



Cátia Sofia Correia Pires

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Cátia Sofia Correia Pires

# Relatório de Estágio

## Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, decorrido no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil E.P.E. - realizado entre Novembro de 2014 e Junho de 2015, abordando as áreas clínicas de Hematologia e de Imunologia e Hormonologia.

Orientador Externo – Doutor Frederico Fernando Monteiro Marques Valido

Orientador Interno – Professora Doutora Teresa do Carmo Pimenta Dinis Silva

Setembro de 2015





## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>v</b>
<b>Índice de esquemas e tabelas</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>ix</b>
<b>Resumo / Abstract</b>	<b>xiii</b>
<b>I. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>II. Caraterização do laboratório</b>	<b>2</b>
<b>III. Atividades desenvolvidas</b>	<b>4</b>
<b>A. Setor de Química Clínica</b>	<b>4</b>
<b>B. Setor de Microbiologia</b>	<b>5</b>
<b>C. Setor de Hematologia</b>	<b>6</b>
<b>1. Caraterização do laboratório</b>	<b>6</b>
<b>2. Amostras biológicas</b>	<b>6</b>
2.1. Circuito de amostras	<b>7</b>
<b>3. Equipamentos e princípios de funcionamento</b>	<b>8</b>
3.1. <i>Beckman Coulter LH 750</i> <sup>®</sup>	<b>9</b>
3.2. <i>ALIFAX</i> <sup>®</sup> <i>TEST 1 BCL</i>	<b>11</b>
3.3. <i>ACL TOP 500</i> <sup>®</sup> <i>Instrumentation Laboratory</i>	<b>11</b>
3.4. <i>Beckman Coulter FC500-MCL</i> <sup>®</sup>	<b>12</b>
3.5. <i>WESCOR Aerospray</i> <sup>®</sup> <i>7150 Hematology Slide-Cytocentrifuge</i>	<b>13</b>
<b>4. Testes Laboratoriais</b>	<b>14</b>
<b>4.1. Hemograma</b>	<b>14</b>
4.1.1. Série vermelha	<b>14</b>
4.1.1.1. Reticulócitos	<b>16</b>
4.1.2. Série branca	<b>16</b>
4.1.2.1. Neutrófilos	<b>17</b>
4.1.2.2. Linfócitos	<b>18</b>
4.1.2.3. Monócitos	<b>18</b>
4.1.2.4. Eosinófilos	<b>19</b>

4.1.2.5. Basófilos	19
4.1.3. Série megacariocítica	19
<b>4.2. Esfregaço sanguíneo</b>	<b>20</b>
4.2.1. Técnica de realização de um esfregaço sanguíneo	21
4.2.2. Coloração do esfregaço sanguíneo	22
<b>4.3. Velocidade de sedimentação</b>	<b>22</b>
<b>4.4. Hemostase</b>	<b>23</b>
4.4.1. Avaliação laboratorial da hemostase	24
4.4.1.1. Tempo de Protrombina (PT)	26
4.4.1.2. Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (aPTT)	27
4.4.1.3. Tempo de Trombina (TT)	27
4.4.1.4. Quantificação de Fibrinogénio	28
4.4.1.5. Produtos de Degradação da Fibrina	28
4.4.1.6. Estudos de Trombofilia – Anticoagulante Lúpico	29
<b>5. Controlo de Qualidade</b>	<b>30</b>
<b>D. Setor de Imunologia e Hormonologia</b>	<b>31</b>
<b>6. Caracterização do laboratório</b>	<b>31</b>
<b>7. Amostras biológicas</b>	<b>31</b>
7.1. Circuito de amostras	32
<b>8. Equipamentos e princípios de funcionamento</b>	<b>34</b>
8.1. <i>Immulite 2000<sup>®</sup> XPI</i> , Siemens	36
8.2. <i>ADVIA Centaur<sup>®</sup> XP Immunoassay system</i> , Siemens	36
8.3. <i>Cobas e601 Analyser<sup>®</sup></i> , Roche Diagnostics	37
8.4. <i>Kryptor<sup>®</sup></i> , Brahms	38
8.5. <i>BNProSpec<sup>®</sup></i> , Siemens	38
8.6. <i>Liaison<sup>®</sup></i> , DiaSorin	39
8.7. <i>Hydrasys<sup>®</sup></i> , Sebia	39
8.8. <i>UniCAP<sup>®</sup> 100<sup>E</sup></i> , Pharmacia Diagnostics	40
8.9. <i>Automatic gamma counter, 1272 CliniGamma</i> , LKB Wallac	40
<b>9. Hormonologia</b>	<b>41</b>
<b>10. Testes Laboratoriais</b>	<b>42</b>
<b>10.1. Hipófise</b>	<b>42</b>
10.1.1. Hormona estimuladora da tiróide	43
10.1.2. Hormona adrenocorticotrófica	43

10.1.3. Hormona folículo-estimulante e Hormona luteinizante	44
10.1.4. Prolactina	44
<b>10.2. Tiróide</b>	<b>45</b>
10.2.1. Tiroglobulina	45
10.2.2. Triiodotironina	45
10.2.3. Tiroxina	46
10.2.4. T3 e T4 livres	46
10.2.5. Anticorpos anti-tiroideos	46
10.2.6. Calcitonina	47
<b>10.3. Paratiróide</b>	<b>47</b>
10.3.1. Hormona paratiróideia	47
<b>10.4. Supra-Renal</b>	<b>48</b>
10.4.1. Ácido vanilmandélico	48
10.4.2. Metanefrinas e Normetanefrinas	48
10.4.3. Cortisol	48
10.4.4. Aldosterona	49
10.4.5. Renina	49
10.4.6. Androstenediona	49
10.4.7. Dehidroepiandrosterona e Dehidroepiandrosterona sulfato	50
<b>10.5. Ovários e Testículos</b>	<b>50</b>
10.5.1. 17 $\beta$ -estradiol	50
10.5.2. Progesterona	51
10.5.3. Testosterona	51
<b>10.6. Técnicas manuais</b>	<b>52</b>
<b>10.7. Proteinograma</b>	<b>52</b>
<b>11. Controlo de Qualidade</b>	<b>55</b>
<b>IV. Conclusões</b>	<b>57</b>
<b>V. Referências Bibliográficas</b>	<b>59</b>

## **Anexos**

<b>Anexo I -</b>	Valores de referência em vigência no setor de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG	<b>63</b>
<b>Anexo II -</b>	Fórmulas de cálculo de parâmetros relativos à série vermelha	<b>64</b>
<b>Anexo III -</b>	Parâmetros analíticos avaliados no setor de Imunologia e Hormonologia e relação com o método de detecção e equipamento de leitura	<b>65</b>
<b>Anexo IV -</b>	Valores de referência em vigência no setor de Imunologia e Hormonologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG	<b>66</b>
<b>Anexo V -</b>	Parâmetros analíticos avaliados por técnicas manuais no setor de Imunologia e Hormonologia	<b>69</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1-</b> <i>Beckman Coulter LH 750<sup>®</sup></i>	<b>9</b>
<b>Figura 2-</b> Representação esquemática do Princípio Coulter ou princípio da impedância elétrica (Retirado de <a href="http://www.beckmancoulter.com">http://www.beckmancoulter.com</a> )	<b>9</b>
<b>Figura 3-</b> <i>ALIFAX<sup>®</sup> TEST I BCL</i>	<b>11</b>
<b>Figura 4-</b> <i>ACL TOP 500<sup>®</sup> Instrumentation Laboratory</i>	<b>11</b>
<b>Figura 5-</b> <i>Beckman Coulter FC500-MCL<sup>®</sup></i>	<b>12</b>
<b>Figura 6-</b> Representação esquemática do funcionamento do equipamento <i>Beckman Coulter FC500-MCL<sup>®</sup></i> (Adaptado de <a href="https://www.abdserotec.com">https://www.abdserotec.com</a> )	<b>13</b>
<b>Figura 7-</b> <i>WESCOR Aerospray<sup>®</sup> 7150 Hematology Slide-Cytocentrifuge</i>	<b>13</b>
<b>Figura 8-</b> Eritrócitos num esfregaço sanguíneo (Imagem adaptada do manual Fundamentos em Hematologia, 6 <sup>a</sup> ed, artmed, 2013)	<b>14</b>
<b>Figura 9-</b> Reticulócitos num esfregaço sanguíneo (Imagem adaptada do manual Dacie and Lewis, Practical Haematology, 9th edition, Churchill Livingstone, 2001)	<b>16</b>
<b>Figura 10-</b> Neutrófilo num esfregaço sanguíneo (Imagem adaptada do manual Fundamentos em Hematologia, 6 <sup>a</sup> ed, artmed, 2013)	<b>17</b>
<b>Figura 11-</b> Linfócito num esfregaço sanguíneo (Imagem adaptada do manual Fundamentos em Hematologia, 6 <sup>a</sup> ed, artmed, 2013)	<b>18</b>
<b>Figura 12-</b> Monócito num esfregaço sanguíneo (Imagem adaptada do manual Fundamentos em Hematologia, 6 <sup>a</sup> ed, artmed, 2013)	<b>18</b>
<b>Figura 13-</b> Eosinófilo num esfregaço sanguíneo (Imagem adaptada do manual Fundamentos em Hematologia, 6 <sup>a</sup> ed, artmed, 2013)	<b>19</b>

<b>Figura 14-</b>	Basófilo num esfregaço sanguíneo (Imagem adaptada do manual Fundamentos em Hematologia, 6 <sup>a</sup> ed, artmed, 2013)	<b>19</b>
<b>Figura 15-</b>	Agregado de plaquetas num esfregaço sanguíneo (Imagem adaptada do manual Dacie and Lewis, Practical Haematology, 9th edition, Churchill Livingstone, 2001)	<b>19</b>
<b>Figura 16-</b>	Representação esquemática da realização de um esfregaço sanguíneo	<b>21</b>
<b>Figura 17-</b>	Representação esquemática das vias da cascata da coagulação: via intrínseca (à esquerda), via extrínseca (à direita) e via comum (ao centro, em baixo) (Retirado de Robbins and Cotran Pathologic Basic of Disease, 9th edition, Elsevier, 2015)	<b>25</b>
<b>Figura 18-</b>	Fórmula de cálculo do valor de INR	<b>26</b>
<b>Figura 19-</b>	<i>Immolute 2000<sup>®</sup> XPI, Siemens</i>	<b>36</b>
<b>Figura 20-</b>	<i>ADVIA Centaur<sup>®</sup> XP Immunoassay system, Siemens</i>	<b>36</b>
<b>Figura 21-</b>	<i>Cobas e601 Analyser<sup>®</sup>, Roche Diagnostics</i>	<b>37</b>
<b>Figura 22-</b>	<i>Kryptor<sup>®</sup>, Brahms</i>	<b>38</b>
<b>Figura 23-</b>	<i>BNProSpec<sup>®</sup>, Siemens</i>	<b>38</b>
<b>Figura 24-</b>	<i>Liaison<sup>®</sup>, DiaSorin</i>	<b>39</b>
<b>Figura 25-</b>	<i>Hydrasys<sup>®</sup>, Sebia</i>	<b>39</b>
<b>Figura 26-</b>	<i>UniCAP<sup>®</sup> 100<sup>E</sup>, Pharmacia Diagnostics</i>	<b>40</b>
<b>Figura 27-</b>	<i>Automatic gamma counter, 1272 CliniGamma, LKB Wallac</i>	<b>40</b>
<b>Figura 28-</b>	Representação da localização anatómica das principais glândulas endócrinas do organismo humano e hormonas associadas (Adaptado de <sup>©</sup> Elsevier, Inc. – Netterimages.com)	<b>42</b>
<b>Figura 29-</b>	Exemplo de um perfil eletroforético normal no qual podem ser distinguidas cinco frações individualizadas – albumina, $\alpha_1$ , $\alpha_2$ , $\beta$ e $\gamma$ – globulinas (Imagem cedida pelo setor de Imunologia e Hormonologia do IPOCFG)	<b>53</b>

## ÍNDICE DE ESQUEMAS E TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Esquema 1-</b> Circuito a que as amostras biológicas obedecem no setor de Hematologia. As linhas a tracejado correspondem a testes não requeridos pelo clínico prescritor mas que o validador entende serem úteis na validação dos resultados	<b>7</b>
<b>Esquema 2-</b> Circuito a que a maioria das amostras biológicas obedece no setor de Imunologia e Hormonologia	<b>34</b>
	<b>Página</b>
<b>Tabela 1-</b> Tratamento a que as diferentes amostras biológicas são submetidas na fase Pré-Analítica no setor de Imunologia e Hormonologia	<b>32</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH** – Hormona adrenocorticotrófica (*Adrenocorticotropic Hormone*)
- ADH** – Hormona antidiurética (*Antidiuretic Hormone*)
- AEQ** – Avaliação Externa da Qualidade
- AL** – Anticoagulante Lúpico
- ALD** – Aldosterona
- Anti-TG** – Anticorpo anti-tiroglobulina
- Anti-TPO** – Anticorpo anti-tiroperoxidase
- aPTT** – Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (*Activated Partial Thromboplastin Time*)
- CGA** – Cromogranina A
- CHCM** – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
- CID** – Coagulação Intravascular Disseminada
- CLIA** – *Chemiluminescence immunoassay*
- CQI** – Controlo de Qualidade Interno
- CRH** – Hormona libertadora da corticotrofina (*Corticotropin-Releasing Hormone*)
- DHEA** – Dehidroepiandrosterona (*Dehydroepiandrosterone*)
- DHEAs** – Dehidroepiandrosterona sulfato (*Dehydroepiandrosterone sulfate*)
- dRVVT** – Tempo de Veneno de Víbora de Russel diluído (*Dilute Russell's Viper Venom Time*)
- EA** – Éster de Acridina
- ECLIA** – *Electrochemiluminescence immunoassay*
- EDTA-K3** – Ácido etilenodiaminotetracético tripotássico
- FEIA** – *Fluoro-enzyme Immunosorbent Assay*
- FFUC** – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
- FSC** – *Forward Scatter*
- FSH** – Hormona folículo-estimulante (*Follicle-Stimulating Hormone*)
- FT** – Fator tecidual
- FVW** – Fator *von Willebrand*
- GnRH** – Hormona libertadora de gonadotrofinas (*Gonadotropin-Releasing Hormone*)

**Hgb** – Hemoglobina

**HCM** – Hemoglobina Corpuscular Média

**HTA** – Hipertensão arterial

**Htc** – Hematócrito

**INR** – *International Normalized Ratio*

**INSA** – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

**Ig** – Imunoglobulina

**IPOCFG** – Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil

**IRMA** – *Immunoradiometric assay*

**ISI** – *International Sensitivity Index*

**LCR** – Líquido cefalorraquidiano

**LH** – Hormona luteinizante (*Luteinizing Hormone*)

**MAC** – Mestrado em Análises Clínicas

**MTP** – Metanefrinas

**NMP** – Normetanefrinas

**OHP** – 17-hidroxi-progesterona

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**PDF** – Produtos de Degradação da Fibrina

**PMP** – Partículas paramagnéticas

**POMC** – Pró-opiomelanocortina

**PRL** – Prolactina

**PT** – Tempo de Protrombina (*Prothrombin Time*)

**PTH** – Hormona paratiróideia (*Parathyroid Hormone*)

**RIA** – *Raddioimmunoassay*

**RBC** – Células sanguíneas vermelhas (*Red Blood Cells*)

**RDW** – Amplitude de distribuição de eritrócitos (*Red cell Distribution Width*)

**RIQAS** – *Randox International Quality Assessment Scheme*

**RNA** – Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

**rpm** – rotações por minuto

**SCT** – *Silica clotting time*

**SPC** – Serviço de Patologia Clínica

**SSC** – *Side Scatter*

**TBG** – Globulina ligadora de tiroxina (*Thyroxin Binding Globulin*)

**TBPA** – Pré-albumina ligadora de tiroxina (*Thyroxin Binding Pré-albumin*)

**TEL** – Testosterona livre

**TES** – Testosterona total

**TG** – Tiroglobulina

**TRAB** – Anticorpo anti-recetor de TSH (*Thyrotropin Receptor Antibody*)

**TRACE** – *Time Resolved Amplified Cryptate Emission*

**TRH** – Hormona libertadora da tirotrófina (*Thyrotropin-Releasing Hormone*)

**TSH** – Hormona estimuladora da tiróide (*Thyroid-Stimulating Hormone*)

**TT** – Tempo de Trombina (*Thrombin Time*)

**T3** – Triiodotironina

**T4** – Tiroxina

**UK NEQAS** – *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

**VCM** – Volume Corpuscular Médio

**VCS** – Volume, Condutividade e Dispersão (*Volume, Conductivity, Scatter*)

**VMA** – Ácido vanilmandélico (*Vanilmandelic acid*)

**VS** – Velocidade de sedimentação

**WBC** – Células sanguíneas brancas (*White blood cells*)



## **RESUMO**

O presente trabalho constitui o relatório de estágio curricular efetuado como parte integrante e conclusiva do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC). Este documento resulta da experiência por mim adquirida durante a realização do estágio no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil (IPOCFG).

Neste relatório são primeiramente descritas as características do local onde decorreu o estágio e em seguida abordadas, de forma resumida, as áreas de Química Clínica e Microbiologia. Finalmente, com maior detalhe, são apresentados os setores de Hematologia e de Imunologia e Hormonologia.

## **ABSTRACT**

The present work represents an internship report made as integrant and conclusive part of Master in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy, University of Coimbra (FFUC). This document is the result of the experience gained by me during the course of the internship at the Service of Clinical Pathology of Francisco Gentil Portuguese Institute of Oncology at Coimbra (IPOCFG).

In this report, first is described the characteristics of the local where de internship took place and then presented, briefly, areas such as Clinical Chemistry and Microbiology. Finally, with greater emphasis, will be presented the sectors of Hematology and Immunology and Hormonology.



## I. INTRODUÇÃO

O laboratório de análises clínicas constitui uma peça fundamental no processo dinâmico que se inicia com a prescrição de exames laboratoriais pelo clínico e que termina com a avaliação da eficácia de medidas terapêuticas, implementadas na tentativa de correção de um desequilíbrio do estado fisiológico do organismo humano. Ao longo deste processo as análises clínicas demonstram ser uma mais-valia em diversas etapas, desde o diagnóstico ao acompanhamento e prognóstico da doença. Torna-se assim essencial que o laboratório assegure que os resultados por ele emitidos sejam fiéis e concordantes com a real situação clínica do doente, garantindo a qualidade dos serviços prestados. Essa qualidade depende de todos os profissionais do laboratório de análises clínicas, desde administrativos a médicos especialistas em Patologia Clínica, técnicos de diagnóstico e terapêutica e técnicos superiores de saúde.

O Serviço de Patologia Clínica (SPC) corresponde a um dos vários serviços do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil (IPOCFG), unidade hospitalar de referência na prestação de cuidados de saúde na área da oncologia. O SPC é composto por quatro grandes valências: Hematologia, Microbiologia, Química Clínica e Imunologia e Hormonologia, tendo sido neste serviço que realizei o meu estágio curricular, sob orientação do Dr. Frederico Valido, responsável pela direção do SPC.

