

Nânci Lúcia dos Santos Ferreira

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Doutora Ana Donato e pela Professora Doutora Ana Miguel Matos e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Nânci Lúcia dos Santos Ferreira

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Doutora Ana Donato e pela Professora Doutora Ana Miguel Matos e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos,

À Professora Doutora Ana Donato e à Professora Doutora Ana Miguel Matos, por todas as orientações, apoio e paciência durante toda esta jornada.

A toda a equipa do LACFFUC, por toda a companhia e boa disposição no ambiente de trabalho.

À minha família e aos meus amigos, por estarem sempre presentes.

Índice

ABREVIATURAS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO	1
2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO	3
3. CONTROLO DE QUALIDADE	5
3.1. CONTROLO QUALIDADE INTERNO	5
3.2. AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE	5
4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	7
4.1. SETOR BIOQUÍMICA	8
4.2. SETOR HEMATOLOGIA	8
4.3. SETOR IMUNOLOGIA/ENDOCRINOLOGIA.....	9
4.4. SECTOR MICROBIOLOGIA	10
5. HEMATOLOGIA	11
5.1. HEMATOPOIESE.....	11
5.1.1. <i>Eritrócitos</i>	12
5.1.2. <i>Leucócitos</i>	14
5.1.3. <i>Plaquetas</i>	16
5.2. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DA HEMATOLOGIA.....	17
5.2.1. <i>Hemograma</i>	17
5.2.2. <i>Esfregaço sangue periférico</i>	20
5.2.3. <i>Contagem de reticulócitos</i>	23
5.3. PATOLOGIA DO ERITRÓCITO	24
5.3.1. <i>Anemia microcítica hipocrômica</i>	25
5.3.1.1. <i>Anemia por deficiência de ferro</i>	26
5.3.1.2. <i>Talassémia</i>	26
5.3.2. <i>Anemia macrocítica</i>	27
5.3.2.1. <i>Anemia macrocítica megaloblástica</i>	27
5.3.2.2. <i>Anemia macrocítica não-megaloblástica</i>	27
5.4. PATOLOGIA DAS PLAQUETAS	28
5.4.1. <i>Trombocitose</i>	28
5.4.2. <i>Trombocitopenia</i>	28
5.4.3. <i>Pseudotrombocitopenia</i>	28
5.5. CASOS CLÍNICOS	29

5.6. HEMOSTASE	39
5.7. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DA COAGULAÇÃO	41
5.7.1. <i>Tempo de protrombina</i>	42
5.7.2. <i>Tempo de tromboplastina parcial ativada</i>	42
5.8. OUTRAS DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	43
5.8.1. <i>Tipagem sanguínea ABO/Rh</i>	43
5.8.2. <i>Velocidade de Sedimentação Globular</i>	44
6. CONCLUSÃO	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	IX
ANEXO	XI
ANEXO I – Princípio de funcionamento do auto-analisador Coulter MAX'X	xi

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DIAGRAMA DE PROCESSOS NO LACFFUC	7
FIGURA 2 - APARELHO VIDAS DA BIOMÉRIEUX.....	9
FIGURA 3 - HEMATOPOIESE	11
FIGURA 4 - MATURAÇÃO DO ERITRÓCITO..	12
FIGURA 5 - SÍNTESE DE HEMOGLOBINA.....	13
FIGURA 6 - ESTRUTURA DA HEMOGLOBINA A	13
FIGURA 7 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA FORMAÇÃO DOS LEUCÓCITOS DA LINHAGEM MIELÓIDE	14
FIGURA 8 - PLAQUETAS. FOTOGRAFIA TIRADA NO LACFFUC	16
FIGURA 9 - COULTER MAX'M	17
FIGURA 10 - BOLETIM DE RESULTADOS COULTER MAX'M	18
FIGURA 11 - DIAGRAMA DE UM ESP. FOTOGRAFIA TIRADA NO LACFFUC.....	20
FIGURA 12 - ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO CORADO COM MAYGRÜNWARD- GIEMSA	20
FIGURA 13 - ESFREGAÇO DE SANGUE CORADO COM AZUL DE METILENO NOVO.....	24
FIGURA 14 - HISTOGRAMA DE ERITRÓCITOS UTENTE I	29
FIGURA 15 - ESP UTENTE I.....	29
FIGURA 16 - HISTOGRAMA DE ERITRÓCITOS UTENTE I (2,5 MESES DEPOIS).....	30
FIGURA 17 - ESP UTENTE I (2,5 MESES DEPOIS)	31
FIGURA 18 - ESP UTENTE II.....	32
FIGURA 19 - ESP UTENTE II (1 MÊS DEPOIS)	33
FIGURA 20 - ESP UTENTE III.....	34
FIGURA 21 - ESP UTENTE IV.....	35
FIGURA 22 - ESP UTENTE V.....	36
FIGURA 23 - ESP UTENTE VI.....	38
FIGURA 24 - VISÃO GERAL DA HEMOSTASE	39
FIGURA 25 - CASCATA DA COAGULAÇÃO	41
FIGURA 26 - SISTEMA ABO	43
FIGURA 27 - PRINCÍPIO DE COULTER	XII
FIGURA 28 - FLUXO HIDRODINÂMICO DE CÉLULAS	XIII
FIGURA 29 - TECNOLOGIA VCS	XIII

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - APARELHOS DO LACFFUC	3
TABELA 2 - MÉTODO DOS APARELHOS DO SECTOR DA BIOQUÍMICA E EXEMPLOS DE ALGUNS PARÂMETROS	8
TABELA 3 - MÉTODO DOS APARELHOS DO SECTOR DA HEMATOLOGIA	9
TABELA 4 - DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS REALIZADAS NO APARELHO VIDAS	9
TABELA 5 - TIPOS DE HEMOGLOBINA.....	13
TABELA 6 - FUNÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS LEUCÓCITOS.....	15
TABELA 7 - VALORES DE REFERÊNCIA DA HEMATOLOGIA LACFFUC	19
TABELA 8 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DO ERITRÓCITO QUE PODEM SER OBSERVADAS NO ESP E POSSÍVEIS CAUSAS DA SUA FORMAÇÃO	21
TABELA 9 - CLASSIFICAÇÃO DAS ANEMIAS E CAUSAS MAIS COMUNS	25
TABELA 10 - CARACTERÍSTICAS E MANIFESTAÇÕES DAS VARIANTES DE TALASSÉMIA.....	26
TABELA 11 - HEMOGRAMA UTENTE I.	29
TABELA 12 - DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS UTENTE I (2,5 MESES DEPOIS)	30
TABELA 13 – HEMOGRAMA UTENTE II.	32
TABELA 14 – DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS UTENTE II (1 MÊS DEPOIS).....	32
TABELA 15 - DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS UTENTE III.	34
TABELA 16 - HEMOGRAMA UTENTE IV.	35
TABELA 17 - HEMOGRAMA UTENTE V	36
TABELA 18 - HEMOGRAMA UTENTE VI	38
TABELA 19 - FATORES DA COAGULAÇÃO	40
TABELA 20 - REAGENTES DO COULTER MAX'X.....	XI

ABREVIATURAS

Ac – Anticorpo

AEQ – Avaliação Externa de Qualidade

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AgHBs – Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B

AgHBe – Antígeno do envelope do vírus da Hepatite B

Ac. Anti-HBs – Anticorpo anti antígeno de superfície do vírus da Hepatite B

Ac. Anti-HBc – Anticorpo anti antígeno do core do vírus da Hepatite B

ALP – Fosfatase alcalina

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

CA 19-9 – Antígeno carcinogénico 19-9

CA 125 – Antígeno carcinogénico 125

CBC – Contagem das células sanguíneas

CEA – Antígeno carcinoembrionário

CQI – Controlo de Qualidade Interno

EDTA – Ácido etileno-diamino-tetra-acético

ESP – Esfregaço de sangue periférico

FR – Fator reumatóide

FSH – Hormona folículo-estimulante

FT – Fator tecidual

GP IIb/IIa – Glicoproteína IIb/IIa

HbA_{1c} – Hemoglobina A_{1c}

HbF – Hemoglobina fetal

HGB – Hemoglobina

HCT – Hematócrito

HCV – Vírus da Hepatite C

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

INR – *International Normalized Ratio*

ISI – *International Sensitivity Index*

LH – Hormona luteinizante

MCV – Volume corpuscular médio
MCH – Concentração de hemoglobina corpuscular
MCHC – Concentração de hemoglobina corpuscular média
OMS – Organização Mundial de Saúde
PcR – Proteína C reativa
PL – Fosfolípidos
PLT – Plaquetas
PSA – Antígeno específico da próstata
RBC – Eritrócitos
RDW – Amplitude de distribuição dos eritrócitos
T3 – Triiodotironina
T4 – Tiroxina
Tg – Tiroglobulina
TP – Tempo de protrombina
TPO – Peroxidase tiróidea
TSH – Hormona estimulante da tiróide
TTPa – Tempo de tromboplastina parcial ativada
VDRL – *Venereal Diseases Research Laboratory*
VSG – Velocidade de sedimentação globular
WBC – Leucócitos

RESUMO

O presente relatório refere-se ao estágio realizado no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (LACFFUC), no âmbito do mestrado em Análises Clínicas, sob a orientação da Doutora Ana Donato e Doutora Ana Miguel Matos.

O objetivo deste relatório é descrever de forma sucinta as atividades desenvolvidas ao longo do estágio, sendo aprofundada a área de Hematologia. É descrita a importância clínica das análises efetuadas, as metodologias aplicadas na sua determinação e fundamentos, patologias clínicas mais comuns, o seu diagnóstico laboratorial e exemplos de casos clínicos. Nos casos clínicos são apresentadas as análises efetuadas, interpretação dos resultados, diagnóstico e determinações futuras.

ABSTRACT

This report show the activities developed in the curricular internship on the purpose to obtain the Master Degree in Clinical Analysis by the Pharmacy Faculty of University of Coimbra. The internship was developed in the Clinical Analysis Laboratory of the Pharmacy Faculty of University of Coimbra, under orientation of Doctor Ana Donato and Doctor Ana Miguel Matos.

The aim of this report is to describe the activities developed during the internship in all sectors. A more detailed description of the Hematology sector is realized including the clinical importance of the analysis performed, the methodologies used in the laboratory, the more common pathologies, their diagnostic and examples with real clinical cases.

I. Introdução

A última etapa de formação do mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra é a realização de um estágio de caráter profissionalizante num laboratório de análises clínicas. O estágio foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O LACFFUC está localizado no edifício da Faculdade de Farmácia no polo das Ciências da Saúde.

O LACFFUC executa análises nas valências de Bioquímica, Hematologia, Imunologia/Endocrinologia e Microbiologia. O estágio abrangeu todos os sectores do laboratório e a valência de Hematologia foi a escolhida para aprofundamento teórico.

Na hematologia são abordados os fundamentos da hematopoiese e hemostase, as determinações analíticas realizadas nesta valência e as patologias mais comuns do eritrócito e plaquetas. É dada especial ênfase às anemias microcíticas e macrocíticas, sendo ilustradas com casos clínicos com os quais contatei durante o estágio.

Nos casos clínicos descrevem-se e interpretam-se os resultados analíticos obtidos e identifica-se o possível diagnóstico e determinações futuras de confirmação e diagnóstico. Ao longo do relatório são descritas patologias relacionadas com o consumo crónico de álcool, sendo ilustradas com casos clínicos de doentes da Unidade de Alcoologia.

2. Caracterização do laboratório

O LACFFUC está sob a Direção Técnica da Dra Ana Donato. Conta ainda com o apoio da Dra Ana Miguel Matos, o técnico de laboratório Daniel Gonçalves e as administrativas Dulce Dias e Maria Teresa Santos. Das instalações do laboratório fazem parte a receção, sala de espera, sala de colheitas, gabinete da direção, gabinete dos funcionários, casas de banho, armazém e as áreas de trabalho: zona de processamento das amostras, área da Hematologia, área da Imunologia/Endocrinologia, área da Bioquímica, área da Microbiologia e sala de lavagens. O laboratório possui um posto de colheitas na unidade de Serviços Médicos da Universidade de Coimbra (SMUC). As áreas de trabalho do laboratório é onde se encontram todos os aparelhos e materiais necessários para a fase analítica. Os equipamentos presentes no LACFFUC são os listados na tabela I.

Tabela I - Aparelhos do LACFFUC.

SECTOR	APARELHO
Bioquímica	AU400 (Beckman Coulter)
	SpotLyte Na/K/Cl analyzer (A.MENARINI diagnostics)
	SAS-1 plus e SAS-2 (Helena Biosciences Europe)
	CombiScan 100 Urine Analyzer (Analiticon Biotechnologies AG)
Hematologia	COULTER MAX'M (Beckamn Coulter)
	Option 4 plus (bioMérieux)
	Sedy 12 (Normax)
Imunologia/Endocrinologia	VIDAS (bioMérieux)
Microbiologia	Câmara de fluxo laminar
	Pipetador semi-automático para antibiograma (bioMérieux)
Outros	Centrífuga Microscópio ótico Banho água Frigoríficos e arcas Micropipetas

O fluxo de amostras no LACFFUC é muito variável. Diariamente cerca de 10 amostras são recolhidas no LACFFUC e no posto de colheitas dos SMUC. Para além destas, o LACFFUC recebe cerca de 7 amostras da Unidade de Alcoologia, às terças e quartas-feiras.

Algumas determinações analíticas, devido à baixa frequência com que são pedidas e devido ao reduzido prazo de validade dos reagentes, não são realizadas no LACFFUC e são enviadas para o laboratório São José.

O laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia está a implementar um sistema de gestão da qualidade com vista à certificação pela Norma NP EN ISO 9001:2008.

3. Controlo de qualidade

3.1. Controlo Qualidade Interno

O controlo de qualidade interno (CQI) consiste na análise diária de amostras de controlo cujos valores analíticos são conhecidos, avaliando a precisão dos ensaios. O CQI permite garantir a reprodutibilidade dos resultados e a ocorrência de não conformidades que desencadearão ações corretivas. Na hematologia, três níveis de controlo são realizados todos os dias antes da análise das amostras e ao longo do dia de trabalho. Na bioquímica, antes da análise das amostras é testado um controlo normal para os testes imunoturbidimétricos e são testados 2 níveis de controlo para as restantes determinações. Na coagulação é realizado o CQI sempre que há reconstituição de novo reagente. Na imunologia/endocrinologia o controlo de qualidade é realizado de acordo com as instruções do fabricante. É também realizado 1 vez por mês um controlo do aparelho VIDAS.

