. et al. – Dacie and Lewis Practical Haematology. 11^a Ed., London, Churchill Livingstone, 2011. ISBN: 978-0-7020-3408-4.
- (2) GREER, John P. et al. - Wintrobe's Clinical Hematology, Volume I. 13^a Ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2014. ISBN 978-1-4511-7268-3.
- (3) HOFFBRAND A. V.; MOSS, P. A. H. – Fundamentos em Hematologia. 6^a Ed., Porto Alegre, Artmed, 2006. ISBN 978-85-65852-30-2.
- (4) THEML, Harald; DIEM, Heinz; HAFERLACH, Torsten – Color Atlas of Hematology, Practical Microscopic and Clinical Diagnosis. 2^a Ed., New York, Thieme, 2004. ISBN 1-58890-193-9.
- (5) GEORGE, T. I. – Malignant or benign leukocytosis. Hematology ASH Education Program 1 (2012) 475-484.
- (6) STASI, R. – How to approach thrombocytopenia. Hematology ASH Education Program 1 (2012) 191-197.
- (7) BLEEKER, J. S.; HOGAN, W. J. - Thrombocytosis: Diagnostic Evaluation, Thrombotic Risk Stratification, and Risk-Based Management Strategies. Thrombosis 2011 (2011) 1-16.
- (8) GOURGEON, M. L. – Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. Nature Reviews Immunology 3 (2003) 392-398.
- (9) KAMAL, A. H.; TEFFERI, A.; PRUTHI, R. K. – How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. Mayo Clin Proc 82 (2007) 864-873.
- (10) KHOR B.; VAN COTT, E. M. – Laboratory tests for protein C deficiency. American Journal of Hematology 85 (2010) 440–442.
- (11) KHOR B.; VAN COTT, E. M. – Laboratory tests for antithrombin deficiency. American Journal of Hematology 85 (2010) 947–950.
- (12) SACKS, David B. – Carbohydrates. In: BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E., Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, St. Louis: Saunders, 2008, ISBN: 978-0-7216-3865-2. p. 373-401.
- (13) GALLAGHER, E. J.; LE ROITH, D.; BLOOMGARDEN, Z. - Review of hemoglobin A_{1c} in the management of diabetes. Journal of Diabetes 1 (2009) 9–17.
- (14) KARCHER, Raymond E.; LANDERS, James P. – Eletrophoresis. In: BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E., Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, St. Louis: Saunders, 2008, ISBN: 978-0-7216-3865-2. p. 102-111.

(15) SILVA, R. O. P.; LOPES, A. F.; FARIA, R. M. D. – Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Revista Médica de Minas Gerais* 18 (2008) 116-122.

(16) JOHNSON, Myron A. – Amino Acids and Proteins. In: BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E., *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, St. Louis: Saunders, 2008, ISBN: 978-0-7216-3865-2. p. 285-316.

(17) KEREN, D. F. - Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis. 1ª Ed., London, Hodder Arnold, 2003. ISBN 978-0340812136.

(18) O'CONNELL T. X. I.; HORITA T.J.; KASRAVI B. – Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *American Family Physician* 71 (2005) 105-112.

(19) FAIRBANKS, K. D.; TAVILL, A. S. – Liver Disease in Alpha 1-Antitrypsin Deficiency: A Review. *American Journal of Gastroenterology* 103 (2008) 2136–2141.

(20) VAIDYA, V. S.; FERGUSON, M. A.; BONVENTRE, J. V. – Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology* 48 (2008) 463-493.

(21) DELVES, P. J. et. al – Roitt's Essential Immunology. 11ª Ed., Massachusetts, Blackwell Publishing, 2006. ISBN 978-1-4051-3603-7.

(22) JOHANSSON, S. G. O. et. al. – A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 56 (2001) 813-824.

(23) FAIRWEATHER, DeLisa – Autoimmune Disease: Mechanisms. *Encyclopedia of Life Sciences* (2007) 1-6.

(24) BELLONE, Matteo – Autoimmune Disease: Pathogenesis. *Encyclopedia of Life Sciences* (2005) 1-8.

(25) BRADWELL, A. R.; HUDGES, R. G. – Atlas of HEp-2 patterns. 3ª Ed., Birmingham, The Binding Site, 2007. ISBN 978-0704425958.

(26) HUDGES, R. G. et. al. – Atlas of Tissue Antibodies. 3ª Ed., Birmingham, The Binding Site, 2008. ISBN 978-0704427013.

(27) TAYLOR, P. et. al – A Systematic Review of Serum Biomarkers Anti-Cyclic Citrullinated Peptide and Rheumatoid Factor as Tests for Rheumatoid Arthritis. *Autoimmune Diseases* 2011 (2011) 1-18.

(28) NIEWOLD, T. B.; HARRISON, M. J.; PAGET, S. A. – Anti-CCP antibody testing as a diagnostic and prognostic tool in rheumatoid arthritis. *QJM* 100 (2007) 193-201.

