



Bernardino João Rebelo Rocha

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Mário João Roque e pela Professora Doutora Armanda Castro Santos, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Bernardino João Rebelo Rocha

Relatório de Estágio

Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de estágio curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Mário João Roque e pela Professora Doutora Armanda Castro Santos, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

Cumpre-me manifestar uma palavra de apreço a toda a equipa integrante do Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, pela hospitalidade que sempre me ofereceram, pela paciência e conhecimentos partilhados que, acredito, me motivam na progressão e construção enquanto pessoa e profissional.

À Professora Doutora Leonor Almeida, coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas, pela preocupação constante no fornecimento da melhor formação possível aos seus discentes.

Ao Dr. Mário João Roque e à Professora Doutora Armanda Castro Santos pela disponibilidade e pela partilha de sabedoria com que me capacitaram.

Aos meus amigos e familiares pelo apoio e motivação.

A todos obrigado.

Índice

ABREVIATURAS	I
Resumo	v
Abstract	v
INTRODUÇÃO	I
BIOQUÍMICA.....	3
A. Avaliação de função hepática	3
A.1. Função metabólica	4
A.1.1. Bilirrubina	4
A.1.1.1. Causas da elevação dos níveis séricos de bilirrubina não conjugada	4
A.1.1.2. Causas da elevação de bilirrubina conjugada no soro	6
A.1.2. Testes laboratoriais na determinação de bilirrubina	7
A.2. Função de síntese.....	7
A.2.1. Albumina.....	8
A.3. Testes de lesão do hepatócito.....	8
A.3.1. Aminotransferases.....	8
A.4. Avaliação de patologia canalicular	9
A.4.1. Fosfatase alcalina.....	9
A.4.2. γ -Glutamil Transferase	10
B. Avaliação da função renal.....	11
B.1. Conceito de <i>clearance</i>	11
B.1.1. Creatinina	11
B.2. Ureia.....	12
B.3. Microalbumina.....	13
C. Lípidos e dislipidoproteinemia.....	13
C.1. Quilomicron.....	15
C.2. VLDL	15
C.3. LDL	15
C.4. HDL.....	16

C.5. Lipoproteína (a)	16
D. Marcadores de lesão cardíaca.....	17
D.1. Troponina cardíaca.....	17
D.2. Creatina cinase	18
D.3. Lactato desidrogenase.....	19
Risco cardíaco.....	19
E. Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo	20
E.1. Cálcio.....	21
E.2. Fósforo	22
E.3. Magnésio.....	23
F. Equilíbrio hidro-eletrolítico	24
F.1. Sódio.....	25
F.2. Potássio.....	26
F.3. Cloreto	27
G. Avaliação da Função pancreática	27
G.1. Amilase	29
G.2. Lipase	29
H. Glicemia e Diabetes	31
H.1. Classificação.....	32
H.1.1. Diabetes <i>Mellitus</i> tipo I	32
H.1.2. Diabetes <i>Mellitus</i> tipo II.....	32
H.1.3. Outros tipos específicos de diabetes	33
H.1.4. Diabetes <i>Mellitus</i> gestacional	33
H.2. Diagnóstico.....	33
H.3. Hemoglobina glicada.....	33
HEMATOLOGIA.....	35
Hemograma	35
A. Hematopoiese.....	36
A.1. Tecidos hematopoiéticos no adulto.....	38
A.1.1. Medula óssea	38

A.2. Eritropoiese.....	40
A.3. Leucopoiese	41
A.4. Megacariopoiese.....	42
B. Anemia	43
B.1. Mecanismos de anemia	44
C. Hemóstase e trombose	48
C.1. Cascata de coagulação.....	49
C.2. Fibrinólise	51
C.3. Testes da fase de coagulação	52
C.3.1. Tempo de tromboplastina parcial ativada.....	52
C.3.2. Tempo de protrombina	53
C.3.3. Fibrinogénio	54
D. Velocidade de sedimentação	54
E. Leucemias agudas	55
E.1. Leucemia mieloide aguda.....	57
E.1.1. Leucemia mieloide aguda, minimamente diferenciada (FAB – M0).....	58
E.1.2. Leucemia mieloide aguda sem maturação (FAB – M1).....	58
E.1.3. Leucemia promielocítica aguda	59
E.1.4. Leucemia mielomonocítica aguda (FAB – M4).....	59
E.2. Leucemias linfoblásticas agudas	60
F. Síndromes mielodisplásicos.....	60
G. Neoplasmas mieloproliferativos.....	62
G.1. Leucemia mieloide crónica.....	63
G.2. Policitémia vera.....	64
G.3. Trombocitémia essencial	65
G.4. Mielofibrose primária.....	66
H. CONCLUSÃO.....	66
I. BIBLIOGRAFIA	68
J. ANEXOS.....	74

Abreviaturas

a.a. - Ácidos aminados

ABC - *ATP-binding cassette*

AGM - *Aorta-Gonad Mesonephros*

ALL - Leucemia linfoblástica aguda

ALP - Fosfatase alcalina

ALT - Alanina aminotransferase

AML - Leucemia mieloide aguda

Apo C - Apoproteína c

Apo E - Apoproteína e

ApoB-100 - Apoproteína b-100

aPTT - Tempo de tromboplastina parcial activada

AST - Aspartato aminotransferase

ATIII - Antitrombina III

ATP - Adenosina trifosfato

BFU-E - *Burst-forming unit-erythroid*

cAMP - Adenosina monofostato cíclica

CCK - Colecistocinina

CD34+ - *Cluster of differentiation 34⁺*

CD38 - *Cluster of differentiation 38*

CFU-GEMM - *Colony-forming unit-granulocyte, erythrocyte, monocyte, and megakaryocyte*

CFU-S - *Colony-forming units-spleen*

CK - Creatina cinase

CK-MB - Creatina cinase 2

CRP - Proteina c-reactiva

cTnI - Troponina I cardíaca

cTnT - Troponina T cardíaca

DM - *Diabetes Mellitus*

DMG - Diabetes *Mellitus* gestacional

ECF - Fluido extracelular

EPO - Eritropoietina

ESP - Esfregaço de sangue periférico

FAB - French, American, British

Fc - Fragmento cristalizável

FGF-23 - *Fibroblast growth factor 23*

FLT3 - *Fms-like tyrosine kinase 3*

G6PD - Glucose-6-fosfato desidrogenase

GATA2 - *GATA binding protein 2*

G-CSF - *Granulocyte colony-stimulating factor*

γ-GT - Gama glutamil transferase

GH - Hormona de crescimento

GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GPIIb/IIIa - Glicoproteína IIb/IIIa

Hb - Hemoglobina

Hb F - Hemoglobina Fetal

HbA1c - Hemoglobina A1c

Hct - Hematócrito

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HLA-DR - *Human Leukocyte Antigen - antigen d related*

HMWK - Cininogénio de alto peso molecular

HSC - Células estaminais hematopoiéticas

hsCRP - Proteína c-reactiva de alta sensibilidade

I.R. - Intervalo de Referência

ICF - Fluido intracelular

IDL - Lipoproteína de densidade intermédia

IL-1 - Interleucina-1

IL-3 - Interleucina-3

IL-5 - Interleucina-5

INR - Razão normalizada internacional

LACCSMC - Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra

LDH - Lactato desidrogenase

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

Lp[a] - Lipoproteína a

LPS - Lipase pancreática

MALT - Tecido linfoide associado a mucosas

MAPSS - *Multiangle polarized scatter separation*

M-CSF - Macrophage colony-stimulating factor

MCV - Volume corpuscular médio

MO - Medula óssea

NADH - Nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

OMS - Organização Mundial de Saúde

P-AMY - Amilase plasmática

PKA - Proteína cinase A

PT - Tempo de protrombina

PTGO - Prova de tolerância à glicose oral

QM - Quilomicrons

RDW - *Red Cell Distribution Width*

REL - Reticulo endoplasmático liso

RIQAS - *Randox International Quality Assessment Scheme*

ROS - Espécies reativas de oxigénio

S-AMY - Amilase salivar

SHU - Síndrome hemolítico urémico

SP - Sangue periférico

SPINKI - *Serine protease inhibitor Kazal type I*

SR-BI - *Scavenger receptor class B member I*

TF - Fator tecidual

TFG - Taxa de filtração glomerular

TFPI - Inibidor da via do fator tecidual

TnI - Troponina I

TnT - Troponina T

t-PA - Plasminogénio tecidual

TPO - Trombopoietina

TxA₂ - Tromboxano A₂

VIH - Vírus da imunodeficiência humana

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

VS - Velocidade de sedimentação

Resumo

O Mestrado em Análises Clínicas da FFUC integra um estágio curricular em ambiente laboratorial, de forma a permitir aos discentes um contacto próximo com a realidade encontrada na rotina laboratorial. Possibilitando desta forma aplicar o conhecimento teórico obtido, através da manipulação de equipamentos automatizados, implementação de técnicas manuais, e manuseamento de amostras biológicas, tendo em conta a garantia de qualidade nos procedimentos.

O presente relatório tem como objetivo final uma breve descrição das atividades desenvolvidas, ao longo do estágio realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra. Será atribuído particular ênfase às valências Bioquímica e Hematologia, referindo os fundamentos analíticos nos parâmetros abordados e a sua importância fisiopatológica.

Abstract

The Master's degree in Clinical Analysis of FFUC includes an internship in a laboratory environment, in order to allow students a close contact with the reality found in the laboratory routine. Thereby enables to implement the theoretical knowledge obtained, by handling automated equipment, implementation of manual techniques, and handling of biological samples, in view of quality assurance procedures.

This report has as its ultimate goal to give a brief description of the activities throughout the internship at the Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra. It will be given particular emphasis to the Biochemistry and Haematology sectors, referring to the analytical foundations of the addressed parameters and their pathophysiological importance.

Introdução

Na derradeira etapa de formação do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, inclui-se o estágio curricular de índole profissionalizante num laboratório de análises clínicas. Estágio esse realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra com a duração de 600 horas. Este estágio permitiu utilizar o conhecimento de forma integrada, obtido na componente curricular do Mestrado, e aplicá-lo à realidade profissional e ao contexto laboratorial encontrado num Laboratório de Análises Clínicas.