3.2. Avaliação Externa da Qualidade

A avaliação externa de qualidade (AEQ) é realizada com vista a avaliar a reprodutibilidade dos ensaios em relação a outros laboratórios clínicos e a um laboratório de referência. O LACFFUC participa no Programa Nacional de Avaliação Externa de Qualidade (PNAEQ) na área da hematologia (contagem celular e morfologia do sangue periférico), coagulação, endocrinologia, marcadores tumorais e virusais, química clínica e hemoglobina glicada.

4. Atividades desenvolvidas

Apesar de participar em todo o processo (Figura 1), as atividades que desenvolvi no LACFFUC focaram-se na fase analítica. A fase pré-analítica inicia-se com a receção e análise da requisição, preparação do doente, colheita da amostra primária, transporte, separação e conservação da amostra. Na fase analítica, as amostras, após serem distribuídas pelas diversas áreas, são processadas de forma a obter os resultados. Consoante as determinações requeridas, as amostras podem ser processadas em quatro sectores: sector da bioquímica, sector da hematologia, sector da imunologia/endocrinologia e sector da microbiologia. A fase pós-analítica consiste na validação, interpretação e emissão dos resultados.



Figura 1 - Diagrama de processos no LACFFUC.

4.1. Setor Bioquímica

Neste setor as amostras mais analisadas são o soro, sangue total colhido em EDTA e urina. São muito diversas as determinações realizadas neste sector e utilizam várias metodologias analíticas, que estão resumidas na tabela 2.

Tabela 2 - Método dos aparelhos do sector da bioquímica e exemplos de alguns parâmetros.

Aparelho	Método	Parâmetro
Beckman Coulter AU400	Espectrofotometria	Colorimétrico Ferro
		Enzimático Glicose
		Cinética enzimática AST, ALT, ALP
	Turbidimetria	Imuno-turbidimétrico HbA _{1c} , PcR, FR
SpotLyte Na/K/Cl analyzer	Potenciometria (eléctrodo seletivo de iões)	Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻
SAS-1 plus e SAS-2	Eletroforese de proteínas	Proteinograma
CombiScan 100 Urine Analyzer	Fotometria de refletância	Sumária de urina: bilirrubina, urobilinogénio, cetonas, ácido ascórbico, glucose, proteínas, sangue, pH, nitritos, leucócitos e densidade.

4.2. Setor Hematologia

Neste setor as amostras analisadas são sangue total colhido com EDTA e sangue total colhido com citrato trissódico em tubo para os ensaios de coagulação e tubo para a velocidade de sedimentação. Os aparelhos utilizados e suas metodologias encontram-se resumidos na tabela 3. Este sector será descrito detalhadamente mais à frente.

Tabela 3 - Método dos aparelhos do sector da hematologia.

Aparelho	Método	Parâmetro
COULTER	Principio Coulter	Hemograma
MAXM	Tecnologia VCS	
Option 4 plus - bioMérieux	Densidade ótica	Tempo de protrombina Tempo de tromboplastina parcialmente ativada
Sedy 12	Infravermelhos	Velocidade de sedimentação

4.3. Setor Imunologia/Endocrinologia

Neste setor a amostra mais utilizada é o soro. São realizadas as determinações analíticas de marcadores infecciosos, marcadores tumorais, hormonas, entre outros (Tabela 4) no aparelho VIDAS da BioMérieux (Figura 2). O princípio de funcionamento deste aparelho é o método imunoenzimático com deteção final por fluorescência (ELFA – *Enzyme Linked Fluorescent Assay*).

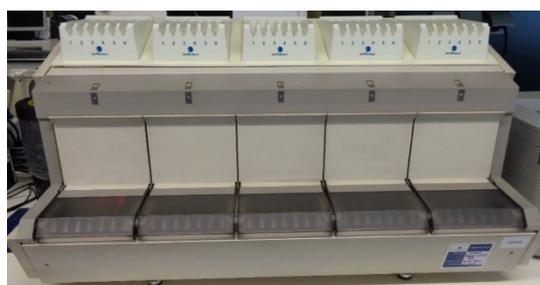


Figura 2 - Aparelho VIDAS da BioMérieux.

Tabela 4 - Determinações analíticas realizadas no aparelho VIDAS.

• AgHBs	• CA125	• LH
• AgHBe	• CA19-9	• FSH
• Ac. Anti-HBs	• Ferritina	• Estradiol
• Ac. Anti-HBc	• T3 total	• Progesterona
• Ac. Anti-HBc IgM	• T4 total	• Prolactina
• Ac. Anti-HCV	• TSH	• Testosterona
• Ac. Anti-HIV-1 e HIV-2	• T3 livre	• PSA total
• Ac. Anti-toxoplasma IgG/IgM	• T4 livre	• PSA livre
• Ac. Anti-rubéola IgG/IgM	• Ac. Anti-Tg	• CEA
• Ac. Anti-citomegalovírus IgG/IgM	• Ac. Anti-TPO	

Para além destas determinações são realizados diversos testes que se baseiam na reação antigénio-anticorpo: testes imunocromatográficos, como a pesquisa de sangue oculto nas fezes e o teste de gravidez na urina; testes de aglutinação, como o teste da VDRL, o teste de Coombs indireto, o teste de Paul-Bunnell e tipagem sanguínea ABO/Rh. A tipagem sanguínea será descrita mais à frente.

4.4. Sector Microbiologia

No setor da microbiologia são analisadas diversas amostras: urina, fezes, exsudato vaginal e exsudatos nasofaríngeos. Consoante a amostra e o tipo de pesquisa, a amostra é processada de diferente forma.

A amostra mais comum é a urina, nomeadamente para pesquisa bacteriológica. A análise do exsudato vaginal inclui o exame micológico, parasitológico e bacteriológico. Nas amostras de fezes pode ser realizado o exame bacteriológico ou parasitológico.

5. Hematologia

A Hematologia é o ramo da ciência que estuda o sangue. O sangue é um tecido conjuntivo líquido, constituído por diversas moléculas, solutos e água, que formam o plasma. É também constituído por células (elementos figurados do sangue). Estes elementos celulares, que estão em suspensão no plasma, são os eritrócitos, leucócitos e plaquetas.

5.1. Hematopoiese

Hematopoiese é o processo de formação, diferenciação e desenvolvimento das células sanguíneas e ocorre em diversos locais consoante a idade. Durante a infância e idade adulta a medula óssea é a única fonte de células sanguíneas, sendo que no adulto a medula hematopoética encontra-se apenas no esqueleto central e extremidades proximais do fémur e úmero (1).

As células sanguíneas derivam todas de um único tipo de células, as células estaminais pluripotentes. A presença de fatores de crescimento específicos permite a divisão e diferenciação destas células em células progenitoras de linhagens específicas de células sanguíneas (Figura 3).

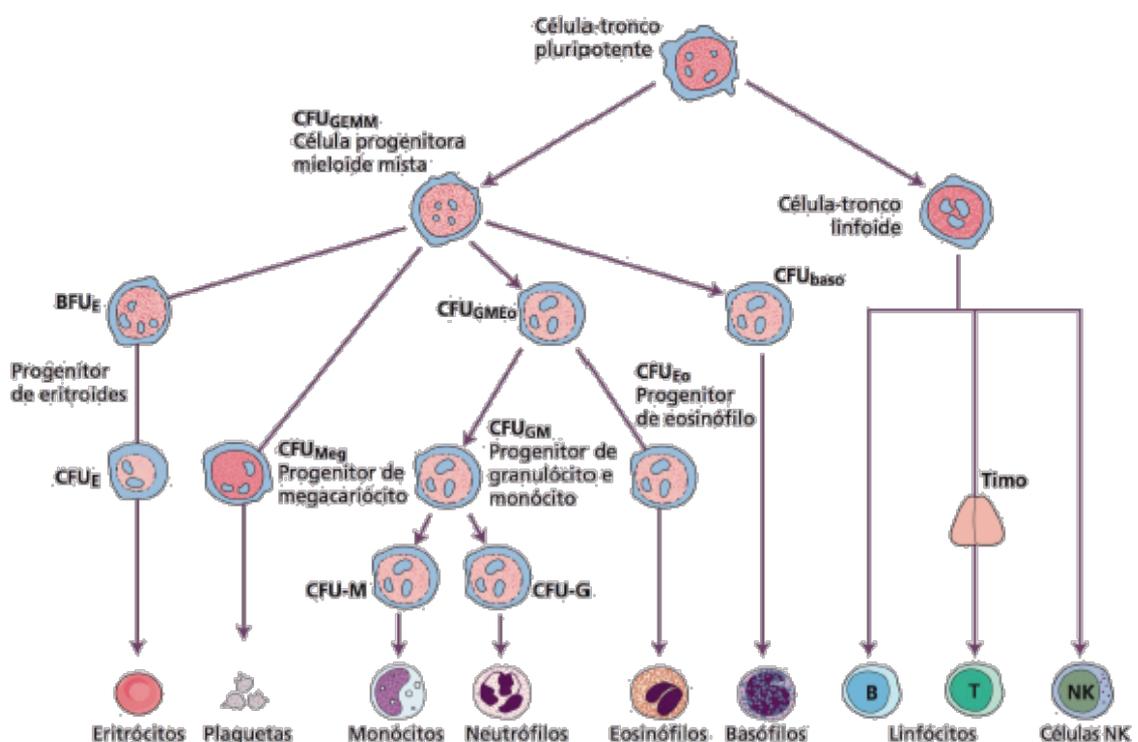


Figura 3 - Hematopoiese (I).

5.1.1. Eritrócitos

Os eritrócitos, cuja função é transportar oxigênio e dióxido de carbono, são os elementos celulares mais abundante do sangue e têm um tempo de semivida aproximadamente de 120 dias. Diariamente são produzidos cerca de 10^{12} eritrócitos na medula óssea. A produção dos eritrócitos é estimulada pela eritropoietina que é produzida maioritariamente no rim.

O processo de formação do eritrócito desde a medula óssea até à corrente sanguínea envolve uma série de proliferações e diferenciações a partir da célula precursora da linhagem eritróide, o proeritroblasto (Figura 4) (2).

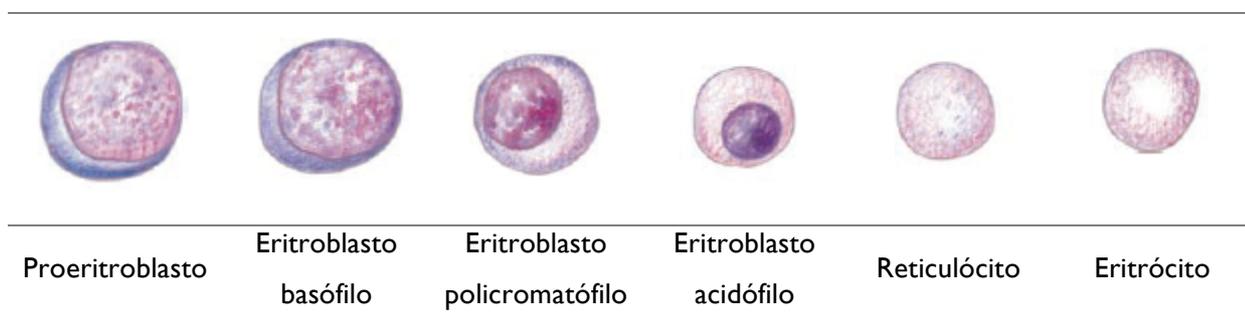


Figura 4 - Maturação do eritrócito. Adaptado de (3).

Ao longo da eritropoiese as células vão-se tornando cada vez mais pequenas e mais rosadas, devido ao aumento da síntese de hemoglobina, até à extrusão do núcleo e maturação final em eritrócito. Na corrente sanguínea encontramos os eritrócitos e os reticulócitos, estes últimos são formados na medula óssea e terminam a maturação na corrente sanguínea. A presença dos percursos eritróides na corrente sanguínea é por norma indicativa de patologia. As substâncias necessárias para a formação dos eritrócitos e produção de hemoglobina são aminoácidos, ferro, vitamina B12 e ácido fólico. Deficiência em qualquer uma destas substâncias resulta numa eritropoiese ineficaz (3).

O eritrócito maduro é um disco bicôncavo anucleado com cerca de 8 μm de diâmetro. A manutenção da sua forma e capacidade de passar na microcirculação deve-se à flexibilidade da membrana. A membrana do eritrócito é constituída pela dupla camada lipídica, por proteínas intrínsecas (glicoforinas e proteína banda 3) e proteínas do citoesqueleto (espectrina, anquirina, proteína banda 4.1 e actina). Defeitos nas proteínas estruturais e/ou intrínsecas leva a alteração da forma do eritrócito e consequente patologia (4).

O eritrócito desempenha a sua função através de uma proteína capaz de efetuar as trocas gasosas: a hemoglobina. Esta proteína é sintetizada nos precursores medulares dos eritrócitos (Figura 5).

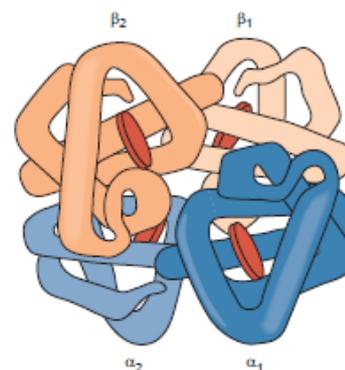
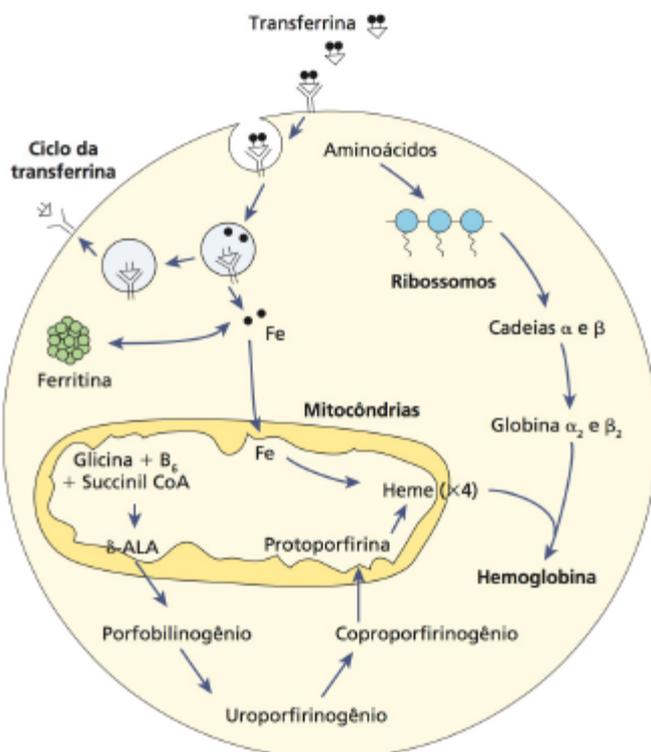


Figura 6 - Estrutura da hemoglobina A (3).