ANEXOS**ANEXO A. Valores de referência para os parâmetros dos hemogramas.**

	Sexo	Idade	Valores de referência (x10¹²/L)
Eritrócitos		<8 Dias	4,0-6,0
		8 Dias-3 Meses	3,2-4,8
		3 Meses-6 Anos	4,1-5,5
		6-12 Anos	4,0-5,4
	Masculino	>12 Anos	4,5-6,5
	Feminino		3,9-5,9
			Valores de referência (g/dL)
Hemoglobina		<8 Dias	13,5-19,5
		8 Dias-3 Meses	9,5-13,5
		3 Meses-6 Anos	10,5-13,5
		6-10 Anos	11,0-13,5
		10-12 Anos	12,0-14,0
	Masculino	>12 Anos	13,0-18,0
	Feminino		11,5-16,5
			Valores de referência (%)
Hematócrito		<8 Dias	44-64
		8 Dias-3 Meses	32-44
		3 Meses-12 Anos	37-45
	Masculino	>12 Anos	41-55
	Feminino		37-47
			Valores de referência (fL)
VGM		<3 Meses	85-105
		3 Meses-12 Meses	70-86
		12 Meses-6 Anos	73-86
		6 Anos-12 Anos	77-91
		>12 Anos	76-96
			Valores de referência (pg)
HGM		<3 Meses	24-34
		3 Meses-12 Meses	23-31
		12 Meses-12 Anos	24-30
		>12 Anos	27-32
			Valores de referência (g/dL)
CHCM			32-36
			Valores de referência (%)
RDW			11-15,8

		Valores de referência ($\times 10^9/L$)
Leucócitos	<8 Dias	10,0-26,0
	8 Dias-12 Meses	6,0-18,0
	12 Meses-12 Anos	4,5-13,5
	>12 Anos	4,1-11,1
Neutrófilos	<1 Dia	5,0-13,0
	1 Dia-3 Dias	1,5-7,0
	3 Dias-6 Anos	2,0-6,0
	>6 Anos	2,0-7,5
Eosinófilos	<1 Dia	0,1-2,5
	1 Dia-3 Dias	0,2-2,0
	3 Dias-6 Anos	0,3-0,8
	>6 Anos	0,04-0,4
Basófilos	<6 Anos	<0,1
	>6 Anos	<0,4
Linfócitos	<1 Dia	3,5-8,5
	1 Dia-3 Dias	2,0-5,0
	3 Dias-6 Anos	5,5-8,5
	>6 Anos	1,5-4,0
Monócitos	<1 Dia	0,5-1,5
	1 Dia-3 Dias	0,3-1,1
	3 Dias-6 Anos	0,7-1,5
	>6 Anos	0,2-0,8
		Valores de referência ($10^9/L$)
Plaquetas		150-500

ANEXO B. Esfregaço de Sangue Periférico

A preparação de um esfregaço de sangue periférico consiste no espalhamento de uma camada fina de sangue, devidamente homogeneizada, ao longo de uma lâmina de vidro. Idealmente, a camada obtida deve ser regular e não apresentar falhas ou estrias, com a extremidade em franja e com as margens paralelas aos bordos da lâmina. A preparação adequada de um esfregaço é essencial para obter o espalhamento homogêneo das células ao longo da lâmina e garantir a qualidade dos resultados obtidos.

Procedimento para a preparação do esfregaço:

- 1 – Identificar a lâmina de acordo com a identificação presente no tubo da amostra;
- 2 – Homogeneizar a amostra por agitação suave;
- 3 – Transferir uma gota de sangue, com auxílio de um capilar, para uma das extremidades de uma lâmina limpa e sem irregularidades;

- 4 – Posicionar de imediato do bordo do espalhador (lamela), devidamente limpo e sem irregularidades, na lâmina e deslizar até ao contacto do bordo com a gota;
- 5 – Após o espalhamento da gota por capilaridade ao longo do bordo do espalhador, assegurar um ângulo de cerca de 35° entre a lâmina e o espalhador e, com um movimento firme e regular, estender a camada de sangue por arrastamento (Figura 36);
- 6 – Deixar secar durante o período de tempo adequado.

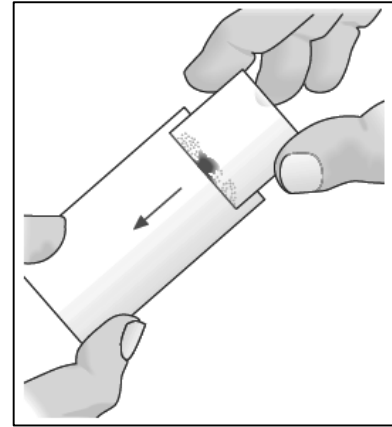


Figura 36 – Preparação de um esfregaço de sangue periférico

A espessura da camada pode ser regulada variando a pressão e a velocidade do espalhamento e alterando o ângulo ao qual o espalhador é posicionado. Nas amostras de doentes com anemia, a espessura correta é assegurada recorrendo a um ângulo mais elevado. Após secagem e coloração, os esfregaços preparados são observados ao microscópio com a objetiva de imersão de 50x. Inicialmente deve ser avaliada a qualidade tanto da preparação do esfregaço como da sua coloração, visto que só um esfregaço bem

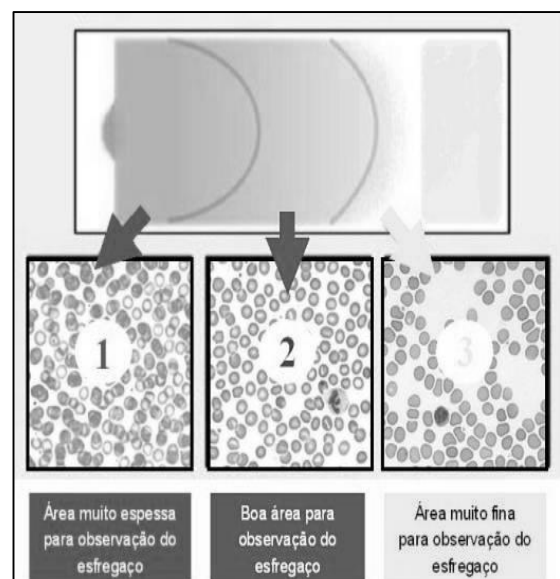


Figura 37 – Zonas de um esfregaço de sangue periférico.

preparado permite obter as conclusões corretas relativamente à amostra. Posteriormente deve ser escolhida a área ideal para a observação tendo em conta a distribuição e sobreposição das células (Figura 37). A visualização inicial dos esfregaços poderá também ser útil na deteção de determinados elementos interferentes, incluindo eritrócitos aglutinados (aglutininas a frio) e agregados plaquetários (pseudo-trombocitopenia).