Como objetivos da realização deste estágio destacam-se a integração no meio profissional e contacto com outros profissionais da área de saúde, a aplicação de conhecimentos teórico-práticos adquiridos durante a formação no Mestrado em Análises Clínicas (MAC) e a capacidade de desenvolvimento de trabalho, não só em equipa mas também de forma autónoma.

O estágio curricular no Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG teve a duração de sete meses, dois dos quais consistiram na repetição das duas valências a abordar de forma mais detalhada neste relatório – a Hematologia e a Imunologia e Hormonologia.

## II. CARATERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

O Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG é dirigido pelo doutor Frederico Fernando Monteiro Marques Valido, médico especialista em Patologia Clínica, e conta com vários profissionais que diariamente asseguram a qualidade dos serviços prestados à comunidade que a instituição serve. Desde médicos, bioquímicos, farmacêuticos, biólogos, técnicos de análises, administrativos e auxiliares de ação médica, todos contribuem para satisfazer as necessidades dos pacientes que, na sua maioria, correspondem a doentes oncológicos em fase de tratamento ou em regime de *follow-up*.

Na sua totalidade o SPC é composto por uma sala de espera, duas salas de colheita, uma área administrativa/secretariado, um gabinete da direção, um gabinete médico, uma sala polivalente e pelas áreas correspondentes às variadas valências que o serviço abrange.

Na área administrativa começam por ser registados os exames laboratoriais do utente no sistema informático do serviço, conforme a informação que consta na requisição médica. O mesmo tratamento é dado aos produtos biológicos de doentes internados na instituição e que chegam ao SPC por meio de auxiliares de ação médica ou a amostras colhidas por técnicos de diagnóstico e terapêutica, que se deslocam às várias enfermarias para efetuar as colheitas. Para utentes em ambulatório, a colheita é feita na sala do próprio serviço destinada a esse fim. Uma vez efetuado o registo e a colheita das amostras, estas são transportadas para os diferentes setores (consoante os exames laboratoriais requeridos pelo clínico prescriptor), para serem analisadas. Após o processamento analítico da amostra, os resultados são validados pelo médico especialista em Patologia Clínica ou pelo técnico superior de saúde e, posteriormente, transmitidos ao clínico prescriptor. Diariamente, o SPC regista um total de, aproximadamente, 300 utentes.

Em termos de tecnologia, o SPC constitui um serviço que dispõe dos mais variados equipamentos que, de forma automática ou semi-automática, permitem os mais variados testes laboratoriais. É pois um serviço que acompanha a evolução da tecnologia, o que se traduz em vantagens significativas, não só para o técnico que contacta diretamente com as amostras biológicas e executa os diferentes testes, como também para o próprio utente.

Um dos objetivos inerente a qualquer laboratório de análises clínicas é garantir que os seus serviços satisfazem as necessidades do utente, no contexto dos cuidados de saúde. O controlo da qualidade deve portanto ser uma preocupação de todo e qualquer laboratório. No SPC, a qualidade dos resultados analíticos é assegurada diariamente pelo Controlo de Qualidade Interno (CQI) e pela participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), nacionais e/ou internacionais, ao nível de todas as áreas clínicas do serviço.

O CQI trata-se de um controlo diário e intra-laboratorial, dizendo respeito a todo o conjunto de procedimentos internos com vista a controlar a qualidade dos resultados produzidos, visando normalmente a melhoria da sua precisão. Na prática este controlo é feito ao nível de todos os equipamentos utilizados na rotina diária do setor e consiste na análise de duas a três amostras controlo, cuja concentração é conhecida.

Já o controlo externo (AEQ) corresponde a um método de avaliação do desempenho do laboratório por uma entidade externa e acreditada. Neste caso, são analisadas amostras de características desconhecidas, enviadas pela entidade organizadora do programa no qual o laboratório se terá inscrito previamente. A participação nestes programas, que podem ser organizados a nível nacional (PNAEQ) ou internacional (RIQAS, UK NEKAS), permite assegurar que o resultado obtido para os diversos parâmetros laboratoriais analisados se aproxima do seu valor real (visando assim uma melhoria da exatidão), para além da recolha de dados que possibilitam ao laboratório a avaliação do desempenho dos métodos, reagentes e equipamentos em uso.

### III. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

#### A. SETOR DE QUÍMICA CLÍNICA

Os recursos humanos do setor de Química Clínica são compostos por um médico especialista em Patologia Clínica, responsável pelo setor, um técnico superior de saúde e três técnicos de diagnóstico e terapêutica.

No setor de Química Clínica são analisados diversos parâmetros bioquímicos que elucidam acerca do funcionamento de diversos órgãos do organismo humano e que incluem enzimas, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, gases e iões. Além dos testes bioquímicos mais comuns são também executadas provas serológicas manuais, cuja metodologia base é, na maioria dos casos, a aglutinação.

Os diferentes parâmetros analíticos são determinados, maioritariamente, de forma automatizada e no soro, fluído biológico obtido a partir do sangue total. Com menor frequência são também avaliadas amostras de outro tipo tais como a urina, o líquido cefalorraquidiano (LCR) e outros líquidos biológicos.

Dos diversos equipamentos disponíveis no setor destacam-se os seguintes:

- Três autoanalisadores que executam a determinação da maioria dos parâmetros bioquímicos: o *Cobas<sup>®</sup> 6000 Analyser Series HITACHI* e o *Cobas<sup>®</sup> c311*, ambos da *Roche<sup>®</sup> Diagnostics*;
- *Rapidlab<sup>®</sup> 1265 series*, da *Siemens* para gasometria;
- *ABL 805* e *ABL 825*, da *Radiometer<sup>®</sup> Copenhagen* utilizados para gasometria e na determinação do cálcio ionizado;
- *Reflotron Plus*, da *Roche<sup>®</sup> Diagnostics* usado na confirmação de um resultado relativo a parâmetros analíticos pré-definidos;
- *RapidChem<sup>™</sup> 744*, da *Bayer<sup>®</sup>*, usado na confirmação de um resultado relativo aos iões sódio, cloreto e potássio.

No setor de Química Clínica tive a oportunidade de participar na preparação pré-analítica das amostras biológicas e contactei também com os diversos equipamentos de que o setor dispõe.

## B. SETOR DE MICROBIOLOGIA

O setor de Microbiologia encontra-se sob a responsabilidade de uma médica especialista em Patologia Clínica e é ainda composto por um técnico superior de saúde e três técnicos de diagnóstico e terapêutica.

Este é, de todos os setores, aquele que apresenta maior diversidade no tipo de amostras que processa. Desde os produtos mais frequentes como urinas, expetorações e hemoculturas até outros menos comuns como cateteres, LCR, exsudatos vaginais, fezes ou raspados de unha. A Microbiologia corresponde também ao setor do SPC que apresenta o menor fluxo diário de amostras mas em contrapartida é o que mais depende do técnico para a execução das respetivas análises. Neste setor são realizados estudos bacteriológicos, parasitológicos e micológicos consoante o pedido do clínico. A grande maioria do trabalho é feita manualmente, como é o caso da sementeira dos produtos nos meios de cultura, o isolamento de estirpes bacteriológicas, os testes rápidos de identificação presuntiva bem como a realização de exames diretos a fresco e com coloração. Outros estudos implicam passos de execução manual antes de a amostra ser analisada pelo respetivo equipamento como é o caso dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, da identificação automática de microrganismos ou da análise sumária de urina (urina tipo II).

De entre os vários equipamentos existentes destacam-se:

- *BD Bactec™ 9050 Blood Culture System*, para a incubação e monitorização das hemoculturas;
- *Vitek® 2 Compact 15*, da *bioMérieux* para identificação automatizada de microrganismos e respetivos testes de sensibilidade aos antimicrobianos;
- *Urisys® 1800*, da *Roche Diagnostics* para execução da análise sumária de urina;
- Microscópios óticos para a observação de sedimentos urinários e outros exames diretos a fresco e com coloração;
- Estufas a diferentes temperaturas para incubação das amostras.

No setor de Microbiologia participei na realização das mais diversas tarefas da rotina laboratorial desde a sementeira de produtos nos meios de cultura apropriados, execução de esfregaços, coloração e observação microscópica, realização da análise sumária de urina e identificação de microrganismos de forma automatizada.

## C. SETOR DE HEMATOLOGIA

### I. Caracterização do laboratório

Dos recursos humanos do setor de Hematologia fazem parte uma médica especialista em Patologia Clínica, responsável pelo setor, um assistente hospitalar, um técnico superior de saúde e três técnicos de diagnóstico e terapêutica.

O setor compreende duas salas fisicamente separadas. Na primeira são recebidas as amostras de sangue acompanhadas da respectiva requisição. Este é também o local de realização do hemograma, de determinação da velocidade de sedimentação (VS) e onde são feitas algumas técnicas manuais tais como os esfregaços de sangue e de medula óssea e respectiva observação microscópica. Na segunda sala são feitos os estudos da coagulação sanguínea e de imunofenotipagem por citometria de fluxo.

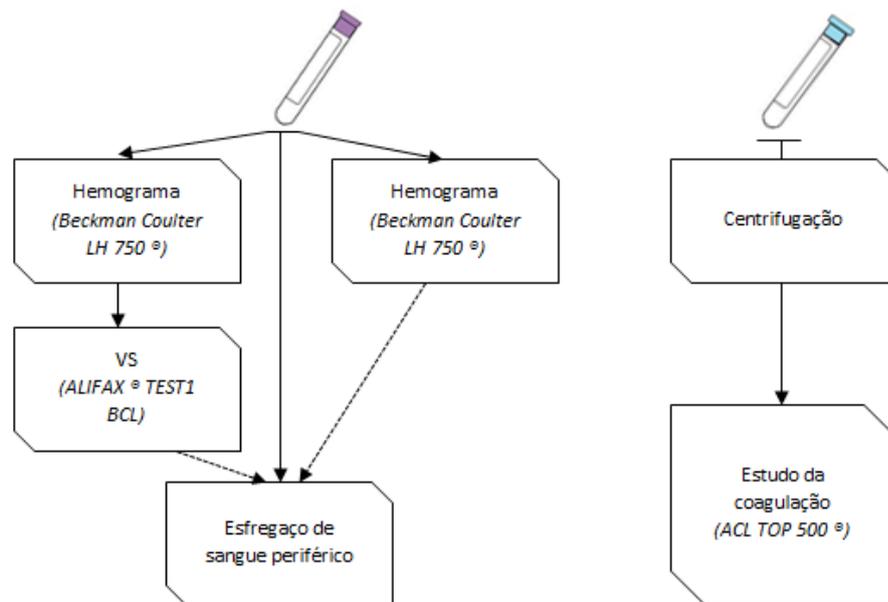
### 2. Amostras biológicas

O setor de Hematologia recebe essencialmente amostras de sangue periférico (colhido na sala de colheitas do próprio Serviço de Patologia Clínica ou em enfermarias da instituição), sendo processadas diariamente cerca de duzentas a trezentas amostras. Com menor frequência são avaliadas amostras de outro tipo, tais como aspirados de medula óssea ou líquidos biológicos, de entre os quais o líquido cefalorraquidiano.

As amostras de sangue periférico destinadas à realização do hemograma e VS são colhidas para tubos contendo EDTA tripotássico (EDTA-K3) como anticoagulante. O EDTA, ao quelatar o cálcio, impede a ocorrência da cascata da coagulação do sangue por este ser um catião bivalente essencial para a formação da trombina. Por outro lado, conserva a morfologia tanto de leucócitos como de eritrócitos e facilita a contagem de plaquetas. Já as amostras de sangue destinadas aos estudos da coagulação devem ser colhidas para tubos contendo citrato de sódio como anticoagulante (na proporção 9:1). O citrato de sódio tem o mesmo efeito que o EDTA sobre o ião cálcio mas, ao contrário do EDTA, apresenta um efeito reversível. Assim, a adição de cálcio ao plasma citratado permite facilmente reverter o efeito do anticoagulante, o que resulta na disponibilização do cálcio para as diversas fases da cascata da coagulação onde o ião participa. O tratamento a que as amostras são sujeitas

depende dos testes de coagulação requeridos pelo clínico prescriptor. Para estudos de rotina a amostra é centrifugada a 3000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos e só posteriormente é submetida a análise. Para estudos mais específicos, como é o caso da pesquisa do anticoagulante lúpico, a amostra deve ser centrifugada duas vezes, cada centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos. Este último procedimento é feito para que se consiga obter plasma sem plaquetas e não um plasma pobre em plaquetas.

## 2.1. Circuito de amostras



Esquema I: Circuito a que as amostras biológicas obedecem no de setor Hematologia. As linhas a tracejado correspondem a testes não requeridos pelo clínico prescriptor mas que o validador entende serem úteis na validação dos resultados.

Assim que as amostras de sangue chegam ao laboratório de Hematologia são separadas conforme o tipo de análise requerido (hemograma e/ou VS, esfregaço de sangue periférico e estudo da coagulação). A cada tubo é posteriormente atribuída uma vinheta com código de barras, conforme o número do dia que foi conferido ao paciente pelo serviço do secretariado. O código de barras permite a identificação da amostra pelos equipamentos automáticos do setor.

Depois de devidamente etiquetadas, as amostras são colocadas num agitador automático até serem introduzidas num suporte adequado que é posteriormente inserido no equipamento de realização do hemograma e/ou VS. Se solicitado na requisição ou se o validador entender ser necessário, a amostra de sangue é ainda sujeita à realização de um esfregaço sanguíneo e respetiva observação microscópica, antes de o tubo ser colocado nos suportes de amostras já analisadas. Relativamente às amostras destinadas aos estudos da coagulação, estas são centrifugadas, etiquetadas e só depois analisadas no respetivo equipamento. No esquema I encontra-se o circuito a que as amostras obedecem neste setor.

### **3. Equipamentos e princípios de funcionamento**

O setor de Hematologia dispõe de dois contadores de células, dois analisadores de VS, um equipamento de coloração de esfregaços, um microscópio ótico, duas centrífugas (uma das quais refrigerada), dois analisadores da coagulação e um citómetro de fluxo. Tanto os contadores de células como os analisadores da coagulação são utilizados alternadamente durante a semana, exceto se for necessário confirmar os resultados obtidos para uma determinada amostra. Nesta situação, a mesma amostra é analisada pelo equipamento que nesse dia não está definido para a rotina do laboratório.

Em seguida são referidos os equipamentos automáticos indispensáveis na atividade que o setor desenvolve diariamente, bem como, uma breve descrição do princípio de funcionamento de cada um.

### 3.1. Beckman Coulter LH 750®



Figura 1: Beckman Coulter LH 750®.

O Beckman Coulter LH 750® é o equipamento utilizado para a realização de hemogramas (Figura 1). O seu funcionamento é baseado no Princípio Coulter para contagem das células sanguíneas, na tecnologia VCS para a diferenciação das populações leucocitárias e na fotometria para a quantificação da hemoglobina.

O Princípio Coulter, ou princípio da impedância elétrica, é baseado na medição de alterações numa corrente elétrica produzidas durante a passagem de partículas, neste caso de células sanguíneas, através de um pequeno orifício situado entre dois eletrodos <sup>(1)</sup>. Para tal, na câmara de contagem é aplicada uma corrente elétrica de baixa frequência entre o eletrodo externo (situado ao nível da suspensão celular) e o interno (submerso num tubo de vidro que possui um pequeno orifício). As células suspensas numa solução condutora (diluyente) passam através da pequena abertura do tubo de vidro causando uma diferença de potencial entre os dois eletrodos submersos (Figura 2). Tal gera um impulso elétrico que é detetado e medido: o número de pulsos é proporcional ao número de células contadas e o tamanho dos pulsos ao volume de cada célula <sup>(1,2)</sup>.

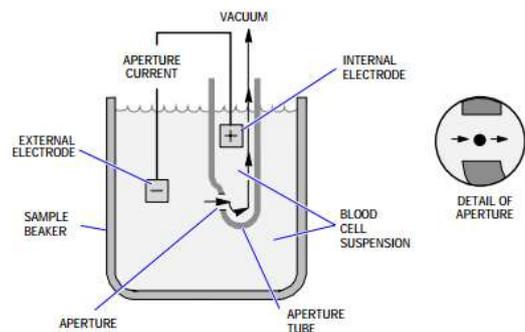


Figura 2: Representação esquemática do Princípio Coulter ou princípio da impedância elétrica (Retirado de <http://www.beckmancoulter.com>).

Na prática, a amostra de sangue é aspirada e dividida por duas câmaras de contagem. Os eritrócitos e as plaquetas são contados numa mesma câmara por possuírem tamanhos bastante diferentes (células entre 2 a 20 fL são contadas como plaquetas e células com mais de 36 fL como eritrócitos), enquanto os leucócitos são contados numa segunda câmara.

A contagem diferencial das cinco populações leucocitárias é possível conjugando a medida do tamanho da célula (*volume*), a condutividade (*conductivity*) e a dispersão (*scatter*) da luz laser provocada por cada tipo de leucócito – tecnologia VCS. Para tal a amostra é tratada com um sistema de dois reagentes. Um primeiro reagente procede à lise dos eritrócitos da amostra, seguindo-se a atuação de um reagente estabilizador de leucócitos, o qual permite manter as células brancas na sua forma quase nativa, fator essencial para a sua contagem.

O sistema contém uma célula de fluxo de cristal de quartzo através da qual os leucócitos são obrigados a passar utilizando a técnica de focagem hidrodinâmica. Tal, garante que as células passem, uma a uma, em frente a um detetor à medida que vão sendo avaliadas para os três parâmetros distintos (tamanho, condutividade e a dispersão). O tamanho de cada leucócito é determinado com base no Princípio Coulter. Para a condutividade é utilizada uma corrente eletromagnética que ao penetrar no leucócito permite obter informação acerca da estrutura interna da célula, incluindo a sua composição química e volume nuclear. Utilizando uma luz laser conclui-se acerca das características superficiais de cada célula, consoante a dispersão da luz que é provocada pela interação luz laser-leucócito. As três determinações são feitas em simultâneo e os resultados expressos num gráfico tridimensional <sup>(3,4)</sup>.

Para a quantificação da hemoglobina é utilizada a fotometria. A absorvância da amostra diluída é avaliada a um comprimento de onda de 525 nm. Esta medição é feita antes da contagem dos leucócitos e implica a lise dos glóbulos vermelhos com consequente libertação do conteúdo de hemoglobina. A absorvância é proporcional à quantidade de hemoglobina presente na amostra <sup>(5)</sup>.

Este equipamento permite ainda a contagem dos reticulócitos, sendo para tal utilizada a coloração supra-vital com o Novo Azul de Metileno. A amostra de sangue total é primeiramente incubada com o corante, o qual é responsável pela precipitação de substâncias basofílicas presentes no reticulócito – o RNA. O corante não ligado e a hemoglobina são posteriormente removidos por um reagente de limpeza. Finalmente a amostra é analisada através da tecnologia VCS <sup>(5)</sup>.

### 3.2. ALIFAX® TEST I BCL



Figura 3: ALIFAX® TEST I BCL.