Figura 5 - Síntese de hemoglobina (4).

A molécula de hemoglobina é composta por quatro cadeias globínicas (α , β , γ e/ou δ) e quatro grupos heme. O grupo heme é constituído por um átomo de ferro e protoporfirina IX (4). Há vários tipos de hemoglobina consoante a conjugação entre as globinas (Tabela 5). No adulto a hemoglobina predominante é a Hemoglobina A (Figura 6) (5).

Tabela 5 - Tipos de hemoglobina (5).

Hemoglobina	Globinas	Adulto (%)
HbA	$\alpha_2 \beta_2$	96-98
HbA₂	$\alpha_2 \delta_2$	1,5-3,2
HbF	$\alpha_2 \gamma_2$	0,5-0,8

5.1.2. Leucócitos

Os leucócitos são as células responsáveis pela defesa do nosso organismo contra os microrganismos invasores ou moléculas estranhas. Há cinco tipos de leucócitos, cada um com funções específicas (Tabela 6). São formados a partir de duas linhagens distintas: a linhagem mielóide e a linhagem linfóide.

Da linhagem mielóide fazem parte os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e os monócitos. São formados na medula óssea a partir do mieloblasto, onde permanecem até à formação da célula madura que é libertada na corrente sanguínea (Figura 7). Por norma os percursores mielóides não circulam no sangue periférico.

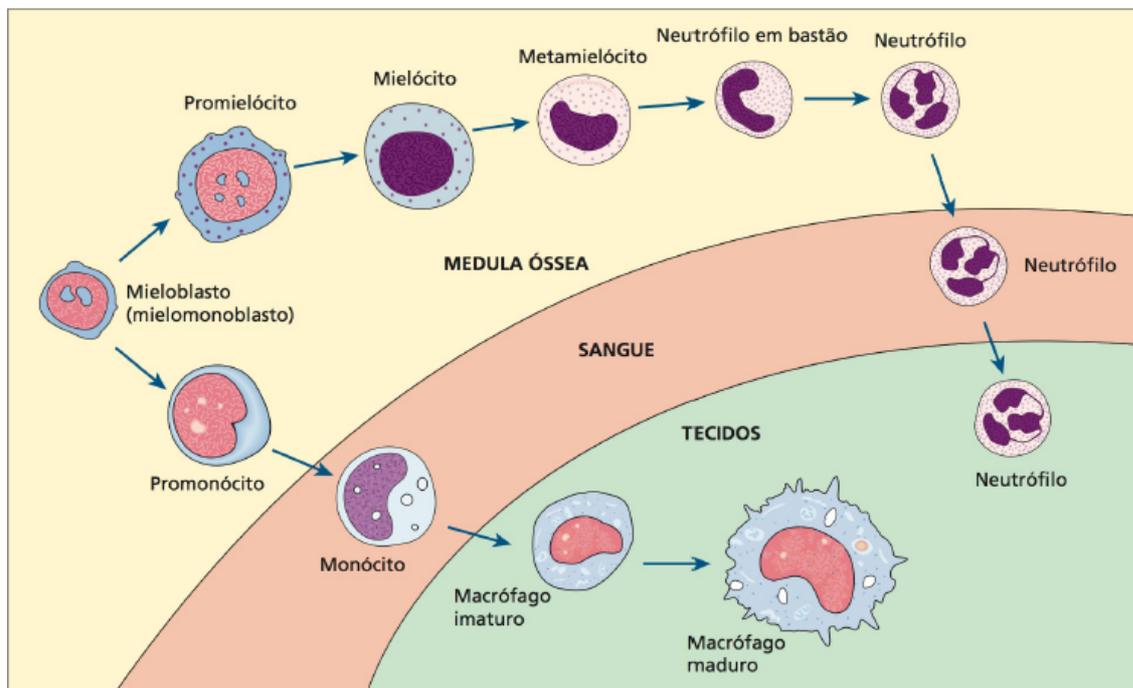


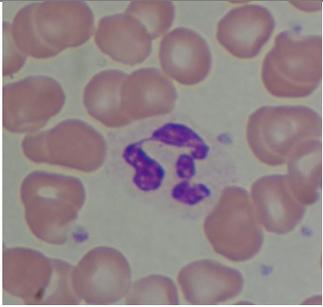
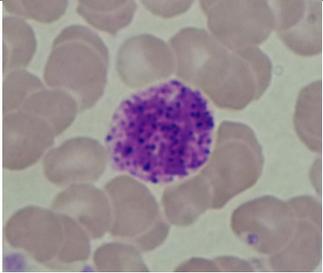
Figura 7 - Esquema representativo da formação dos leucócitos da linhagem mielóide (6).

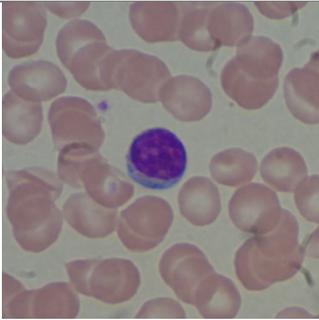
Os granulócitos contêm granulações específicas no citoplasma e núcleo lobado. O monócito diferencia-se em macrófago nos tecidos. Os granulócitos e macrófagos fazem parte da imunidade inata (6). O aumento de uma destas células na corrente sanguínea é designado por neutrofilia, eosinofilia, basofilia ou monocitose. Já a diminuição é designada por neutropenia, eosinopenia ou monocitopenia.

A linhagem linfóide origina os linfócitos. Os linfócitos são células imunologicamente competentes que auxiliam as células fagocíticas na defesa do organismo, fazendo parte da imunidade adaptativa. Ao contrário das células fagocíticas, os linfócitos possuem

especificidade antigénica e memória imunológica. Existem dois tipos de linfócitos: os linfócitos B e os linfócitos T que são formados a partir de um precursor na medula óssea, o linfoblasto, mas a sua maturação ocorre em locais distintos. Os linfócitos B maturam na medula óssea, são libertados na corrente sanguínea e quando ativados diferenciam-se nos órgãos linfóides secundários em plasmócitos, que são células produtoras de anticorpos. Já os linfócitos T maturam no timo, são libertados na corrente sanguínea e após interação com as células apresentadoras de antígenos desencadeiam uma resposta celular (7). O aumento dos linfócitos no sangue é designado por linfocitose e a sua diminuição por linfopenia.

Tabela 6 - Função e características dos leucócitos.

Leucócito	Função	Caraterísticas	
Neutrófilo	Fagocitar microrganismos e outras substâncias.	Núcleo com dois a cinco lobos; as granulações específicas citoplasmáticas coram rosado ou avermelhado; 10 a 12 µm de diâmetro.	
Eosinófilo	Resposta a infeção por helmintas e processos alérgicos.	Núcleo frequentemente bilobado; as granulações específicas citoplasmáticas coram de alaranjado ou vermelho; 11 a 14 µm de diâmetro.	
Basófilo	Reações alérgicas e inflamatórias (libertação de histamina); Libertação de heparina.	Núcleo com dois lobos indistintos; as granulações específicas citoplasmáticas coram de roxo; 10 a 12 µm de diâmetro.	

Linfócito	Produção de anticorpos e mediadores químicos para destruição de microrganismos, reações alérgicas e controlo de tumores.	Núcleo redondo; citoplasma forma um fino anel em redor do núcleo; 6 a 14 μm de diâmetro.	
Monócito	Célula fagocítica que se diferencia em macrófago nos tecidos.	Núcleo redondo, em forma de rim ou ferradura; contem mais citoplasma que o linfócito; pode conter vacúolos; 12 a 20 μm de diâmetro.	

Adaptado de (2). Fotografias tiradas no LACFFUC.

5.1.3. Plaquetas

As plaquetas (Figura 8) são fragmentos celulares rodeadas por uma membrana plasmática contendo grânulos e têm 2 a 4 μm de diâmetro. São formadas na medula óssea por fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, células com cerca de 100 μm de diâmetro.

O megacarioblasto é o precursor do megacariócito, sendo a sua produção estimulada pela trombopoietina, hormona produzida maioritariamente no fígado. O megacariócito amadurece por replicação nuclear sincronizada endomitótica, o que aumenta o volume de citoplasma porque ocorre replicação do ADN sem haver divisão nuclear ou do citoplasma. Numa fase mais avançada de maturação, o citoplasma torna-se granular. A fragmentação das extremidades do citoplasma origina as plaquetas, cuja principal função é a formação de agregados plaquetários que funcionam como tampão mecânico na resposta a uma lesão vascular. Libertam ainda substâncias químicas necessárias à coagulação do sangue (8).

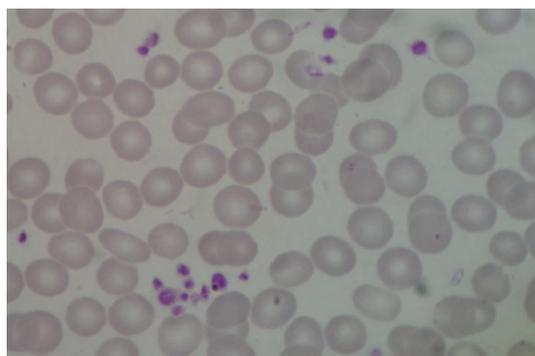


Figura 8 - Plaquetas. Fotografia tirada no LACFFUC.

5.2. Determinações analíticas da Hematologia

5.2.1. Hemograma

Uma das análises de rotina mais pedidas no laboratório é o hemograma. No LAC, o hemograma com contagem diferencial de leucócitos é realizado no aparelho Coulter MAX'M da Beckman Coulter (Figura 9). A contagem de células do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) é realizada pelo método da impedância (Princípio de Coulter) e a contagem diferencial dos glóbulos brancos pela tecnologia VCS. A metodologia utilizada pelo aparelho Coulter encontra-se descrita em anexo (Anexo I).



Figura 9 - Coulter MAX'M (Beckman Coulter).

Após a contagem de células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e determinação da concentração de hemoglobina outros parâmetros são estimados por cálculo. O aparelho produz um boletim de resultados (Figura 10) onde inclui um histograma dos eritrócitos e plaquetas, uma ilustração da distribuição dos leucócitos e as alterações por ele detetadas. O hemograma inclui os seguintes parâmetros:

1. Eritrócitos (RBC);
2. Concentração de hemoglobina (HGB);
3. Hematócrito (HCT): corresponde ao volume de eritrócitos num litro de sangue. No Coulter MAX'M este parâmetro é calculado multiplicando o MCV pelo número de eritrócitos (RBC);
4. Volume corpuscular médio (MCV): no Coulter MAX'M este parâmetro é medido rigorosamente;

5. Hemoglobina corpuscular média (MCH):

$$\text{MCH (pg)}: \frac{\text{hemoglobina g/L}}{\text{eritrócitos} \times 10^{12}/\text{L}}$$

6. Concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC):

$$\text{CHCM (g/L)}: \frac{\text{hemoglobina g/L}}{\text{hematócrito L/L}}$$

7. Amplitude da distribuição eritrocitária (RDW);

8. Plaquetas (PLT);

9. Leucócitos (WBC);

10. Contagem diferencial de leucócitos.

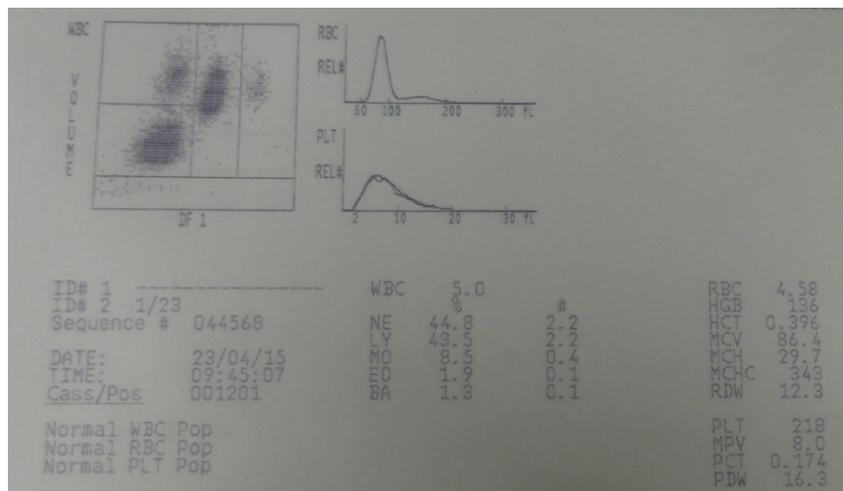


Figura 10 - Boletim de resultados Coulter MAX'M.

Os valores de referência e as unidades em que se expressam os resultados do hemograma e outras determinações em hematologia encontram-se na tabela 7.

Tabela 7 - Valores de referência da hematologia LACFFUC.

Parâmetro	Sexo	Valor de referência
Hemograma		
Eritrócitos	Homem	4,5 – 5,9x10 ¹² /L
	Mulher	4,1 – 5,1x10 ¹² /L
Hemoglobina	Homem	140-175 g/L
	Mulher	120-153 g/L
Hematócrito	Homem	0,42-0,50 L/L
	Mulher	0,36-0,45 L/L
VCM	Adulto	80-96 fl
HCM	Adulto	27-33 pg
CHCM	Adulto	300-350 g/L
Leucócitos	Adulto	4,0-11,0x10 ⁹ /L
Neutrófilos	Adulto	2,0-7,0x10 ⁹ /L (40-80%)
Linfócitos	Adulto	1,0-3,0x10 ⁹ /L (20-40%)
Monócitos	Adulto	0,2-1,0x10 ⁹ /L (2-10%)
Eosinófilos	Adulto	0,02-0,5x10 ⁹ /L (1-6%)
Basófilos	Adulto	0,02-0,1x10 ⁹ /L (<1%)
Plaquetas	Adulto	150-400x10 ⁹ /L
Reticulócitos	Adulto	50-100x10 ⁹ /L (0,5-2,5%)
Eletroforese hemoglobinas		
Hemoglobina A	Adulto	96,8-97,8 %
Hemoglobina F	Adulto	<0,5 %
Hemoglobina A2	Adulto	2,2-3,2 %
Outras hemoglobinas	Adulto	Ausência
Outras determinações		
Ferro	Homem	70-180 µg/dL
	Mulher	60-180 µg/dL
Ferritina	Homem	70-435 ng/mL
	Mulher fértil	10-160 ng/mL
	Mulher menopausa	25-280 ng/mL

5.2.2. Esfregaço sangue periférico

Quando o hemograma é indicativo de alguma alteração significativa (qualitativa ou quantitativa) ou há necessidade de determinar a fórmula leucocitária de forma manual, é efetuado um esfregaço de sangue periférico (ESP) (Figura 11) para analisar a morfologia das células sanguíneas (Figura 12), o que permite verificar e validar as alterações indicadas no hemograma ou até mesmo observar alterações não detetadas pelo auto-analisador. O ESP é corado pela coloração de MayGrünwald- Giemsa. A observação do ESP ao microscópio ótico deve ser realizada numa zona onde não ocorra sobreposição dos eritrócitos de forma a se poder observar a sua morfologia e dos leucócitos e plaquetas.