O LACCSMC dispõe das valências tipicamente encontradas num laboratório de análises clínicas: bioquímica, imunologia/endocrinologia, hematologia e microbiologia. Presta apoio aos representantes das forças armadas ou aos seus familiares diretos em análises clínicas de rotina, retendo ainda uma componente de despiste toxicológico quando assim é necessário. Sob a direção técnica do Tenente-Coronel Farmacêutico Dr. Mário João Roque, o LACCSMC inclui como recursos humanos, técnicos de diagnóstico e terapêutica, administrativos e auxiliares.

O estágio permitiu o contacto direto e a prossecução das atividades desenvolvidas nas valências supracitadas, com uma distribuição temporal equitativa no caso da hematologia e bioquímica/imunologia tendo menor ênfase o sector de microbiologia devido sobretudo ao menor volume e diversidade das amostras biológicas recebidas.

Neste relatório serão desenvolvidas as valências bioquímica e hematologia, tendo selecionado para cada uma delas os parâmetros/análises mais frequentemente solicitados pelas entidades médicas, ou pela sua relevância clínica e académica. Incidindo sobretudo na interdependência das alterações analíticas, e os correspondentes estados patológicos mais vulgarmente associados, referindo sempre que possível os fundamentos fisiopatológicos e a sua importância como ferramenta de diagnóstico.

O LACCSMC tem como objetivo último garantir a qualidade e fiabilidade dos resultados analíticos fornecidos aos seus utentes. Desta forma, encontram-se implementados sistemas de controlo da qualidade, tanto internos como externos. Os controlos internos são efetuados diariamente ou semanalmente dependendo do equipamento ou analito em causa. Os controlos externos encontram-se implementados e são fornecidos pelo RIQAS, e pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, o que permite avaliar a exatidão dos resultados obtidos, sendo as amostras tratadas como qualquer amostra dos utentes.

Bioquímica

A. Avaliação da função hepática

O fígado é o maior e mais complexo órgão do trato gastrointestinal. Globalmente, envolve três sistemas: o sistema bioquímico hepatocístico, que é responsável pela maioria da atividade metabólica no organismo, incluindo a síntese proteica. Este sistema engloba: i) o metabolismo anaeróbico e aeróbico da glicose e outros hidratos de carbono; ii) o catabolismo e anabolismo do glicogénio; iii) metabolismo dos ácidos aminados e ácidos nucleicos; iv) a interconversão de amino ácidos e ácidos dicarboxílicos pela via das transaminases (aminotransferases); v) síntese e metabolismo de lipoproteínas; vi) metabolismo de xenobióticos, envolvendo normalmente o sistema oxidativo do citocromo P450; vii) armazenamento de ferro e vitaminas como a D, e B12; viii) e a síntese de hormonas como o angiotensinogénio, o factor semelhante a insulina I, a triiodotironina, hepcidina, trombopoietina, e a prohormona 25-OH vitamina D. É também o local de remoção de muitas hormonas tais como a insulina, a paratiróide, estrogénios, e cortisol. O fígado é o local exclusivo do ciclo da ureia.^[1,2]

A albumina é sintetizada no fígado bem como todos os fatores de coagulação com a exceção do fator de von Willebrand que é sintetizado nas células endoteliais e nos megacariócitos.

O segundo maior sistema hepático é o hepatobiliar, que se correlaciona com o metabolismo da bilirrubina, um processo que envolve o transporte da bilirrubina para o hepatócito para desta forma ser conjugada com o ácido glucurónico e segregada nos canalículos biliares para o sistema enterohepático. Por último, o sistema reticuloendotelial, que compreende as células de Kupffer. Estas células fagocíticas integram o sistema imunológico e constituem um local de extrema importância na defesa contra bactérias provenientes do intestino, estando ainda envolvidas na remoção de complexos antígeno-anticorpo.

Tendo em conta que a manifestação sintomática da doença hepática só tardiamente se reconhece em relação à progressão da mesma, visto que o fígado compreende uma grande reserva funcional, é de vital importância uma deteção atempada das hepatopatias. Felizmente, a avaliação da função hepática pode ser efetuada através da determinação de analitos no soro, conhecidos como testes da função hepática. Muitos destes analitos não são exclusivos do fígado, mas quando avaliados em conjunto, permitem um diagnóstico correto das patologias do fígado.^[1,2]

A.1. Função metabólica

A.1.1. Bilirrubina

A bilirrubina foi descoberta por Virchow em 1849, na altura designou este pigmento amarelo de “hematoidina”. O termo bilirrubina foi proposto por Stadeler em 1864 e em 1874 Tarchanoff demonstrou a ligação entre os pigmentos biliares e a hemoglobina.^[3] A bilirrubina é o mais relevante metabolito do heme, o anel tetrapirrólico ligante de ferro, que se encontra presente na hemoglobina, mioglobina e citocromos. São produzidos diariamente 250-300 mg de bilirrubina em adultos saudáveis, dos quais cerca de 85% derivam do *turnover* das hemácias senescentes.^[2,3] Nos macrófagos principalmente no baço, a metahemoglobina é clivada para originar cadeias globínicas livres e um grupo heme. O anel de porfirina do heme é oxidado pela heme oxigenase microsomal, produzindo o composto biliverdina e libertando ferro. Nesta reação é libertada uma mole de CO o qual é transportado como carboxihemoglobina, que pode ser avaliada no soro como indicador de anemia hemolítica. A biliverdina é posteriormente reduzida a bilirrubina pela biliverdina redutase, uma enzima dependente de NADPH. A bilirrubina ligada à albumina é transportada principalmente através do sistema portal para o fígado, onde entra nos hepatócitos através da membrana, por difusão passiva ou transporte mediado por recetores.^[2]

Este processo de *uptake* de bilirrubina pelos hepatócitos é altamente eficiente. A *clearance* de bilirrubina não conjugada para valores normais é aproximadamente de 5mg/kg/dia. O tempo de meia vida da bilirrubina não conjugada é curto, 60% da bilirrubina marcada surge nos hepatócitos 5 min após injeção.^[2]

Na sua forma isomérica mais comum (*trans*-), a bilirrubina é altamente insolúvel em água, sendo a maior parte transportada ligada à albumina. A luz pode provocar fotoisomerização da bilirrubina, da forma *trans*- para uma forma mais compacta e hidrofílica *cis*-, tornando-a muito mais hidrossolúvel e possibilitando desta forma a sua excreção na urina. Este processo é a base da fototerapia no tratamento da hiperbilirubinemia neonatal. No hepatócito a bilirrubina transita entre complexos proteicos, inicialmente complexa com as proteínas Y e Z, e posteriormente complexa com a ligandina.

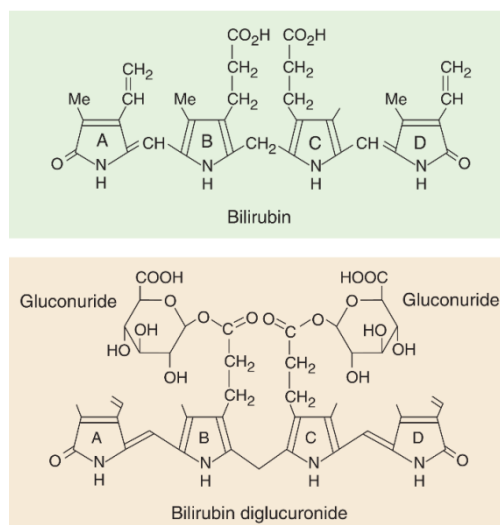


Fig.1. Conformação molecular da bilirrubina não conjugada e conjugada. ^[2]

A partir deste complexo é transportada para o retículo endoplasmático liso (REL), onde é substrato da enzima glucoronil transferase, a qual catalisa a esterificação das cadeias laterais de ácido propiónico com ácido glucurónico (presente como uridina do ácido difosfoglucurónico) para formar conjugados diglucurónidos (Fig.1.). Alguns conjugados monoglucurónidos ou até triglucurónidos também se podem formar.^[2]

A bilirrubina conjugada é posteriormente transportada para os canalículos. Apenas a bilirrubina conjugada consegue atravessar a membrana da face canalicular. Uma vez excretada nos canalículos e finalmente no trato intestinal, a bilirrubina é subsequentemente metabolizada por bactérias intestinais formando compostos coletivamente designados de urobilinogénio e urobilina, que podem por sua vez ser reabsorvidos. A maioria do urobilinogénio reabsorvido é reexcretado pelo fígado, e apenas uma pequena fração é excretada na urina. Por ultimo, o urobilinogénio intestinal é convertido em pigmentos fecais tais como a estercobilina, cuja ausência se manifesta por fezes descoradas, um sinal de alteração do metabolismo da bilirrubina.

Quando a bilirrubina conjugada está presente no soro, pode ligar-se covalentemente à albumina produzindo biliproteína ou Δ -bilirrubina. Embora a bilirrubina conjugada tenha um tempo de meia vida <24h, a Δ -bilirrubina tem um tempo de meia vida semelhante à albumina (~17 dias), provocando icterícia prolongada durante a recuperação de um dano hepatocelular. A bilirrubina conjugada, sendo hidrossolúvel, pode ser filtrada pelo glomérulo e surgir na urina podendo ser detetada por método colorimétrico. A bilirrubina urinária está elevada na maioria dos pacientes com aumento da bilirrubina conjugada no soro. ^[2]

A.1.1.1 Causas da elevação dos níveis séricos de bilirrubina não conjugada.

Hemólise. Nas anemias hemolíticas a bilirrubina indireta surge elevada devido à excessiva libertação de hemoglobina pelas hemácias. Se a formação de bilirrubina exceder a capacidade de *clearance* por parte do fígado, existirá um aumento do nível de bilirrubina no soro. Nos adultos uma prova confirmatória de anemia hemolítica é a verificação da elevação de bilirrubina indireta no soro, normalmente na gama de 1,5-3,0 mg/dL.