ANEXO C. Coloração de Wright

A coloração de Wright consiste na modificação da técnica clássica de Romanowsky e é utilizada em rotina na seção de Hematologia para a coloração dos esfregaços de sangue periférico. O corante utilizado neste procedimento (corante de Wright) é composto pelo azul-de-metileno e pela eosina diluídos em metanol, que atua como fixador das células.

O azul-de-metileno é um corante com pH básico e possui afinidade para as estruturas ácidas das células, nomeadamente as granulações dos basófilos e o citoplasma dos linfócitos e monócitos. A eosina é um corante com pH ácido e possui afinidade para as estruturas básicas das células, incluindo as granulações dos eosinófilos e o citoplasma dos eritrócitos. As estruturas com propriedades neutras, incluindo os núcleos dos leucócitos, as granulações dos neutrófilos e as estruturas das plaquetas, apresentam afinidade para os dois corantes e por isso demonstram coloração arroxeadada ou violácea. Assim, a aplicação de dois corantes com propriedades de pH distintas demonstra elevada utilidade na visualização das estruturas celulares durante a observação microscópica dos esfregaços, particularmente a nível da diferenciação entre os diferentes tipos de leucócitos.

Procedimento para a Coloração de Wright:

- 1 – Cobrir completamente a lâmina do esfregaço com o corante de Wright e deixar atuar durante 5 minutos;
- 2 – Cobrir a lâmina do esfregaço com solução tampão sem retirar o corante de Wright e deixar atuar durante 10 minutos;
- 3 – Lavar a lâmina com água corrente e deixar secar.

ANEXO D. Coloração de May-Grünwald-Giemsa

À semelhança da técnica de Wright, a coloração de May-Grünwald-Giemsa é baseada nos métodos de coloração clássicos de Romanowsky. Deste modo, os corantes de May-Grünwald e Giemsa são essencialmente compostos por uma mistura de eosina (corante ácido) e azul-de-metileno (corante básico), diluídos em metanol (fixador), e fornecem resultados semelhantes relativamente à coloração de Wright na observação microscópica dos esfregaços. Embora seja normalmente utilizada em esfregaços de sangue periférico, a técnica de May-Grünwald-Giemsa é principalmente utilizada na seção da Hematologia para a coloração de esfregaços de medula óssea.

Procedimento para a Coloração de May-Grünwald-Giemsa:

- 1 – Colocar os esfregaços numa tina com metanol e deixar durante 10 minutos (20 minutos para esfregaços de medula óssea);
- 2 – Transferir os esfregaços para uma tina com corante May-Grünwald diluído e deixar atuar durante 10 minutos;
- 3 – Transferir os esfregaços para uma tina com corante Giemsa diluído e deixar atuar durante 20 minutos;

- 4 – Lavar com água corrente e deixar secar;
- 5 – Montagem das lâminas com lamelas e auxílio de uma resina para a colagem.

ANEXO E. Coloração de Perls

Na seção da Hematologia, a coloração de Perls é utilizada em esfregaços de medula óssea para a observação microscópica de depósitos de ferro e dos grânulos de ferritina nos sideroblastos. A visualização destes depósitos é proporcionada pelo ferrocianeto de potássio da Solução de Perls, que reage com os cátions férricos para formar o ferrocianeto de ferro observado nas preparações como grânulos de coloração azulada. Esta coloração é particularmente importante no auxílio ao diagnóstico de síndromes mielodisplásicas, em particular a anemia refratária com sideroblastos em anel (Figura 38).

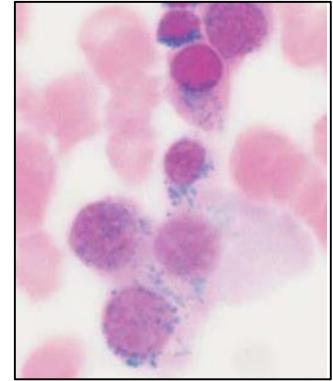


Figura 38 – Sideroblastos em anel (4).

Procedimento para a Coloração de Perls:

- 1 – Ligar o banho-maria a 56°C;
- 2 – Preparar a Solução de Perls antes de cada coloração (mistura de partes iguais de ferrocianeto de potássio e HCl 0,2 N)
- 3 – Fixar os esfregaços em metanol durante 10 minutos e deixar secar;
- 4 – Colocar os esfregaços numa tina com Solução de Perls e tapar;
- 5 – Colocar a tina no banho-maria e deixar atuar durante 5 minutos com o banho desligado;
- 6 – Lavar as lâminas com água destilada e secar com papel absorvente;
- 7 – Cobrir as lâminas com safranina diluída (corante de contraste) e deixar atuar durante 20 minutos;
- 8 – Lavar com água destilada e deixar secar;
- 9 – Montagem das lâminas com lamelas e auxílio de uma resina para a colagem.

ANEXO F. Valores de referência para as provas da coagulação.