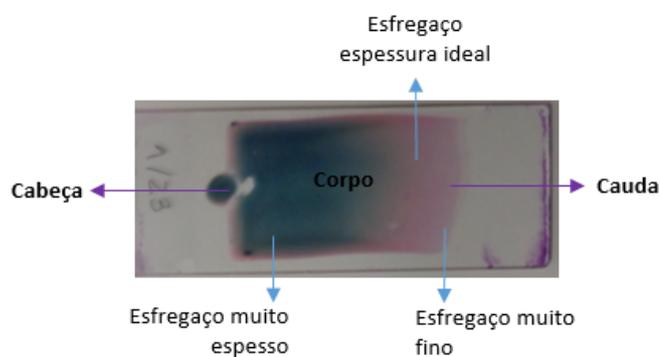


Figura 11 - Diagrama de um ESP. Fotografia tirada no LACFFUC.

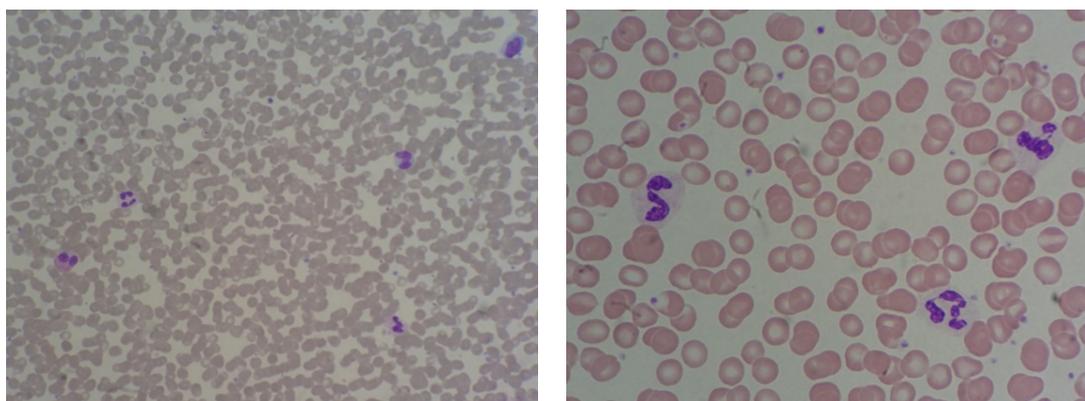
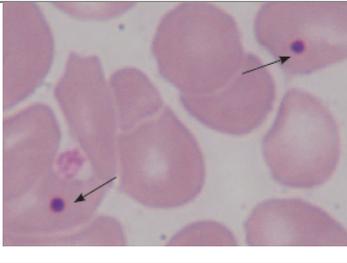
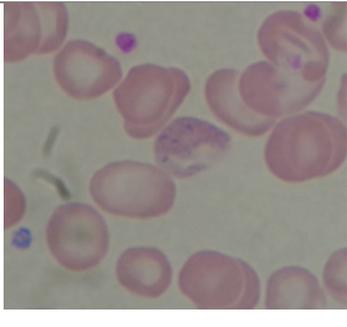
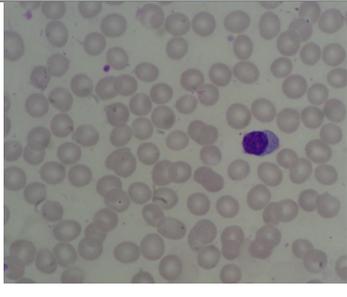
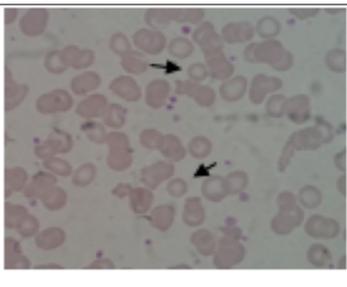
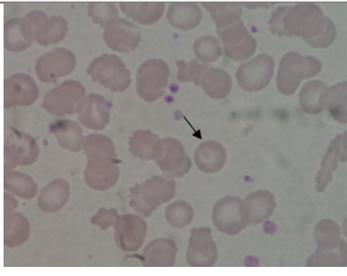
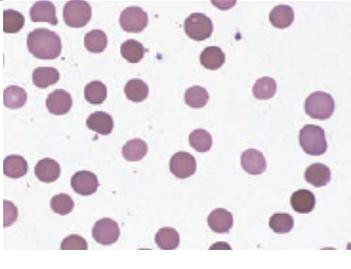
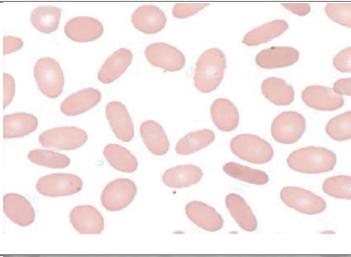
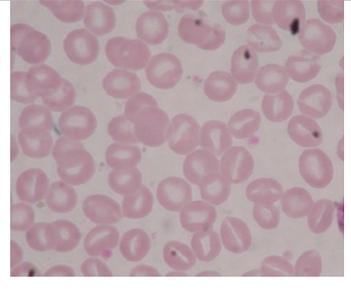
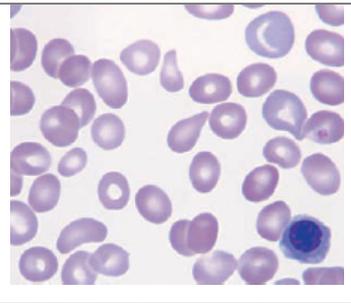


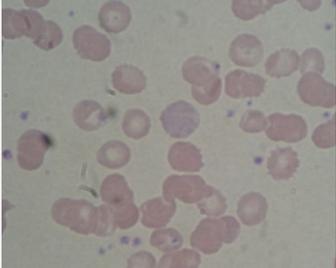
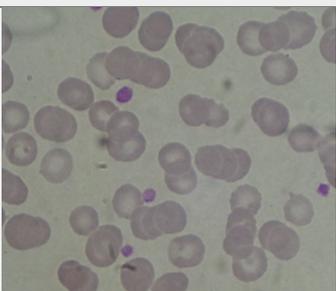
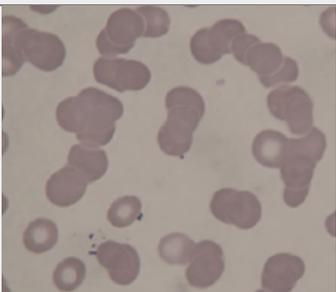
Figura 12 - Esfregaço de sangue periférico corado com MayGrünwald- Giemsa. a) Observação com objetiva 40x; b) observação com objetiva de imersão (100x). Fotografias tiradas no LACFFUC.

Na observação do ESP várias anomalias podem ser detetadas nas células sanguíneas. As anomalias mais comuns observadas no eritrócito encontram-se descritas na tabela 8.

Tabela 8 - Alterações morfológicas do eritrócito que podem ser observadas no ESP e possíveis causas da sua formação (10).

Anomalia		Causas
Inclusões citoplasmáticas		
Corpos de Howell-Jolly*		Anemia hemolítica Anemia megaloblástica β-talassémia Anemia perniciosa
Pontuado basófilo		Intoxicação com chumbo Talassémia Anemia megaloblástica Infecções Hepatopatia
Anisocitose Variação do tamanho dos glóbulos vermelhos		
Macrócitos		Anemia megaloblástica Alcoolismo Anemia aplástica Mielodisplasia
Micrócitos		Deficiência de ferro Talassémia Anemia doença crónica
Poiquilocitose Variação na forma dos glóbulos vermelhos		
Células em alvo (codócitos)		Deficiência de ferro Hemoglobinopatia Doença hepática crónica

<p>Esferócitos*</p>		<p>Esferocitose hereditária Anemia hemolítica auto-imune</p>
<p>Eliptócitos*</p>		<p>Eliptocitose hereditária</p>
<p>Equinócitos</p>		<p>Anemias variadas Desequilíbrio osmótico</p>
<p>Estomatócitos*</p>		<p>Anemia hemolítica auto-imune Doença hepática Alcoolismo</p>
<p>Dacriócitos*</p>		<p>Mielofibrose Anemia severa β-talassémia</p>
<p>GV em charuto</p>		<p>Deficiência de ferro</p>

Drepanócitos*		Anemia falciforme
Policromasia		Reticulocitose
Hipocromia		Deficiência de ferro Talassemia
GV em rouleaux*		Mieloma múltiplo

* Fotografias adaptadas de (9,10). As restantes fotografias foram tiradas no LACFFUC.

5.2.3. Contagem de reticulócitos

A contagem dos reticulócitos, último precursor dos eritrócitos, permite perceber a resposta da medula óssea numa situação de anemia. Os reticulócitos são eritrócitos jovens que contêm RNA ribossomal. Os corantes básicos como o azul-de-metileno novo reagem com o RNA e formam precipitados azuis dentro do reticulócito (11).

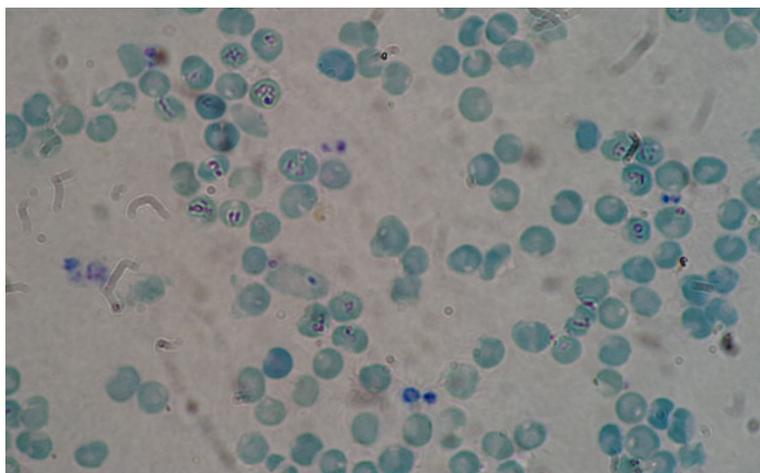


Figura 13 - Esfregaço de sangue corado com azul de metileno novo. Fotografia tirada no LACFFUC (obj. 100X).

O sangue total colhido com EDTA é incubado em partes iguais com o corante azul-de-metileno novo. Após a incubação a 37°C durante 20 minutos, é realizado um esfregaço que é observado no microscópio ótico com objetiva de imersão (Figura 13). A razão de reticulócitos/eritrócitos é determinada em 1000 eritrócitos e corrigida com o valor do hematócrito. O resultado é dado em percentagem e valor absoluto.

$$\% \text{ reticulócitos} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ reticulócitos contados}}{\text{n}^{\circ} \text{ eritrócitos contados}} \times 100$$

$$\text{Reticulócitos} = \% \text{ reticulócitos} \times \frac{\text{HCT medido}}{\text{HCT normal}}$$

5.3. Patologia do eritrócito

A organização mundial de saúde (OMS) define um estado de anemia quando há a redução da concentração de hemoglobina no sangue periférico, abaixo dos valores normais para a idade e sexo (mulher <12 g/dL; homem <13 g/dL) (12).

Em Portugal, a OMS estima que a anemia possa atingir 15% da população. O estudo EMPIRE levado a cabo pelo Anemia Working Group Portugal apontou para uma prevalência de 20,4% de anemia na população adulta portuguesa, o que ultrapassa a estimativa da OMS. A principal causa da anemia é a deficiência de ferro (13).

Uma das classificações das anemias baseia-se na avaliação das constantes eritrocitárias: volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média (Tabela 9). A anemia pode ser devida a diversos fatores, onde se destacam alterações da produção e alterações estruturais da hemoglobina, hemólise e hemorragia.

Tabela 9 - Classificação das anemias e causas mais comuns (4).

Classificação da anemia	Doença/Causa	
Hipocrômica microcítica MCV < 80 fl MCH < 27 pg	Anemia por deficiência de ferro	
	Anemia sideroblástica	
	Talassémias	
Normocrômica normocítica MCV 80 – 95 fl MCH > 26 pg	Anemia hemolítica	Hereditária
		Esferocitose hereditária
		Eliptocitose hereditária
		Défice em G6PD
	Adquirida	Anemia falciforme
		Anemia hemolítica auto-imune
		Aloimune
		Doença hemolítica do recém-nascido
	Hemorragia aguda	
	Falência medular	
Macrocítica MCV > 95 fl	Anemia megaloblástica	Défice vitamina B12 e ácido fólico
		Anticorpos anti-fator intrínseco (Anemia perniciosa)
	Anemia não-megaloblástica	Álcool Hepatopatia

5.3.1. Anemia microcítica hipocrômica

Esta anemia é diagnosticada quando o volume corpuscular médio e a concentração de hemoglobina estão diminuídas. Os eritrócitos apresentam-se descorados e pequenos (micrócitos).

5.3.1.1. Anemia por deficiência de ferro

A anemia por deficiência de ferro é a anemia mais comum. Como a deficiência de ferro é a doença nutricional mais espalhada pelo mundo, a Organização Mundial De Saúde estima que cerca 2 bilhões de pessoas (30% população mundial) sofram deste tipo de anemia (14).

A deficiência de ferro pode ser devida a uma dieta pobre em ferro, perda de sangue (período menstrual), má absorção do ferro (doenças intestinais), aumento das necessidades de ferro (gravidez ou surtos de crescimento) e inflamação (15).

O diagnóstico laboratorial desta anemia inclui o hemograma e determinação do ferro sérico, capacidade total de fixação do ferro, saturação da transferrina e ferritina sérica.

5.3.1.2. Talassémia

A talassémia é uma anomalia genética autossômica recessiva onde há produção insuficiente das cadeias globínicas α ou β da hemoglobina. Os genes para as cadeias de globina α encontram-se no cromossoma 16 (4 genes) e para as cadeias β no cromossoma 11 (2 genes). A α -talassémia ocorre quando há deficiência da síntese de cadeias α , levando a um excesso de cadeias β . Enquanto que a β -talassémia ocorre quando há deficiência da síntese de cadeias β , levando a um excesso de cadeias α . As cadeias β são substituídas por cadeias δ ou γ , aumentando a percentagem de HbA₂ e/ou HbF. Consoante o número de genes afetados e o tipo de alteração o fenótipo da doença é diferente (Tabela 10) (16).