Síndromes de Gilbert e Crigler-Najjar. A síndrome de Gilbert é caracterizada por hiperbilirrubinémia moderada. Nesta patologia ocorre uma mutação no promotor do gene *UGT1A1*, resultando numa diminuição da taxa de transcrição do mesmo, e globalmente na redução da atividade da glucoril transferase. Um caso mais sério é a síndrome de Crigler-Najjar, caracterizada por níveis elevados de bilirrubina não conjugada no soro, motivados por mutações múltiplas no gene referido, as quais levam a alteração de conformação da proteína que fica disfuncional. Na sua forma mais severa tipo I (homozigótica), a

hiperbilirubinemia é marcada excedendo 5 mg/dL, podendo em determinadas situações exceder 20 mg/dL, e provocando icterícia. Lactentes afetados desenvolvem hiperbilirubinemia não conjugada severa, que tipicamente leva ao desenvolvimento de kernicterus, pela deposição de bilirubina no cérebro afetando em particular os gânglios basais e o núcleo lenticular provocando disfunção motora e atraso mental severos.^[2]

A.1.2. Causas da elevação de bilirrubina conjugada no soro.

Deficiência na excreção: síndrome de Dubin-Johnson. Nesta síndrome ocorre um bloqueio na excreção de bilirrubina para os canalículos biliares, devido à existência de defeitos no transportador canalicular multiespecífico de aniões orgânicos ABC (ATP-binding cassette), MRP2/cMOAT/ABCC2

(Fig.2). A síndrome de Dubin-Johnson está associada com um aumento dos níveis plasmáticos de bilirrubina conjugada, tipicamente com icterícia moderada (bilirrubina total de 2-5 mg/dL), e com pigmentação escura do fígado devido à acumulação de lipofuscina. A bilirrubina conjugada acumula-se nos hepatócitos e eventualmente reflui para a circulação.^[2,4]

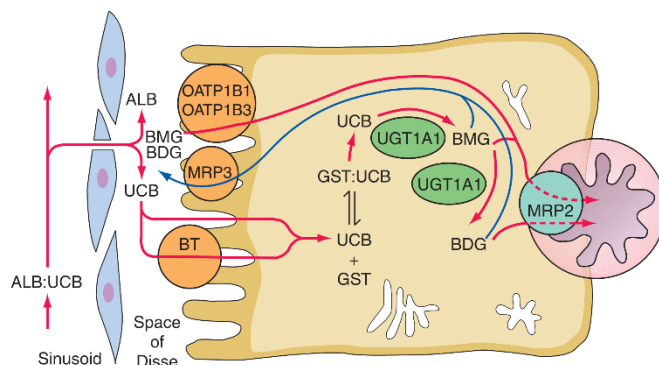


Fig. 2. Transporte hepatocelular da bilirrubina. ALB, albumina; BDG, bilirrubina diglicuronídeo; BMG, bilirrubina monoglicuronídeo; GST, glutathione-S-transferase; MRP, multidrug resistance-associated proteins; UCB, bilirrubina não conjugada; UGT1A1, bilirrubina-UDP-glucuronosiltransferase.^[4]

Obstrução biliar. Nos adultos a coledoclitase é a causa mais prevalente de hiperbilirubinemia. Resulta da presença de cálculos biliares, mais frequentemente no ducto biliar. A obstrução biliar devida a coledoclitase resulta na elevação da bilirrubina total (>90% bilirrubina direta), sendo que concomitantemente em 90% dos pacientes ocorre também elevação da fosfatase alcalina (> 300 UI/L). Na hepatite, resultante da destruição tóxica dos hepatócitos por causas viricas, químicas, traumáticas, necrose focal ou dano celular, ocorre elevação tanto da bilirrubina conjugada como não conjugada. A elevação da bilirrubina conjugada pode ainda ocorrer por outras causas como septicemia, nutrição parenteral, e determinadas drogas, como androgênios.

A.1.3. Testes laboratoriais na determinação de bilirrubina.

A bilirrubina é tipicamente medida utilizando ácido sulfanílico diazotado, o qual forma um composto conjugado azo com o anel porfirina da bilirrubina, resultando num produto de reação com absorvância elevada a 540 nm. Devido ao facto da bilirrubina não conjugada reagir mais lentamente, são usados aceleradores tais como a cafeína e metanol na medição da bilirrubina total. A remoção destes aceleradores permite a determinação da bilirrubina direta. Aproximadamente 70-80% da bilirrubina conjugada, Δ -bilirrubina e uma pequena percentagem de bilirrubina não conjugada são medidos no teste da bilirrubina direta. A precisão do ensaio de bilirrubina direta depende do manuseamento e da composição do reagente. A exposição prolongada à luz provoca fotoisomerização, aumentando a bilirrubina direta.^[2]

A.2. Função de síntese

Síntese proteica

O fígado é local de síntese de grande parte das proteínas do soro. As exceções mais relevantes incluem as imunoglobulinas e o fator de von Willebrand. A síntese de mais de 90% de todas as proteínas e 100% da albumina ocorre no fígado, assim a destruição extensiva do tecido hepático resulta num nível sérico baixo de proteínas totais e de albumina. Na cirrose, para além da destruição dos hepatócitos, outra causa da diminuição da síntese proteica é a hipertensão portal, que provoca uma diminuição do aporte de ácidos aminados (a.a.) ao fígado. Contudo, deve considerar-se que a diminuição sérica de proteínas totais e de albumina pode dever-se a outras causas, como a síndrome nefrótica, malnutrição, enteropatia com perda proteica, doença inflamatória crónica, estados catabólicos (hipertiroidismo, síndrome de Cushing), ação de citocinas, ação de hormonas (cortisol, GH, estrogénios, hormonas da tiroide) etc.^[1,2] A alteração do perfil proteico plasmático observado na doença hepática depende do tipo, severidade e duração da doença. Por exemplo, na disfunção hepática aguda normalmente não ocorre alteração substancial deste perfil, enquanto que na hepatite fulminante a concentração de proteínas hepáticas de vida curta (transtirretina e protrombina) cai abruptamente, porém proteínas com tempo de $\frac{1}{2}$ vida superior apresentam um perfil minimamente alterado.^[1]

A avaliação dos fatores de coagulação é também importante na avaliação da capacidade de síntese do fígado. Estas proteínas serão abordadas no capítulo de coagulação na componente de hematologia.

A.2.1. Albumina.

A albumina é a proteína prevalente da síntese hepática, a sua produção é estimulada pela diminuição da pressão oncótica plasmática, e diminuída por determinadas citocinas como a IL-6. Embora a síntese normal de albumina se situe em 120 mg/kg/dia, esta pode duplicar em situações de pressão oncótica reduzida.^[1] Na doença hepática a hipoalbuminemia é principalmente observada na cirrose, hepatite autoimune, e hepatite alcoólica. A albumina é a proteína transportadora para muitas substâncias, tanto endógenas (bilirrubina, hormonas tiroideias), como exógenas (drogas). Devido ao facto da albumina ser um coloide intravascular osmoticamente ativo, a hipoalbuminemia resulta normalmente em edema.^[1]

A maioria do laboratórios utiliza métodos colorimétricos para a medição sérica ou plasmática da albumina, tendo por base a alteração no espectro de absorção de corantes como verde de bromocresol ou púrpura de bromocresol.^[5]

A.3. Testes de lesão do hepatócito

Os hepatócitos como células metabolicamente complexas contêm níveis enzimáticos elevados. Na lesão hepática estas enzimas podem ser libertadas para o plasma, sendo a sua avaliação importante no auxílio do diagnóstico e monitorização terapêutica.

Localização celular das enzimas

As enzimas normalmente determinadas na avaliação da lesão hepática, têm uma distribuição específica no interior do hepatócito. Enzimas como a lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST), e alanina aminotransferase (ALT) são citoplasmáticas. As enzimas mitocondriais como a isoenzima aspartato aminotransferase mitocondrial (ASTm) são libertadas após lesão da mitocôndria. As enzimas canaliculares tais como a fosfatase alcalina (ALP) e γ -glutamyl transferase (γ -GT) apresentam valores elevados em processos obstrutivos (Fig.3).

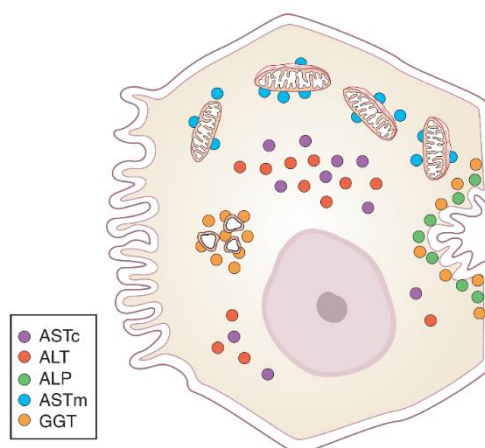


Fig. 3. Localização enzimática hepatocelular.^[2]

A.3.1. Aminotransferases (transaminases)

Nesta categoria estão incluídas duas enzimas de valor diagnóstico relevante, a AST também designada por l-aspartato:2-oxoglutarato aminotransferase, e a ALT designada por l-

alanina:2-oxoglutarato aminotransferase.^[6] Estas enzimas catalisam reversivelmente a transferência do grupo amina para o α -cetoglutarato para formar glutamato conjuntamente com o cetoácido correspondente (i.e., oxaloacetato ou piruvato respetivamente). Ambas requerem piridoxal fosfato (vitamina B6) como cofator, que pode ser um fator influenciador na sua determinação caso o paciente tenha insuficiência desta vitamina, como acontece com pacientes alcoólicos.