Parâmetro	Valores de referência	Unidades
Tempo de Protrombina	10-12	Segundos
Tempo de Tromboplastina Parcial ativada	23-32	Segundos
Fibrinogênio	180-350	mg/dL
D-dímeros	<500	ng/mL
Proteína C	70-140	%
Proteína S	M: 67,5-139 F: 60,1-113,6	%
Anti-trombina	87-126	%

ANEXO G. Valores de referência para as hemoglobinas específicas.

Parâmetro	Valores de referência (%)
Hemoglobina A _{1c}	4-6
Hemoglobina A ₂	1,3-3,7
Hemoglobina F	< 1

ANEXO H. Valores de referência e principais proteínas das frações obtidas por separação eletroforética de amostras de soro.

Frações	Valores de referência no soro (%)	Principais proteínas
Albumina	55,8 - 66,1	Albumina
Fração α ₁	2,9 - 4,9	α ₁ -antitripsina α ₁ -glicoproteína ácida α-fetoproteína
Fração α ₂	7,1 - 11,8	Haptoglobina α ₂ -macroglobulina Ceruloplasmina
Fração β ₁	4,7 - 7,2	Transferrina C ₄
Fração β ₂	3,2 - 6,5	C ₃
Fração γ	11,1 - 18,8	Imunoglobulinas Proteína C Reativa

Para o cálculo da concentração de cada fração é utilizada a concentração de proteínas totais obtida nos ensaios da seção da Química Clínica/Imunoquímica. Os valores de referências para as proteínas totais no soro e na urina são 5,7-8,2 g/dL e <149 mg/24h, respetivamente.

ANEXO I. Eletroforese em amostras de urina.

Para a eletroforese em amostras de urina de 24h o procedimento é semelhante ao utilizado para as amostras de soro. A principal diferença é a preparação prévia das amostras através da sua filtração por diálise, visando a eliminação de compostos interferentes e a concentração das proteínas na amostra. Os sistemas de dialise utilizados consistem em tubos de 20 mL com uma membrana de polietersulfona (PES) de porosidade específica, que permite a retenção de macromoléculas de peso molecular acima de 10 kDa durante a centrifugação dos tubos. Deste modo, as proteínas da amostra são retidas e concentradas na membrana de dialise enquanto os compostos de peso molecular mais baixo são filtrados por centrifugação.

Procedimento para a preparação de amostras de urina para eletroforese:

- 1 – Centrifugar a amostra a 4000 g durante 10 minutos;
- 2 – Fazer a pré-diluição do sobrenadante conforme a concentração de proteínas totais (PT) determinada na seção da Química Clínica/Imunoquímica (Tabela 9);

Tabela 9 – Diluições realizadas na preparação de amostras de urina para eletroforese.

[PT]	Pré-diluição	V _{urina}	V _{solução tampão (pH=9,9)}
< 1 g/L	Não	2 mL	18 mL
1 < PT < 3	Não	0,5 mL	19,5 mL
> 3 g/L	Diluir em solução tampão até 3 g/L	0,5 mL	19,5 mL

- 3 – Transferir o volume de sobrenadante (V_{urina}) para o dispositivo de diálise, de acordo com a concentração de proteínas totais (Tabela 9), e adicionar o volume correspondente de solução tampão (V_{solução tampão}) até obter um volume final de 20 mL;
- 4 – Homogeneizar a urina diluída por inversão do dispositivo de diálise;
- 5 – Centrifugar a amostra a 4400 g durante 40 minutos;
- 6 – Rejeitar o filtrado após a centrifugação;

7 – Completar o volume de 0,5 mL, visualizado na graduação da cavidade inferior do sistema de diálise (Figura 39), com solução tampão, tendo o cuidado de recolher qualquer porção da amostra que possa ter permanecido na zona plana superior do sistema de diálise;

8 – Ressuspender a amostra na solução tampão e transferir a sua totalidade para um microtubo de 1,5 mL;

9 – Alterar o modo do funcionamento do equipamento para o programa adaptado a amostras de urina e realizar a eletroforese da amostra concentrada.

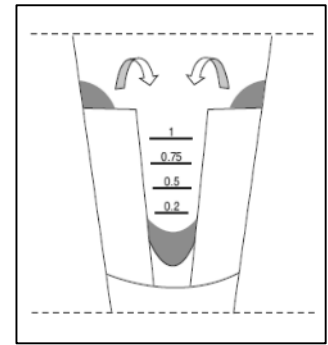


Figura 39 – Sistema de diálise para amostras de urina.

ANEXO J. Valores de referência nos doseamentos de proteínas específicas.

Parâmetro	Valores de referência	Unidades
α I-antitripsina	90-200	mg/dL
B2M (Soro)	1090-2530	ng/mL
B2M (Urina)	<300	
Cistatina C	0,5-1,0	mg/dL
Haptoglobina	30-200	mg/dL
C3	90-180	mg/dL
C4	10-40	mg/dL
Cadeias κ (Soro)	200-440	mg/dL
Cadeias λ (Soro)	90-210	
Cadeias κ (Urina)	<7,1	mg/L
Cadeias λ (Urina)	<3,9	

ANEXO K. Valores de referência das imunoglobulinas.

Imunoglobulinas	Sexo/Idade	Valores de referência (mg/dL)
IgG	M/F: <1 Ano	400-1760
	M/F: 1-10 Anos	350-1620
	M/F: 10-30 Anos	650-1620
	M/F: >30 Anos	650-1690
IgM	M: <3 Meses	6-66
	M: 3 Meses-1 Ano	30-183
	M: 1-30 Anos	30-265
	M: >30 Anos	37-258

	F: <3 Meses	6-66
	F: 3 Meses-1 Ano	34-206
	F: 1-30 Anos	34-348
	F: >30 Anos	39-338
IgA	M: <10 Anos	17-318
	M: >10 Anos	57-543
	F: <10 Anos	25-290
	F: >10 Anos	57-543

ANEXO L. Anticorpos IgE específicos quantificados por EIA.