O equipamento ALIFAX® TEST I BCL (Figura 3) é um analisador automático fechado utilizado na determinação da velocidade de sedimentação das amostras de sangue, a qual depende da capacidade de agregação dos glóbulos vermelhos. O seu princípio de funcionamento baseia-se na técnica da fotometria capilar.

Os tubos com as amostras de sangue são colocados em “racks” que são introduzidas no equipamento. Usando uma agulha de aspiração, o analisador procede à extração de sangue a partir do tubo de colheita primário, à sua distribuição num capilar e à centrifugação a 20g. O sistema utiliza um microfotómetro de infravermelhos e um detetor de fotodíodos, responsável pela medição dos impulsos elétricos gerados, os quais se encontram diretamente relacionados com a agregação dos eritrócitos presentes em cada capilar. Finalmente, através de um algoritmo matemático, os dados obtidos são convertidos em resultados de VS (mm/h) <sup>(6)</sup>.

### 3.3. ACL TOP 500® Instrumentation Laboratory



Figura 4: ACL TOP 500® Instrumentation Laboratory.

O *ACL TOP 500*<sup>®</sup> da *Instrumentation Laboratory* (Figura 4) é um analisador automático projetado especificamente para a realização de testes de coagulação e fibrinólise, *in-vitro*. O sistema é capaz de executar testes de turbidimetria e imunoturbidimetria. Nos testes de avaliação da coagulação sanguínea é utilizado o princípio turbidimétrico sendo avaliado o decréscimo de luz transmitida à medida que ocorre a formação do coágulo. Para a pesquisa do anticoagulante lúpico (AL) e determinação de D-dímeros é utilizado o princípio imunoturbidimétrico. Estes últimos tratam-se de testes baseados na formação de um complexo antigénio-anticorpo, o qual afeta a transmissão da luz pela amostra <sup>(7)</sup>.

### 3.4. **Beckman Coulter FC500-MCL**<sup>®</sup>



Figura 5: *Beckman Coulter FC500-MCL*<sup>®</sup>.

O *Beckman Coulter FC500-MCL*<sup>®</sup> (Figura 5) é o equipamento utilizado nos estudos de imunofenotipagem permitindo contar, analisar e classificar partículas microscópicas suspensas num líquido em fluxo. Atualmente, a imunofenotipagem é uma das maiores aplicações da citometria de fluxo.

O sistema é constituído por uma fonte de radiação, uma câmara de fluxo, unidades de filtros óticos e fotodíodos ou fotomultiplicadores para a deteção e processamento de sinais. Uma vez aspirada, a suspensão celular é injetada no núcleo central do citómetro contido na câmara de fluxo. Neste núcleo as células formam um fluxo laminar passando uma a uma em frente ao feixe luminoso. A interação das células com o feixe luminoso origina sinais que vão ser adquiridos por detetores <sup>(8)</sup>.

A informação recolhida pode agrupar-se em dois tipos fundamentais: a que é originada pela dispersão da luz e a relacionada com a emissão de luz por fluorocromos que foram previamente ligados às células. A luz que é dispersa frontalmente (*forward scatter*, FSC) fornece indicação acerca do tamanho celular, enquanto a luz dispersa em ângulo reto (*side scatter*, SSC) é indicativa da complexidade celular. Já a fluorescência corresponde à emissão de energia luminosa pelos fluorocromos. Estes compostos absorvem energia, fazendo com que os eletrões passem a um nível energético superior. No momento em que esses eletrões regressam ao estado de repouso, emitem fótons e libertam energia. Os sinais vão depois ser convertidos em dados digitais para serem representados através de gráficos (Figura 6).

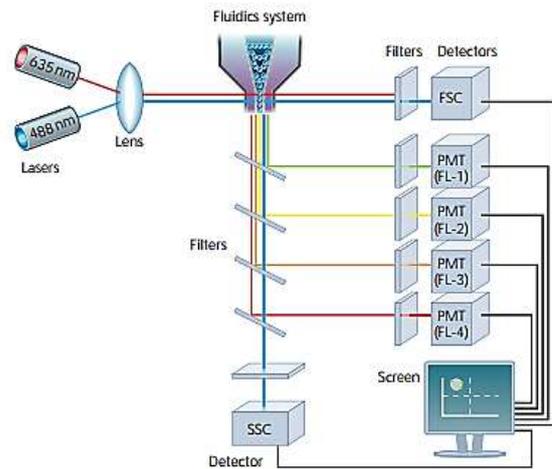


Figura 6: Representação esquemática do funcionamento do equipamento Beckman Coulter FC500-MCL® (Adaptado de <https://www.abdserotec.com>).

### 3.5. WESCOR Aerospray® 7150 Hematology Slide-Cyto centrifuge



Figura 7: WESCOR Aerospray® 7150 Hematology Slide-Cyto centrifuge.

O WESCOR Aerospray® 7150 Hematology Slide-Cyto centrifuge (Figura 7) é um equipamento automático de bancada que permite a coloração de um total de 12 esfregaços em apenas alguns minutos, sendo fácil de programar e bastante económico no que respeita ao consumo de reagentes. Pode ser utilizado para corar esfregaços de sangue, aspirados de medula óssea ou de outros fluidos corporais. A qualidade da coloração é elevada, assegurando uma diferenciação precisa dos elementos celulares <sup>(9)</sup>.

## 4. Testes laboratoriais

### 4.1. Hemograma

O hemograma é um dos exames complementares de diagnóstico mais frequentemente requeridos pelo clínico, permitindo obter informação quantitativa e qualitativa dos diversos elementos celulares do sangue – eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Em conjunto com o esfregaço de sangue permite o estudo das células sanguíneas. É um exame útil na avaliação, monitorização e controlo de doenças hematológicas e de terapêuticas instituídas, juntamente com resultados obtidos em outros setores analíticos. Os valores de referência relativos aos diferentes parâmetros do hemograma, encontram-se listados no Anexo I.

#### 4.1.1. Série vermelha

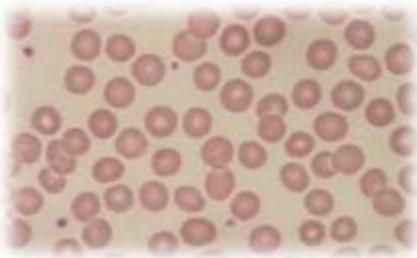


Figura 8: Eritrócitos num esfregaço sanguíneo.

O eritrócito maduro corresponde a um disco bicôncavo com coloração rósea (Figura 8) cuja principal função é a oxigenação dos tecidos e o retorno do dióxido de carbono dos tecidos aos pulmões. Para executar estas trocas gasosas, a célula contém uma proteína especializada – a hemoglobina (Hgb). Eritrócitos nucleados não estão presentes no sangue periférico em condições normais, podendo a sua

presença ser observada em casos de eritropoiese extramedular ou em algumas doenças da medula óssea. Através do estudo da série vermelha (eritrograma) é possível obter informação acerca de alterações na produção ou de aumentos da destruição de eritrócitos, bem como de possíveis perdas sanguíneas. O eritrograma é ainda útil no diagnóstico de Anemia ou Poliglobulia/Policitemia e no estudo do sistema de transporte de gases do organismo e de casos de carência nutricional <sup>(10,11)</sup>.

O equipamento *Beckman Coulter LH 750*<sup>®</sup> expressa os resultados referentes à série vermelha quantitativamente e na forma de histogramas, emitindo alertas caso as determinações ultrapassem, por defeito ou por excesso, os valores de referência.

Para a avaliação da série vermelha o equipamento procede à determinação automática dos seguintes parâmetros: contagem de eritrócitos, quantificação da hemoglobina e volume corpuscular médio. Para o hematócrito, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média, o equipamento dispõe de *software* que permite obter estes valores a partir dos determinados.

Contagem de eritrócitos - Corresponde ao número total de eritrócitos por unidade de volume de sangue total, sendo expressa em número de células por microlitro de sangue (células/ $\mu$ l). Na prática laboratorial, é determinada automaticamente pelo Princípio Coulter<sup>(11)</sup>.

Concentração de hemoglobina - Corresponde à quantidade de hemoglobina por unidade de volume de sangue e é expressa, normalmente, em gramas por decilitro (g/dl). A determinação é feita com recurso a métodos espectrofotométricos. O seu valor de referência varia consoante o sexo e a idade verificando-se, fisiologicamente, níveis mais elevados no sexo masculino<sup>(11)</sup>.

Hematócrito (Htc) - O hematócrito corresponde à proporção do volume da amostra de sangue que é ocupado pelos glóbulos vermelhos e é expresso em percentagem (%) ou litro por litro (l/l). É um parâmetro calculado pelo equipamento através dos resultados da contagem de eritrócitos e do volume corpuscular médio (fórmula de cálculo presente no Anexo II)<sup>(11)</sup>.

Volume corpuscular médio (VCM) - O volume corpuscular (ou globular) médio é uma medida do tamanho médio dos glóbulos vermelhos, sendo expresso em fentolitros (fl). É um parâmetro determinado diretamente pelo equipamento embora, manualmente, possa também ser calculado tendo em conta o valor do hematócrito e o número de glóbulos vermelhos (fórmula de cálculo presente no Anexo II). O VCM é útil na classificação de anemias que têm como base os índices hematimétricos, permitindo a distinção entre anemias macrocíticas, normocíticas e microcíticas<sup>(11)</sup>.

Hemoglobina corpuscular média (HCM) - A hemoglobina corpuscular (ou globular) média representa o conteúdo médio de hemoglobina por cada eritrócito e é expressa em picogramas (pg). É calculada pelo *software* do equipamento através dos valores da concentração de hemoglobina e do número de eritrócitos (fórmula de cálculo presente no Anexo II). É também útil na classificação de anemias<sup>(11)</sup>.

Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) - Corresponde à concentração média de hemoglobina por eritrócito. É expressa em grama por decilitro (g/dl) e permite distinguir glóbulos vermelhos normocrómicos de hipocrómicos. É calculada através do valor do hematócrito e da concentração de hemoglobina (fórmula de cálculo presente no Anexo II)<sup>(11)</sup>.

Amplitude da distribuição eritrocitária (RDW) - É um índice de anisocitose eritrocitária, fornecendo indicação acerca da variação de tamanhos dos glóbulos vermelhos. É um parâmetro obtido a partir do histograma dos eritrócitos e é expresso em percentagem (%)<sup>(11)</sup>.

#### 4.1.1.1. Reticulócitos

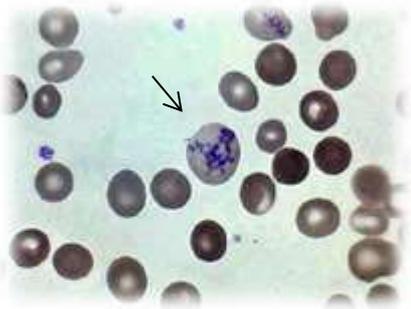


Figura 9: Reticulócitos num esfregaço sanguíneo.

O reticulócito (Figura 9) corresponde a uma célula da série vermelha, intermediária entre o eritrócito maduro e os precursores eritroblásticos. Neste estágio de diferenciação, a célula já perdeu o núcleo mas ainda contém ribossomas. São células maiores que o eritrócito e que coram com corantes designados de supra-vitais como o Novo Azul de Metileno. Na prática, os reticulócitos são determinados automaticamente no analisador *LH 750*<sup>®</sup> da

*Beckman Coulter* implicando sempre o controlo prévio do equipamento, uma vez que o número de pedidos deste tipo de análise não justifica um controlo diário do autoanalisador.

O número de reticulócitos constitui um índice da produção de eritrócitos pela medula óssea, servindo este parâmetro como meio de avaliação do funcionamento da medula. Um aumento periférico do número de reticulócitos (reticulocitose) pode acompanhar, por exemplo, uma anemia hemolítica ou uma anemia após o tratamento da deficiência em ferro (anemia ferropénica), ácido fólico ou vitamina B12 (anemia megaloblástica). Já em anemias associadas a eritropoiese ineficaz, verificam-se contagens de reticulócitos normais ou diminuídas<sup>(12)</sup>.

#### 4.1.2. Séria branca

Os leucócitos são células nucleadas capazes de defender o organismo humano contra a invasão por microrganismos ou por substâncias estranhas ao organismo, removendo também os restos celulares resultantes da morte ou lesão das células. A sua classificação pode ocorrer de acordo com a sua origem, presença de grânulos, função ou forma do núcleo. Esta última característica permite distinguir os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) dos leucócitos mononucleares (monócitos e linfócitos)<sup>(13)</sup>.

O aumento no número de leucócitos (leucocitose) resulta, na maioria dos casos, de um aumento do número de neutrófilos (neutrofilia). Situações como infecção, inflamação ou traumatismos são as mais comuns, existindo ainda quadros patológicos que são acompanhados pelo aumento específico de uma das subpopulações leucocitárias. Já a diminuição do número de leucócitos abaixo dos respectivos valores de referência (leucopenia), resulta geralmente da redução dos níveis de neutrófilos (neutropenia). Terapêuticas imunossupressoras e síndromes de imunodeficiência são as principais causas da leucopenia <sup>(14)</sup>.

O estudo da série branca (leucograma) engloba a contagem total e diferencial dos leucócitos (fórmula leucocitária), sendo os resultados expressos quantitativamente, em contagens relativas e absolutas, e na forma de histogramas tridimensionais nos quais é possível distinguir as cinco subpopulações leucocitárias, de acordo com o seu tamanho e complexidade.

#### 4.1.2.1. Neutrófilos

Num indivíduo adulto saudável os neutrófilos correspondem aos leucócitos mais abundantes no sangue periférico. Possuem um núcleo denso característico, com dois a cinco lóbulos, citoplasma pálido com contorno irregular e contendo muitos grânulos finos rosa-azulados ou cinza-azulados (Figura 10). Os grânulos presentes na célula podem ser primários ou secundários, sendo ambos de origem lisossômica <sup>(10,14)</sup>.

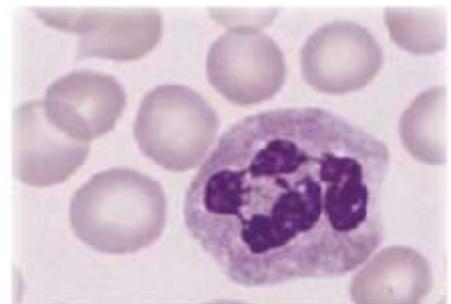


Figura 10: Neutrófilo num esfregaço sanguíneo.

No sangue periférico podem também aparecer neutrófilos que ainda não terão completado a sua maturação - neutrófilos em bastão. Os neutrófilos são capazes de deixar os vasos sanguíneos e passar para os tecidos onde protegem o organismo, fagocitando bactérias e substâncias estranhas.

#### 4.1.2.2. Linfócitos

Os linfócitos (Figura 11) são o segundo tipo de leucócitos mais abundantes no sangue periférico. Embora microscopicamente não seja possível distinguir linfócitos T de linfócitos B, podem ser identificadas duas populações distintas de linfócitos: uma população em que os linfócitos se apresentam com um tamanho mais pequeno, cromatina densa, membrana nuclear fina, núcleo redondo ou oval e citoplasma azul claro e uma segunda população em

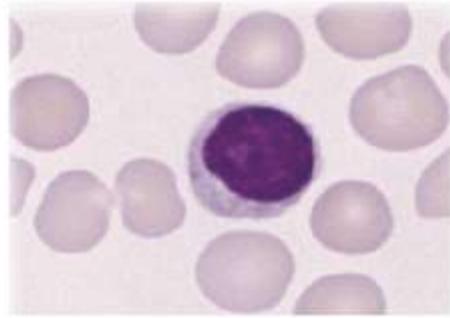


Figura 11: Linfócito num esfregaço sanguíneo.

que as células se apresentam mais volumosas e com o citoplasma mais basofílico. A primeira população corresponderá a linfócitos inativos enquanto a segunda é característica de linfócitos que já terão reagido contra determinado antígeno (linfócitos ativados) <sup>(10,14)</sup>.

São células imunologicamente competentes que auxiliam os fagócitos na defesa do organismo contra a infeção e outras invasões. O linfócito T é responsável, principalmente, pelo auxílio do sistema imunológico e resposta imunológica celular enquanto o linfócito B encontra-se envolvido na resposta imunológica humoral.

#### 4.1.2.3. Monócitos

Em geral, os monócitos correspondem à maior das células sanguíneas em circulação no sangue periférico. Apresentam um núcleo grande, central, oval ou irregular, com cromatina aglomerada. O citoplasma abundante cora de azul e pode conter vacúolos finos (Figura 12). Os grânulos citoplasmáticos podem também estar presentes <sup>(10,14)</sup>.

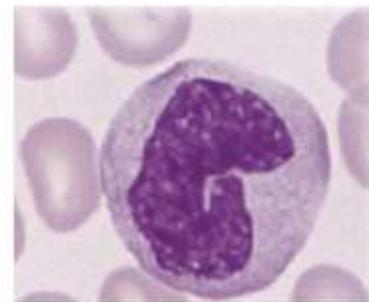


Figura 12: Monócito num esfregaço sanguíneo.

Quando nos tecidos, os monócitos convertem-se em células grandes e fagocíticas denominadas de macrófagos. São células que, entre outras funções, auxiliam na defesa contra microrganismos e células tumorais, promovem a remoção de células velhas e processam antígenos para posterior apresentação a células do sistema imunológico.

#### 4.1.2.4. Eosinófilos

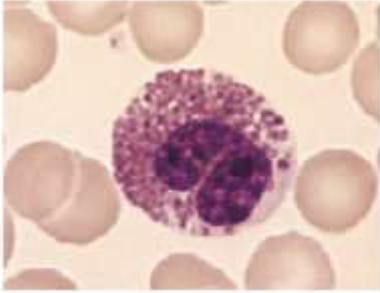


Figura 13: Eosinófilo num esfregaço sanguíneo.

Os eosinófilos possuem grânulos citoplasmáticos que coram de laranja-vermelho e núcleo geralmente bilobado, com cromatina densa e sem nucléolos (Figura 13) <sup>(10,14)</sup>.

O número de eosinófilos circulantes aumenta de forma muito acentuada no sangue circulante durante as reações alérgicas e em infecções parasitárias.

#### 4.1.2.5. Basófilos

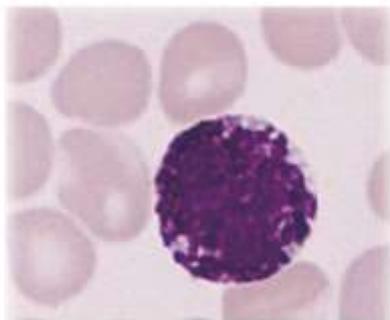


Figura 14: Basófilo num esfregaço sanguíneo.

Existem no sangue periférico normal em quantidades muito reduzidas, em relação aos demais leucócitos. Possuem numerosos grânulos citoplasmáticos escuros que cobrem o citoplasma e o núcleo da célula. Quando visível, o núcleo apresenta dois a três lóbulos (Figura 14) <sup>(14)</sup>.