A AST e ALT têm respetivamente tempos de meia vida no sangue de 17 e 47 horas, e limites superiores de referência em torno de 40 U/L (35 AST; 60 ♂ e 42 ♀ para ALT).^[6] A AST tem uma distribuição tanto intramitocondrial como extramitocondrial, contudo a ALT é exclusivamente extramitocondrial. A AST tem uma distribuição ubíqua nos tecidos, incluindo coração e musculo esquelético, enquanto que a ALT é encontrada principalmente no fígado, embora existam quantidades significativas no rim.^[2]

Na maioria dos eventos hepatocelulares agudos, tais como a hepatite, a AST apresenta inicialmente valores superiores à ALT devido à atividade da primeira ser superior nos hepatócitos. Contudo, nas 24 a 48h subsequentes a ALT progressivamente apresentará valores superiores à AST, devido ao seu tempo de $\frac{1}{2}$ vida ser superior. No caso da hepatite alcoólica existem estudos que indicam que o etanol promove agressão mitocondrial, resultando na libertação de AST mitocondrial, que para além de ser a forma predominante nos hepatócitos, tem um tempo de $\frac{1}{2}$ vida substancialmente superior a AST extramitocondrial e à ALT. Facto que resulta na elevação desproporcional da AST em relação à ALT, com o concomitante quociente AST/ALT na ordem de 3 ou 4:1, um ratio também designado de DeRitis.^[2]

Na cirrose a ALT é tipicamente superior à AST, contudo com a progressão da fibrose verifica-se um declínio da ALT, com a subsequente elevação do quociente AST/ALT.

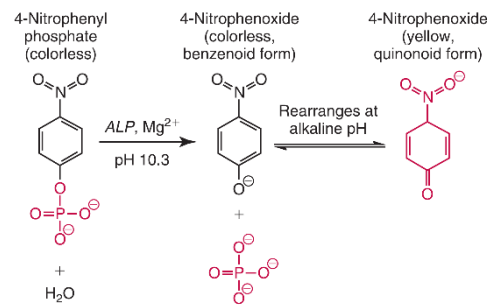
A atividade da ALT é mais específica na deteção de doença hepática em pacientes assintomáticos e não alcoólicos. Em infeções por Hepatite C verificam-se elevações moderadas da ALT. A AST é particularmente útil na monitorização terapêutica de fármacos potencialmente hepatotóxicos, e caso os valores sejam superiores a 3 vezes o limite superior de referência deve ser interrompida a terapêutica.^[2]

A.4. Avaliação de patologia canalicular.

A.4.1. Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina (fosfohidrolase-monoéster ortofosfórica alcalina; ALP) catalisa a hidrolise alcalina de uma grande variedade de substratos naturais e sintéticos.^[6] Este grupo de metaloenzimas (Zn^{2+}) encontra-se distribuído em todos os tecidos, contudo a sua maior

atividade é observada no fígado, osso, intestino, rim e placenta. No fígado, localiza-se nas microvilosidades dos canalículos biliares, e desta forma serve como um marcador de obstrução biliar extrahepática, como no caso de cálculos no ducto comum biliar, ou na colestase intrahepática como a colestase tóxica ou cirrose biliar primária. A ALP encontra-se em concentrações elevadas nos casos de obstrução extrahepática e apenas ligeiramente aumentada em patologias hepatocelulares tais como hepatites ou cirrose.^[7] Uma vez que o osso é também fonte de ALP, o seu aumento pode estar relacionada com patologias ósseas tais como a doença de Paget, aumento de atividade osteoblástica e o crescimento ósseo na puberdade. A ALP também se encontra elevada na gravidez devido à sua libertação pela placenta. Desta forma, a interpretação da concentração de ALP é difícil visto que pode existir elevação sem que existam patologias hepática.^[7]



A utilização de 4-nitrofenil fosfato (4-NPP) é o método mais comumente utilizado na deteção da ALP, este éster incolor serve de substrato para a enzima tendo como produto final um composto amarelo a pH da reação (Fig.4).^[6]

Fig.4. Reação química do 4-nitrofenil fosfato a 4-nitrofenóxido.^[6]

A.4.2. γ -Glutamil Transferase

A γ -Glutamil Transferase (γ -GT), regula o transporte de ácidos aminados (a.a.) através da membrana, ao catalisar a transferência de um grupo glutamyl da glutathiona para um a.a. livre. Tem como principal utilidade o auxílio na discriminação da fonte da elevação da ALP, visto que a γ -GT não se encontra presente no tecido ósseo. Caso a ALP se encontre elevada e a γ -GT também, então é mais provável que a ALP tenha origem no trato biliar. Encontra-se elevada em casos de cirrose biliar primária e colangite esclerosante. Os níveis séricos da γ -GT estão habitualmente elevados em alcoólicos, em obesos, e na presença de elevadas concentrações medicamentosas tais como acetaminofeno, fenitoína e carbamazepinas, possivelmente pelo fato do aumento da γ -GT ser necessário para repor a glutathiona usada no metabolismo destes fármacos.^[2]

A maioria dos ensaios para a γ -GT utilizam o substrato γ -glutamyl-p-nitroanilida. Na reação catalisada pela γ -GT é libertada p-nitroanilina que é cromogénica e pode desta forma ser medida espectrofotometricamente a 405 nm.^[6]

B. Avaliação da função renal.

Os rins formam um sistema de órgãos emparelhado localizado no espaço retroperitoneal. O rim adulto tem cerca de 12 cm e pesa 150g. Estes são enervados tanto pelo sistema simpático como parassimpático, cuja função se prende com a regulação da atividade vasomotora. A drenagem linfática renal inclui capilares linfáticos no glomérulo em proximidade com o aparelho justaglomerular, estando associados com a remoção de material das células mesangiais. Nos adultos os rins recebem aproximadamente 25% do débito cardíaco mantendo as células tubulares, metabolicamente exigentes, em atividade. A pressão de perfusão glomerular é mantida a 45 mm Hg. O nefrônio é a unidade funcional do rim, consistindo em glomérulo, túbulo proximal, ansa de Henle, túbulo distal e ducto coletor.^[8]

O rim tem um papel crucial no equilíbrio hidro-eletrolítico, no equilíbrio ácido-base na destoxificação de produtos catabólicos e na manutenção da homeostase do organismo em geral, apresenta ainda funções endócrinas como por exemplo a síntese de eritropoietina.^[9]

B.1. Conceito de clearance

A clearance renal relaciona a velocidade de excreção urinária de determinado composto com a concentração no plasma desse mesmo composto.^[9] Define-se como o volume de plasma a partir do qual determinada substância é completamente removida por unidade de tempo pelo rim.^[10] A equação formal para a clearance é a seguinte:

$$C_x = (U_x V) / P_x$$

Onde C_x é a clearance da substância x , U_x e P_x são as concentrações dessa substância na urina e plasma, respetivamente, e V é o volume de urina por unidade de tempo.^[9]

B.1.1. Creatinina

A creatinina é uma substância endógena com um peso molecular de 113 Da. É produzida no músculo a partir da creatina fosfato através de um processo de desidratação não enzimático. A velocidade de produção de creatinina é proporcional à pool de creatina-creatina fosfato, que por sua vez é proporcional à massa muscular.^[9] A creatinina é um marcador da taxa de filtração glomerular (TFG) amplamente utilizado por variadas razões. É uma substância endógena com uma constante de produção relativamente uniforme; não se encontra ligada às proteínas do plasma e desta forma pode ser livremente filtrada pelo glomérulo; não é reabsorvida pelos túbulos renais e somente uma pequena quantidade é

excretada por estes. Quando a função renal é normal e estável, a excreção de creatinina é equivalente à sua produção, que depende primariamente da massa muscular. A massa muscular varia com o género, idade e peso corporal. A velocidade de produção é estimada como se segue (i = idade):

Produção creatinina (mg/kg/dia): $28 - 0,2i$ (σ)

Produção creatinina (mg/kg/dia): $23,8 - 0,17i$ (φ)

A creatinina como marcador de TFG é conveniente e barata na sua medição, contudo é afetada por vários fatores como a idade, género, exercício, determinados fármacos (cimetidina, trimetropim), massa muscular e estado nutricional. Existem marcadores adicionais que podem ser utilizados na determinação da TFG, tais como a inulina, a cistatina c entre outros. Devido à percepção da dificuldade na colheita da urina de 24h, foram desenvolvidos vários modelos matemáticos no sentido de estimar a taxa de filtração glomerular a partir da creatina do soro. As duas fórmulas mais amplamente utilizadas são a formula de Levey (MDRD; *Modification of Diet in Renal Disease*) e a fórmula de Cockcroft-Gault.

A metodologia de avaliação da creatinina baseia-se na reação de Jaffe, descrita em 1886, a qual se baseia na reação da creatinina com trinitrofenol, também designado por ácido pícrico. A reação é favorecida em meio alcalino, daí o termo método de picrato alcalino, contudo esta não é específica da creatina, podendo o picrato reagir com cetonas, glucose, ascorbato, piruvato, proteínas, e cefalosporinas entre outros, que são interferentes na medição da creatina por espectrofotometria a 490-500 nm.^[9]

B.2. Ureia

A ureia, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, com um peso molecular de 60 Da é o principal composto nitrogenado resultante do metabolismo das proteínas.^[10] A biossíntese da ureia, a partir da amónia, é realizada em exclusivo por enzimas hepáticas integrantes do ciclo da ureia. Mais de 90% da ureia é excretada pelo rim, com perdas mínimas no trato gastrointestinal e pele. Desta forma, a patologia renal associa-se com o aumento de ureia no sangue. Por convenção a concentração da ureia é expressa apenas pelo seu conteúdo de azoto (nitrogénio), designado azoto ureico.^[9]

A ureia é filtrada livremente no glomérulo, mas é reabsorvida passivamente no túbulo proximal e no ducto coletor medular interno por transportadores. A ureia sérica é usada amplamente como marcador da função renal, mas apresenta várias limitações como parâmetro na medição da TFG. A concentração da ureia depende, não só da função renal,

mas também da sua produção, a qual é influenciada por diversos fatores como o consumo proteico, a atividade enzimática nos hepatócitos, a terapêutica com cortisol, a desidratação e a diminuição da perfusão renal por insuficiência cardíaca. Desta forma a *clearance* da ureia não reflete a TFG de forma precisa.^[9]