	Testes para IgE específicos:	Descrição:
Rastreios Phadiatop®	Phadiatop®	Conjunto de alergénios inalantes para o rastreio de IgE específicas de vários grupos.
	Phadiatop Infant®	Conjunto de alergénios inalantes e alimentares para o rastreio de IgE específicas de vários grupos.
Painéis Multi-Rast	Painel de alergénios alimentares	Componentes do trigo, leite, clara de ovo, bacalhau, amendoim e grão de soja.
	Painel de alergénios de Ervas Daninhas	Componentes de erva de santiago/tasneira (<i>Ambrosia elatior</i>), artemísia verdadeira (<i>Artemisia vulgaris</i>), corrijó/tanchagem (<i>Plantago lanceolata</i>), pé de ganso (<i>Chenopodium álbum</i>) e soda/barrilha espinhosa (<i>Salsola kali</i>).
	Painel de alergénios de Gramíneas	Componentes de panasco (<i>Dactylis glomerata</i>), sargaço bravo (<i>Festuca elatior</i>), azevém (<i>Lolium perenne</i>), rabo-de-gato (<i>Phleum pratense</i>) e erva de febra (<i>Poa pratensis</i>)
	Epitélios e proteínas de animais	Componentes da caspa de gato (<i>Felis domesticus</i>) e caspa de cão (<i>Canis familiaris</i>).
	Pó de casa	Diversos componentes presentes na poeira das casas, em particular alergénios de animais (ácaros e baratas).
IgE específicas a um alérgeno	Leite de Vaca	Conjunto de diversos componentes do leite.
	Clara do Ovo	Conjunto de diversos componentes da clara do ovo.
	Gema do Ovo	Conjunto de diversos componentes da gema do ovo.
	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Componentes extraídos a partir de ácaros das casas.
	<i>Dermatophagoides farinae</i>	
	<i>Lepydoglyphus destructor</i>	Componentes extraídos a partir de ácaros dos armazéns.
	Oliveira	Componentes do pólen de oliveira (<i>Olea europaea</i>).
Látex	Secreções naturais de <i>Hevea brasiliensis</i> não sujeitas a tratamento com amónia.	

Alergologia Molecular	Albumina do ovo	Proteína de 44 kDa purificada a partir da clara do ovo.
	Mucóide do ovo	Proteína de 28 kDa purificada a partir da clara do ovo.
	Amoxicilina	Presente na forma do derivado amoxiciloil, ligado <i>in vivo</i> a aminoácidos (determinante antigénico); Avalia a potencial reatividade cruzada com outras penicilinas.

ANEXO M. Imunofluorescência indireta.

A imunofluorescência indireta é a metodologia utilizada na pesquisa e titulação de autoanticorpos em amostras de soro para o diagnóstico e monitorização de doenças autoimunes. A técnica utilizada consiste essencialmente na incubação de amostras diluídas de soro em poços com material celular/tecidual (substrato) adsorvido, com adição posterior de um anticorpo anti-imunoglobulina humana conjugado com um composto fluorescente (FITC). Caso a amostra apresente os autoanticorpos a serem pesquisados, estes irão ligar-se especificamente aos autoantígenos presentes no substrato e não serão removidos durante a lavagem com solução tampão. Os anticorpos conjugados ligam-se às imunoglobulinas que permaneceram nos poços, permitindo o desenvolvimento de marcação fluorescente dos substratos, observada ao microscópio de fluorescência.

No contexto da avaliação de doenças autoimunes, os autoanticorpos mais frequentemente detetados são do tipo IgG. A utilização de anticorpos conjugados específicos para as cadeias pesadas γ permite deste modo eliminar a deteção de anticorpos de outras classes e diminuir a obtenção de resultados menos relevantes. Na seção da Imunologia todos os ensaios de IFI são realizados recorrendo a anticorpos conjugados anti-IgG, com exceção da pesquisa de anticorpos anti-endomísio que é específica para autoanticorpos do tipo IgA.

Procedimento para os ensaios de Imunofluorescência Indireta:

- 1 – Permitir que as lâminas com substrato e os reagentes atinjam a temperatura ambiente;
- 2 – Caso necessário, preparar a solução tampão de PBS a partir da solução concentrada – diluir 25 mL de solução PBS concentrada em 975 mL de água desionizada, adicionar 2-3 gotas de solução de azul de Evans 1% (melhora o contraste na visualização dos resultados) e misturar;
- 3 – Diluir adequadamente as amostras de soro em solução PBS diluída, de acordo com o grupos de autoanticorpos a pesquisar ou as titulações a serem realizadas;
- 4 – Transferir uma gota (20-25 μ L) dos controlos positivos e negativos e das amostras diluídas para os poços pré-definidos;

- 5 – Incubar as lâminas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante 30 minutos, numa câmara com atmosfera húmida (o substrato não pode secar durante o procedimento);
- 6 – Lavar as lâminas com auxílio de uma pipeta e solução de PBS diluída, evitando direcionar a ponta da pipeta para os poços de modo a prevenir danos no substrato, e colocar numa tina com a solução tampão diluída durante 5 minutos, com agitação;
- 7 – Remover o excesso de solução tampão e adicionar imediatamente uma gota de solução de anticorpo conjugado com FITC a cada um dos poços;
- 8 – Incubar novamente as lâminas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante 30 minutos, numa câmara com atmosfera húmida;
- 9 – Lavar as lâminas pelo processo descrito anteriormente, repetindo o processo de lavagem na tina duas vezes, renovando a solução tampão de PBS a cada lavagem;
- 10 – Remover o excesso de solução tampão e realizar de imediato a montagem das lâminas por adição de uma gota de meio de montagem (0,09% de azida de sódio) a cada dois poços e emprego de uma lamela a cobrir a totalidade dos poços, evitando a formação de bolhas de ar;
- 11 – Deixar as lâminas estabilizar por refrigeração (4°C) e posteriormente à temperatura ambiente;
- 12 – Observar a marcação fluorescente do substrato ao microscópio de fluorescência, com as objetivas de 10x e de 40x.