A sua desgranulação aquando da ligação à imunoglobulina E (IgE) provoca a libertação de histamina. Nos tecidos convertem-se em mastócitos.

#### 4.1.3. Série megacariocítica

As plaquetas são produzidas na medula óssea por fragmentação das extremidades das extensões do citoplasma dos megacariócitos, uma das maiores células do organismo. Apresentam uma forma discóide e um tamanho muito reduzido (Figura 15). As suas glicoproteínas de superfície são particularmente importantes nas reações de adesão e agregação que levam à formação do tampão plaquetário durante a hemostase, sendo esta a principal função das plaquetas.

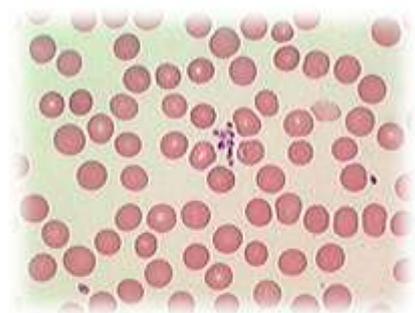


Figura 15: Agregado de plaquetas num esfregaço sanguíneo.

Contêm diversos tipos de grânulos de armazenamento que são libertados após a ativação plaquetária e que são essenciais para a sua ação <sup>(14)</sup>.

A diminuição do número de plaquetas (trombocitopenia) constitui a alteração plaquetária mais comum, podendo apresentar diversas etiologias. Sempre que se verifica trombocitopenia não concordante com o histórico do paciente, é aconselhável a pesquisa de coágulo na amostra de sangue seguida da realização de um esfregaço sanguíneo, para excluir a presença de agregados plaquetários ou de plaquetas gigantes.

Relativamente às plaquetas, o hemograma fornece resultados quantitativos e qualitativos na forma de um histograma.

#### **4.2. Esfregaço sanguíneo**

O esfregaço de sangue periférico é uma das principais técnicas manuais usadas em hematologia como meio complementar de diagnóstico de eventuais doenças hematológicas. Pode ser realizado por diversos motivos para além do estudo morfológico das células sanguíneas, desde que os resultados ou a situação clínica do doente o justifique. Um hemograma demonstrativo de valores não concordantes com os de referência, história clínica ou indicação de alterações morfológicas significativas (células imaturas ou blastos, células vermelhas nucleadas), hemograma com valores concordantes com os de referência mas histogramas alterados, incapacidade persistente de o contador automático executar a contagem diferencial, são exemplo de situações que justificam a execução do esfregaço sanguíneo. Assim, facilmente se compreende que, não obstante as vantagens associadas à automatização do laboratório de hematologia através da introdução de contadores automáticos, técnicas manuais como o esfregaço sanguíneo continuam a revestir-se de grande importância clínica no estudo laboratorial das células sanguíneas.

Na observação microscópica de um esfregaço de sangue deve ser tido em conta o tamanho, a forma, a coloração e a presença de possíveis inclusões nas células sanguíneas das diferentes séries. Quando observadas alterações em qualquer um destes parâmetros, estas devem ser criteriosamente descritas.

#### 4.2.1. Técnica de realização de um esfregaço sanguíneo

A técnica de execução do esfregaço sanguíneo é essencial para a obtenção de uma preparação de qualidade, a partir da qual possam ser estudados diferentes parâmetros, os quais terão suscitado dúvida e/ou que justificaram a realização do esfregaço. Desta forma é essencial que este seja bem executado e bem corado <sup>(11)</sup>.

A homogeneização do tubo de colheita é o primeiro passo na realização de um esfregaço sanguíneo. Uma correta homogeneização é essencial para garantir que a quantidade de sangue utilizada no esfregaço seja representativa de toda a amostra sanguínea do doente. A quantidade de sangue colocada sobre a lâmina é também um ponto fundamental para que se obtenha um esfregaço fino. Com o auxílio de uma segunda lâmina ou lamela, deve arrastar-se o sangue para trás do seu ponto de colocação e deixar que a amostra espalhe pela largura da lâmina/lamela de espalhamento. Num movimento rápido e com um ângulo de 45°, deve executar-se o esfregaço, de modo a que o sangue cubra a extensão da lâmina de vidro. Um esfregaço de qualidade é aquele que apresenta uma densidade decrescente relativamente ao seu ponto de origem. A figura 16 ilustra, esquematicamente, as várias etapas da realização de um esfregaço sanguíneo.

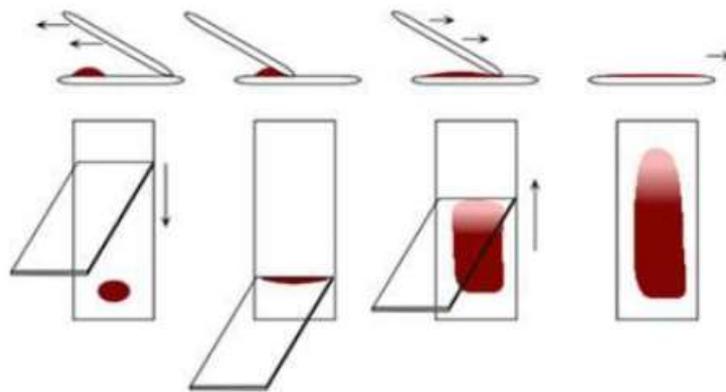


Figura 16: Representação esquemática da realização de um esfregaço sanguíneo.

Depois de corado, o esfregaço deve ser observado ao microscópio ótico, primeiro com a objetiva de menor ampliação para que se consiga escolher um bom campo de contagem e observação das células sanguíneas, e depois com uma objetiva de maior ampliação. A contagem deve incluir no mínimo 200 células sanguíneas e incidir numa zona do esfregaço em que a densidade celular seja média.

#### 4.2.2. Coloração do esfregaço sanguíneo

Para a coloração do esfregaço sanguíneo é utilizada a coloração de Wright-Giemsa, a qual faz uso de um conjunto de corantes que permitem observar microscopicamente a morfologia das células sanguíneas: o azul de metileno – corante alcalino que cora as estruturas ácidas da célula e a eosina – corante ácido que cora as estruturas alcalinas da célula <sup>(15)</sup>. Desta forma os núcleos apresentam diversos tons de púrpura e os citoplasmas tons de azul a rosa claro, o que permite a identificação dos diferentes tipos de células sanguíneas, como descrito anteriormente.

Na prática, no SPC do IPOCFG, o esfregaço sanguíneo é corado através da coloração Wright-Giemsa num equipamento automático (*WESCOR Aerospray® 7150 Hematology Slide-Cytocentrifuge*).

#### 4.3. Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação eritrocitária é usada como uma medida não-específica na monitorização de diversas patologias e no diagnóstico de doenças inflamatórias <sup>(16,17)</sup>. É, juntamente com o hemograma, um dos testes laboratoriais mais requisitados a nível hematológico. Na prática é avaliada por um equipamento automático e expressa em milímetros por hora (mm/h).

A sedimentação dos eritrócitos ocorre, caracteristicamente, em três fases distintas: a fase de agregação, a fase de precipitação e a fase de empacotamento <sup>(16)</sup>. A agregação dos eritrócitos é um fator crítico para a sedimentação e é facilitada pela presença de certas proteínas plasmáticas tais como o fibrinogénio, as imunoglobulinas e a  $\alpha_2$ -macroglobulina. Qualquer fator capaz de afetar uma das três fases, incluindo o número e forma dos glóbulos vermelhos ou a viscosidade do plasma, traduz-se na alteração da velocidade de sedimentação.

##### **Fatores plasmáticos**

Uma VS elevada é favorecida por elevados níveis de fibrinogénio e de  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -globulinas, as quais tendem a aumentar em condições inflamatórias, infecciosas ou malignas. Estas proteínas plasmáticas são responsáveis por diminuir a carga negativa dos eritrócitos que tende a mantê-los afastados, promovendo a formação de “rouleaux” que favorecem a sedimentação mais rápida dos eritrócitos <sup>(11)</sup>.

### **Fatores eritrocitários**

Quadros clínicos tais como a Anemia são responsáveis por causar um aumento dos valores da VS devido a alterações na razão eritrócitos/plasma, que favorecem a formação de “rouleaux”, independentemente da concentração em proteínas plasmáticas. Também no mieloma múltiplo, na macroglobulinemia e na crioglobulinemia o valor da VS encontra-se aumentado devido à formação dos agregados de eritrócitos, que tendem a ocorrer nestas patologias. Tendo em conta que a velocidade de sedimentação é diretamente proporcional ao volume celular, os macrócitos (eritrócitos de tamanho superior ao normal) tendem a sedimentar mais rapidamente que os micrócitos (eritrócitos de tamanho inferior ao normal) <sup>(11)</sup>.

Apesar da utilidade da VS ao nível hematológico, isoladamente, este parâmetro não serve para diagnóstico. O valor de referência relativo à velocidade de sedimentação encontra-se listado no Anexo I.

### **4.4. Hemostase**

A hemostase corresponde ao processo fisiológico que assegura a existência do sangue num estado fluído e que previne a sua perda através de vasos lesados, graças à formação de coágulos de sangue (tampão hemostático). O processo envolve cinco componentes distintos mas interligados: os vasos sanguíneos, as plaquetas, os fatores de coagulação e respetivos inibidores e ainda o sistema fibrinolítico <sup>(12)</sup>.

Como consequência de uma lesão num vaso sanguíneo ocorre a exposição do subendotélio lesado, o qual, juntamente com o fator *von Willebrand (FVW)*, é responsável pela ocorrência da adesão plaquetária. Posteriormente, plaquetas ativadas libertam substâncias químicas que atraem plaquetas adicionais para o local da lesão, resultando na agregação plaquetária. Juntamente com a vasoconstrição, estes são os eventos iniciais da resposta hemostática, os quais resultam na formação de um tampão hemostático primário. A ativação da cascata da coagulação permitirá a formação de fibrina que ao infiltrar os agregados de plaquetas nos locais de lesão vascular, converte os tampões primários e instáveis em tampões hemostáticos secundários firmes e estáveis <sup>(18,19)</sup>.

A limitação da coagulação do sangue é conseguida graças à existência de mecanismos protetores assegurados pelo organismo humano, de forma a impedir a ocorrência de fenómenos de coagulação descontrolada do sangue. Esses mecanismos incluem a existência de inibidores dos fatores de coagulação, o fluxo sanguíneo que promove a diluição e

dispersão dos fatores ativados em torno da região lesada e a fibrinólise. Esta última é uma resposta hemostática fisiológica à lesão vascular, responsável por remover os coágulos de fibrina insolúveis (tampões hemostáticos secundários) por hidrólise enzimática <sup>(20)</sup>.

Assim, apesar da importância da existência de um mecanismo rápido e eficiente que impeça a ocorrência de extensas hemorragias em locais de lesão vascular, é também essencial que essa resposta seja estritamente controlada para evitar o desenvolvimento de coágulos de forma descontrolada. Deste modo, o sistema hemostático traduz-se num equilíbrio dinâmico entre mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes, aliado a um processo de fibrinólise <sup>(21)</sup>.

#### **4.4.1. Avaliação laboratorial da hemostase**

A hemorragia, a trombose e o embolismo são algumas das manifestações clínicas associadas a muitas patologias. Uma hemorragia pode traduzir, além de uma lesão num vaso, uma doença hereditária ou adquirida do sistema hemostático. Por outro lado, a trombose ou o embolismo podem ter como causa uma ativação desregulada desse mesmo sistema. O seu correto diagnóstico passa por uma história clínica cuidada e um rigoroso exame físico que devem ser realizados pelo médico, e também pela execução de alguns testes laboratoriais que permitem ao clínico avaliar a função hemostática do doente <sup>(22)</sup>. Os valores de referência dos diferentes testes referentes à avaliação laboratorial da hemostase encontram-se listados no Anexo I.

#### **Cascata da coagulação**

De acordo com o modelo clássico da coagulação sobre o qual assenta a avaliação laboratorial da hemostase, a cascata da coagulação pode ser dividida em duas vias: a via intrínseca (ou via da ativação por contacto) e a via extrínseca (ou via do fator tecidual). As duas convergem numa via comum na qual a ativação do fator X (Xa) leva, em última instância, à formação de fibrina (Figura 17).

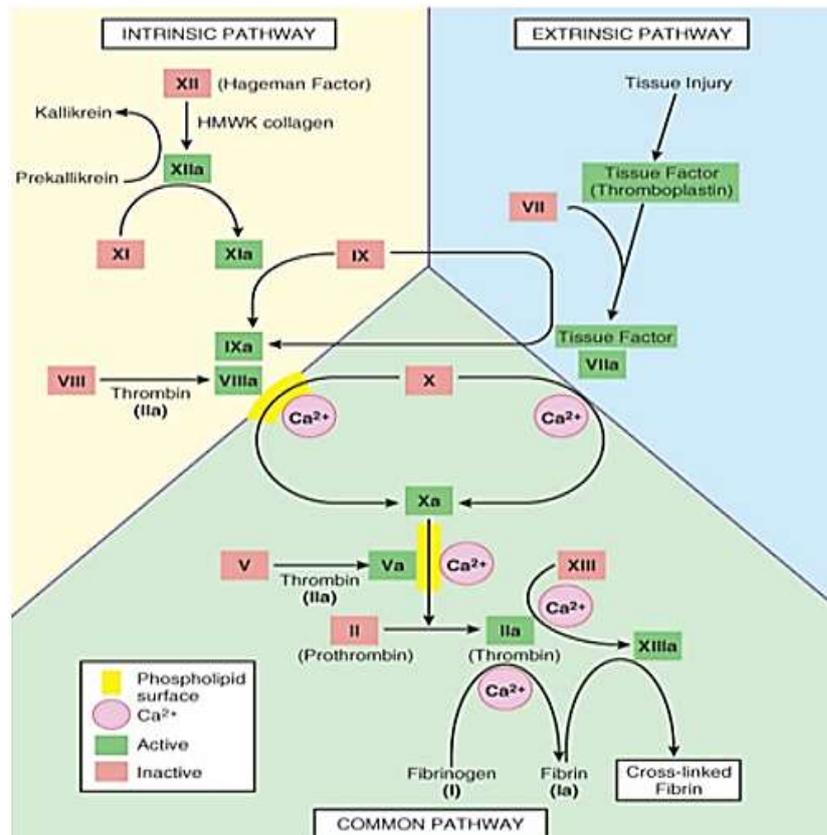


Figura 17: Representação esquemática das vias da cascata da coagulação: via intrínseca (à esquerda), via extrínseca (à direita) e via comum (ao centro, em baixo). (Retirado de Robbins and Cotran Pathologic Basic of Disease, 9th edition, Elsevier, 2015).

A via intrínseca da coagulação é desencadeada quando o fator XII é ativado pelo contacto com uma superfície carregada negativamente (que na prática corresponde à parede de um tubo de vidro). Além deste fator, estão também envolvidos neste processo o fator XI, a pré-caliceína e o cinogénio de alto peso molecular. Da interação destes elementos é ativado o fator XI que ativa o fator IX. Consequentemente, os fatores IXa e VIIIa na presença de fosfolípidos estimulam a conversão do fator X em Xa. Na via extrínseca, a coagulação tem início quando os tecidos lesados libertam o fator tecidual (que na prática corresponde à adição da tromboplastina ao meio de reação), o qual forma um complexo com o fator VII. O complexo resultante age sobre o fator X, estimulando a sua conversão em Xa. A partir da ativação do fator X as duas vias seguem um caminho comum, no qual ocorre a conversão de protrombina em trombina. A trombina é responsável por produzir fibrina a partir do fibrinogénio <sup>(22)</sup>.

#### 4.4.1.1. Tempo de Protrombina (PT)

Este teste avalia o tempo de coagulação na presença de uma concentração ótima de extrato tecidual (tromboplastina) e indica a eficácia global da via extrínseca e comum. Como tal avalia os fatores VII, X, V, II (protrombina), e fibrinogénio, cuja deficiência é acompanhada por um alargamento do tempo necessário para a formação do coágulo <sup>(11)</sup>.

Para a realização deste teste, uma tromboplastina (equivalente à tromboplastina tecidual) e o plasma pobre em plaquetas do doente são incubados por alguns minutos, após os quais o plasma citratado é recalificado através da adição de um excesso de cloreto de cálcio. Nestas condições, é medido o tempo necessário para a formação do coágulo de fibrina e o seu resultado definirá o tempo de protrombina <sup>(23)</sup>.

O tempo de protrombina reflete alterações em três dos fatores dependentes de vitamina K (fatores II, VII e X) sendo por isso um parâmetro muito utilizado para a avaliação de estados de deficiência desta vitamina. É também utilizado na monitorização da terapia com anticoagulantes orais, mas neste caso determina-se uma razão denominada INR (*International Normalised Ratio*). Como a tromboplastina que incorpora o reagente deste teste pode variar entre laboratórios, para reduzir a influência desta variável nos resultados do tempo de protrombina, a OMS (Organização Mundial da Saúde) preconizou o uso do INR para padronizar mundialmente o resultado do teste, através da criação do ISI (*International Sensitivity Index*) <sup>(11)</sup>. O ISI é determinado comparando cada reagente com uma preparação de referência internacional (tromboplastina padrão). Após a determinação do ISI da tromboplastina os resultados são referenciados como INR, traduzindo-se este pela razão entre o PT do paciente e o PT de referência, tendo como expoente o ISI (Figura 18).

Um INR prolongado pode traduzir uma deficiência de vitamina k ou dos fatores I,II, V, VII e X, uma terapêutica com anticoagulantes, uma doença hepática grave, coagulação intravascular disseminada (CID), entre outros. Podem ser obtidos valores reduzidos em estados pró-trombóticos como os estados pós-cirúrgicos <sup>(20)</sup>.

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

Figura 18: Fórmula de cálculo do valor de INR.

#### 4.4.1.2. Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (aPTT)

Este teste mede o tempo de coagulação do plasma, depois da ativação dos fatores de contacto, indicando globalmente a eficácia da via intrínseca e comum. Avalia portanto os fatores I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII e ainda a pré-caliceína e o cininogénio de alto peso molecular. É também utilizado na deteção do anticoagulante lúpico e na monitorização laboratorial da terapêutica com heparina <sup>(11)</sup>.

Na avaliação do tempo de tromboplastina parcialmente ativada (também designado por tempo de cefalina caulino), são utilizados substitutos dos fosfolípidos plaquetários (como a cefalina ou o fosfatidilinositol) que correspondem a tromboplastinas parciais, incapazes de ativar a via extrínseca. O plasma é colocado na presença de um destes fosfolípidos pró-coagulantes bem como de um ativador por contacto (sílica) e cálcio. O tempo que demora o plasma a coagular nestas condições é definido como o aPTT <sup>(23)</sup>.

O aPTT encontra-se prolongado em caso de deficiência de qualquer um dos fatores descritos previamente bem como na doença hepática, CID, terapêutica com heparina, doses elevadas de anticoagulantes orais, entre outros. Para aPTT prolongados há também a considerar o risco trombótico, principalmente quando não ocorre correção deste tempo no teste de mistura do plasma do paciente com uma mistura de plasmas “normais”. Nesta situação deve proceder-se ao despiste de anticorpos antifosfolipídicos como é o caso do anticoagulante lúpico, através de testes mais específicos. Já os estados de hipercoagulabilidade são acompanhados de uma diminuição no aPTT <sup>(11)</sup>.