Existem essencialmente 3 métodos de medição da ureia, por espectrometria de massa, colorimétricos e enzimáticos. No último, o mais habitual no laboratório clínico, a amónia produzida pela hidrólise da ureia reage com 2-oxoglutarato e NADH para produzir glutamato e NAD⁺, reação catalisada pela glutamato desidrogenase. A quantidade de NADH consumido é medida por espectrofotometria a 340 nm, para determinar a concentração de ureia.^[9]

B.3. Microalbumina

O termo microalbuminúria descreve pequenas quantidades de albumina na urina, não detetáveis pelos métodos colorimétricos. A microalbumina urinária é importante no controlo de pacientes diabéticos, os quais apresentam elevados riscos de desenvolver nefropatia diabética no curso da sua vida. Numa fase inicial da nefropatia ocorre hipertrofia renal, hiperfunção e um aumento da espessura das membranas basais do glomérulo e túbulo. Nesta fase não se constata sinais de disfunção renal. No decorrer dos 7 a 10 anos subsequentes existe uma progressão da esclerose glomerular, com um aumento da permeabilidade capilar do glomérulo. Esta permeabilidade permite que quantidades mínimas de albumina (micro) surjam na urina.^[11]

A microalbuminúria é um biomarcador para o risco de disfunção renal e de eventos cardiovasculares e morte em diabéticos tipo 2. Muitos dos pacientes com diabetes tipo 1 e 2 e microalbuminúria sucumbem por complicações cardiovasculares antes de progredirem para proteinúria e insuficiência renal.^[12,13]

Vários autores sugerem que valores baixos de albumina urinária, variando entre 20 a 200 mg/l, são um indicador inicial de lesão glomerular possivelmente reversível.^[9]

C. Lípidos e dislipidoproteinemia.

As desordens do metabolismo lipídico são de premente importância no processo aterosclerótico e na doença coronária. Existe uma relação direta entre níveis elevados de colesterol no soro e o enfarte do miocárdio. A nível tecidual, os depósitos de colesterol ocorrem em áreas de lesão celular do endotélio e fazem parte das lesões ateroscleróticas. Desta forma o colesterol pode ser considerado “mau”, mas é na verdade um componente

vital das membranas celulares e serve de precursor das hormonas esteroides e ácidos biliares. Os triglicerídeos, ou triacilgliceróis, são uma fonte energética relevante para as células. Tanto os triacilgliceróis como o colesterol são os lípidos mais importantes no estudo da doença coronária cardíaca.

Os lípidos são solúveis em solventes orgânicos apolares, tais como o clorofórmio ou éter, e praticamente insolúveis em solventes polares como a água. Por este motivo, o colesterol e os triglicerídeos circulam no plasma em complexos moleculares hidrossolúveis, designados por *lipoproteínas*. Estas partículas contêm colesterol sob 2 formas: colesterol livre, um álcool polar não esterificado (30%), e ésteres de colesterol, uma forma hidrofóbica onde o colesterol se encontra ligado a um ácido gordo (70%). As lipoproteínas têm um arranjo micelar, onde os lípidos mais hidrofóbicos se dispõem no seu interior, e os lípidos mais hidrofílicos, como o colesterol livre e os fosfolípidos, se encontram na superfície com os grupos polares para o exterior. As apoproteínas (apo), a fração proteica das lipoproteínas, estão também dispostas à superfície. Desta forma, estas moléculas têm características anfífilas (anfipáticas).^[14]

Tabela I. Características físico-químicas das principais classes de lipoproteínas.

Partícula	Mobilidade electroforética	Apolipoproteínas principais	Lípidos principais	Diâmetro (nm)	Densidade (kg/l)
Quilomicron	Origem	ApoA-I, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III, E	Triglicerídeos exógenos	>70	<0,95
VLDL	Pré-β	ApoB-100, C-I, C-II, C-III, E	Triglicerídeos Endógenos	27-70	0,95-1,006
IDL	β ou Pré-β	ApoB-100, E	Triglicerídeos Endógenos, ésteres de colesterol	22-24	1,006-1,019
LDL	β	ApoB-100	Ésteres de colesterol	19-23	1,019-1,063
HDL ₂	α	ApoA-I, A-II, E	Fosfolípidos	4-10	1,063-1,125
HDL ₃	α	ApoA-II, A-I, E	Fosfolípidos	4-10	1,125-1,210
Lp(a)	Pré-β	ApoB-100, apo(a)	Ésteres de colesterol, fosfolípidos		1,045-1,080

Existem 4 classes mais relevantes de lipoproteínas: Quilomicrons (QM), *very-low-density lipoprotein* (VLDL), *low-density lipoprotein* (LDL), e *high-density lipoprotein* (HDL). Existem também outras lipoproteínas de menor importância, tais como a IDL (*intermediate-density lipoprotein*) e a lipoproteína (a) (Lp[a]). As lipoproteínas podem ser diferenciadas pela sua densidade, tamanho, composição química, e mobilidade electroforética.^[14]

As lipoproteínas podem ser agrupadas tendo por base a presença (QM, VLDL, IDL, LDL) ou ausência (HDL) de apoB. Esta classificação é importante porque a apoB é uma apolipoproteína não permutável, estando apenas presente uma molécula por lipoproteína. As

lipoproteínas que a contêm podem possuir apolipoproteínas adicionais como a apoA1, apoC, e apoE (tabela 1). Estas são principalmente sintetizadas nos hepatócitos e enterócitos.

C.1. Quilomicron

Os QM são partículas de grandes dimensões produzidas no intestino para o transporte de lípidos, com origem na dieta, para os tecidos muscular e adiposo. São extremamente ricos em triglicerídeos, mas relativamente pobres em colesterol livre, fosfolípidos e proteínas. Estas partículas são segregadas nos linfáticos mesentéricos e atingem a circulação no ducto torácico. Estas lipoproteínas adquirem a apoC-II, um cofactor da lipoproteína lípase, a partir do plasma. A interação dos QM com a lipoproteína lípase na superfície luminal do endotélio capilar, resulta na depleção de triacilglicerois, sendo os quilomicrons remanescente removidos pelo fígado da circulação. Quando presentes no plasma, os quilomicrons conferem-lhe um aspeto leitoso.^[14]

C.2. VLDL

As partículas de VLDL são produzidas pelo fígado e fornecem aos tecidos colesterol e triglicerídeos de origem endógena, principalmente hepática. Estas são ricas em triglicerídeos, contendo em massa cerca de 50% de colesterol, 40% de fosfolípidos, e cerca de 10% de proteínas, maioritariamente apoB-100 e apoC-(I;II;III) mas também apoE. A lipoproteína lípase hidrolisa VLDL, produzindo partículas menores e altamente aterogénicas, designadas de IDL e remanescentes de VLDL. Estas partículas podem ser removidas do plasma por recetores de LDL e subsequentemente metabolizadas a LDL.^[14]

C.3. LDL

As lipoproteínas de baixa densidade são produzidas pela metabolização de VLDL circulante e constituem cerca de 50% das lipoproteínas no plasma humano. São constituídas principalmente por 50% de colesterol, maioritariamente esterificado, 25% proteínas, principalmente apoB-100 e traços de apoC, 20% de fosfolípidos e triglicerídeos em número reduzido. O fígado recolhe a maioria de LDL circulante (~75%), onde a apoB-100 serve de ligando para o recetor hepático. A LDL remanescente é entregue nos tecidos, mas alguma LDL pode ser modificada e removida da circulação pelas células “scavenger”, tais como as que se encontram nas placas ateromatosas.^[14]

A LDL é oxidada em microdomínios na parede arterial, onde é sequestrado por proteoglicanos e outros constituintes da matriz extracelular. A LDL oxidada (oxLDL) tem várias propriedades pro-aterogénicas, incluindo o *uptake* rápido pelos macrófagos para

formar células “espumosas”, quimiotaxia para os monócitos circulantes, promoção da diferenciação de monócitos em macrófagos tecidulares, sendo ainda citotóxica para vários tipos celulares, e imunogénica.^[15]

O método indireto para a determinação de LDL mais frequentemente utilizado baseia-se na equação de Friedewald:

$$(\text{Colesterol LDL}) = (\text{Colesterol Total}) - (\text{Colesterol HDL}) - (\text{Triglicerídeos})/5$$

A componente (Triglicerídeos)/5 da equação é baseada na estimativa do colesterol VLDL, que por sua vez se baseia na razão entre triglicerídeos e colesterol de VLDL. Esta equação apenas mantém validade caso o valor de triacilgliceróis seja inferior a 400 mg/dL.^[15]

C.4. HDL

A lipoproteína de alta densidade (HDL) é uma partícula pequena constituída principalmente por proteínas, colesterol, fosfolípidos e triacilgliceróis vestigiais. É produzido no fígado e intestino estando envolvido no transporte reverso do colesterol. Estudos *in vitro* sugerem que o HDL está associado a mecanismos antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-trombóticos e indutores da síntese de óxido nítrico, fatores globalmente inibidores do processo aterosclerótico.^[14] O fígado é o principal local de remoção de HDL, e o mecanismo melhor conhecido é o da captura dos ésteres de colesterol, a partir do HDL, pelo recetor SR-BI expresso no fígado.