Na interpretação dos resultados, a deteção de um determinado tipo de autoanticorpo é realizada através da observação de intensidade de fluorescência significativa acima da diluição limite estabelecida (Anexo N), em conjunto com os padrões específicos a cada ensaio. A presença de elementos interferentes na amostra, nomeadamente lipémia, icterícia e hemólise, pode dificultar a interpretação dos resultados através do desenvolvimento de fluorescência de fundo ou alteração da produção de fluorescência pelos anticorpos conjugados. A visualização adequada dos resultados pode também ser dificultada pela presença de anticorpos heterófilos (Figura 40). Os anticorpos heterófilos são anticorpos humanos que podem ligar-se a determinados antígenos de tecidos animais produzindo falsos positivos por mimetização de padrões de fluorescência clinicamente relevantes. Estes anticorpos variam de acordo com os diferentes tecidos e

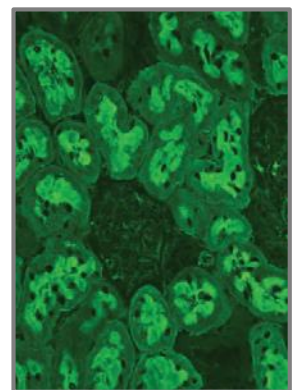


Figura 40 – Anticorpos heterófilos em tecido renal de rato (26).

espécies animais utilizadas e são normalmente detetados em tecidos de rato, devido à menor homologia com os tecidos humanos.

Substratos Utilizados:

1) Células HEp-2

A linha celular HEp-2 é o substrato utilizado na pesquisa e titulação de anticorpos antinucleares, embora a sua estrutura celular permita também a detecção de autoanticorpos específicos para componentes citoplasmáticos. Embora inicialmente consideradas como células de carcinoma da laringe humano, as células HEp-2 resultam de uma contaminação com células HeLa (células do cancro cervical humano). Este substrato é atualmente aplicado como substituto do tecido triplo de rato, inicialmente aplicado na avaliação de ANA, e apresenta as seguintes vantagens relativamente a estes tecidos:

a) Distribuição uniforme e de níveis elevados de autoantigénios – maior sensibilidade na identificação de vários padrões de fluorescência clinicamente relevantes;

b) Células de origem humana – maior especificidade ao método, associada à semelhança em autoantigénios;

c) Núcleos de grandes dimensões – maior detalhe nos padrões de fluorescência complexos;

d) Disposição das células em monocamada – melhor visibilidade de todos os núcleos;

e) Células em várias fases da divisão mitótica – visualização de padrões de fluorescência adicionais devido à variabilidade na marcação da cromatina condensada e do citoplasma das células em divisão (Figura 41).

Devido à sua elevada sensibilidade, este substrato é essencialmente utilizado no rastreio de um conjunto de diversos anticorpos antinucleares. Embora a inespecificidade das células HEp-2 não permita a sua utilização para a identificação de autoanticorpos específicos, a informação obtida nestes ensaios pode ser um passo inicial importante neste sentido.

2) *Crithidia luciliae*

O protozoário monoflagelado *Crithidia luciliae* (Figura 42) é o substrato utilizado para a pesquisa de anticorpos anti-dsDNA. Estruturalmente, este microrganismo unicelular é caracterizado por uma mitocôndria de grandes dimensões que possui no seu interior uma massa condensada de dsDNA (cinetoplasto). A aplicação deste substrato permite a detecção sensível e específica de anticorpos anti-dsDNA devido à elevada condensação do dsDNA e à

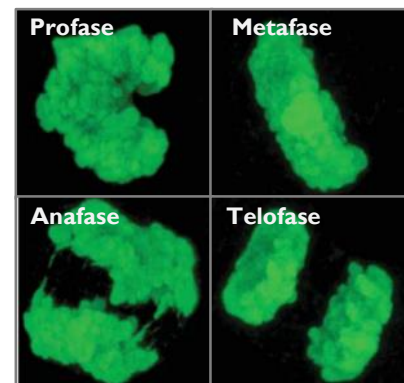


Figura 41 – Padrão nuclear homogéneo nas diferentes fases da mitose (26).

ausência de ssDNA, histonas ou outros autoantígenos nucleares na sua composição. O ensaio de IF com este substrato é normalmente utilizado para complementar os resultados da pesquisa de ANA, devido à inespecificidade das células HEp-2 no diagnóstico de LES.

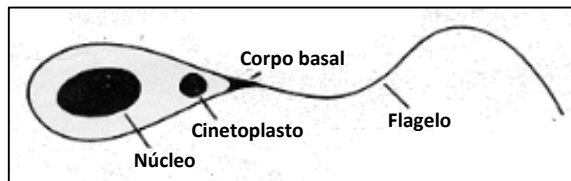


Figura 42 – Estrutura celular do protozoário *Crithidia luciliae*.