#### 4.4.1.3. Tempo de Trombina (TT)

O tempo de trombina consiste na adição de trombina ao plasma do doente e reflete o tempo de formação do coágulo, avaliando a conversão de fibrinogénio em fibrina. Como tal este teste é o resultado da quantidade (e qualidade) de fibrinogénio presente na amostra <sup>(11)</sup>.

O TT pode estar aumentado em caso de inibição da trombina (pela heparina ou por produtos de degradação da fibrina), ou devido a fibrinogénio qualitativa e/ou quantitativamente deficiente.

#### 4.4.1.4. Quantificação de Fibrinogénio

O fibrinogénio (fator I) é uma glicoproteína sintetizada no fígado e que está envolvida na etapa final da coagulação, a qual consiste na sua conversão em fibrina sob a ação da trombina. Os níveis de fibrinogénio afetam de forma significativa a velocidade de formação do coágulo de tal forma que, concentrações elevadas de fibrinogénio associam-se a um aumento do risco trombótico enquanto níveis baixos estão presentes em várias situações clínico-patológicas (doença hepática ou CID) <sup>(11)</sup>. Por ser uma proteína de fase aguda encontra-se frequentemente elevada durante os processos inflamatórios.

Na rotina o fibrinogénio é quantificado pelo método de *Clauss* – método de referência para a quantificação do fibrinogénio. Para tal é adicionado um excesso de trombina ao plasma diluído de forma a que o tempo de coagulação dependa apenas da quantidade de fibrinogénio e não da trombina. O tempo de coagulação obtido é posteriormente comparado com uma preparação de fibrinogénio padrão, verificando-se uma relação de proporcionalidade inversa entre a concentração de fibrinogénio presente na amostra e o tempo de coagulação <sup>(23)</sup>.

#### 4.4.1.5. Produtos de Degradação da Fibrina

Como resultado da ação da plasmina sobre o coágulo de fibrina resultam vários produtos de degradação da fibrina (PDF), dos quais o D-dímero é um fragmento específico da degradação <sup>(10,11)</sup>.

Esta determinação é feita por técnica imunoturbidimétrica na qual o equipamento procede à adição de uma suspensão de partículas de látex revestidas de um anticorpo monoclonal que apresenta elevada especificidade para o D-dímero. Como resultado da ligação entre o anticorpo monoclonal e o D-dímero, forma-se um complexo cujo grau de aglutinação é proporcional à concentração de D-dímeros presentes. Os complexos assim formados são responsáveis por diminuir a luz que é transmitida e detetada pelo equipamento <sup>(23)</sup>.

O teste do D-dímero é muito utilizado para o diagnóstico de CID e de trombose bem como na monitorização da terapia trombolítica <sup>(10)</sup>.

#### 4.4.1.6. Estudos de Trombofilia – Anticoagulante Lúpico

O anticoagulante lúpico (AL) é um autoanticorpo encontrado numa grande variedade de doenças autoimunes e, por vezes, também em indivíduos saudáveis <sup>(24)</sup>. Corresponde a imunoglobulinas que ligam a fosfolípidos de carga negativa ou a complexos de fosfolípidos-proteínas plasmáticas e conseqüentemente prolongam os tempos de coagulação de testes tais como o aPTT <sup>(11, 22)</sup>. Apesar de laboratorialmente se traduzirem pelo prolongamento do tempo de coagulação, a presença do AL não se encontra associado a fenómenos de hemorragia mas sim a uma maior tendência para a ocorrência de trombozes. Por esta razão existe uma clara associação entre o AL e quadros patológicos diversos tais como a trombose venosa, acidentes vasculares cerebrais e insucessos obstétricos <sup>(22)</sup>.

Na pesquisa do AL são utilizadas duas metodologias com princípios distintos: o teste do veneno de víbora de Russell diluído (dRVVT) e o teste *Silica Clotting Time* (SCT). Para cada uma destas metodologias são feitos dois testes, um de *screening* e um confirmatório pelo que, na sua totalidade, são realizados quatro testes laboratoriais na pesquisa do AL. A diferença entre o teste de *screening* e o confirmatório consiste no facto de no primeiro serem utilizadas baixas concentrações de fosfolípidos, o que resulta no prolongamento do tempo de coagulação enquanto nos confirmatórios, por serem usadas elevadas concentrações de fosfolípidos, há correção do tempo de coagulação graças à ação neutralizadora desse excesso de fosfolípidos sobre o AL. No teste dRVVT, o veneno de víbora de Russell é responsável por ativar o fator X da cascata da coagulação levando à formação do coágulo de fibrina na presença do fator V, de fosfolípidos e de iões cálcio. Ao ligar aos fosfolípidos, o AL impede a ação do veneno de víbora de Russel e prolonga o tempo de coagulação. Já no teste SCT é utilizada a sílica como ativador da cascata da coagulação que na presença de cálcio resulta na ativação da via intrínseca <sup>(22,23)</sup>.

Para que uma amostra seja considerada positiva na pesquisa do AL basta que apenas um dos testes se revele positivo.

## 5. Controle de Qualidade

No setor de Hematologia a qualidade dos resultados analíticos é assegurada pelo controle realizado diariamente (Controle de Qualidade Interno) e pela participação em dois programas de avaliação externa da qualidade.

Diariamente, antes da análise de qualquer amostra biológica, todos os equipamentos automáticos utilizados na rotina do setor são controlados utilizando controles de dois ou três níveis diferentes (dependendo do equipamento), para cada parâmetro analítico. Os resultados são tratados e validados de acordo com as Regras de *Westgard*. Já no controle de qualidade externo, o laboratório de Hematologia analisa amostras de características desconhecidas enviadas por uma entidade externa nacional (INSA) e por uma entidade externa internacional (RIQAS), também para cada um dos parâmetros analíticos e de acordo com um calendário pré-definido.

## **D. SETOR DE IMUNOLOGIA E HORMONOLOGIA**

### **6. Caracterização do laboratório**

No Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG as áreas de Imunologia e Hormonologia encontram-se fisicamente restritas a um mesmo espaço, compondo um setor único que em termos dimensionais se destaca das restantes valências do SPC. Este é sem dúvida o setor que mais diversidade apresenta em termos tecnológicos e de parâmetros laboratoriais analisados. A maioria das determinações analíticas é feita de forma automática por equipamentos, embora sejam também executadas algumas técnicas manuais.

Dos recursos humanos do setor de Imunologia e Hormonologia fazem parte três técnicos superiores de saúde, um dos quais responsável pelo setor, bem como dois técnicos de diagnóstico e terapêutica.

### **7. Amostras biológicas**

Neste setor é processado, em maior número, o sangue total a partir do qual é obtido o soro ou plasma, consoante as determinações analíticas a serem realizadas. Com menor frequência é avaliada a urina e outro tipo de produtos biológicos, tais como os aspirados da tiróide ou a saliva.

O soro corresponde ao fluido biológico sobre o qual incide a maioria das determinações analíticas realizadas no setor, sendo obtido por centrifugação da amostra de sangue total após a completa retração do coágulo sanguíneo. Neste fluido são determinados marcadores tumorais, marcadores cardíacos, hormonas, proteínas, enzimas e fármacos, conforme o requerido pelo clínico prescriptor. É ainda utilizado na realização de proteinogramas, imunofixações, estudos de autoimunidade e em diversas técnicas manuais que incidem sobre parâmetros pré-estabelecidos.

Para além do soro, também o plasma é frequentemente processado na rotina diária do setor, sendo obtido após a centrifugação do sangue total colhido para um tubo contendo EDTA-K3 como anticoagulante.

A urina é utilizada na determinação do cortisol e do iodo urinário, na pesquisa da proteína de Bence Jones bem como na quantificação de metabolitos das catecolaminas, como é o caso das metanefrinas e ácido vanilmandélico.

### 7.1. Circuito de amostras

Uma vez transportadas até ao setor de Imunologia e Hormonologia, todas as amostras biológicas são sujeitas a um segundo registo informático. Neste novo registo são confirmados os dados referentes ao paciente (nomeadamente o número de processo único, os dados biográficos e o número de registo do dia) e registados os parâmetros laboratoriais através da utilização de perfis analíticos. A cada requisição é conferido um número interno do setor, procedimento que permite inserir no sistema informático todos os testes laboratoriais a realizar por cada equipamento, bem como o envio dos respetivos resultados para o boletim do paciente.

Após esta etapa inicial as amostras são centrifugadas, sendo as condições desta fase pré-analítica adequadas ao tipo de amostra e ao parâmetro analítico a ser determinado. O tratamento a que as diferentes amostras biológicas são sujeitas na rotina diária do setor de Imunologia e Hormonologia pode ser consultado na tabela I.

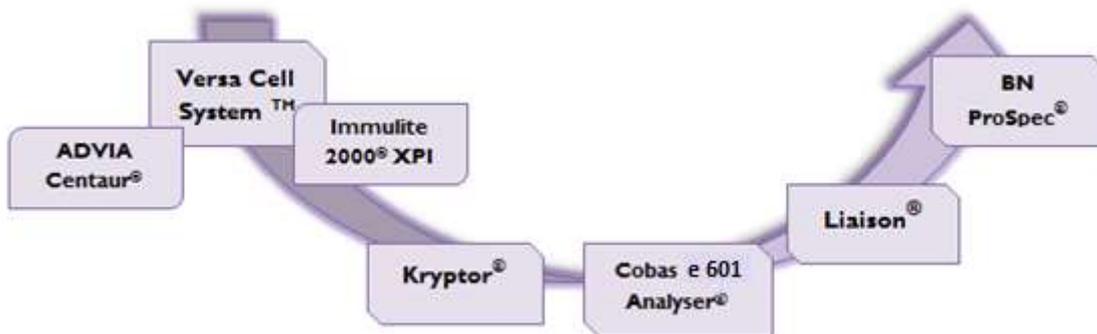
Tabela I: Tratamento a que as diferentes amostras biológicas são submetidas na fase Pré-Analítica no setor de Imunologia e Hormonologia.

	CONDIÇÕES DE CENTRIFUGAÇÃO	PROCEDIMENTOS ADICIONAIS
<p><b>SALIVA</b></p> <p>Cortisol</p>	<p>1000 rpm, 2 min, 15°C</p>	<p>Avaliação no equipamento <i>Cobas e601 Analyser</i><sup>®</sup></p>

Tabela I: (continuação)

	CONDIÇÕES DE CENTRIFUGAÇÃO	PROCEDIMENTOS ADICIONAIS
<b>URINA</b>		
<u>24 horas</u> Cortisol urinário Proteinúria de Bence Jones Metanefrinas urinárias Acido vanilmandélico 5-hidroxiindolacético	3000 rpm, 10 min, 15°C	(Procedimento dependente do parâmetro analítico a determinar)
<u>Primeira urina da manhã</u> Iodo urinário	3000 rpm, 10 min, 15°C	Congelar até à realização da referida técnica
<b>SANGUE TOTAL</b>		
<u>Soro</u> Maioria dos parâmetros analíticos	3000 rpm, 10 min, 15°C	(Amostras obedecem a um circuito pré-definido – esquema 2)
<u>Soro</u> CGA TEL ALD OHP	3000 rpm, 10 min, 15°C	Separar o soro e congelar (-20°C) até à realização da referida técnica manual
<u>Soro</u> Imunofixação Proteinogramas	3000 rpm, 10 min, 15°C	Separar o soro e realização da referida técnica
<u>Plasma</u> ACTH	2000 rpm, 10 min, 5°C	Separar o plasma e avaliação no equipamento <i>Immulite 2000® XPI</i>
<u>Plasma</u> MTP NMP	2000 rpm, 10 min, 5°C	Separar o plasma e congelar (-20°C) até à realização da referida técnica manual
<u>Plasma</u> Renina	3000 rpm, 10 min, 15°C	Separar o plasma e avaliação no equipamento <i>Liaison®</i>

Após a etapa da centrifugação a amostra é identificada com uma vinheta, a qual contém um código de barras que permite a sua identificação de forma automática pelos diferentes equipamentos. Posteriormente, a amostra é sujeita a um circuito pré-estabelecido pelo setor, o qual se encontra representado no esquema 2. Paralelamente a este circuito são ainda executadas as seguintes metodologias: imunofixação sérica, estudo eletroforético de proteínas, proteinúria de Bence Jones e estudo de autoimunidade. No final do dia, as amostras a serem avaliadas por técnicas manuais são separadas e armazenadas até à realização da referida determinação. As restantes, uma vez validadas são descartadas.



Esquema 2: Circuito a que a maioria das amostras biológicas obedece no setor de Imunologia e Hormonologia.

## 8. Equipamentos e princípios de funcionamento

Como dito anteriormente, o setor de Imunologia e Hormonologia possui uma vasta gama de equipamentos que permitem efetuar de forma automática uma grande diversidade de determinações analíticas. Apesar desta variedade na instrumentação, a maioria dos equipamentos disponíveis apresenta uma metodologia de funcionamento comum – o Imunoensaio. Os imunoensaios, ou ensaios imunológicos, baseiam-se no reconhecimento específico entre um anticorpo e um antigénio <sup>(25)</sup> e podem implicar métodos e princípios de deteção distintos <sup>(11,26)</sup>. Consoante o método utilizado na deteção do imunocomplexo, os imunoensaios podem classificar-se em radioativos, fluorescentes, quimioluminescentes, eletroquimioluminescentes, entre outros. Relativamente ao princípio de deteção, pode distinguir-se o ensaio competitivo e o não-competitivo.

- **Ensaio não-competitivo** - Neste tipo de ensaio (também designado ensaio *sandwich*), são utilizados anticorpos marcados na deteção do analito de interesse. Numa primeira etapa, o antígeno presente na amostra (analito) reage com um anticorpo primário, imobilizado numa matriz insolúvel de fase sólida. Posteriormente é adicionado um segundo anticorpo que reconhece, no antígeno, epítomos distintos daqueles que foram reconhecidos pelo anticorpo primário. Esta última ligação só se verifica caso tenha ocorrido a formação prévia do imunocomplexo antígeno-anticorpo primário. Para este tipo de imunoensaio, a relação entre a quantidade de anticorpo marcado e a concentração do analito presente na amostra é de proporcionalidade direta <sup>(11,27)</sup>.
- **Ensaio competitivo** - No ensaio competitivo faz-se uso de dois antígenos – um presente na amostra do doente e que se pretende quantificar (analito) e outro análogo ao primeiro, mas marcado. Os dois antígenos competem entre si pela ligação a um anticorpo específico, adsorvido à superfície de uma fase sólida. Neste tipo de ensaio verifica-se uma relação de proporcionalidade inversa entre a quantidade medida de antígeno marcado e a concentração do analito presente na amostra do doente <sup>(11,27)</sup>.

Seguidamente são referidos os auto-analisadores mais utilizados na rotina diária do setor de Imunologia e Hormonologia, bem como alguns equipamentos cuja utilização é menos frequente em consequência de um menor registo de pedidos. Paralelamente é descrito o princípio de funcionamento inerente a cada equipamento apresentado. Os parâmetros analíticos avaliados por cada analisador encontram-se listados no anexo III.

### 8.1. Immulite 2000® XPI, Siemens



Figura 19: Immulite 2000® XPI, Siemens.

O Immulite 2000® XPI da Siemens (Figura 19) apresenta a Imunoquimioluminescência (CLIA) como princípio de funcionamento, utilizando técnicas competitivas e não competitivas para a determinação dos diferentes parâmetros analíticos <sup>(28)</sup>.

Os ensaios CLIA combinam a quimioluminescência - tipo de reação química, que ao processar-se gera energia luminosa, com a tecnologia do imunoensaio <sup>(29)</sup>. São utilizadas esferas de poliestireno como fase sólida e enzimas como marcadores da reação, as quais requerem um determinado substrato sobre o qual possam atuar. Como resultado da ação enzimática é originado um produto instável que rapidamente perde energia, produzindo luz que ao ser avaliada por um luminômetro permite a quantificação do analito de interesse.

A fosfatase alcalina corresponde à enzima utilizada na marcação, podendo encontrar-se associada ao antigénio análogo do analito a quantificar (nos ensaios competitivos) ou ao anticorpo secundário (nos ensaios não-competitivos). O dioxetano corresponde ao substrato da fosfatase alcalina, e ao ser adicionado à mistura de reação permite a emissão de luz e a consequente quantificação do analito de interesse <sup>(11)</sup>.

### 8.2. ADVIA Centaur® XP Immunoassay system, Siemens



Figura 20: ADVIA Centaur® XP Immunoassay system, Siemens.

O princípio utilizado pelo equipamento *ADVIA Centaur*<sup>®</sup> XP (Figura 20) corresponde igualmente à Imunoquimioluminescência (CLIA). Como marcador é utilizado o éster de acridina (EA), composto que ao ser oxidado pelo peróxido de hidrogénio promove a emissão de luz. Nesta metodologia há ainda o uso de partículas paramagnéticas (PMP) que se unem covalentemente a antígenos ou a anticorpos numa fase sólida. Tais partículas proporcionam uma superfície de reação maior e são utilizadas para separar o material ligado do não ligado<sup>(11)</sup>. Tal como o *Immulite 2000*<sup>®</sup> XPI, este equipamento permite vários formatos do teste (ensaio competitivo vs ensaio não-competitivo).

### 8.3. Cobas e601 Analyser<sup>®</sup>, Roche Diagnostics



Figura 21: *Cobas e601 Analyser*<sup>®</sup>, Roche Diagnostics.

O *Cobas e601 Analyser*<sup>®</sup> da Roche Diagnostics (Figura 21) apresenta como metodologia de funcionamento a Eletroquimioluminescência (ECLIA), na qual a reação quimioluminescente é eletricamente estimulada pela aplicação de uma corrente elétrica. Neste tipo de método faz-se uso de dois anticorpos monoclonais - um anticorpo biotilado e outro marcado com complexos de ruténio. O antígeno e os anticorpos monoclonais, ao reagirem entre si, formam um imunocomplexo que é fixado à superfície do eletrodo existente no equipamento, graças à adição de micropartículas com capacidade de ligação aos complexos formados. A posterior aplicação de uma corrente elétrica no eletrodo é responsável por induzir a emissão de luz pelo complexo de ruténio, a qual é lida por um luminómetro<sup>(11,30)</sup>.

#### 8.4. **Kryptor®, Brahms**



Figura 22: Kryptor®, Brahms.

O princípio de funcionamento do equipamento *Kryptor®* da *Brahms* (Figura 22) é baseado na tecnologia TRACE (*Time Resolved Amplified Cryptate Emission*), que consiste na transferência de energia não radioativa entre dois marcadores fluorescentes – o dador (criptato) e o recetor (XL 665). Trata-se de um imunoensaio do tipo não-competitivo que utiliza dois anticorpos específicos do antigénio a dosear, marcados com fluorocromos. Como consequência da formação do imunocomplexo antigénio-anticorpo, ocorre uma transferência de energia do criptato para o XL665, sendo para tal essencial uma proximidade física entre dador e recetor. A intensidade do sinal obtido a partir do XL665 é proporcional à concentração de antigénio presente na amostra <sup>(31,32)</sup>.