Tabela 10 - Características e manifestações das variantes de talassémia.

Talassémia		Características	Manifestação
Talassémia α	Minor	Ausência de 1 ou 2 genes	Impercetível a hipocromia e microcitose
	Major	Ausência de 3 genes	Anemia hipocrômica e microcítica grave
Talassémia β	Minor	Heterozigotia HbA ₂ > 3,5% e HbF > 2%	Anemia ligeira, hipocrômica e microcítica
	Intermédia	Homozigotia ou dupla heterozigotia HbA ₂ > 3,5% e HbF 10-60%	Anemia moderada, hipocrômica e microcítica Esplenomegalia
	Major	Homozigotia Não há HbA ₂ e HbF elevada Ausência de síntese cadeias β	Anemia severa, dependente de transfusões Hepatoesplenomegalia

5.3.2. Anemia macrocítica

A anemia macrocítica é diagnosticada quando há uma diminuição da concentração de hemoglobina e há um aumento do volume corpuscular médio. Quando observados ao microscópio, os eritrócitos são anormalmente grandes (macrócitos). Consoante a causa esta anemia pode ser classificada em megaloblástica ou não-megaloblástica.

5.3.2.1. Anemia macrocítica megaloblástica

A anemia macrocítica megaloblástica é uma anemia devida a uma deficiência nutricional em vitamina B12 (cobalamina) e/ou vitamina B9 (folato) ou a anomalias no metabolismo destas vitaminas. A vitamina B12 é uma vitamina sintetizada na natureza por microrganismos. É obtida pelo Homem através da dieta pela ingestão de alimentos de origem animal. Esta vitamina funciona como coenzima e participa no metabolismo do folato. O folato é uma vitamina utilizada na síntese de precursores de purinas do ADN, que está presente na maioria dos alimentos e a ingestão é a única fonte de folato do Homem.

Na anemia megaloblástica os eritroblastos na medula óssea sofrem um atraso de maturação do núcleo em relação ao citoplasma devido à síntese defeituosa de ADN. Como resultado há macrocitose e os neutrófilos apresentam-se com o núcleo hipersegmentado e macrocíticos.

O diagnóstico laboratorial desta anemia inclui o hemograma e doseamento da vitamina B12 e folato. É importante fazer o diagnóstico diferencial com a anemia perniciosa.

5.3.2.2. Anemia macrocítica não-megaloblástica

As anemias macrocíticas não-megaloblásticas podem ter várias causas: álcool, hepatopatia, mixedema, mielodisplasia, hemólise, entre outras. A principal causa é o consumo crónico de álcool. Uma vez que o álcool, para além de diminuir a absorção nutricional, é tóxico para a medula óssea, interfere na produção das células sanguíneas. Neste caso, é comum ocorrer anemia, leucopenia e/ou trombocitopenia. O consumo de álcool também origina hepatopatias, o que provoca alterações da coagulação.

A principal característica da anemia macrocítica não-megaloblástica é a macrocitose dos eritrócitos e, ao contrário da anemia macrocítica megaloblástica, não há neutrófilos hipersegmentados e macrocíticos (17).

5.4. Patologia das plaquetas

5.4.1. Trombocitose

A trombocitose é definida por um aumento do número de plaquetas. A trombocitose pode ser de origem genética (trombocitose hereditária ou familiar), associada a doenças mieloproliferativas ou reativa (trombocitose secundária). A trombocitose reativa pode ser observada em conjunto com doenças inflamatórias crónicas, infeções crónicas, drogas, perda aguda e crónica de sangue, entre outros (18).

5.4.2. Trombocitopenia

A trombocitopenia, diminuição do número de plaquetas, pode ser patológica ou uma pseudotrombocitopenia. Quando o hemograma indica trombocitopenia deve ser observado ao microscópio um esfregaço de sangue periférico. Tal como referido anteriormente, uma situação onde é comum ocorrer trombocitopenia é no consumo crónico de álcool.

5.4.3. Pseudotrombocitopenia

Uma das causas da pseudotrombocitopenia é a formação de agregados plaquetares nas amostras de sangue colhidas com EDTA, podendo também ocorrer o satelitismo plaquetário à volta dos neutrófilos (19). O EDTA expõe e proporciona a ligação de anticorpos anti-criptoantigénios da GP IIb/IIIa das plaquetas, levando à aglutinação plaquetária. Esta aglutinação é mais exacerbada quando a amostra de sangue se encontra abaixo dos 25°C. Quando a pseudotrombocitopenia é devida ao EDTA, a amostra de sangue deve ser colhida em citrato e/ou heparina e deve ser realizada uma nova contagem de plaquetas e observação do ESP.

A pseudotrombocitopenia também pode ocorrer devido a erros durante a fase pré-analítica, quando há uma incorreta mistura do sangue com o anticoagulante ou o tubo de colheita possui um defeito na quantidade de anticoagulante.

5.5. Casos clínicos

Caso clínico I

Utente do sexo feminino, 36 anos. Dirigiu-se ao LACFFUC para a realização de um hemograma de rotina (Tabela II).

Tabela II - Hemograma utente I.

Hemograma	
RBC	4,66 × 10 ¹² /L
HGB	99 g/L
HCT	0,322 L/L
VCM	69,1 fl
HCM	21,3 pg
CHCM	308 g/L
RDW	17,5 %
PLT	305 × 10 ⁹ /L

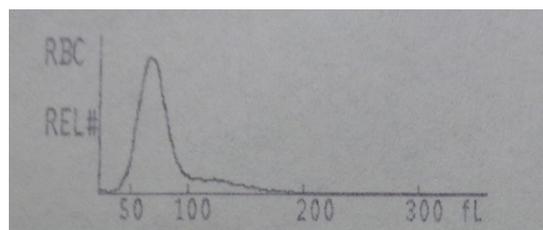


Figura 14 - Histograma de eritrócitos utente I.

O hemograma indica que a utente está com anemia pois a concentração de hemoglobina encontra-se diminuída. O volume corpuscular médio e a hemoglobina corpuscular média estão diminuídos e que indica tratar-se de uma anemia hipocrômica e microcítica. O RDW indica a presença de grande variação de tamanho dos eritrócitos. Foi realizado um ESP (Figura 15).

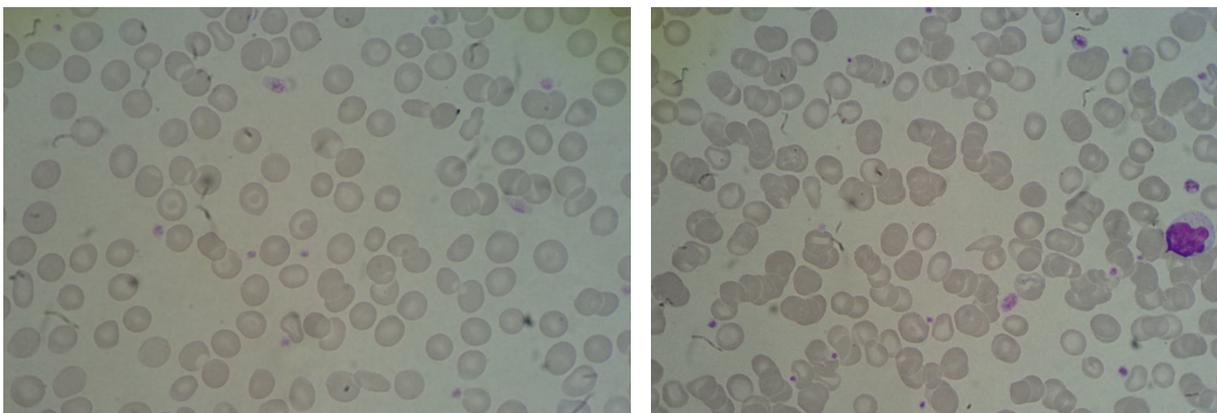


Figura 15 - ESP utente I. Fotografias tiradas no LACFFUC (obj. 100x).

No ESP, os eritrócitos são pequenos e descorados, o que confirma o diagnóstico de anemia microcítica e hipocrômica. Observa-se também anisopoiquilocitose com presença de células em alvo, estomatócitos e dacriócitos, o que é característico deste tipo de anemia.

A causa mais comum da anemia microcítica e hipocrômica é a deficiência de ferro. De forma a perceber se é esta a causa da anemia devem ser determinados os seguintes parâmetros: ferro sérico, ferritina, capacidade total de fixação do ferro e saturação da transferrina.

Cerca de dois meses e meio após ter iniciado uma terapêutica oral com um suplemento de ferro, a utente regressou ao LACFFUC para repetir o hemograma e dosear o ferro sérico (Tabela 12).

Tabela 12 - Determinações analíticas utente I (2,5 meses depois).

Hemograma	
RBC	5,24 x 10 ¹² /L
HGB	133 g/L
HCT	0,413 L/L
VCM	78,7 fl
HCM	25,4 pg
CHCM	323 g/L
RDW	28,0 %
PLT	186 x 10 ⁹ /L
Outras determinações	
Ferro	60 µg/dL

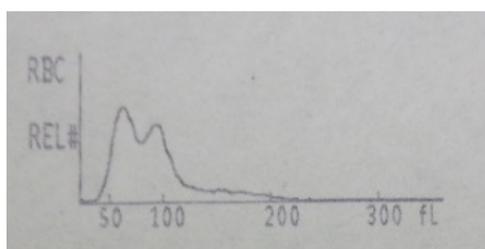


Figura 16 - Histograma de eritrócitos utente I (2,5 meses depois).

A utente já não se encontra anémica pois o valor de hemoglobina encontra-se nos valores de referência. O VCM e HCM, apesar de ainda não estarem dentro do valor de referência, encontram-se bastante aumentados em relação às últimas análises. Isto indica que a utente recuperou da anemia após o tratamento com o suplemento de ferro o que confirmou que a anemia era devida a um défice em ferro. A determinação do ferro indica que este agora já está dentro dos valores de referência. O histograma dos eritrócitos (Figura 16) indica a existência de duas populações distintas de eritrócitos, o que não se verificava nas primeiras análises (Figura 14). Tal é comprovado pelo elevado RDW (28%) que reflete a anisocitose observada no ESP (Figura 17).

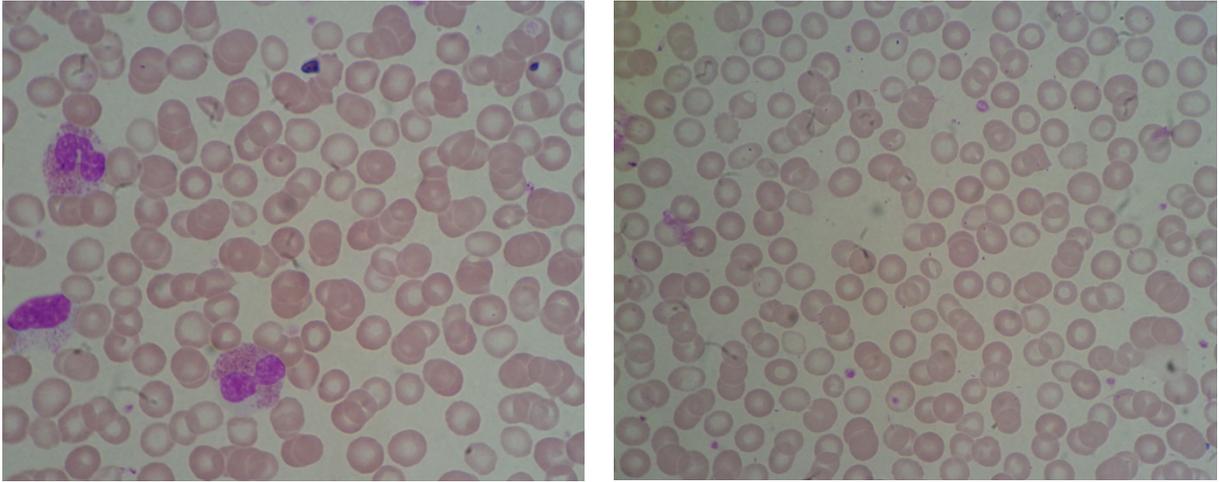


Figura 17 - ESP utente I (2,5 meses depois). Fotografias tiradas LACFFUC (obj. 100x).

No ESP é possível observar uma população de eritrócitos hipocrômicos e microcíticos e outra população de eritrócitos normocrômicos e normocíticos. Isto significa que a medula óssea está a responder ao tratamento com ferro. Devido ao longo tempo de semivida, os eritrócitos deficientes em ferro ainda circulam na corrente sanguínea. Ao longo do tempo esta população antiga de eritrócitos é substituída pelos novos eritrócitos. É comum observar dimorfismo eritrocitário quando há o tratamento eficaz da anemia ou em transfusões sanguíneas.

Caso clínico 2

Utente do sexo feminino, 21 anos. Dirigiu-se o LACFFUC para a realização de um hemograma de rotina (Tabela 13).

Tabela 13 - Hemograma utente II.

Hemograma	
RBC	4,64 x 10 ¹² /L
HGB	90 g/L
HCT	0,294 L/L
VCM	63,5 fl
HCM	19,3 pg
CHCM	304 g/L
RDW	16,8 %
PLT	709 x 10 ⁹ /L
WBC	9,2 x 10 ⁹ /L

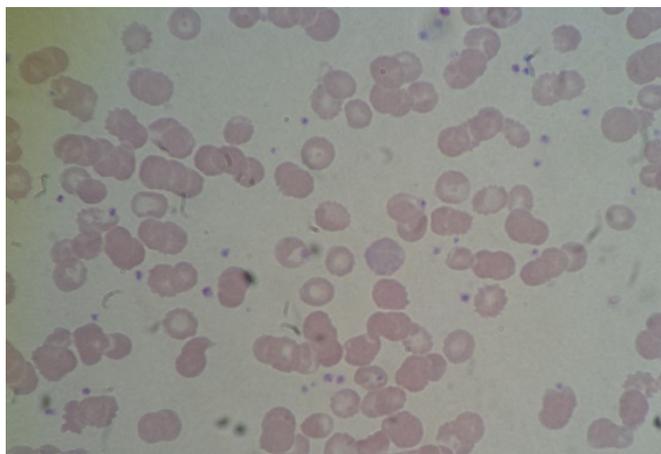


Figura 18 - ESP utente II. Fotografia tirada LACFFUC (obj. 100x).

A utente encontra-se anémica pois a concentração hemoglobina está diminuída. O hematócrito, VCM e HCM estão bastante diminuídos, o que indica tratar-se de uma anemia microcítica e hipocrômica. Há ainda trombocitose pois o valor de plaquetas esta muito acima da referência. No ESP (Figura 18) é possível observar-se, para além do elevado número de plaquetas, elevada anisopoiquilocitose, com presença de células em alvo, equinócitos e macrócitos. Há ainda policromasia, o que indica que os reticulócitos devem estar aumentados.