3) Neutrófilos humanos

Os neutrófilos humanos são utilizados na pesquisa de anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos, que são específicos para as proteínas presentes nas granulações destas células. Conforme o método utilizado na fixação deste substrato, a disposição dos grânulos citoplasmáticos é alterada, permitindo deste modo auxiliar a identificação diferencial dos dois grupos principais destes autoanticorpos (c-ANCA e p-ANCA). Na fixação com etanol, as proteínas dos grânulos fortemente catiónicas migram para a membrana nuclear (carregada negativamente), enquanto as proteínas fracamente catiónicas ou neutras permanecem no citoplasma. Nestas condições, os autoanticorpos específicos para proteínas carregadas positivamente levam ao desenvolvimento de padrões perinucleares/nucleares (p-ANCA), enquanto os específicos para proteínas carregadas negativamente levam ao desenvolvimento de padrões citoplasmáticos (c-ANCA) (Figura 43). Nas lâminas fixadas com formalina, o reagente induz a formação de ligações cruzadas entre os autoantígenos e outras proteínas do citoplasma, impedindo a sua migração para a membrana nuclear. Como resultado, os padrões observados nestas lâminas são exclusivamente citoplasmáticos (Figura 43).

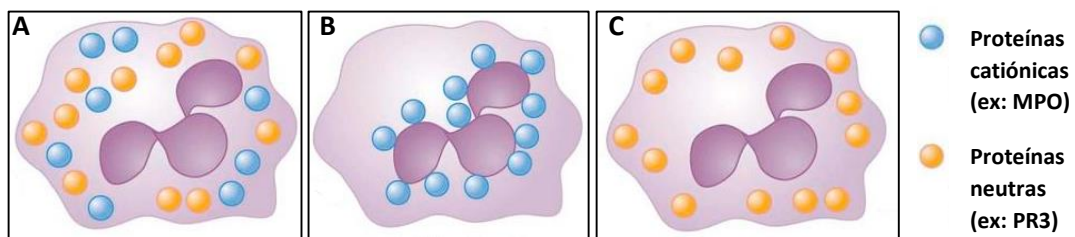


Figura 43 – Disposição das granulações dos neutrófilos na fixação com formalina (A) e em etanol (B – p-ANCA; C – c-ANCA).

A principal vantagem da utilização deste substrato incide no facto de ser uma linha celular humana que, ao apresentar a composição ideal em autoantígenos de interesse clínico, confere maior sensibilidade ao método. Este substrato permite ainda a deteção de anticorpos antinucleares, que são diferenciados dos p-ANCA que demonstram marcação nuclear através da avaliação dos eosinófilos também presentes a nível do substrato. Devido à sua

especificidade para as granulações dos neutrófilos, os p-ANCA não marcam a zona nuclear/perinuclear dos eosinófilos, enquanto os ANA reagem com os autoantígenos nucleares presentes em todos os tipos de células presentes no substrato.

4) Tecido triplo

O tecido triplo é um conjunto de seções de tecido gástrico, hepático e renal (córtex e medula) de rato (Figura 44) e é utilizado na pesquisa de anticorpos antimitocondriais, anti-músculo liso, anti-célula parietal gástrica e anti-fração microssomal de fígado/rim. A aplicação dos três tecidos no mesmo poço é vantajosa pois permite a observação de diferentes padrões de fluorescência para cada tecido em simultâneo, que em combinação auxiliam a identificação específica dos autoanticorpos avaliados. Deste modo, a validação da presença de um grupo de autoanticorpos deve obedecer a determinados critérios relativamente aos padrões observados para cada tecido, o que torna a interpretação dos resultados mais completa e método mais específico (Figura 45).

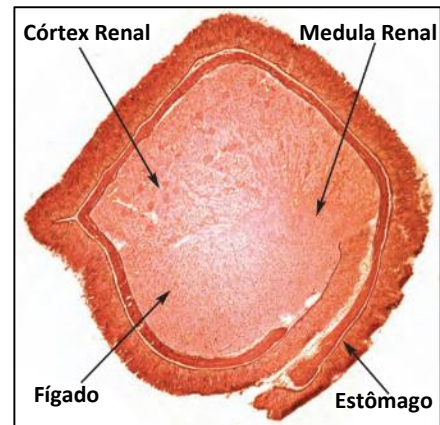


Figura 44 – Tecido triplo (26).

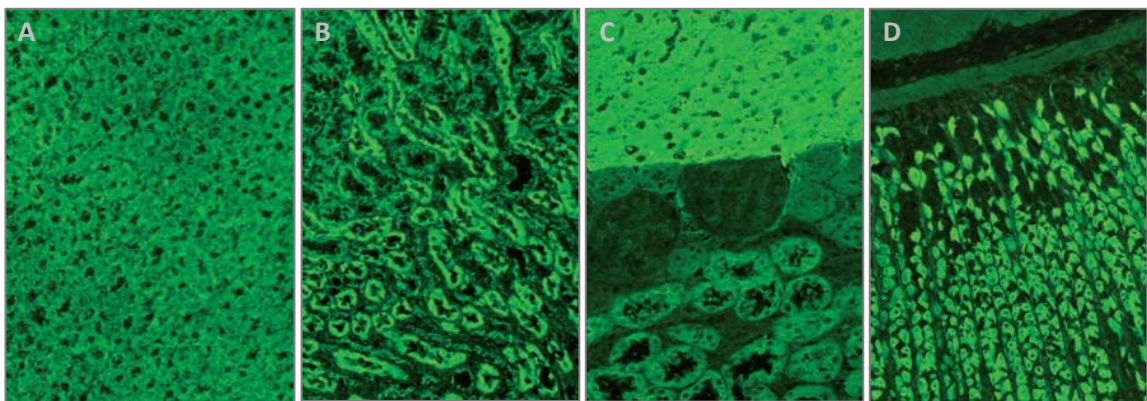


Figura 45 – Padrões de fluorescência em tecido triplo: (A) e (B) Anticorpos Antimitocondriais em tecido hepático e renal, respetivamente; (C) Anticorpos anti-LKM em tecido hepático e renal; (D) Anticorpos anti-Célula Parietal Gástrica em tecido gástrico (26).