#### 8.5. **BNProSpec®, Siemens**



Figura 23: BNProSpec®, Siemens.

O *BNProSpec* (Figura 23) apresenta como princípio de funcionamento a Nefelometria, sendo utilizado para a quantificação de proteínas específicas. Este método é baseado na reação entre as proteínas presentes na amostra em estudo e anticorpos específicos, levando à formação de imunocomplexos que causam a dispersão da luz incidente na amostra. Esta

metodologia permite avaliar a quantidade de material suspenso numa dada amostra, a partir da medição da luz dispersa pelo imunocomplexo formado <sup>(11)</sup>. O detetor encontra-se posicionado segundo um ângulo de 90° em relação ao feixe de luz incidente, sendo a quantidade de luz dispersa diretamente proporcional à quantidade de proteína presente na amostra <sup>(28)</sup>.

### 8.6. Liaison<sup>®</sup>, DiaSorin



Figura 24: Liaison<sup>®</sup>, DiaSorin.

O Liaison<sup>®</sup> da DiaSorin (Figura 24), à semelhança de outros equipamentos anteriormente descritos, apresenta como princípio de funcionamento a Imunoquimioluminescência (CLIA). Porém, utiliza como marcador do imunoensaio um derivado do isoluminol <sup>(33)</sup>.

### 8.7. Hydrasys<sup>®</sup>, Sebia



Figura 25: Hydrasys<sup>®</sup>, Sebia.

O Hydrasys<sup>®</sup> da Sebia (Figura 25) corresponde a um equipamento semiautomático utilizado na realização de eletroforeses e imunofixação de proteínas. Requer apenas a intervenção do operador na preparação das amostras e do gel, bem como na aplicação dos reagentes. De forma automática realiza as etapas de aplicação da amostra, migração

eletroforética, incubação com os reagentes, secagem, lavagem, coloração, descoloração e secagem final.

### 8.8. **UniCAP® 100<sup>E</sup>, Pharmacia Diagnostics**



Figura 26: UniCAP® 100<sup>E</sup>, Pharmacia Diagnostics.

O UniCAP® 100<sup>E</sup> da Pharmacia Diagnostics (Figura 26) é usado na detecção e quantificação de imunoglobulinas, sendo particularmente útil nas áreas da Alergiologia e Autoimunidade. Apresenta como princípio de funcionamento a Imunofluorescência (FEIA), fazendo uso de um material revestido com antígenos reconhecidos especificamente por anticorpos alvo a determinar na amostra do doente. Caso o anticorpo de interesse esteja presente na amostra, ocorre a sua ligação ao antígeno. A técnica implica ainda o uso de uma enzima conjugada com um anticorpo secundário, enzima esta que converte o substrato adicionado ao meio de reação num produto fluorescente. Comparando o sinal de fluorescência com o sinal de calibradores cuja concentração é conhecida, torna-se possível a quantificação do anticorpo de interesse <sup>(34)</sup>.

### 8.9. **Automatic gamma counter, 1272 CliniGamma, LKB Wallac**



Figura 27: Automatic gamma counter, 1272 CliniGamma, LKB Wallac.

O *Automatic gamma counter 1272 CliniGamma* (Figura 27) é um equipamento destinado à quantificação de analitos marcados com radioisótopos por técnicas manuais. Consoante a técnica manual executada, assim o teste corresponde a um ensaio competitivo (*RIA* – *Radioimmunoassay*) no qual um antigénio análogo ao analito de interesse é marcado com o radioisótopo  $I^{125}$ , ou a um ensaio não-competitivo (*IRMA* – *Immunoradiometric Assay*) em que a marcação é feita no anticorpo secundário. A quantificação, independentemente do princípio utilizado no teste, requer a elaboração de uma curva de calibração a partir da qual a concentração do analito de interesse possa ser determinada <sup>(11,27)</sup>.

## 9. Hormonologia

Para que o organismo humano funcione corretamente, os vários órgãos e sistemas que o constituem necessitam de comunicar entre si de forma a assegurar a homeostase do organismo. Dois dos sistemas que garantem essa comunicação correspondem ao sistema endócrino e ao sistema nervoso <sup>(29)</sup>.

O sistema endócrino consiste em glândulas e tecidos secretores de hormonas, mensageiros químicos que afetam o comportamento de outros tecidos ou glândulas. Estas substâncias são capazes de influenciar processos diversos no organismo humano, como o metabolismo das células, o crescimento e desenvolvimento do corpo ou a reprodução. Uma vez sintetizadas, as hormonas são libertadas na corrente sanguínea e transportadas às respetivas células alvo. Enquanto algumas hormonas possuem alvos específicos (como é o caso da hormona adrenocorticotrófica ou da hormona estimuladora da tiróide), outras possuem efeitos em diferentes tipos de células (como é o caso da hormona do crescimento). Carateristicamente, as células alvo possuem recetores capazes de reconhecer a hormona em questão e podem encontrar-se expostos à superfície da célula ou no seu interior. Como resultado da interação hormona-recetor é desencadeada uma cascata de reações bioquímicas, a qual culmina na modificação da função ou da atividade da(s) célula(s) alvo.

De forma a manter a homeostase do organismo, e para que a resposta desencadeada pelo sistema endócrino seja apropriada, é essencial que a produção e secreção hormonal seja altamente regulada. Para tal, operam no organismo eficientes mecanismos de retrocontrolo positivo e negativo, os quais podem conduzir a diversas patologias em caso de desregulação <sup>(29,35)</sup>.

Seguidamente são apresentadas as principais glândulas endócrinas do organismo humano, bem como alguns dos analitos associados e que mais frequentemente são alvo de estudo no setor de Imunologia e Hormonologia (cujos valores de referência se encontram listados no anexo IV). A figura 28 ilustra a localização anatômica das glândulas abordadas.

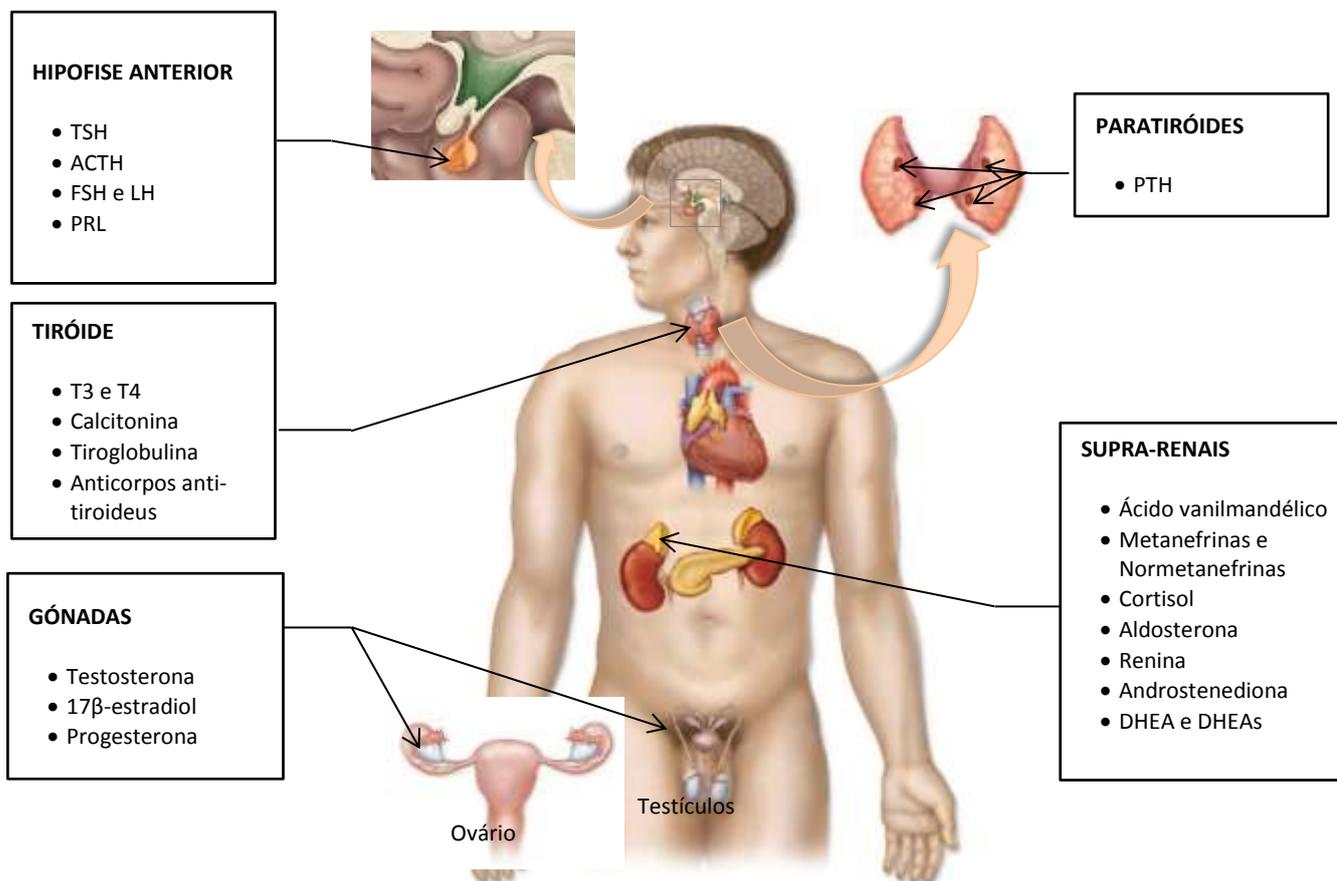


Figura 28: Representação da localização anatômica das principais glândulas endócrinas do organismo humano e hormonas associadas. (Adaptado de ©Elsevier, Inc. – Netterimages.com).

## 10. Testes Laboratoriais

### 10.1. Hipófise

A hipófise encontra-se localizada na base do crânio numa cavidade óssea denominada de *sela turca*. É uma glândula pequena e anatomicamente dividida numa porção anterior (*adenohipófise*) e posterior (*neurohipófise*). Entre outras hormonas a adenohipófise secreta a hormona estimuladora da tíróide (TSH), a hormona adrenocorticotrófica (ACTH), a prolactina (PRL) e as gonadotropinas (hormona folículo-estimulante - FSH e hormona luteinizante - LH), enquanto a hormona antidiurética (ADH) é produzida no hipotálamo e

transportada através de fibras nervosas à neurohipófise <sup>(29)</sup>. Assim, a neurohipófise não funciona como um órgão endócrino distinto mas antes como um reservatório para as hormonas produzidas ao nível do hipotálamo. Já a adenohipófise é controlada pelo hipotálamo que é responsável pela produção de pequenas hormonas peptídicas, cuja ação pode ser estimulatória ou inibitória sobre a adenohipófise.

#### **10.1.1. Hormona estimuladora da tiróide**

A hormona estimuladora da tiróide é uma glicoproteína sintetizada pelas células tireotróficas da adenohipófise, que promove o crescimento e a captação de iodo pela tiróide, estimulando assim a síntese e secreção das hormonas tiroideias triiodotironina (T3) e tiroxina (T4). Os níveis séricos de TSH são regulados pela hormona libertadora da tirotrófina (TRH) e pelas concentrações circulantes das hormonas da tiróide.

A TSH é essencial na avaliação da função tiroideia, sendo a sua quantificação útil no diagnóstico diferencial do hipotireoidismo primário, secundário ou terciário, bem como na monitorização das terapêuticas de substituição hormonal <sup>(35)</sup>.

#### **10.1.2. Hormona adrenocorticotrófica**

A corticotrofina ou hormona adrenocorticotrófica é uma hormona peptídica secretada como um dos derivados do precursor pró-opiomelanocortina (POMC). A sua ação verifica-se principalmente ao nível do córtex adrenal onde estimula a síntese e a secreção de corticosteróides. Os níveis de ACTH no sangue são regulados pela hormona libertadora da corticotrofina (CRH) e pelo cortisol secretado pelas supra-renais <sup>(29)</sup>.

Juntamente com a avaliação do cortisol, esta hormona possui interesse clínico no diagnóstico e na monitorização de condições associadas ao excesso ou ao défice de cortisol no sangue. Na Doença de Addison os níveis de ACTH encontram-se tipicamente elevados ao contrário do que se verifica nos casos de insuficiência adrenal secundária. Já na Síndrome de Cushing as determinações da ACTH podem ser úteis na avaliação da causa da hipersecreção do cortisol <sup>(35)</sup>.

### 10.1.3. Hormona folículo-estimulante e Hormona luteinizante

A hormona folículo-estimulante é responsável por estimular o crescimento e a maturação dos folículos no ovário, a secreção de estrogénios, por promover mudanças a nível do endométrio características da fase proliferativa do ciclo menstrual e por estimular a espermatogénese pelas células de Sertoli nos testículos. Já a hormona luteinizante, em conjunto com a hormona folículo-estimulante, promove a ovulação e a secreção de androgénios e progesterona. É ainda responsável pela iniciação e manutenção da fase secretora do ciclo menstrual e pela formação do corpo lúteo. No sexo masculino, estimula o desenvolvimento e a atividade funcional das células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona. Ambas as hormonas são controladas pelos níveis circulantes da hormona libertadora das gonadotrofinas (GnRH) e das hormonas sexuais <sup>(29)</sup>.

Em conjunto, a FSH e a LH possuem interesse clínico na avaliação dos casos de infertilidade. No sexo feminino, a LH é utilizada para a deteção da ovulação e para o estudo de irregularidades menstruais. Uma vez que, juntamente com a hormona do crescimento, é das primeiras hormonas da hipófise a surgir alterada em caso de alteração desta glândula, é também um parâmetro útil na avaliação da disfunção hipofisária. Tal como a LH, a quantificação da FSH é também importante no diagnóstico de distúrbios envolvendo as gónadas e de alterações da hipófise <sup>(35)</sup>.

### 10.1.4. Prolactina

A prolactina é uma hormona polipeptídica, cujo principal papel corresponde ao desenvolvimento da glândula mamária durante a gravidez e à estimulação e sustentação da lactação no pós-parto. Tal como para outras hormonas da adenohipófise, a sua secreção encontra-se sob controlo hipotalâmico. Contudo é a única hormona, entre as demais da adenohipófise, cuja regulação ocorre por um mecanismo inibitório e não estimulatório.

A hiperprolactinémia corresponde à disfunção hipotalâmica-hipofisária mais comum da Endocrinologia Clínica, estando a hipersecreção associada a estados de hipogonadismo em ambos os sexos. Como consequência da sua ação sobre o sistema reprodutor, elevados níveis de PRL podem traduzir-se em amenorreia e infertilidade nas mulheres e em oligospermia e impotência nos homens <sup>(35)</sup>.

## 10.2. Tiróide

A tiróide corresponde a uma glândula situada na face anterior do pescoço, acima da traqueia, apresentando dois lóbulos unidos por uma estreita porção de tecido designado de *istmo*. Apesar de pequena, trata-se de uma glândula de extrema importância no organismo humano devido às funções que desempenha. O *folículo tireoidiano* corresponde à sua unidade secretora, sendo responsável pela produção das hormonas T3 e T4. Possui também um outro tipo de células – as *células parafoliculares* ou *células C*, as quais são responsáveis pela produção do peptídeo calcitonina <sup>(35)</sup>.

### 10.2.1. Tiroglobulina

A tiroglobulina (TG) corresponde a uma glicoproteína específica da tiróide. As hormonas tiroideias T3 e T4 são sintetizadas a partir da TG por iodação dos resíduos tirosina desta proteína.

Por ser produzida unicamente pelas células foliculares da tiróide, a TG é um parâmetro útil na avaliação pós-cirúrgica da tireoidectomia total, podendo também ser utilizada como marcador tumoral nos carcinomas diferenciados da tiróide <sup>(35)</sup>. A presença de auto-anticorpos dirigidos a esta proteína pode interferir com a sua determinação pelo que a avaliação dos níveis de TG deve ser sempre acompanhada pela quantificação de anticorpos anti-tiroglobulina.

### 10.2.2. Triiodotironina

A quantificação da T3 engloba a fração ligada e a não ligada da hormona às proteínas transportadoras (T3 total). Por esta razão, qualquer condição que altere os níveis destas proteínas, é também responsável por alterar os valores de triiodotironina <sup>(29)</sup>.

Maioritariamente a T3 tem origem na desiodação periférica da T4 e como tal não se revela um parâmetro útil no estudo de casos de hipotireoidismo. No entanto, existem determinadas situações em que se verifica a necessidade de quantificar a T3 como no caso de suspeita de hipertireoidismo ou da toma de terapêuticas que possam interferir com a desiodação periférica de T4 em T3 <sup>(35)</sup>.

### 10.2.3. Tiroxina

A tiroxina ou tetraiodotironina corresponde à principal hormona sintetizada pela tiróide. À semelhança da T3, os ensaios de tiroxina quantificam tanto a fração livre como a ligada às proteínas transportadoras <sup>(29)</sup>.

Valores elevados de T4 são encontrados no hipertiroidismo, na gravidez e em caso de toma de contraceptivos. No hipotiroidismo, nas neoplasias hepáticas e na deficiência genética da globulina ligadora de tiroxina (TBG), os níveis de T4 apresentam-se frequentemente diminuídos <sup>(35)</sup>.

### 10.2.4. T3 e T4 livres

As frações livres da triiodotironina e da tiroxina correspondem às formas biologicamente ativas das hormonas da tiróide, apesar da maioria da T3 e T4 se encontrar em circulação ligada a proteínas transportadoras como a TBG, a pré-albumina ligadora de tiroxina (TBPA) ou a albumina.

A quantificação destas frações é útil nos casos em que os níveis das proteínas transportadoras se encontram alterados.

### 10.2.5. Anticorpos anti-tiroideus

A determinação de anticorpos anti-tiroideus na avaliação da função tiroideia tem como principal objetivo o diagnóstico de uma doença auto-imune associada à glândula. Esta avaliação laboratorial é baseada na deteção e quantificação de anticorpos contra antígenos da tiróide do próprio indivíduo, sendo mais frequentemente avaliados os anticorpos anti-tiroglobulina (anti-TG), anti-tiroperoxidase (anti-TPO) e anti-recetor de TSH (TRAB).

Os anticorpos anti-TPO são produzidos contra a enzima peroxidase da tiróide, a qual é responsável por catalisar a iodação da tiroglobulina. Já o anticorpo anti-TG é direcionado à tiroglobulina, proteína fundamental na biossíntese das hormonas tiroideias. A utilidade destes auto-anticorpos assenta no diagnóstico das tiroidites auto-imunes, das quais a Tiroidite de Hashimoto e a Doença de Graves são exemplo. O anti-TG é ainda útil na deteção de interferências nas medições de TG. O TRAB corresponde a um anticorpo dirigido aos recetores celulares da TSH, sendo a sua determinação importante no diagnóstico da Doença de Graves <sup>(29,35)</sup>.