A utente regressou ao LACFFUC 1 mês depois. Repetiu o hemograma, fez uma electroforese de hemoglobinas e doseou a ferritina (Tabela 14).

Tabela 14 - Determinações analíticas utente II (1 mês depois).

Hemograma		Outras determinações	
RBC	4,7 x 10 ¹² /L	Ferritina	<1,50 ng/mL
HGB	89 g/L	Eletroforese hemoglobinas	
HCT	0,294 L/L	Hemoglobina A	> 97,9 %
VCM	62,5 fl	Hemoglobina F	< 0,1 %
HCM	18,9 pg	Hemoglobina A2	< 2,1 %
CHCM	303 g/L	Outras hemoglobinas	Negativo
RDW	16,5 %		
PLT	467 x 10 ⁹ /L		
WBC	8,2 x 10 ⁹ /L		

O hemograma continua de acordo com o diagnóstico inicial de anemia microcítica e hipocrômica pois a hemoglobina, VCM e HCM continuam diminuídos. A eletroforese de hemoglobinas exclui a possibilidade de β -talassémia pois a percentagem das diferentes hemoglobinas está dentro da referência para um indivíduo adulto. A ferritina está bastante diminuída, o que indica que a causa da anemia microcítica e hipocrômica poderá ser uma deficiência de ferro.

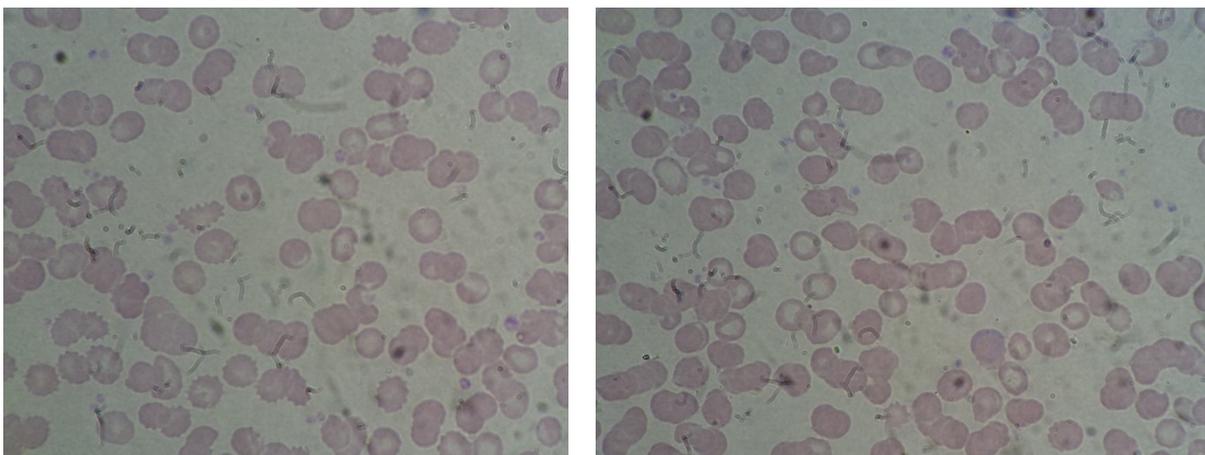


Figura 19 - ESP utente II (1 mês depois). Fotografias tiradas no LACFFUC (obj. 100x).

No ESP (Figura 19) podemos ver que a utente continua com policromasia, anisopoiquilocitose com células em alvo, equinócitos e alguns eritrócitos em roleaux.

De forma a confirmar ou excluir a deficiência de ferro como causa da anemia deve-se dosar o ferro sérico, a capacidade total de fixação do ferro e a saturação da transferrina.

Caso clínico 3

Utente sexo feminino, 20 anos. Dirigiu-se ao LAC para a realização de um hemograma de rotina e doseamento do ferro sérico (Tabela 15).

Tabela 15 - Determinações analíticas utente III.

Hemograma	
RBC	5,05 x 10 ¹² /L
HGB	96 g/L
HCT	0,311 L/L
VCM	61,7 fl
HCM	19,0 pg
CHCM	307 g/L
RDW	14,6 %
WBC	9,9 x 10 ⁹ /L
PLT	299 x 10 ⁹ /L
Outras determinações	
Ferro	65 µg/dL

A utente encontra-se com anemia pois o valor de hemoglobina esta diminuído. O VCM e HCM estão diminuídos o que indica ser uma anemia microcítica e hipocrómica. O ferro está dentro dos valores de referência, o que excluiu a deficiência de ferro como a causa da anemia. O facto de os eritrócitos estarem dentro dos valores de referência, apesar da anemia, indica que poderá tratar-se de uma talassémia.

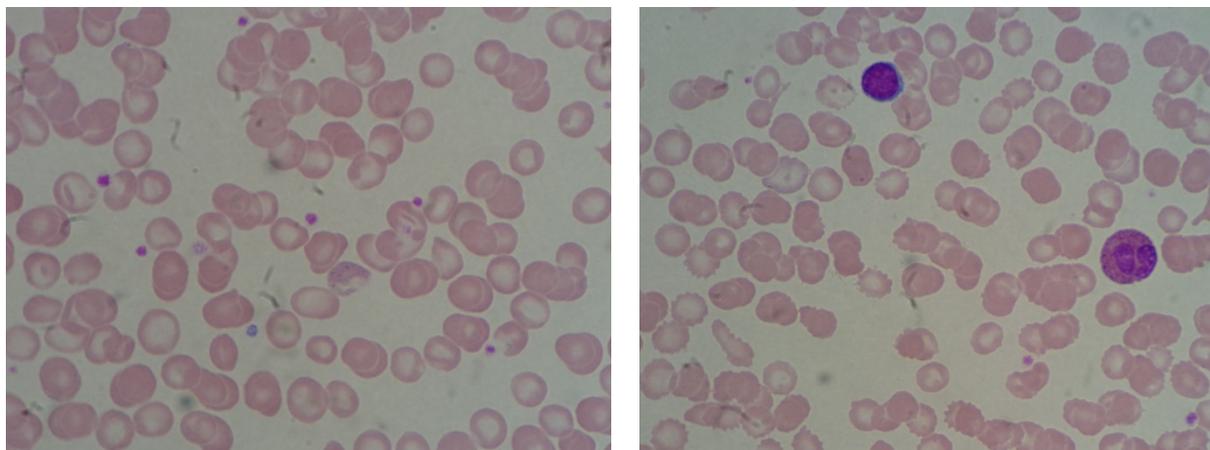


Figura 20 - ESP utente III. Fotografias tiradas no LACFFUC (obj. 100x).

No ESP (Figura 20) podemos ver grande anisopoiquilocitose com micrócitos, eritrócitos em alvo, em charuto e equinócitos. Há policromasia e pontuado basófilo. A hipocromia com a presença de eritrócitos em alvo e pontuado basófilo é um forte indicador de talassémia. De forma confirmar o diagnóstico e a classificar a talassémia deve ser efetuado uma eletroforese de hemoglobinas.

Caso clínico 4

Utente sexo masculino, 47 anos, doente da Unidade de Alcoologia. Uma amostra de sangue foi enviada para o LACFFUC de forma a realizar o hemograma de rotina (Tabela 16).

Tabela 16 - Hemograma utente IV.

Hemograma	
RBC	3,25 x 10 ¹² /L
HGB	130 g/L
HCT	0,376 L/L
VCM	115,8 fl
HCM	40,2 pg
CHCM	347 g/L
RDW	13,6 %
WBC	3,6 x 10 ⁹ /L
PLT	18 x 10 ⁹ /L



Figura 21 - ESP utente IV. Fotografia tirada no LACFFUC (obj. 100x).

O utente está com anemia discreta pois a concentração de hemoglobina está ligeiramente diminuída. Apresenta macrocitose e hiper Cromia pois o VCM e HCM estão aumentados. Apresenta também uma acentuada trombocitopenia pois o número de plaquetas está muito abaixo do valor de referência. No ESP (Figura 14) pode ver a presença de macrócitos, células em alvo e a ausência de plaquetas. Não foram observados neutrófilos hipersegmentados e macrocíticos. A macrocitose com ausência de hipersegmentação indica estarmos presente a uma anemia macrocítica não megaloblástica. Tendo em conta o histórico do utente, a causa da anemia macrocítica e trombocitopenia é o consumo crónico e excessivo de álcool.

Caso clínico 5

Utente do sexo feminino, 46 anos, doente da Unidade de Alcoologia. Uma amostra de sangue foi enviada para o LACFFUC para realizar o hemograma de rotina (Tabela 17).

Tabela 17 - Hemograma utente V.

Hemograma	
RBC	$3 \times 10^{12}/L$
HGB	91 g/L
HCT	0,279 L/L
VCM	92,8 fl
HCM	30,4 pg
CHCM	328 g/L
RDW	23,5 %
WBC	$8,9 \times 10^9 /L$
PLT	$546 \times 10^9/L$

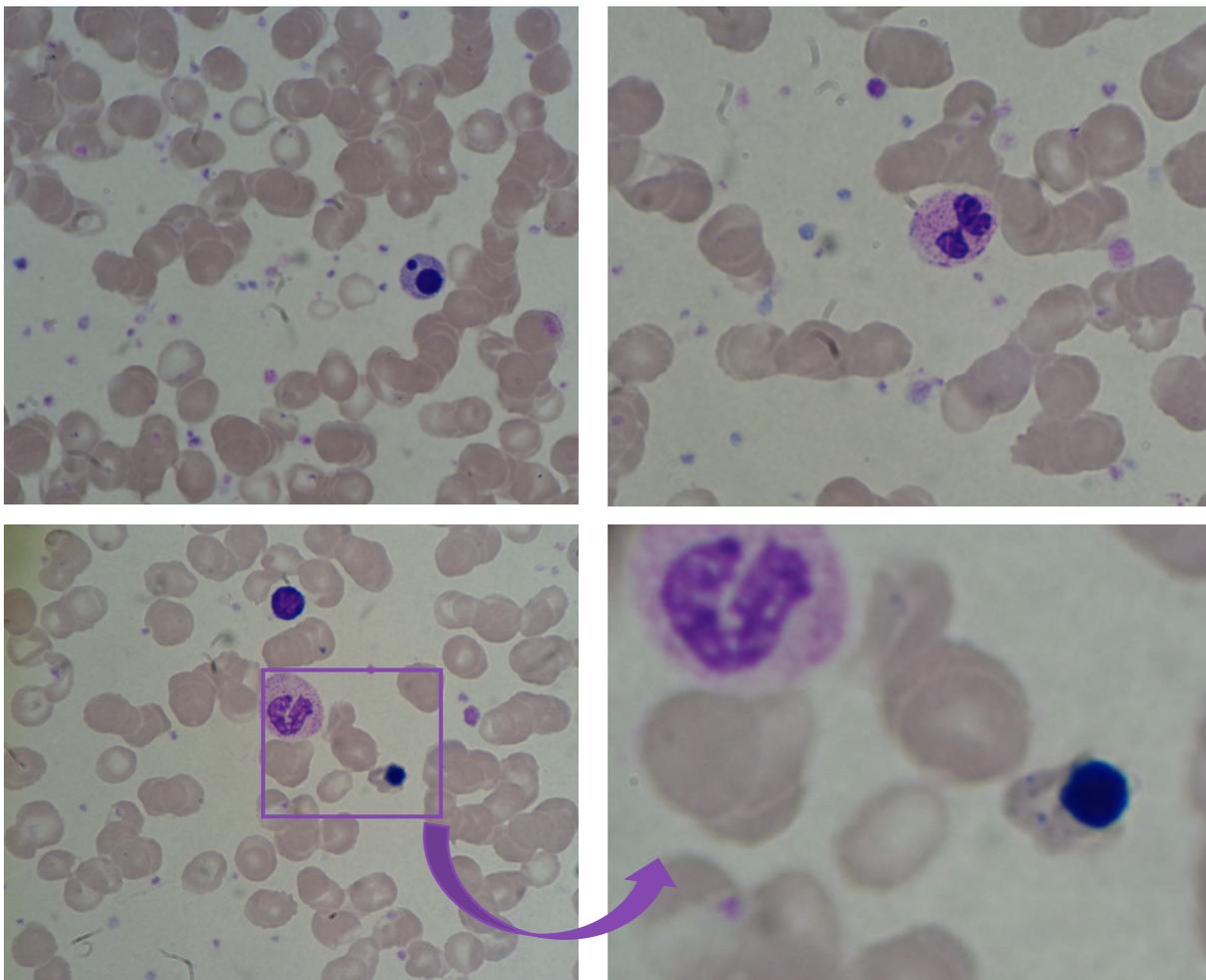


Figura 22 - ESP utente V. Fotografias tiradas no LACFFUC (obj. 100x).

A utente encontra-se com anemia pois a concentração de hemoglobina está diminuída. É uma anemia normocítica normocrómica porque o VCM, HCM e CHCM estão dentro dos valores de referência. As constantes eritrocitárias não alteradas indicam que não se trata de uma deficiência nutricional. O RDW está muito aumentado o que indica grande anisocitose. As plaquetas estão aumentadas o que indica trombocitose. Foi realizado um ESP (Figura 22).

No ESP podemos ver um elevado número de plaquetas (trombocitose) e algumas delas macrocíticas. Para além disso vemos células em alvo, eritroblastos com pontuado basófilo, células em apoptose e neutrófilos com granulações tóxicas. As granulações tóxicas ocorrem quando há *stress* químico, metabólico ou bacteriano (20). Neste caso a toxicidade deve-se ao álcool. Para além disso, a ação tóxica do álcool sobre a medula está a causar uma eritropoiese ineficaz. A trombocitose pode ser devida a um processo inflamatório.

Caso clínico 6

Doente sexo masculino, 57 anos, da Unidade de Alcoolismo. Uma amostra de sangue foi enviada para o LACFFUC para realizar um hemograma de rotina (Tabela 18).

Tabela 18 - Hemograma utente VI.

Hemograma	
RBC	3,72 x 10 ¹² /L
HGB	12,9 g/L
HCT	0,386 L/L
VCM	103,7 fl
HCM	34,7 pg
CHCM	335 g/L
RDW	13,5 %
WBC	7,7 x 10 ⁹ /L
PLT	66 x 10 ⁹ /L

O hemograma indica que o utente está com anemia macrocítica pois a concentração de hemoglobina esta diminuída e o VCM está aumentado. As plaquetas estão muito abaixo do valor de referência, o que indica trombocitopenia. Foi realizado um ESP (Figura 23).