A principal desvantagem da utilização deste substrato é a discrepância na composição em autoantígenos entre estes tecidos e os tecidos humanos, o que torna este ensaio menos sensível e resulta na observação de padrões com fluorescência menos intensa e de falsos negativos. A diferença na composição de antígenos reflete-se também na ocorrência dos anticorpos heterófilos, os quais podem dificultar a validação da presença de autoanticorpos clinicamente relevantes.

Este substrato permite também a detecção dos anticorpos antinucleares, através da marcação fluorescente dos núcleos dos diferentes tipos de tecido, embora as características das células HEp-2 previamente discutidas tornem esse substrato mais sensível e específico para esta finalidade.

5) Tecido esofágico de macaco

O tecido esofágico de macaco é o substrato utilizado na pesquisa de anticorpos anti-endomísio. Este tecido apresenta a vantagem de ser mais semelhante aos tecidos humanos, em termos de estruturas e de composição em autoantígenos, permitindo maior especificidade na detecção de autoanticorpos. No entanto, as imunoglobulinas presentes nos compartimentos vasculares e extravasculares do tecido apresentam também elevada homologia com as imunoglobulinas humanas e podem demonstrar reatividade cruzada com os anticorpos conjugados e resultar no aumento da fluorescência de fundo. Para evitar este problema, são utilizados anticorpos purificados de elevada afinidade para a imunoglobulina humana, que aumentam a especificidade da detecção de autoanticorpos humanos por ligação a epítomos específicos a estas imunoglobulinas (Figura 46).

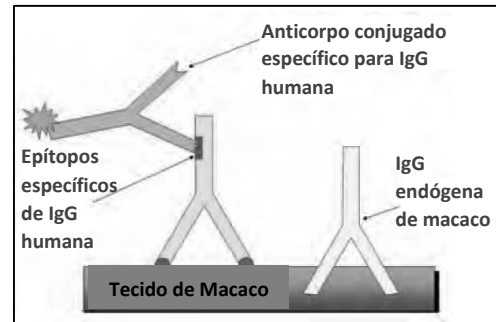


Figura 46 – Aplicação de anti-Ig humana em tecido de macaco (26).

extravasculares do tecido apresentam também elevada homologia com as imunoglobulinas humanas e podem demonstrar reatividade cruzada com os anticorpos conjugados e resultar no aumento da fluorescência de fundo. Para evitar este problema, são utilizados anticorpos purificados de elevada afinidade para a imunoglobulina humana, que aumentam a especificidade da detecção de autoanticorpos humanos por ligação a epítomos específicos a estas imunoglobulinas (Figura 46).

6) Tecido renal de macaco

O tecido renal de macaco é o substrato utilizado na pesquisa de anticorpos anti-membrana basal glomerular. Devido à sua natureza, este tecido apresenta as mesmas vantagens e desvantagens relativamente ao substrato mencionado anteriormente, sendo utilizado em conjunto com anticorpos conjugados de elevada afinidade para imunoglobulinas humanas para maior especificidade na detecção dos autoanticorpos. Uma vez que os autoantígenos de interesse se encontram relativamente inacessíveis devido à conformação proteica, o substrato é previamente incubado com uma solução de ureia, durante 30 minutos em atmosfera húmida, permitindo deste modo aumentar a sensibilidade do método.

ANEXO N. Autoanticorpos avaliados e respectivos valores de referência utilizados nos ensaios de IFI e na quantificação de autoanticorpos específicos.

Autoanticorpo determinado	Diluição de referência em IFI	Valores de referência nos EIA/Ensaio Nefelométricos
Ac's Antinucleares	1:160 (1:80 para < 15 anos)	---
Ac's anti-Sm	---	< 10 UI/mL (Equívoco: 5,0-10 UI/mL)
Ac's anti-UI-snRNP	---	
Ac's anti-SSA	---	< 10 UI/mL (Equívoco: 7,0-10 UI/mL)
Ac's anti-SSB	---	
Ac's anti-Scl70	---	
Ac's anti-Jo-1	---	
Ac's anti-Centrômero	---	
Ac's anti-dsDNA	1:10	< 15 UI/mL (Equívoco: 10-15 UI/mL)
Ac's anti-Citoplasma dos Neutrófilos	1:20	---
Ac's anti-PR3	---	< 3,0 UI/mL (Equívoco: 2,0-3,0 UI/mL)
Ac's anti-MPO	---	< 5,0 UI/mL (Equívoco: 3,5-5,0 UI/mL)
Ac's Antimitocondriais	1:20	---
Ac's anti-Músculo Liso	1:40	---
Ac's anti-Célula Parietal Gástrica	1:20	---
Ac's anti-LKM	1:20	---
Ac's Anti-Endomísio (IgA)	1:5	---
Ac's anti-Membrana Basal Glomerular	1:5	---
Fator Reumatoide	---	< 30 UI/mL
Ac's anti-CCP	---	< 10 UI/mL (Equívoco: 7,0-10 UI/mL)