As partículas de HDL podem ser consideradas heterógenas visto terem sido identificadas subpopulações tendo por base diferenças no tamanho e carga, incluído duas subclasses de ultracentrifugação principais, HDL₂ e HDL₃. Esta distinção é relevante porque se pensa que o HDL₂ é mais cardioprotetor que o HDL₃, e indivíduos com níveis baixos de HDL₂ têm um risco aumentado de complicações cardiocirculatórias.^[14]

C.5. Lipoproteína (a)

A lipoproteína (a) é semelhante à LDL em termos de densidade e composição em geral, pode ser entendida como uma partícula LDL com a adição de apo(a), ligada à apoB-100 através de uma ponte dissulfureto. A Lp(a) geralmente está presente em concentrações muito inferiores à LDL, contudo em indivíduos normais os valores podem variar entre <20-1500 mg/L. Este aumento pode ter origem hereditária com um padrão autossómico dominante, e foi associado a um risco aumentado de doença cardiovascular aterosclerótica.^[14]

D. Marcadores de lesão cardíaca.

É de fato irônico que para o coração, um órgão que bombeia vários litros de sangue por minuto, o processo patológico mais relevante seja a isquemia (fornecimento inadequado de sangue). O músculo cardíaco está dependente de nutrição constante através de um sistema de artérias coronárias, que são altamente vulneráveis ao processo aterosclerótico. Nos estádios iniciais da aterosclerose, onde o fluxo sanguíneo nas coronárias é gradualmente reduzido, tipicamente não existem sintomas ou evidências laboratoriais de dano cardíaco. Caso o diâmetro das artérias coronárias seja reduzido para 20-30% do seu diâmetro original, normalmente surge dor no peito (*angina pectoris*), principalmente associada ao exercício físico, quando a necessidade de O_2 é maior. Quando um trombo bloqueia completamente o fluxo sanguíneo, o músculo irá desenvolver isquemia irreversível, designado por enfarte do miocárdio. Se o bloqueio não for completo, a destruição irreversível pode ser evitada, mas o paciente irá experimentar angina severa mesmo em repouso, uma síndrome designada por angina instável.

D.1. Troponina cardíaca.

A troponina é um complexo proteico regulatório de 3 proteínas que se encontra em intervalos regulares do filamento fino do músculo estriado. As 3 proteínas individuais são a subunidade ligante de tropomiosina (TnT, 37 kDa), a subunidade inibidora (TnI, 27 kDa), e a subunidade ligante de cálcio (TnC, 18 kDa). O estímulo do Ca^{2+} para a contração muscular é transmitido via complexo de troponinas, o qual provoca uma alteração conformacional na tropomiosina, permitindo que a interação entre a miosina e actina ocorra.^[16] Apenas duas isoformas relevantes de troponina C se encontram no coração e músculo esquelético humano, sendo a isoforma cardíaca idêntica à isoforma do músculo esquelético de contração lenta (tipo 2), o que invalida a sua utilização como biomarcador cardíaco.^[17,18] A troponina I exhibe uma forma cardioespecífica (cTnI), bem como isoformas distintas para as fibrilas musculares esqueléticas tipo 1 e 2, codificadas por genes separados. A troponina T apresenta também uma forma distinta no miocárdio (cTnT), contudo foi detetada no músculo esquelético fetal e em situações de distrofia muscular, ou falha renal.^[17] Actualmente os anticorpos usados nos ensaios imunoquímicos para detetar cTnT do miocárdio têm uma especificidade de aproximadamente 100%.

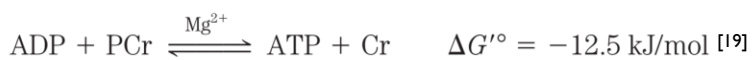
Nos miócitos cardíacos, a cTnT e cTnI encontram-se ligadas predominantemente às fibras musculares, sendo libertadas lentamente durante 1 ou 2 semanas, após enfarte do miocárdio. Embora tanto cTnT como cTnI sejam proteínas relativamente pequenas que são

rapidamente removidas da circulação, os seus níveis plasmáticos descem lentamente após complicação cardíaca. Uma pequena fração das troponinas (cTn) encontra-se livre no citoplasma das células do miocárdio (cTnT~6%; cTnI 2%-5%), esta fração livre abandona o citoplasma das células do miocárdio, após agressão, o que permite a sua deteção numa janela temporal semelhante à creatina cinase 2, atingindo um pico 24h após enfarte do miocárdio (Fig.5.). Devido à libertação lenta das cTn ligadas às miofibrilas, o rápido declínio das cTn circulantes é normalmente seguido de um *plateau* ou mesmo de um aumento secundário, o que não deve ser interpretado como novo enfarte.

Ao contrário de outros marcadores cardíacos, a cTnT e cTnI são praticamente ausentes do soro de indivíduos saudáveis, contudo estes marcadores nem sempre significam obstrução coronária cardíaca, já que a agressão aos miócitos pode ter origem em pericardite, miocardite, embolismo pulmonar, falha renal, septicémia etc.

D.2. Creatina cinase.

A fosfocreatina, também designada de creatina fosfato, serve como fonte imediata de grupos fosforil para a síntese rápida de ATP a partir de ADP. A enzima creatina cinase (CK) catalisa a seguinte reação reversível:



A CK é encontrada predominantemente como um dímero de subunidades catalíticas, cada uma das quais com 40 kDa, as duas subunidades são designadas de M (*Muscle*) e B (*Brain*). As 3 isoenzimas resultantes são a CK₁ (BB), CK₂ (MB), e CK₃ (MM). A CK é encontrada em pequenas quantidades em todos os tecidos, sendo encontrada em concentrações superiores no cérebro e músculo, embora a CK do cérebro nunca atravesse a barreira hematoencefálica. No músculo estriado esquelético, a fração de CK-MB (CK₂) representa cerca de 2% nas fibras tipo I, e 5%-7% nas fibras tipo 2.^[17] No coração saudável, cerca de 15%-20% da CK é a isoforma CK₂ com uma distribuição heterogénea, sendo mais abundante no coração direito que no esquerdo.^[16] Desta forma, a isoforma MB da CK é sensível mas pouco específica, uma vez que a sua elevação pode estar associada a patologias do músculo esquelético. Após enfarte do miocárdio a CK₂ começa a aumentar em 3 a 12 horas, com pico máximo às 24 horas, regressando ao normal após 48-72h.^[20] Com o advento imunoensaios para as cTn, a utilização da CK₂ como biomarcador cardíaco tornou-se obsoleto, sendo contudo ainda utilizado devido à resistência por parte dos clínicos, ou por indisponibilidade de testes para as cTn em determinados países menos desenvolvidos.^[17]

D.3. Lactato desidrogenase

Quando os tecidos não são abastecidos com oxigênio de forma a assegurar a oxidação aeróbica do piruvato e NADH produzidos na glicólise, o NAD^+ é regenerado a partir de NADH pela redução de piruvato a L-lactato, reação catalisada reversivelmente a pH 7 pela lactato desidrogenase (LDH).^[19] Tendo em conta que esta reação da via glicolítica, dependente de NADH, pode ocorrer em praticamente todas as células do organismo, pelo que a especificidade deste marcador para o miocárdio é significativamente baixa. Elevações da LDH sérica ocorrem numa miríade de patologias, nomeadamente enfarte do miocárdio, hepatite, hemólise, e desordens do músculo, pulmão e rim.^[6] Contudo, pela distinção de isoenzimas (LDH_1 a LDH_5) no plasma, foi possível aumentar esta especificidade. A LDH_1 é particularmente abundante no miocárdio e a LDH_4 e LDH_5 são expressas principalmente no fígado e músculo esquelético. Tendo em conta que normalmente os níveis séricos de LDH_2 são superiores aos de LDH_1 , o diagnóstico do enfarte do miocárdio era realizado através da comparação dos níveis plasmáticos de LDH_1 e LDH_2 . Foi demonstrado que após 24h a 48h do enfarte do miocárdio, o rácio $\text{LDH}_1 : \text{LDH}_2$ plasmático excede 0,75 e permanece elevado até 2 semanas.^[21]

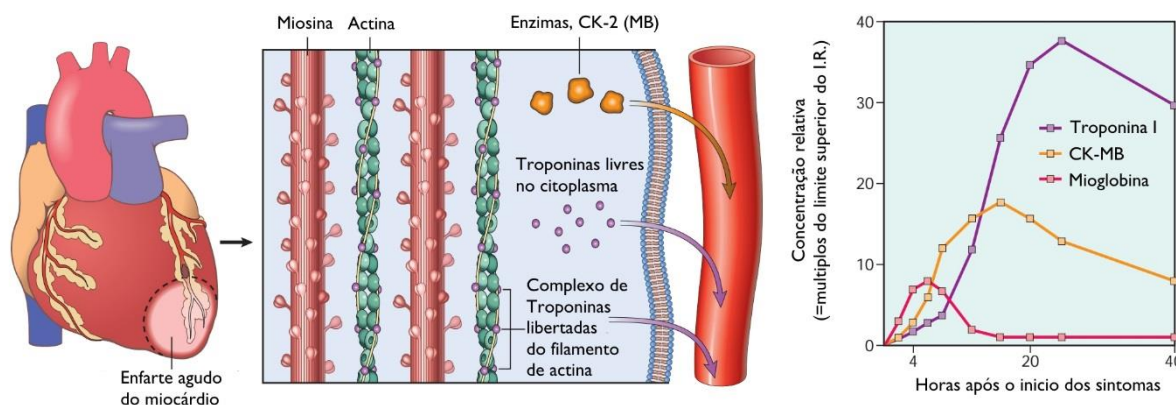


Fig. 5. Libertação de proteínas dos miócitos após enfarte do miocárdio, e respetiva cinética sérica. Algumas destas proteínas como a troponina I ou T, e CK-2 são utilizados na rotina como biomarcadores de diagnóstico.^[20]

Risco cardíaco

Proteína C-reativa

Isolada em 1930 a partir de plasma de pacientes com pneumonia pneumocócica, a proteína C-reativa (CRP) foi assim designada pelo facto de ligar o polissacarídeo C de *Streptococcus pneumoniae*. Posteriormente foi detetada no plasma em processos infecciosos e inflamatórios, sendo uma proteína de fase aguda. Atualmente pertence à família das pentraxinas, e compreende 5 protómeros cada um dos quais com 206 a.a. não glicosilados, formando um polímero cíclico com um peso molecular de 115 kDa.^[15] Com a participação

de iões de Ca^{2+} , a CRP liga várias proteínas e fosfolípidos, particularmente a fosfocolina. Oponiza partículas e ativa o complemento pela via clássica. No plasma de indivíduos normais os valores médios são de aproximadamente 1 mg/L, e 10 mg/L para o percentil 99. Em pacientes com doença aguda as citocinas, principalmente interleucina-6, estimulam a produção hepática de CRP, podendo os níveis plasmáticos ser superiores a 300 mg/L. A CRP apresenta valores plasmáticos aumentados numa miríade de situações, incluindo infeções, trauma, enfarte do miocárdio, processos cirúrgicos, ou proliferação neoplásica. Geralmente os valores são superiores para infeções bacterianas do que para virais, contudo podem existir elevações associadas à gripe ou mononucleose infecciosa.^[5,16]