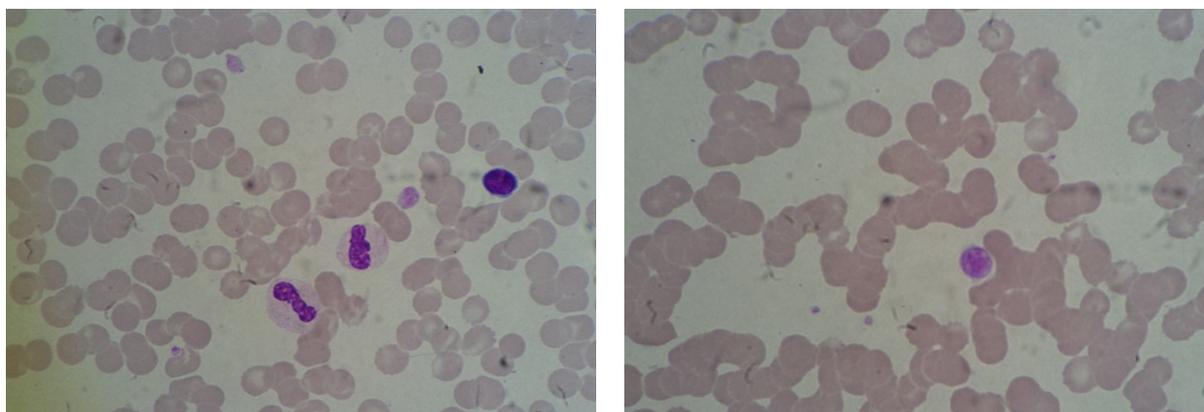


Figura 23 - ESP utente VI. Fotografias tiradas no LACFFUC (obj. 100x).

A presença de macrócitos com ausência de neutrófilos macrocíticos e hipersegmentados indica tratar-se de uma anemia macrocítica não-megaloblástica, cuja causa é o álcool. A reduzida quantidade de plaquetas confirma a trombocitopenia indicada no hemograma. Das poucas plaquetas existentes a maioria são gigantes, algumas com tamanho semelhante a um linfócito. A trombocitopenia acompanhada de macrocitose plaquetar é também bastante comum nos alcoólicos.

5.6. Hemostase

A hemostase é o conjunto de processos com a finalidade de parar uma hemorragia, de forma a manter a homeostase. A resposta hemostática é conseguida devido à interação entre três componentes fundamentais: as células endoteliais, as plaquetas e as proteínas do plasma (fatores da coagulação, inibidores da coagulação e sistema fibrinolítico) (Figura 24).

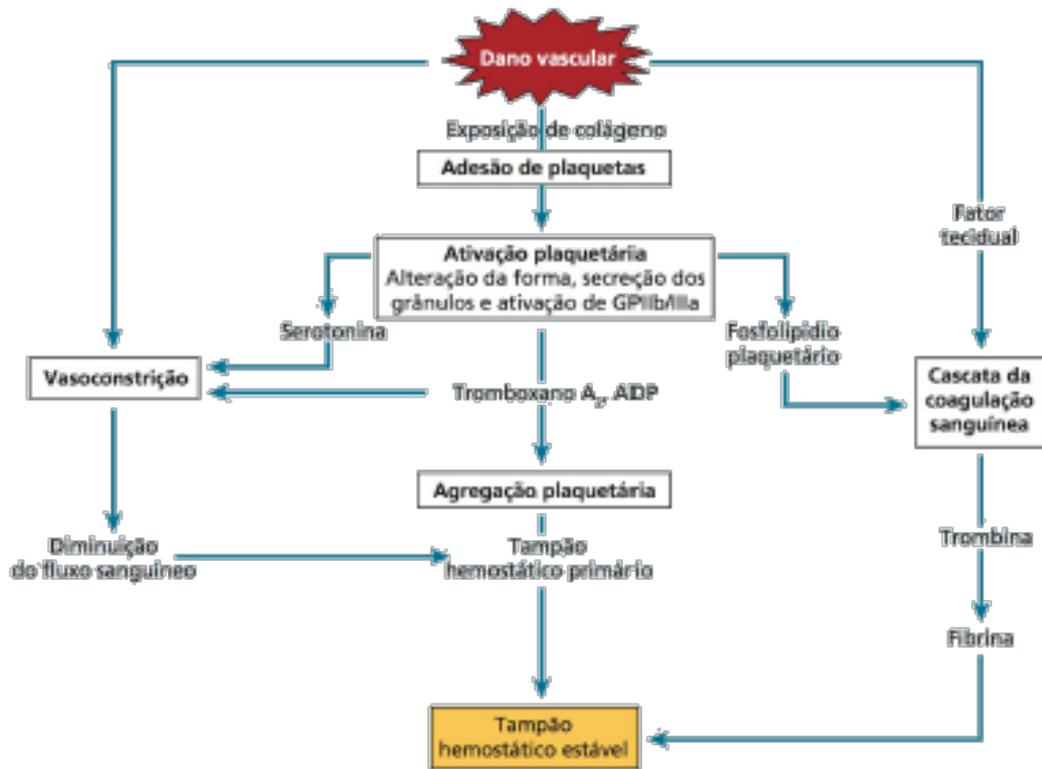


Figura 24 - Visão geral da hemostase (8).

A hemostase primária consiste na vasoconstrição e formação do rolhão plaquetário devido à adesão e agregação das plaquetas. Em seguida é desencadeada a cascata da coagulação que depende de uma série de fatores de coagulação (Tabela 19) que se encontram no plasma na forma inativa. Muitos dos fatores da coagulação são sintetizados no fígado e a sua formação depende de vitamina K. Distúrbios hepáticos e alterações nutricionais ou na absorção podem levar a um desequilíbrio na coagulação (2).

Tabela 19 - Fatores da coagulação (8) (9).

Fator	Nome	Forma ativa	Local de produção
I	Fibrinogênio	Subunidade de fibrina	Fígado
II	Protrombina	Serina-protease	Fígado Depende de vit. K
III	Fator tecidual	Receptor/co-fator	Tecidos
IV	Iões de cálcio	Cálcio ionizado	
V	Fator lábil (pró-acelerina)	Co-fator	Fígado
VII	Proconvertina	Serina-protease	Fígado Dependente de vit. K
VIII	Fator anti-hemolítico	Co-fator	Megacariócitos e células endoteliais
IX	Fator Christmas	Serina-protease	Fígado Dependente de vit. K
X	Fator Stuart	Serina-protease	Fígado Dependente de vit. K
XI	Antecedente tromboplastínico do plasma	Serina-protease	Fígado
XII	Fator Hageman	Serina-protease	
XIII	Fator estabilizante da fibrina	Transglutaminase	Plasma e plaquetas

A cascata da coagulação pode iniciar-se por duas vias diferentes: a via intrínseca ou de contato e a via extrínseca ou do fator tecidual. A via intrínseca é desencadeada quando o fator XII entra em contato com o colagênio do vaso lesado. A via extrínseca inicia-se quando o fator tecidual é libertado pelo vaso danificado. Qualquer uma destas vias culmina na via comum, que resulta na formação de um coágulo de fibrina. Na figura 25 encontra-se um diagrama simplificado da cascata da coagulação.

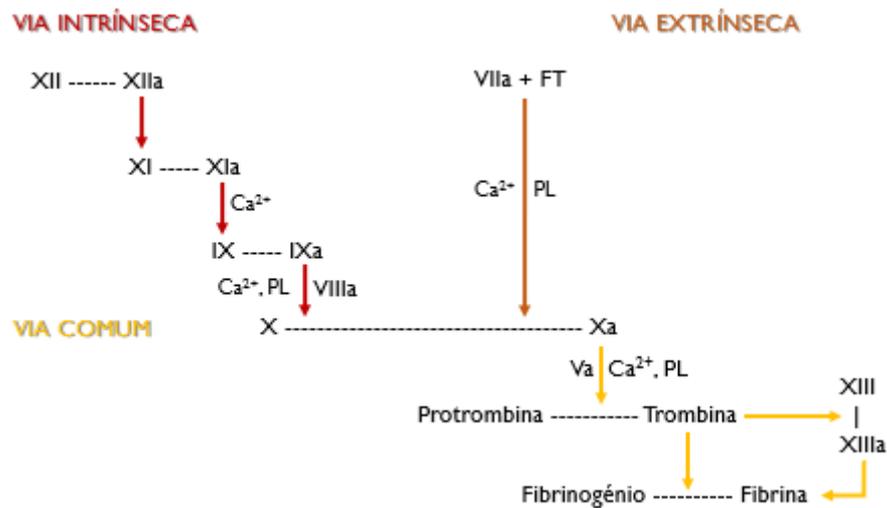


Figura 25 - Cascata da coagulação. FT – fator tecidual; PL – fosfolípidos.

Adaptado de (2) (8).

Após controlada a hemorragia é posto em ação um sistema de dissolução do coágulo e inibição da coagulação, a fibrinólise, de forma a restabelecer a normal circulação naquele vaso. A deficiência em algum dos fatores da coagulação ou do sistema anticoagulante provoca um desequilíbrio na coagulação que pode levar a hemorragia contínua ou formação de trombos, respetivamente (8).

5.7. Determinações analíticas da Coagulação

As determinações relacionadas com a coagulação que são realizadas no LACFFUC são o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), recorrendo ao Option 4 plus da bioMérieux. Este aparelho deteta diferenças de densidade ótica e contabiliza o tempo entre estas diferenças, ou seja, o tempo que demora a formar o coágulo de fibrina após o desencadeamento da cascata da coagulação. A amostra utilizada para as determinações relacionadas com a coagulação é o plasma obtido de sangue total colhido em citrato trissódico, na proporção de nove partes de sangue para uma parte de citrato.

5.7.1. Tempo de protrombina

O tempo de protrombina (TP) é realizado adicionando tromboplastina contendo facto tecidular e cálcio à amostra de plasma. O TP varia entre 10 a 14 segundos. Avalia a via extrínseca da coagulação e encontra-se prolongado na deficiência dos fatores V, VII, X, protrombina e fibrinogénio. É usado para monitorizar a terapêutica com anticoagulante orais derivados cumarínicos (ex. varfarina) e como prova da função hepática.

O TP varia com a tromboplastina e com o aparelho utilizado na determinação. De forma a uniformizar os resultados entre diferentes laboratórios, o TP é convertido no INR (*International Normalized Ratio*) através da correção com o ISI da tromboplastina utilizada na determinação. O ISI (*International Sensitivity Index*) normaliza a tromboplastina utilizada em relação a uma tromboplastina de referência estabelecida pela OMS (21), tornando assim reprodutível a determinação do tempo de protrombina em qualquer laboratório, o que permite ao doente controlar a terapêutica anticoagulante oral em qualquer parte do mundo.

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{TP utente}}{\text{TP lab 100\%}} \right)^{\text{ISI}}$$

Num individuo saudável, o INR situa-se entre 0,9 e 1,2. Num individuo doente que faz terapêutica anticoagulante o INR deverá situar-se entre 2 e 3.

5.7.2. Tempo de tromboplastina parcial ativada

O tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) é realizado após a incubação da amostra de plasma com a tromboplastina parcial (ativador de superfície e fosfolípidos), seguido da adição de cálcio que vai desencadear a cascata da coagulação. Num indivíduo normal, o TTPa encontra-se entre os 27 e 40 segundos. O TTPa avalia a via intrínseca da cascata da coagulação e é utilizado para detetar a deficiência dos fatores da via de contacto (fator IX, VIII, X, V, protrombina e fibrinogénio) e monitorizar a terapêutica com heparina.

5.8. Outras determinações analíticas

5.8.1. Tipagem sanguínea ABO/Rh

Os eritrócitos possuem muitos antígenos diferentes na sua superfície, sendo os mais importantes os do sistema ABO e sistema Rh (antígeno D). A determinação do grupo sanguíneo com base nestes sistemas é de extrema importância nas transfusões sanguíneas, de forma a evitar uma reação transfusional. No banco de sangue é determinado o sistema ABO e o sistema CDE, entre outros.

Consoante o grupo sanguíneo de um indivíduo, este produz diferentes anticorpos (Figura 26).

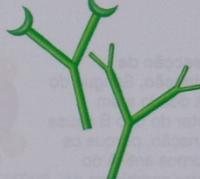
	Antígeno A	Antígeno B	Antígenos A e B	Sem antígenos A ou B
Glóbulos vermelhos				
Plasma	Anticorpo anti-B	Anticorpo anti-A	Sem anticorpos anti-A ou anti-B	Anticorpos anti-A e anti-B
				
	Tipo A Glóbulos vermelhos com antígenos de superfície do tipo A e plasma com anticorpos do tipo anti-B.	Tipo B Glóbulos vermelhos com antígenos de superfície do tipo B e plasma com anticorpos do tipo anti-A.	Tipo AB Glóbulos vermelhos com antígenos de superfície dos tipos A e B e plasma sem anticorpos dos tipos anti-A ou anti-B.	Tipo O Glóbulos vermelhos sem antígenos de superfície do tipo A ou tipo B e plasma com anticorpos dos tipos anti-A e anti-B.

Figura 26 - Sistema ABO (2).

Os antígenos A e B consistem em cadeias de açúcares ligadas a lípidos ou proteínas que fazem parte integral da membrana celular do GV (22). No organismo existem anticorpos naturais anti-A e anti-B do tipo IgM que são produzidos através do contacto com antígenos dos alimentos que são semelhantes aos antígenos dos eritrócitos.

O sistema Rh refere-se a outro grupo de antígenos de superfície em que o mais importante é o antígeno D. Os anticorpos anti-D são tipo IgG e só são produzidos pelo contacto real com o antígeno. A incompatibilidade Rh é de extrema importância na gravidez, quando a mãe é Rh- e o feto é Rh+, podendo provocar a doença hemolítica do recém-nascido (2).

A determinação do grupo sanguíneo é baseada na reação antígeno-anticorpo, através de testes de hemaglutinação. Nos testes de aglutinação o antígeno encontra-se à superfície de uma partícula. O grupo ABO é definido pela presença dos antígenos A e/ou B à superfície dos eritrócitos e presença ou ausência de anticorpos anti-A e/ou anti-B no soro. O grupo Rh é definido pela presença do antígeno D à superfície dos eritrócitos.

Os grupos sanguíneos são determinados pela prova globular e posterior confirmação por prova sérica. Na prova globular os antígenos A, B e D são identificados após reação com reagente anti-A, anti-B, anti-AB e anti-D. Na prova sérica é pesquisada a presença de anti-A, anti-B no soro através da mistura do soro do indivíduo com eritrócitos do grupo A e do grupo B.

No LACFFUC, a tipagem sanguínea ABO/Rh é feita através da prova globular em placa. Numa placa, é adicionada uma gota da amostra de sangue total colhido em EDTA a cada um dos anti-soros (anti-A, anti-B, anti-AB e anti-D).