### **10.2.6. Calcitonina**

É uma hormona hipocalcémica produzida nas células parafoliculares da tiróide, sendo regulada pelos níveis séricos de cálcio no organismo. Exibe influência sobre as concentrações séricas de cálcio, sendo o osso o principal órgão onde exerce a sua ação. A calcitonina interage com os recetores na membrana do osteoclasto, diminuindo a atividade destas células e aumentando o tempo de vida dos osteoblastos <sup>(29,36)</sup>.

Assume uma maior importância clínica em casos de carcinoma medular da tiróide, mas surge também aumentada em numerosas doenças não malignas como o hiperparatiroidismo ou a insuficiência renal <sup>(35)</sup>.

## **10.3. Paratiróide**

As glândulas paratiróides correspondem a quatro pequenas formações arredondadas ou ovais, anatomicamente muito próximas da tiróide. A sua principal função é a regulação dos níveis de cálcio no organismo, mantendo a concentração sanguínea desse catião dentro de valores que permitam o bom funcionamento dos sistemas nervoso e muscular, através da síntese e secreção da paratormona <sup>(35)</sup>.

### **10.3.1. Hormona paratiróideia**

A paratormona ou hormona paratiróideia (PTH) é responsável por regular a concentração de cálcio e fósforo na corrente sanguínea. Ao nível do osso, a PTH promove a destruição do tecido ao estimular a atividade dos osteoclastos e inibir a atividade dos osteoblastos. No rim, ativa a eliminação de fosfatos e a reabsorção de cálcio ao nível dos túbulos renais. Além destas ações é ainda responsável por estimular a produção de vitamina D, a qual por sua vez aumenta a absorção de cálcio, mas a nível intestinal <sup>(29,36)</sup>.

Clinicamente podem ser encontrados níveis elevados de PTH em casos de hiperparatiroidismo associados a adenoma, a hiperplasia ou a cancro da paratiróide (hiperparatiroidismo primário) ou devido, por exemplo, a insuficiência renal crónica (hiperparatiroidismo secundário). Já o hipoparatiroidismo é comum no contexto da tireoidectomia <sup>(35)</sup>.

## 10.4. Supra-Renal

As glândulas adrenais ou supra-renais correspondem a estruturas bilaterais situadas sobre os rins. Apresentam-se revestidas por uma cápsula e são divididas em 2 zonas distintas: o córtex e a medula. O córtex adrenal é por sua vez subdividido em 3 zonas - a zona glomerulosa, mais externa e que secreta a aldosterona (hormona mineralocorticóide), a zona fasciculada que produz o glucocorticóide cortisol e a zona reticular, responsável pela produção das hormonas sexuais <sup>(37)</sup>. Já a medula adrenal corresponde à região central da glândula, e é responsável pela secreção das catecolaminas.

### 10.4.1. Ácido vanilmandélico

O ácido vanilmandélico (VMA) é o principal produto final do metabolismo da epinefrina e norepinefrina, catecolaminas produzidas na medula das glândulas supra-renais <sup>(35)</sup>.

Clinicamente é útil no diagnóstico e monitorização de tumores neuroendócrinos produtores de catecolaminas, como o feocromocitoma, paraganglioma ou o neuroblastoma <sup>(38)</sup>.

### 10.4.2. Metanefrinas e Normetanefrinas

As metanefrinas e normetanefrinas são fisiologicamente formadas a partir das catecolaminas epinefrina e norepinefrina, respetivamente <sup>(35)</sup>.

Níveis aumentados destes produtos do metabolismo das catecolaminas podem ser encontrados em pacientes diagnosticados com feocromocitoma, paraganglioma ou outros tumores neurológicos <sup>(35,38)</sup>.

### 10.4.3. Cortisol

O cortisol corresponde ao principal glucocorticóide produzido pelo organismo humano, sendo sintetizado a partir do colesterol. Esta hormona afeta o metabolismo da glicose, de proteínas e lípidos, possuindo também atividade imunossupressora e anti-inflamatória. Apresenta um ritmo circadiano que, em indivíduos saudáveis, é responsável pelos níveis de cortisol ao final da tarde serem cerca de metade dos da manhã <sup>(35)</sup>.

Este analito possui interesse clínico como indicador da função adrenocortical, nomeadamente em quadros patológicos como a Doença de Addison, a Síndrome de

Cushing, a hiperplasia e o carcinoma adrenal <sup>(39,40)</sup>. É também útil na avaliação de disfunções da hipófise e do hipotálamo, uma vez que se trata de uma hormona cuja regulação se encontra sob o domínio do eixo hipotálamo-hipófise-glândulas adrenais.

#### **10.4.4. Aldosterona**

Os mineralocorticóides possuem como principal função a manutenção da homeostasia dos sais no organismo humano, através da conservação de sódio e excreção de potássio a nível renal. Desta forma são também responsáveis pela regulação do volume vascular. A aldosterona é o mineralocorticóide mais potente e produzida exclusivamente na zona glomerulosa do córtex adrenal <sup>(29,35)</sup>. A sua secreção é regulada pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona, pela concentração plasmática de sódio e de potássio e, em menor escala, pelos níveis de ACTH.

Juntamente com a renina, a aldosterona é um parâmetro analítico de extrema importância no diagnóstico e na monitorização de hipertensão secundária a um hiperaldosteronismo primário, bem como na avaliação da função das glândulas adrenais <sup>(29)</sup>.

#### **10.4.5. Renina**

A renina é uma enzima proteolítica sintetizada e armazenada nas células epiteliais justaglomerulares do rim e que faz parte do sistema regulador da síntese de aldosterona (sistema renina-angiotensina-aldosterona). Ao ser libertada na circulação, hidrolisa o angiotensinogénio a angiotensina I, o qual por uma série de reações bioquímicas leva, em última instância, à produção da aldosterona. A sua libertação é controlada pelas células justaglomerulares sensíveis aos níveis de sódio em circulação e à pressão sanguínea.

A sua determinação tem utilidade no estudo de doentes com hipertensão arterial (HTA) assim como no diagnóstico do hiperaldosteronismo primário <sup>(35)</sup>.

#### **10.4.6. Androstenediona**

A androstenediona é uma hormona esteróide secretada tanto pelas glândulas adrenais como pelas gónadas masculinas e femininas. Corresponde ao precursor mais importante da testosterona e dos estrogénios.

O seu interesse clínico reside na avaliação de estados de virilização, de hirsutismo e da síndrome do ovário policístico na mulher <sup>(29)</sup>.

#### 10.4.7. Dehidroepiandrosterona e Dehidroepiandrosterona sulfato

A quantificação da dehidroepiandrosterona (DHEA) e do seu conjugado sulfatado (DHEAs), é importante na avaliação da produção adrenal de androgénios.

Tratam-se de hormonas esteróides precursoras da testosterona e do estrogénio, sendo secretadas pelo córtex adrenal e, em menor quantidade, pelas gónadas <sup>(35)</sup>. O DHEAs é um parâmetro mais vantajoso que o DHEA, em termos de avaliação da produção androgénica adrenal, pois existe na circulação em concentrações mais elevadas. Por outro lado, não apresenta o ritmo circadiano que a DHEA exhibe, nem circula associado a proteínas transportadoras. Apesar de ser considerado um androgénio fraco, pode ser metabolizado em androgénios mais potentes e conseqüentemente, de forma indireta, ser a causa de hirsutismo ou virilismo nas mulheres. Assim, a determinação de DHEAs é importante na avaliação da função adrenal como causa de hirsutismo, de infertilidade, de amenorreia, da síndrome do ovário policístico, entre outros <sup>(29)</sup>.

### 10.5. Ovários e Testículos

Os testículos correspondem às gónadas masculinas cuja principal função é a espermatogénese mas que atuam também como glândula endócrina, através da síntese e secreção da testosterona ao nível das *células de Leydig*. Para além da testosterona (principal hormona sexual masculina), os testículos são também responsáveis pela produção de outros androgénios como a DHEA e a androstenediona. Pequenas quantidades de estrogénios são também produzidas nas gónadas masculinas <sup>(35)</sup>. Os ovários correspondem às gónadas femininas e, tal como os testículos, a sua função não se limita apenas à produção das células germinativas femininas, atuando também como glândula endócrina ao produzir e secretar estrogénios, essencialmente o estradiol, e a progesterona <sup>(35)</sup>.

O eixo hipotálamo-hipófise-gónadas é responsável não só pela estimulação e maturação das glândulas reprodutoras mas também pela libertação das hormonas sexuais. Todas as hormonas sexuais, femininas e masculinas, têm como precursor o colesterol.

#### 10.5.1. $17\beta$ – estradiol

Para além do  $17\beta$ -estradiol, também o estriol e a estrona pertencem ao grupo dos estrogénios que, juntamente com a progesterona constituem as hormonas sexuais femininas. Este é o estrogénio mais potente e o secretado mais significativamente pelo ovário na

mulher não grávida e em idade fértil, sendo responsável pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias femininas. As glândulas adrenais e os testículos secretam também estrogênios, mas em menor quantidade quando comparada com a produção ovárica<sup>(29)</sup>. A sua síntese é controlada pelas gonadotropinas hipofisárias e os seus níveis variam durante o ciclo menstrual da mulher.

A determinação do  $17\beta$ -estradiol tem interesse clínico no diagnóstico e na monitorização da terapêutica de casos de infertilidade. É ainda importante na avaliação da amenorreia, da ginecomastia masculina e nos distúrbios do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas<sup>(29,41)</sup>.

### 10.5.2. Progesterona

A progesterona é uma hormona sexual especialmente importante na preparação do útero para a implantação do blastocisto e na manutenção da gravidez. Em mulheres não-gestantes, esta hormona é principalmente secretada pelo corpo lúteo. Já o córtex adrenal e os testículos surgem como fontes secundárias da progesterona. A sua secreção pelo corpo lúteo é estimulada e regulada pelas gonadotropinas hipofisárias.

Do ponto de vista clínico, o seu doseamento é útil na avaliação da eficácia da terapêutica de indução da ovulação, bem como na monitorização de terapias de reposição de progesterona. Nas grávidas, o seu interesse reside na deteção do risco precoce de aborto e na avaliação da função placentária<sup>(29)</sup>.

### 10.5.3. Testosterona

A testosterona é uma hormona sexual masculina, correspondendo ao principal androgénio secretado pelas *células de Leydig* nos testículos. No sexo masculino é ainda secretada pelas glândulas adrenais. Esta hormona é responsável pelo desenvolvimento das características sexuais masculinas secundárias, pela espermatogénese e pela secreção de gonadotropinas. Na mulher, os níveis de testosterona são mais baixos comparativamente ao homem e provêm essencialmente da conversão periférica de androstenediona e dehidroepiandrosterona, correspondendo os ovários e o córtex adrenal a outras fontes da hormona<sup>(29)</sup>. A maioria da testosterona circula ligada a proteínas transportadoras, embora seja a forma livre (e a fracamente ligada à albumina) a fração biologicamente ativa.

Nos homens, a determinação dos níveis de testosterona tem interesse na avaliação de estados de hipogonadismo e no diagnóstico e *follow-up* do carcinoma testicular. Nas mulheres é um parâmetro útil na avaliação de hiperplasia das glândulas adrenais, na virilização e em tumores ováricos. Juntamente com as gonadotropinas permite o despiste de patologias associadas ao eixo hipotálamo-hipófise-gónadas <sup>(35)</sup>.

### 10.6. Técnicas manuais

Apesar do setor de Imunologia e Hormonologia ser essencialmente automatizado, vários parâmetros laboratoriais são determinados através da execução de técnicas manuais. Os ensaios que utilizam isótopos radioativos como marcadores da reação correspondem à maioria das técnicas manuais realizadas neste setor, sendo utilizados na quantificação de hormonas ou seus metabolitos. Para além destas, também as técnicas cromatográficas (que visam a quantificação de metabolitos das catecolaminas e da serotonina) e a determinação do cortisol e do iodo urinário requerem o trabalho manual da amostra, com vista à quantificação do analito de interesse.

O anexo V resume os parâmetros analíticos avaliados por técnicas manuais neste setor, bem como o método utilizado na quantificação e o equipamento empregue na leitura do resultado.

### 10.7. Proteinograma

O proteinograma, ou eletroforese de proteínas séricas, é um teste de rotina utilizado na investigação de anomalias proteicas por análise de um perfil proteico. As alterações verificadas podem ser resultantes de problemas das mais diversas índoles, desde patologias hepáticas a anomalias renais ou hematológicas. Trata-se de um teste baseado na técnica de eletroforese, que permite a separação das proteínas presentes no soro em cinco frações distintas: albumina,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  – globulinas, em condições normais <sup>(42)</sup>.

A técnica de separação é baseada no facto de as proteínas possuírem carga elétrica diferente. Assim, quando aplicado um campo elétrico, as proteínas migram do ânodo em direção ao cátodo (ou vice-versa, consoante a carga das proteínas e o pH do meio), em função da sua carga, permitindo a separação das proteínas séricas em diferentes frações, com cada fração a conter uma ou mais proteínas <sup>(43)</sup>.

Na prática, o proteinograma é executado utilizando o equipamento semi-automático *Hydrasis*<sup>®</sup> da *Sebia* e os respectivos kits *Hydragel* destinados à separação, em meio alcalino, das proteínas presentes no soro humano. Depois da separação eletroforética, o gel é corado com negro de amido e por fim semi-quantificado no densitômetro/*scanner*. Este último equipamento possui um *software* (*software Phoresis* da *Sebia*) que traduz o resultado da separação das proteínas séricas num perfil eletroforético, como representado na Figura 29.

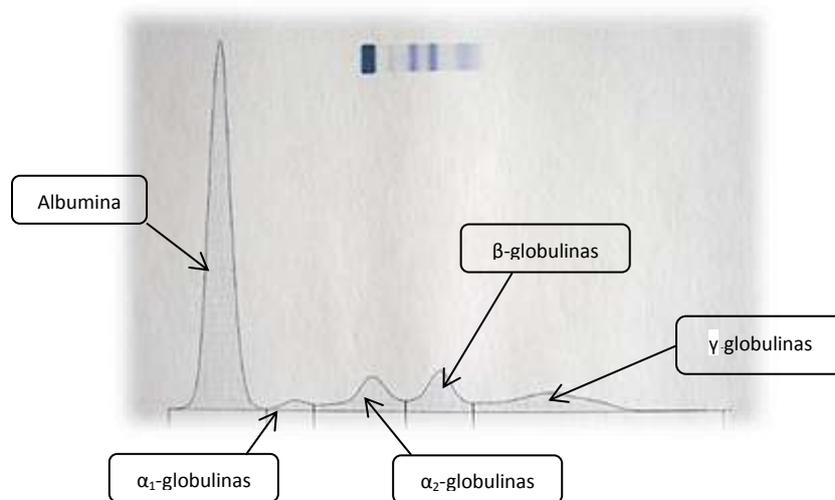


Figura 29: Exemplo de um perfil eletroforético normal, no qual podem ser distinguidas cinco frações individualizadas – albumina,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  – globulinas. (Imagem cedida pelo setor de Imunologia e Hormonologia do IPOCFG).

As proteínas mais representativas de cada uma das cinco frações obtidas pela técnica eletroforética são descritas seguidamente.

Albumina - Corresponde à proteína mais abundante no plasma. É sintetizada exclusivamente pelo fígado e apresenta diversas funções importantes no organismo humano <sup>(44)</sup>. O aumento desta fração é comum em estados de desidratação, enquanto a hipoalbuminemia pode verificar-se no caso de uma síntese diminuída da proteína pelo fígado (cirrose hepática ou hepatite grave) ou na sequência de uma perda acentuada de proteínas (síndrome nefrótica ou gastroenteropatia) <sup>(42)</sup>.

$\alpha_1$ -globulinas - A proteína mais representativa desta fração corresponde à  $\alpha_1$ -antitripsina. Trata-se de uma proteína de fase aguda, sintetizada no fígado e que pode ser encontrada noutros fluidos biológicos para além do sangue <sup>(44)</sup>. A sua deficiência está

associada ao enfisema pulmonar e à cirrose hepática, enquanto níveis elevados são devidos, na maioria dos casos, a uma reação de fase aguda por infecção ou inflamação <sup>(42)</sup>. Esta fração engloba ainda outras proteínas séricas de menor proporção, como a  $\alpha_1$ - glicoproteína ácida e a  $\alpha$ -fetoproteína <sup>(44)</sup>.

$\alpha_2$ -globulinas - Esta fração inclui proteínas como a haptoglobina, a  $\alpha_2$ -macroglobulina e a ceruloplasmina. A haptoglobina é uma proteína de fase aguda responsável por ligar a hemoglobina e remove-la da circulação em situações de hemólise <sup>(44)</sup>. Os seus níveis encontram-se portanto diminuídos em situações tais como a hepatopatia grave ou a anemia falciforme <sup>(43)</sup>. A ceruloplasmina constitui a principal proteína de transporte do cobre, verificando-se uma diminuição dos seus níveis em caso de Doença de Wilson ou na síndrome nefrótica. Já a  $\alpha_2$ -macroglobulina é uma glicoproteína inibidora de proteases. Os seus valores são frequentemente baixos em estados hiperfibrinolíticos e na insuficiência hepática grave <sup>(43)</sup>.

$\beta$ -globulinas - Esta fração engloba a  $\beta$ -lipoproteína, a transferrina, componentes do complemento e a  $\beta_2$ -microglobulina, entre outras. A variação desta banda é proporcional à concentração de transferrina, principal proteína transportadora de ferro <sup>(44)</sup>. Devido ao aumento de colesterol associado a patologias como o hipotireoidismo, a cirrose biliar e a alguns casos de diabetes Mellitus, associado a estas situações clínicas é frequente verificar-se o aumento das  $\beta$ -lipoproteínas. A elevação do nível das  $\beta$ -globulinas é comum em casos de cirrose hepática, verificando-se nestas situações uma sobreposição com a fração relativa às  $\gamma$ -globulinas <sup>(44)</sup>.

$\gamma$ -globulinas - A fração gama é composta por cinco classes de imunoglobulinas – IgG, IgA, IgM, IgE e IgD. Tratam-se de anticorpos produzidos pelos plasmócitos, sendo o mais abundante a IgG. A hipogamaglobulinémia pode ocorrer em consequência de imunodeficiências congénitas ou adquiridas (como em infeções ou tumores malignos). Já o aumento pode ocorrer de forma mono ou policlonal. Bandas policlonais são comuns em doenças inflamatórias, patologia imune ou neoplasias disseminadas. O mieloma múltiplo exhibe tipicamente um pico monoclonal, tal como a macroglobulinemia de Waldenström <sup>(43)</sup>.

## 11. Controlo de Qualidade

A qualidade dos resultados analíticos no setor de Imunologia e Hormonologia é, à semelhança dos restantes setores do SPC, assegurada através da implementação de controlos de qualidade internos e externos.