A inflamação crónica é um importante componente no desenvolvimento e progressão da aterosclerose, e vários estudos epidemiológicos demonstraram que concentrações séricas aumentadas de CRP estão associados a um maior risco de eventos cardiovasculares. O uso da CRP para este propósito requer um método mais sensível (imunoturbidimetria ou imunonefelometria) com um limite de deteção inferior a 0,3 mg/L, designado de proteína C-reativa de alta sensibilidade (hsCRP).^[15]

Pelo facto dos valores de hsCRP se correlacionarem minimamente com a concentração das lipoproteínas, a medição da hsCRP não substitui a determinação do painel lipídico, e deve ser entendido como um complemento na avaliação do risco cardiovascular.^[15]

E. Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo

O esqueleto é um órgão metabolicamente ativo que sofre remodelação continua durante o curso da vida. Esta remodelação é necessária, tanto para manter a integridade estrutural do esqueleto como para manter a sua função metabólica como reservatório de cálcio e fósforo. A remodelação do osso pode ser despoletada por alterações das forças mecânicas ou por microfraturas e por ação hormonal em resposta aos níveis circulantes de Ca^{2+} e fósforo. O esqueleto serve ainda como uma 2ª linha de defesa em situações de acidose, já que é capaz de libertar fosfatos inorgânicos que tamponizam o plasma.^[22,23]

O osso pode ser subdividido em 2 classes: osso cortical ou compacto que tem um papel de suporte, e osso trabecular ou esponjoso que serve como repositório de células hematopoiéticas, e apresenta uma extensa área para trocas de minerais. Tanto o osso cortical como o trabecular são compostos principalmente de minerais inorgânicos (cálcio e fósforo) e uma matriz orgânica. Cerca de 90%-95% da matriz é constituída por colagénio tipo I, e o remanescente por diferentes proteínas como a osteocalcina, osteopontina,

osteonectina, trombospondina e sialoproteínas. Os osteoclastos reabsorvem ativamente o osso através da produção de hidrogeniões para mobilizar os minerais, e enzimas proteolíticas para hidrolisar a matriz orgânica. Os osteoblastos sintetizam a matriz orgânica e controlam a mineralização do osso formado de novo.^[23]

A concentração plasmática de cálcio, fosfato e magnésio está dependente do equilíbrio entre a deposição e reabsorção óssea, absorção intestinal e excreção renal. As principais hormonas que regulam este processo são a PTH, a calcitonina e a 1,25-hidroxivitamina D.^[23]

E.1. Cálcio

O cálcio é o 5º elemento mais abundante, e o catião mais prevalente do organismo humano. Um adulto saudável contém cerca de 1-1,3 kg de cálcio, onde 99% se encontra sob a forma de cristais extracelulares no tecido ósseo com forma desconhecida, mas com composição semelhante à hidroxiapatite, o restante 1% encontra-se nos tecidos moles e no fluido extracelular.^[22,23]

O cálcio plasmático existe sob 3 formas diferentes: (1) livre ou ionizado (50%), que representa a forma fisiologicamente ativa; (2) cálcio complexado com variadíssimos aniões, incluindo bicarbonato, lactato, fosfato, e citrato (10%); (3) ligado a proteínas (40%). Cerca de 80% da fração de cálcio ligado a proteínas está associado à albumina.

Para além da sua importância na mineralização do esqueleto, o cálcio desempenha um papel fundamental em processos fisiológicos básicos como a coagulação, transmissão neuronal, capacidade tamponizadora do plasma, processos enzimáticos, e na manutenção do tónus e excitabilidade do músculo esquelético e cardíaco. O Ca^{2+} é um ativador no processo de transdução intracelular (2º mensageiro) e é essencial na biossíntese de DNA e RNA.

O cálcio é absorvido ativamente no duodeno e jejuno superior. A absorção de Ca^{2+} aumenta significativamente em períodos de rápido crescimento em crianças, na gravidez e lactação, diminuindo com a idade. A vitamina D serve como principal estímulo para a absorção de Ca^{2+} , embora a absorção seja também estimulada pela hormona de crescimento, e o aumento de proteínas na dieta.

Maioritariamente as perdas de Ca^{2+} ocorrem via excreção urinária, variando entre 2,5 e 10 mmol/dia (100- 200 mg/dia). A excreção urinária de Ca^{2+} está aumentada em situações de hipercaliémia, acidose, privação de fosfato e terapêutica com glucocorticoides. Determinados diuréticos, a PTH e provavelmente a vitamina D diminuem a excreção urinária de Ca^{2+} .

A concentração de Ca^{2+} ionizado no fluido extracelular (ECF) é mantida numa estreita gama de valores, de aproximadamente 1,25 mmol/L. O ajustamento da concentração de Ca^{2+} no ECF é conseguido principalmente pela ação da PTH, pela 1,25-dihidroxitamina D3 ($1,25[\text{OH}]_2\text{D}_3$), tendo a calcitonina um papel menos relevante e ainda controverso em humanos.^[23]

A hipercalcemia, aumento da concentração de Ca^{2+} sérica, está associada com anorexia, náuseas, vômitos, hipotonia, depressão, alta voltagem das ondas T na eletrocardiografia, e ocasionalmente letargia e morte. A hipercalcemia pode ter várias causas como o hiperparatiroidismo primário, ou outras endocrinopatias (tirotoxicose), mediada por tumores (mieloma múltiplo, linfomas), doenças granulomatosas (sarcoidose, tuberculose, coccidioidomicose), ou ter origem medicamentosa (intoxicação por vitamina D, lítio).^[22,23,24]

A hipocalcemia, diminuição da concentração de Ca^{2+} sérica, apresenta um quadro neurológico e neuromuscular, incluindo espasmos, parestesia perioral e periférica, arritmias cardíacas, aumento do intervalo QT e baixa voltagem da onda T no eletrocardiograma. A hipocalcemia apresenta várias causas, que podem ser subdivididas em: (1) deficiência na secreção ou síntese de PTH (hipoparatiroidismo), (2) resistência à ação da PTH (hipomagnesemia), (3) deficiência de vitamina D ou seus metabolitos (doença renal crónica), (4) deficiências na mineralização óssea para valores normais de vitamina D ou PTH.^[22,23,24]

E.2. Fósforo

Um adulto tem aproximadamente 600 g ou 20 moles de fósforo em fosfatos orgânicos e inorgânicos, dos quais cerca de 85% no esqueleto (hidroxiapatite, fosfato de cálcio), e o restante maioritariamente nos tecidos moles. O plasma contém tanto fosfato orgânico como inorgânico, contudo apenas o inorgânico é medido. O fosfato inorgânico existe na forma de aniões monovalentes (H_2PO_4^-) e divalentes (HPO_4^{2-}), representando importantes funções de tamponização. O ratio de H_2PO_4^- : HPO_4^{2-} é dependente do pH e varia entre 1:1 em situações de acidose, 1:4 a pH 7.4 e em situações de alcalose é de 1:9. Cerca de 10% do fosfato sérico encontra-se ligado a proteínas, 35% está complexado com sódio, cálcio e magnésio, e 55% encontra-se livre.

Para além do seu papel no esqueleto, o fosfato tem importantes funções tanto extra como intracelulares. É um importante constituinte dos ácidos nucleicos, visto que tanto o DNA como RNA representam fosfodiésteres complexos. É parte integrante de fosfolípidos e fosfoproteínas. Forma compostos de alta energia (ATP) e cofatores (NADPH) estando ainda envolvido no metabolismo intermediário e em vários sistemas enzimáticos (adenilato

ciclase). O fosfato é essencial para a normal contractilidade da musculatura, função neurológica, transporte de eletrólitos, transporte de O₂ pela hemoglobina (2,3-difosfoglicerato).

O fator de crescimento de fibroblastos (FGF-23; *fibroblast growth factor*) é um modulador essencial na homeostase do fosfato. O FGF-23 aumenta a excreção de fosfato pelos rins, e diminui a produção da forma ativa de vitamina D (1,25-dihidroxitamina D) pela redução da enzima responsável pela sua formação, a 1 α -hidroxilase. O FGF-23 é sintetizado por células da linhagem dos osteoblastos, principalmente osteócitos, em resposta ao aumento sérico de fosfato ou 1,25-dihidroxitamina D. Na doença crónica renal, o FGF-23 aumenta num mecanismo compensatório contra o aumento de fosfato sérico. Com a progressão da perda da função renal, a resposta ao FGF-23 diminui (com perda do Klotho, o coreceptor do FGF-23) e desta forma não consegue reduzir o fosfato sérico.^[22,23,25,26]

E.3. Magnésio

O magnésio é o catião divalente intracelular mais abundante. A concentração sérica de magnésio é regulada apertadamente dentro da gama de 0,7-1 mmol/L (1,5-2 meq/L; 1,7-2,4 mg/dL). O conteúdo em magnésio do organismo adulto é de aproximadamente 25 g ou cerca de 1 mole, dos quais 55% residem no esqueleto. Apenas 1% do magnésio total está presente no fluido extracelular. No soro, cerca de 55% apresenta-se ionizado ou livre (Mg²⁺), 30% associado a proteínas (albumina), e 15% está complexado com fosfato, citrato e outros aniões. Cerca de 99% do magnésio total do organismo apresenta-se na matriz óssea ou é intracelular, maioritariamente no músculo esquelético. No contexto intracelular o magnésio encontra-se compartimentalizado, e a sua maioria ligado a proteínas ou moléculas carregadas negativamente; a maioria do magnésio citosólico surge ligado ao ATP. Quantidades apreciáveis de magnésio encontram-se no núcleo, nas mitocôndrias ou retículo endoplasmático.