5.8.2. Velocidade de Sedimentação Globular

A velocidade de sedimentação globular (VSG) consiste na determinação da velocidade de sedimentação dos eritrócitos quando a amostra de sangue é colocada em repouso durante um período de tempo determinado num tubo de vidro vertical com diâmetro e comprimento definido (método de Westergren) (23).

A VSG depende principalmente da formação de eritrócitos em rouleaux, concentração plasmática de moléculas proteicas grandes, viscosidade do plasma e hematócrito. Encontra-se aumentada em processos inflamatórios onde há um aumento da concentração de proteínas de fase aguda (fibrinogênio), como nas doenças inflamatórias sistêmicas, neoplasias e gravidez. É um parâmetro importante nos processos inflamatórios crônicos (artrite reumatóide). Devido à inespecificidade da determinação, esta não deve ser interpretada isoladamente. Alterações da VSG podem ser utilizadas para monitorizar a resposta ao tratamento (24).

No LACFFUC a VSG é realizada, após homogeneização de uma amostra de sangue total colhida com citrato trissódico na proporção de uma parte de citrato para quatro partes de sangue, no aparelho Sedy 12 que faz a leitura por infravermelhos ao fim de 20 minutos. O valor de referência para a VSG é < 10 mm/hora para os homens e < 20 mm/hora para as mulheres.

6. Conclusão

A realização deste estágio proporcionou-me a visão geral de um laboratório de análises clínicas e da sua aplicabilidade na clínica, o que confirmou para mim a importância das análises clínicas como ferramenta de diagnóstico mas também como controlo e monitorização da terapêutica.

Além da aplicação útil e integrada dos conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado, o contato com a realidade do laboratório permitiu-me aprimorar habilidades práticas na execução das técnicas laboratoriais. Assim, interligação entre conhecimento teórico e os resultados práticos tornou-se uma parte fundamental do estágio uma vez que permitiu analisar e interpretar resultados clínicos, obtendo respostas para os casos que surgiam no dia-a-dia.

O facto de o estágio ter sido realizado num ambiente de ensino e com uma equipa experiente, com grande formação e sempre pronta a ajudar transformou este estágio numa etapa enriquecedora tanto a nível académico e profissional como pessoal.

Apesar de estar ainda a iniciar o meu caminho, sei que é pelas análises clínicas que quero continuar.

7. Referências Bibliográficas

1. Hoffbrand A V., Moss PAH. Hematopoese. Fundamentos em Hematologia. 6ª Edição. Artmed; 2013. p. 1–14.
2. Seeley R, Stephens T, Tate P. Aparelho Circulatório: Sangue. Anatomia e Fisiologia. 8ª Edição. Lusociência; 2008. p. 667–95.
3. Turgeon ML. Erythrocyte Maturation, Physiology and Lifecycle. Clinical Hematology: Theory and Procedures. 5th Edition ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2012. p. 89–125.
4. Hoffbrand A V., Moss PAH. Eritropoese e aspectos gerais da anemia. Fundamentos em Hematologia. 6ª Edição. Artmed; 2013. p. 15–32.
5. Higgins T, Beutler E, Doumas BT. Hemoglobin, Iron and Bilirubin. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6th Editio. Saunders Elsevier; 2008. p. 509–26.
6. Hoffbrand A V., Moss PAH. Leucócitos 1: granulócitos, monócitos e seus distúrbios benignos. Fundamentos em Hematologia. 6ª Edição. Artmed; 2013. p. 108–25.
7. Hoffbrand A V., Moss PAH. Leucócitos 2: Linfócitos e seus distúrbios benignos. Fundamentos em Hematologia. 6ª Edição. Artmed; 2013. p. 126–41.
8. Hoffbrand A V., Moss PAH. Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia. Fundamentos em Hematologia. 6ª Edição. Artmed; 2013.
9. Turgeon ML. Erythrocyte Morphology and Inclusions. Clinical Hematology: Theory and Procedures. 5th Edition ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2012. p. 126–44.
10. Bain BJ, Bates I, Laffan MA, Lewis SM. Blood cell morphology in health and disease. Dacie and Lewis: Practical Haematology. 11th Ed. Elsevier Ltd; 2011. p. 69–100.
11. Thelml H, Diem H, Haferlach T. i Thelml, Color Atlas of Hematology. 2nd Editio. 2004. 208 p.
12. Who, Chan M. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Geneva, Switz World Heal Organ [Internet]. 2011;1–6. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Haemoglobin+concentrations+for+the+diagnosis+of+anaemia+and+assessment+of+severity#l>
13. Fonseca C, Nunes AR, Marques F, Cortez J, Brilhante D. Estudo epidemiológico para determinação da prevalência da anemia e do déficit de ferro na população portuguesa - Estudo EMPIRE. 20º Congresso Nacional de Medicina Interna [Internet]. 2014. Available from: http://www.spmi.pt/20congresso/resumos_aceites_consulta.php?id=CO-13-05
14. WHO WHO. Micronutrient deficiencies [Internet]. 2015 [cited 2015 Jul 23]. Available from: <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/>
15. Hoffbrand A V., Moss PAH. Anemias hipocrômicas. Fundamentos em Hematologia. 6ª Edição. Artmed; 2013. p. 33–49.

16. Hoffbrand A V., Moss PAH. Distúrbios genéticos da hemoglobina. Fundamentos em Hematologia. 6ª Edição. Artmed; 2013. p. 89–107.
17. Hoffbrand A V., Moss PAH. Anemias megaloblásticas e outras anemias macrocíticas. Fundamentos em Hematologia. 6ª Edição. Artmed; 2013. p. 58–72.
18. Turgeon ML. Disorders of Hemostasis and Thrombosis. Clinical Hematology: Theory and Procedures. 5th Edition ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2012. p. 431–64.
19. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MDG. Pseudotrombocitopenia. J Bras Patol Med Lab. 2004;40(5):321–4.
20. Thieml H, Diem H, Haferlach T. Normal cells of the Blood and Hematopoietic organs. Color Atlas of Hematology. 2nd Edition ed. Thieme; 2004. p. 29–60.
21. Bates SM, Weitz JI. Coagulation assays. Circulation. 2005;112(4):e53–60.
22. Hoffbrand A V., Moss PAH. Transfusão de sangue. Fundamentos em Hematologia. 6ª Edição. Artmed; 2013. p. 397–412.
23. Bain BJ, Bates I, Laffan MA, Lewis SM. Supplementary techniques including blood parasite diagnosis. Dacie and Lewis: Practical Haematology. 11th Ed. Elsevier Ltd; 2011. p. 101–21.
24. Hoffbrand A V., Moss PAH. Alterações hematológicas em doenças sistêmicas. Fundamentos em Hematologia. 6ª Ed. ed. Artmed; 2013. p. 381–96.
25. Stanley DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. JAMA: The Journal of the American Medical Association. 1999. 283-283 p.
26. Oliveira RAG. Hemograma - como fazer e interpretar. LMP Editora;
27. Bain BJ, Bates I, Laffan MA, Lewis SM. Basic haematological techniques. Dacie and Lewis: Practical Haematology. 11th Ed. Elsevier Ltd; 2011. p. 23–56.

Anexo

ANEXO I – Princípio de funcionamento do auto-analisador Coulter MAX'X

O auto-analisador Coulter MAX'X possui dois compartimentos distintos: num compartimento faz a contagem dos eritrócitos e plaquetas e no outro a contagem de leucócitos e concentração de hemoglobina. Os reagentes necessários para o funcionamento do aparelho são os listados na tabela 20.

Tabela 20 - Reagentes do Coulter MAX'X.

Reagente	Função
Diluyente	Dilui a amostra de sangue total para análise e limpa o sistema entre amostras
Reagente lítico CBC	Lisa os glóbulos vermelhos para a contagem dos glóbulos brancos e converte a hemoglobina a cianometahemoglobina
Erithrolyse II (Diff lytic reagente)	Lisa os glóbulos vermelhos enquanto preserva os glóbulos brancos no seu estado nativo para a análise das subpopulações
StabiLyse (Diff leukocyte preservative)	Preserva os glóbulos brancos no seu estado nativo para a análise das subpopulações
Agente de limpeza	Limpa e lava todo o sistema

A contagem de células do sangue é realizada através do Princípio de Coulter e a contagem diferencial dos leucócitos através da tecnologia VCS.

I. Contagem células do sangue (CBC)

A contagem de células do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) é realizada através do Princípio de Coulter. Este princípio baseia-se na impedância elétrica devido à incapacidade das células conduzirem a corrente elétrica. Quando uma célula, em suspensão numa solução de eletrólito (diluyente), passa numa abertura entre 2 eletrodos há um aumento da resistência, o que produz um pico na diferencial de potencial entre os 2 eletrodos (Figura 27). Quanto maior o tamanho da célula, maior vai ser o pulso elétrico (25).

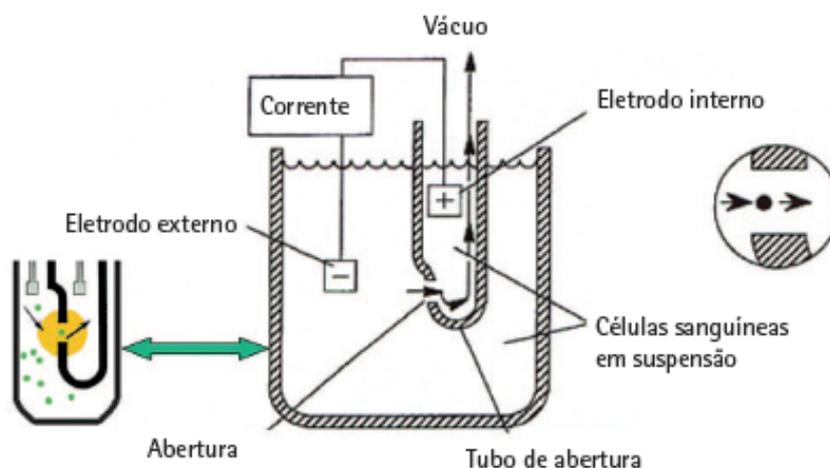


Figura 27 - Princípio de Coulter. Adaptado de (26).

2. Concentração de hemoglobina

A concentração da hemoglobina é determinada na câmara de contagem dos leucócitos pelo método da cianometahemoglobina. Os eritrócitos são lisados e a hemoglobina é libertada. O átomo de ferro é oxidado pelo ferricianeto de potássio e a hemoglobina liga-se ao cianeto de potássio formando a cianometahemoglobina, um pigmento estável que é medido por espectroscopia a 540 nm (27).

3. Contagem diferencial de leucócitos (*WBC differential*)

A contagem diferencial dos leucócitos é feita pela tecnologia VCS (*Volume, Conductivity, Scatter*), que permite fazer a contagem diferencial dos leucócitos nas diferentes populações: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. A amostra de sangue é tratada com o reagente *Erithrolyse II* e *StabiLyse*, o que provoca a lise dos eritrócitos, remoção parcial do citoplasma dos leucócitos e manutenção do seu núcleo no estado nativo. Uma diluição da amostra de sangue após tratamento é transportada numa corrente de fluido (*sheath fluid stream*) até à zona do sensor (Figura 28).

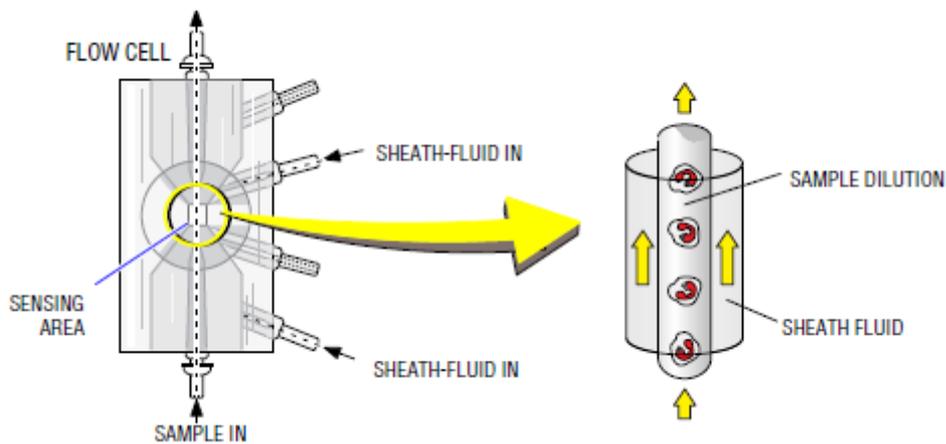


Figura 28 - Fluxo hidrodinâmico de células. Adaptado de: Coulter MAX^M Hematology Analyzer service manual.

Quando a célula passa no sensor três parâmetros são medidos: o volume, a condutividade e a luz dispersa (scatter). O volume celular é medido pela impedância (princípio de Coulter) (Figura 29a). A condutividade, que depende do conteúdo celular, é medida através da aplicação de uma corrente de alta frequência entre os eletrodos (Figura 29b). A luz scatter (scatter light) é medida quando a célula passa por um laser e reflete a luz incidente. Esta luz scatter é detetada por um sensor colocado entre 10° a 70° graus do laser (Figura 29c). Varia com a granularidade celular, número de lóbulos no núcleo e estrutura da superfície celular (27).

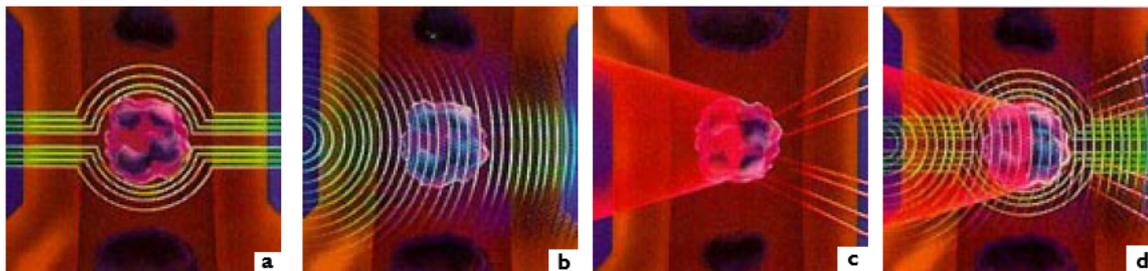


Figura 29 - Tecnologia VCS: a) Volume; b) Condutividade; c) Scatter e d) Tecnologia VCS associando os três parâmetros. Adaptado de (26).

O sistema integra e corrige os três parâmetros, dividindo os leucócitos em cinco populações diferentes.

Após a contagem de células sanguíneas e determinação da concentração de hemoglobina outros parâmetros são estimados por cálculo. O aparelho produz um boletim de resultados onde inclui também um histograma dos eritrócitos e plaquetas e as alterações por ele detetadas.