Diariamente são utilizados controlos fornecidos por uma casa comercial independente do equipamento a controlar. Estes controlos (internos) avaliam múltiplos parâmetros laboratoriais e abrangem dois níveis distintos. Os resultados são tratados e validados de acordo com as Regras de *Westgard*, existindo ainda a possibilidade de comparação dos resultados inter-laboratorialmente através de um *software* informático disponível no setor. Periodicamente são também avaliadas amostras de características desconhecidas (amostras de controlo externo), enviadas pela entidade organizadora dos programas de avaliação externa da qualidade em que o laboratório se encontra inscrito – o INSA (nacional) e o RIQAS (internacional).



## IV. CONCLUSÕES

O Mestrado em Análises Clínicas e, sobretudo, o estágio curricular que integra este curso constituiu uma experiência bastante enriquecedora, uma vez que revelou ter sido uma mais-valia na minha valorização a nível profissional e pessoal.

O estágio no Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG possibilitou-me o conhecimento da dinâmica típica de um laboratório de análises clínicas, a aplicação de conhecimentos adquiridos ao longo de dois anos letivos no presente mestrado bem como a aquisição e/ou aprofundamento de tantos outros conceitos, o contacto com diversos tipos de produtos biológicos e a manipulação de vários sistemas automatizados ou semi-automatizados. De facto, as vantagens associadas à automatização de um laboratório são inquestionáveis. Além de uma maior exatidão e precisão nos resultados obtidos comparativamente aos métodos manuais, o volume e a rapidez de processamento das amostras devem também ser realçados. Tal torna-se essencial não só ao nível do diagnóstico mas também do tratamento, o qual deve ser iniciado o mais precocemente possível.

O tipo de instituição que é o IPOCFG permitiu-me o contacto com vários casos clínicos que dificilmente seriam observados noutra tipo de laboratório de análises clínicas. Por se tratar de uma unidade hospitalar essencialmente direccionada a doentes cuja suspeita de uma patologia do foro oncológico os encaminha até esta instituição para serem diagnosticados, tratados e monitorizados, a existência de resultados analíticos alterados nas mais diversas áreas das análises clínicas não é surpreendente. Por esta razão, ao longo deste estágio, tive a oportunidade de contactar com múltiplos casos em que a distinção entre o estado patológico e o fisiológico era notória, o que certamente contribuiu de forma significativa para o meu conhecimento enquanto técnica superior de análises clínicas.

Assim, o SPC revelou ser um ótimo laboratório de formação, dotado de uma equipa de profissionais de saúde bastante qualificada não só no desempenho das suas funções diárias mas também no apoio à integração e à consolidação de conhecimentos dos estagiários, o que me permitiu uma primeira experiência bastante positiva enquanto profissional na área das análises clínicas.



## V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TATSUMI, N. [et al.] – Principle of blood Cell counter – Development of electric impedance method. *Sysmex Journal International*. 9 (1999) 8-20.
2. GRAHAM, M. – The coulter principle: foundation of an industry. *JALA*. 8 (2003) 72-81.
3. BUTTARELLO, M., PLEBANI, M. – Automated blood cell counts. *Am J Clin Pathol*. 130 (2008) 104-116.
4. CHAVES, F. [et. al.] – Quantitative determination of neutrophil VCS parameters by the Coulter automated Hematology Analyzer. *Am J Clin Pathol*. 124 (2005) 440-444.
5. BACALL, N. – Analisador automático hematológico e importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 31 (2009) 218-220.
6. CHA, C. [et. al.] – Erythrocyte sedimentation rate measurements by TEST 1 better reflect inflammation than do those by the Westergren method in patients with malignancy, autoimmune disease, or infection. *Am J Clin Pathol*. 131 (2009) 189-194.
7. MILOS, M. [et. al.] – Evaluation and performance characteristics of the coagulation system: ACL TOP analyzer – HemosIL reagents. *Int Jnl Lab Hem*. 31 (2009) 26-35.
8. PICOT, J. [et. al.] – Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. 64 (2012) 109-130.
9. HOUWEN, B. – Blood film preparation and staining procedures. *Laboratory Hematology*. 6 (2000) 1-7.
10. HOFFBRAND AV., MOSS, P.A.H. – Fundamentos em Hematologia. 6ª edição. Artmed. 2013.
11. MCPHERSON, R., PINCUS, M. – Henry's, clinical diagnosis and management by laboratory methods. 22<sup>nd</sup> edition. Saunders Elsevier. 2011.
12. MEHTA, A., HOFFBRAND, A.V. – Hematology at a Glance. 2nd edition. Wiley-Blackwell. 2000.
13. FAILACE, R. – Hemograma: Manual de interpretação. 5º edição. Artmed. 2009.
14. BAIN, B.J. – Blood Cells - A practical guide. 4<sup>th</sup> edition. Blackmell Publishing. 2006.

15. ADEWOYIN, A.S., NWOGOH, B. – Peripheral blood film – A review. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*. 12 (2014) 71-79.
16. VENNAPUSA, B. [et. al.] – Erythrocyte sedimentation rate (ESR) measured by the streck ESF-auto plus is higher than with the sediplast Westergren method. *Am J Clin Pathol*. 135 (2011) 386-390.
17. SANTOS, V.M., DA CUNHA, S.F., DA CUNHA, D.F. – Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. *Rev Ass Med Brasil*. 46 (2000) 232-236.
18. BROOS, K. [et. al.] – Platelets at work in primary hemostasis. *Blood reviews*. 25 (2011) 155-167.
19. RODRIGUES, E. [et. al.] – New concepts on the physiology of hemostasis. *Rev Univ Vale Rio Verde*. 10 (2012) 218-233.
20. BAKLAJA, R. [et. al.] – Hemostasis and hemorrhagic disorders. 2<sup>nd</sup> edition. Fermentation-Biotec GmbH. 2008.
21. FRANCO, R. – Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto*. 34 (2001) 229-237.
22. BAIN, J. B. [et. al.] – Dacie and Lewis, *Practical Haematology*. 9<sup>th</sup> edition. Churchill Livingstone. 2001.
23. CHANDLER, W. [et. al.] – Handbook of diagnostic hemostasis and thrombosis tests. 3<sup>th</sup> edition. University of Washington, Department of Laboratory Medicine. 2005.
24. CAMPOS, M.M., SANTOS, I. – Síndrome de Hipoprotrombinémia – Anticoagulante Lúpico. *Acta Med Port*. 24 (2011) 611-616.
25. KUBOTA, E., YAMAMOTO, Y. – Alguns aspetos de imunoensaios aplicados à química clínica. *Química Nova*. 22 (1999) 874-879.
26. NAIRN, R., HELBERT, M. – *Immunology for medical students*. 4<sup>th</sup> edition. Mosby Elsevier. 2002.
27. WILSON, K., WALKER, J. – *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. 7<sup>th</sup> edition. Cambridge University Press. 2010.
28. OWEN, W. E. [et. al.] – Performance characteristics of six IMMULITE 2000 TORCH assays. *Am J Clin Pathol*. 126 (2006) 900-905.
29. BURTIS, C.A., ASHWOOD, E.R., BRUNS, D.E. – *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6<sup>th</sup> edition. W. B. Saunders Company. 2008.
30. WANG, C. [et. al.] – Chemiluminescent Imumunoassay and its applications. *Chinese J Anal Chem*. 40 (2012) 3-10.

31. TRUCHAUND, E. B. [et. al.] – An Innovative Modular Approach in an Automated Compact Immunoassay System. *JALA*. 14 (2009) 41-48.
32. BAZIN, H. [et. al.] – Time resolved amplification of cryptate emission: a versatile technology to trace biomolecular interactions. *Rev Mol Biotechnol*. 85 (2002) 233-250.
33. MARANGONI, A. [et. al.] – Evaluation of LIAISON Treponema Screen, a Novel Recombinant Antigen-Based Chemiluminescence Immunoassay for Laboratory Diagnosis of Syphilis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 12 (2005) 1231-1234.
34. JOHANSSON, S. – ImmunoCAP specific immunoglobulin E test: tool for research and allergy diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 3 (2004) 89-94.
35. HOLT, R., HANLEY, N. – *Essential Endocrinology and Diabetes*. 6<sup>th</sup> edition. Wiley – Blackwell. 2012.
36. ALVES, M. [et. al.] – Vitamina D – Importância da avaliação laboratorial. *Rev Port Endocrinol Diabetes Metab*. 8 (2013) 32-39.
37. CARDOSO, R., PALMA, I. – Córtex Supra-Renal: Anatomia, Embriologia e Fisiologia. *Rev Port Endocrinol Diabetes Metab*. 1 (2009) 71-76.
38. SANTOS, J., PAIVA, I., CARVALHEIRO, M. – Feocromocitoma: atualizações no diagnóstico e tratamento. *Rev Port Endocrinol Diabetes Metab*. 1 (2009) 99-111.
39. DUARTE, L. [et. al.] – Síndrome de Cushing Subclínica. *Rev Port Endocrinol Diabetes Metab*. 1 (2009) 89 -98.
40. CARDOSO, T., PALMA, I. – Insuficiência do Córtex Supra-Renal: Fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. *Rev Port Endocrinol Diabetes Metab*. 1 (2009) 77-87.
41. NASCIMENTO, M. – Disfunção gonadal secundária a tratamento oncológico. *Rev Bras Oncologia Clínica*. 1 (2005) 15-18.
42. O'CONNELL, T., HORITA, T., KASRAVI B. – Understanding and Interpreting Serum Protein Electrophoresis. *Am Fam Physician*. 71 (2005) 105-112.
43. BOSSUYT, X. [et. al.] – Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system. *Clinical Chemistry*. 5 (1998) 944-949.
44. KEREN, D. – *Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis*. 1<sup>st</sup> edition. Hodder Arnold. 2003.



## ANEXOS

- **ANEXO I – Valores de referência em vigência no setor de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG**

Parâmetro analítico	Valor de referência	Unidades
RBC	Mulher: 4,0 – 5,5 Homem: 4,5 – 6,5	t/l
Hgb	Mulher: 12 – 16 Homem: 13 – 18	g/dl
Htc	35 – 47	%
VCM	85 – 95	fl
HCM	27 – 32	pg
CHCM	32 – 36	g/dl
RDW	11,5 – 14,5	%
Reticulócitos	0,5 – 2,5	%
WBC	4,0 – 11,0	g/l
Neutrófilos	45 – 70	%
Linfócitos	20 – 40	%
Monócitos	3 – 10	%
Eosinófilos	1 – 5	%
Basófilos	0 – 2	%
Plaquetas	150 – 450	g/l
VS	0 – 20	mm/h
PT	11,3	seg.
aPTT	28	seg.
TT	14	seg.
Fibrinogênio	200 – 400	mg/dl
PDF	< 278	ng/ml
AL	dRVVT: 0,90 – 1,20 SCT: < 1,20	

- **ANEXO II – Fórmulas de cálculo de parâmetros relativos à série vermelha**

Hematócrito ( <i>Htc</i> )	$Htc (\%) = (RBC \times VCM) / 10$ <i>RBC</i> ( $10^6/\mu l$ ) <i>VCM</i> (fl)
Volume corpuscular médio ( <i>VCM</i> )	$VCM (fl) = Htc \div RBC$ <i>Htc</i> (l/l) <i>RBC</i> ( $10^{12}/l$ )
Hemoglobina corpuscular média ( <i>HCM</i> )	$HCM (pg) = (Hgb \div RBC) \times 10$ <i>Hgb</i> (g/dl) <i>RBC</i> ( $10^6/\mu l$ )
Concentração de hemoglobina corpuscular média ( <i>CHCM</i> )	$CHCM \left(\frac{g}{dl}\right) = (Hgb \div Htc) \times 100$ <i>Hgb</i> (g/dl) <i>Htc</i> (%)

• **ANEXO III – Parâmetros analíticos avaliados no setor de Imunologia e Hormonologia e relação com o método de detecção e equipamento de leitura**

Parâmetro analítico	Método de detecção	Equipamento
ACTH	CLIA	Immulite 2000® XPI
TSH	CLIA	Immulite 2000® XPI
FSH	CLIA	ADVIA Centaur® XP
LH	CLIA	ADVIA Centaur® XP
PRL	CLIA	Immulite 2000® XPI
TG	CLIA	Immulite 2000® XPI
T3	ECLIA	Cobas e601 Analyser®
T4	ECLIA	Cobas e601 Analyser®
T3 livre	ECLIA	Cobas e601 Analyser®
T4 livre	ECLIA	Cobas e601 Analyser®
Anti-TPO	CLIA	Immulite 2000® XPI
Anti-TG	CLIA	Immulite 2000® XPI
TRABs	ECLIA	Cobas e601 Analyser®
Calcitonina	CLIA	Immulite 2000® XPI
PTH	CLIA	ADVIA Centaur® XP
VAN	Espetrofotometria	Shimadzu Spectrophotometer
MTP	RIA	Automatic gamma counter
NMP	RIA	Automatic gamma counter
Cortisol sérico	ECLIA	Cobas e601 Analyser®
Cortisol salivar	ECLIA	Cobas e601 Analyser®
Cortisol urinário	ECLIA	Cobas e601 Analyser®
ALD	RIA	Automatic gamma counter
Renina	CLIA	Liaison®
AND	CLIA	Immulite 2000® XPI
DHEA	CLIA	ADVIA Centaur® XP
DHEAs	CLIA	ADVIA Centaur® XP
17 $\beta$ -estradiol	CLIA	ADVIA Centaur® XP
PRG	CLIA	ADVIA Centaur® XP
TEL	RIA	Automatic gamma counter
TES	ECLIA	Cobas e601 Analyser®

• **ANEXO IV – Valores de referência em vigência no setor de Imunologia e Hormonologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG**

Parâmetro analítico	Valor de referência	Unidades
ACTH	< 46	pg/ml
TSH	0,4 – 4,0	mUI/ml
FSH	Mulher	2,5 – 10,2
	Fase folicular:	3,4 – 33,4
	Pico ovulatório:	1,5 – 9,1
	Fase lútea:	23,0 – 116,3
	Pós-menopausa:	1,4 – 18,1
Homem:		UIII
LH	Mulher	1,9 – 12,5
	Fase folicular:	8,7 – 76,3
	Pico ovulatório:	0,5 – 16,9
	Fase lútea:	15,9 – 54,0
	Contraceção oral:	0,7 – 5,6
	Pós-menopausa:	
	Homem	
19 – 69 anos:	1,5 – 9,3	
> 69 anos:	3,1 – 34,6	
		UIII
PRL	Mulher não-grávida:	1,9 – 20,0
	Homem:	2,5 – 17,0
		ng/ml
TG	< 55,0	ng/ml
T3	84,0 – 182,0	ng/dl
T4	4,5 – 12,5	µg/dl
T3 livre	2,0 – 4,4	pg/ml
T4 livre	0,8 – 1,8	ng/dl
Anti-TPO	< 35,0	UI/ml
Anti-TG	< 40,0	UI/ml
TRAB	Negativo:	< 1,0
	Duvidoso:	1,0 – 1,5
	Positivo:	> 1,5
		UIII
Calcitonina	Mulher:	< 11,5
	Homem:	< 18,2
		pg/ml

PTH	12,0 – 67,0	pg/ml
VAN	< 13,6	mg/24h
MTP plasmáticas	< 90,0	pg/ml
MTP urinárias	< 350	µg/24h
NMP plasmáticas	15,0 – 170,0	pg/ml
Cortisol sérico	7 – 10h: 6,4 – 20,0 16 – 20h: 2,3 – 12,0	µg/dl
Cortisol salivar	8 – 10h: 0,07 – 0,69 23 – 24h: < 0,40	µg/dl
Cortisol urinário	20,0 – 124,0	µg/24h
ALD	Decúbito: 2,94 – 16,2 Ortostatismo: 4,0 – 31,0	ng/dl
Renina	Decúbito: 2,80 – 39,90 Ortostatismo: 4,40 – 46,10	mU/l
AND	Mulher: 0,5 – 3,7 Homem: 0,8 – 3,1	ng/ml
DHEA	Mulher: 0,8 – 10,5 Homem: 1,4 – 12,5	ng/ml
DHEAs	Mulher: 26,0 – 460,2 Homem: 34,5 – 569,0	µg/dl
17 β-estradiol	Mulher Fase folicular: 19,5 – 144,2 Pico ovulatório: 63,9 – 356,7 Fase lútea: 55,8 – 214,2 Contraceção oral: < 102,0 Pós-menopausa: < 32,2 Homem: < 39,8	pg/ml
PRG	Mulher Fase folicular: 0,33 – 1,20 Fase lútea: 0,72 – 17,8 Contraceção oral: 0,34 – 0,92 Pós-menopausa: < 1,0 Homem: 0,27 – 0,90	ng/ml
TEL	Mulher Fase folicular: 0,45 – 3,17 Fase lútea: 0,46 – 2,48 Contraceção oral: 0,55 – 2,01 Pós-menopausa: 0,29 – 1,73 Homem 20 -39 anos: 8,80 – 27,0 40-59 anos: 7,20 – 23,0 60-90 anos: 5,60 – 19,0	pg/ml

<i>TES</i>	Mulher		
	Fértil:	<b>0,084 – 0,48</b>	
	Pós-menopausa:	<b>0,029 – 0,41</b>	<i>ng/ml</i>
	Homem		
	20 – 49 anos:	<b>2,49 – 8,35</b>	
	> 50 anos:	<b>1,93 – 7,40</b>	
<i>Albumina</i>		<b>4,40 – 5,50</b>	<i>g/dl</i>
<i>α<sub>1</sub>-globulinas</i>		<b>0,10 – 0,20</b>	<i>g/dl</i>
<i>α<sub>2</sub>-globulinas</i>		<b>0,50 – 0,80</b>	<i>g/dl</i>
<i>β-globulinas</i>		<b>0,60 – 0,90</b>	<i>g/dl</i>
<i>γ-globulinas</i>		<b>0,70 – 1,20</b>	<i>g/dl</i>

- **ANEXO V – Parâmetros analíticos avaliados por técnicas manuais no setor de Imunologia e Hormonologia**

<b>Parâmetro analítico</b>	<b>Método de determinação</b>	<b>Equipamento</b>
<i>Testosterona livre (TEL)</i>	RIA	<i>Automatic gamma counter</i>
<i>Aldosterona (ALD)</i>	RIA	<i>Automatic gamma counter</i>
<i>Metanefrinas e normetanefrinas plasmáticas (MTP e NMP)</i>	RIA	<i>Automatic gamma counter</i>
<i>Cortisol urinário</i>	ECLIA	<i>Cobas e601 Analyser®</i>
<i>Metanefrinas urinárias</i>	RIA	<i>Automatic gamma counter</i>
<i>Iodo urinário (IUR)</i>	Método baseado na reação Sandell-Kolthoff	<i>ABE-2 Plus</i>
<i>Acido vanilmandélico (VAN)</i>	Cromatografia em coluna de troca iônica com leitura espectrofotométrica	<i>Shimadzu Spectrophotometer UV-120-02</i>
<i>5- hidroxindolacético (5-HIAA)</i>	Cromatografia de afinidade com leitura espectrofotométrica	<i>Shimadzu Spectrophotometer UV-120-02</i>
<i>17-hidroxiprogesterona (OHP)</i>	RIA	<i>Automatic gamma counter</i>