O magnésio é essencial para o funcionamento de mais de 300 enzimas celulares, incluído aquelas relativas à transferência de grupos fosfato (ATPases), todas as reações que requeiram ATP, e em todos os passos da replicação e transcrição de DNA e na tradução de mRNA. Este catião é essencial para o metabolismo energético, tendo também um papel importante na estabilização das biomembranas na condução nervosa, no transporte iónico e na atividade dos canais de cálcio. O magnésio tem ainda um papel fundamental na manutenção da concentração do K⁺ intracelular, através da regulação do movimento de K⁺ através das membranas celulares do miocárdio.^[22,23,25,26]

F. Equilíbrio hidro-eletrolítico

A água é o constituinte mais abundante do organismo, compreendendo cerca de 50% do peso das mulheres e 60 % do peso dos homens. O total da água do organismo distribui-se entre 2 compartimentos principais: 55-75% é intracelular (fluido intracelular; ICF), e 25-45% é extracelular (fluido extracelular; ECF). O ECF é subsequentemente subdividido em espaço intravascular e extravascular (intersticial) num rácio de 1:3. O movimento do fluido entre os espaços intravascular e intersticial ocorre através da parede dos capilares e é determinado pelas forças de Starling (Ernest Starling), designadas por pressão hidrúlica capilar e pressão colóide osmótica (oncótica). O gradiente da pressão hidrúlica transcáпилar excede a correspondente pressão oncótica, favorecendo desta forma o movimento do ultrafiltrado plasmático para o espaço extravascular. O regresso do fluido para o espaço intravascular ocorre via circulação linfática.^[27]

A concentração de solutos ou partículas de um fluido é designado como osmolalidade, expressa como miliosmoles por quilograma de água (mOsm/kg). A água difunde facilmente através da maioria das biomembranas no sentido de atingir o equilíbrio osmótico (equilíbrio de Gibbs-Donnan).^[28] A composição em solutos difere consideravelmente entre os espaços intra e extracelular devido à atividade de vários transportadores, canais e ATPases. As principais partículas do ECF são o Na^+ e os aniões Cl^- e HCO_3^- , sendo o K^+ e ésteres de fosfatos orgânicos (ATP, fosfocreatina, e fosfolípidos) predominantes no ICF.^[27] A maioria das membranas celulares são essencialmente impermeáveis aos solutos, e desta forma contribuem para os gradientes osmóticos (osmoles efetivos), existem contudo alguns solutos, particularmente a ureia, que são difundíveis nas biomembranas, não contribuindo por isso para o gradiente osmótico (osmoles inefetivos).^[29]

A secreção de vasopressina (hormona antidiurética), ingestão de água e o transporte renal de água colaboram no sentido de manter a osmolalidade do fluido entre 280 e 295 mOsm/kg. A vasopressina é sintetizada nos neurónios magnocelulares do hipotálamo, os axónios distais destes neurónios projetam-se na pituitária posterior ou neurohipófise, onde a vasopressina é libertada na circulação. Uma rede de neurónios centrais “osmorecetes”, são sensíveis à osmolalidade circulante via canais catiónicos não seletivos. Estes neurónios osmorecetes são ativados ou inibidos por aumento ou redução na osmolalidade circulante, respectivamente. A sua ativação leva à libertação de vasopressina e à sede.

A excreção ou retenção de água pelos rins é modulada pela vasopressina. Esta atua nos recetores tipo V_2 da ança ascendente de Henle e nas células principais de ducto coletor, aumentando os níveis intracelulares de AMP cíclico (cAMP), um 2º mensageiro, que ativa

múltiplas proteínas transportadoras dependentes da PKA. Esta ativação, dependente de vasopressina e PKA, do transporte de $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ e K^+ é um processo chave no mecanismo de contracorrente (estabelece um gradiente osmótico) o qual permite a concentração da urina.

A vasopressina, através da PKA, estimula a inserção de canais de aquaporinas-2 no lúmen do ducto coletor, resultando na absorção transepitelial da água a favor do gradiente de concentração.

A reabsorção tubular renal do $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ filtrado é regulada por múltiplas hormonas endócrinas e parácrinas, para além da atividade dos nervos renais. A angiotensina II (potente vasoconstritor) ativa a reabsorção proximal de $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$, tal como os recetores adrenérgicos sob a influência da inervação simpática renal; a dopamina gerada localmente tem, em contraste, um efeito natriurético. A aldosterona ativa primariamente a reabsorção de $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ no nefrónio distal sensível a aldosterona. Em particular, a aldosterona ativa os canais ENaC nas células principais, induzindo a absorção de Na^+ e promovendo a excreção de K^+ . Neste eixo, designado de renina-angiotensina-aldosterona, o principal estímulo para a libertação de renina da macula de densa (aparelho justaglomerular) é a diminuição da perfusão renal, levando em ultima análise à libertação de aldosterona.^[30]

A integridade circulatória é crítica para a perfusão e função dos órgãos vitais. A hipovolémia é sentida por recetores de pressão ventriculares e vasculares resultando na ativação neurohumoral (aumento do tónus simpático, ativação do eixo renina-angiotensina-aldosterona, e aumento da vasopressina circulante) que sinergicamente aumentam a reabsorção de $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$, a resistência vascular e a reabsorção renal de água. Isto ocorre no contexto da diminuição do débito cardíaco, caso de estados hipovolémicos, diminuição da pressão oncótica, e aumento da permeabilidade capilar.^[27]

O Na^+ , K^+ e Cl^- são habitualmente quantificados por potenciometria, recorrendo a eléctrodos seletivos de ião.

Eletrólitos

F.1. Sódio

O sódio é o catião preponderante do fluido extracelular. Tendo em conta que representa aproximadamente 90% de 154 mmol de catiões inorgânicos por litro de plasma, o Na^+ é responsável por cerca de metade da força osmótica do plasma. Possui desta forma um papel central na manutenção da distribuição normal da água bem como da pressão osmótica no fluido extracelular.

O Na^+ é livremente filtrado no glomérulo renal. Cerca de 80% do sódio filtrado é ativamente reabsorvido nos túbulos proximais, com o Cl^- e a água a acompanhar este

movimento de forma electroneutra e isosmótica. Existe também reabsorção de sódio na ansa de Henle, e nos túbulos distais a interação da aldosterona com os sistemas de troca $\text{Na}^+\text{-K}^+$ e $\text{Na}^+\text{-H}^+$ resulta na reabsorção direta de Na^+ e indiretamente de Cl^- . A regulação do anterior sistema determina em ultima análise a quantidade de Na^+ excretado na urina.^[28,29,31]

A hiponatremia define-se como uma diminuição da concentração de Na^+ no plasma (<130 a 135 mmol/L). Manifesta-se clinicamente por náuseas, fraqueza generalizada, confusão, e para valores entre 90 a 105 mmol/L surgem convulsões, coma ou mesmo morte. A hiponatremia pode ser hiposmótica, hiperosmótica, ou isosmótica. A hiponatremia hiposmótica, ocorre quando a concentração de Na^+ plasmática é baixa, e pode ocorrer devido a perda excessiva (hiponatremia deplecional), ou pelo aumento do volume do ECF (hiponatremia dilucional). Se o Na^+ urinário é baixo (<10 mmol/L), a perda é assumida como extrarenal, podendo ter origem no trato gastrointestinal (vómitos, diarreias), ou pele. Caso o Na^+ urinário seja elevado (>20 mmol/L), é mais provável a perda a nível renal, tendo como causas (1) diurese osmótica, (2) diuréticos, (3) insuficiência adrenal (ausência de aldosterona); (4) nefropatias com perda de sal. A síndrome da secreção inapropriada de ADH (SIADH), polidipsia primária, e hipotireoidismo são também causas de hiponatremia.

A hipernatremia ($\text{Na}^+ > 150$ mmol/L) é sempre hiperosmolar, e pode resultar de perda ou ingestão insuficiente de H_2O , ou menos comumente resultar de Diabetes Insipidus, tanto central como nefrogénica.^[28,29,31]

F.2. Potássio

O potássio é o catião intracelular prevalente. Nos tecidos, tem uma concentração média de 150 mmol/L, sendo nos eritrócitos de 105 mmol/L. Esta concentração intracelular elevada é mantida pela $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ que transporta ativamente, para o contexto intracelular, 2K^+ por troca com 3Na^+ contra o gradiente de concentração. Esta bomba é crucial no sentido de manter e ajustar gradientes iónicos essenciais para a transmissão nervosa e contractilidade muscular. A difusão de K^+ do ambiente intracelular para o plasma e espaço extracelular ocorre sempre que a atividade da bomba de Na^+ se encontre diminuída.

O potássio é filtrado no glomérulo e é quase totalmente reabsorvido nos túbulos proximais, sendo posteriormente excretado nos túbulos distais por troca com o Na^+ , sob a influencia da aldosterona. A aldosterona promove a secreção de K^+ e a reabsorção de Na^+ nos túbulos distais pelo mecanismo de troca de $\text{Na}^+\text{-K}^+$. O rim responde de forma imediata ao aumento plasmático de K^+ aumentando a secreção urinária, podendo a concentração na urina atingir 100 mmol/L. Contrariamente, a resposta tubular no sentido de conservar K^+ é muito lenta na fase inicial de depleção.

A hipercaliémia (K^+ plasmático $>5,0$ mmol/L) é uma emergência médica pelo facto de resultar na alteração do electrocardiograma (aumento da curva QRS, e aumento do pico T) podendo levar a paragem cardíaca. A hipercaliémia pode ter como causas o aumento da ingestão, a redistribuição do K^+ do ICF para o ECF, como o verificado em casos de rabdomiólise, hemólise intravascular, acidose metabólica ou situações de insulinopenia (cetoacidose diabética). A hipercaliémia pode ainda resultar de excreção diminuída (retenção) tanto por insuficiência renal como por hipoaldosteronismo (inibidores da ACE; espironolactona, diurético poupador de K^+).

Os fatores que regulam a secreção de K^+ nos túbulos distais incluem a ingestão de Na^+ e K^+ , concentração de mineralocorticoides, e o equilíbrio ácido-base. Neste último ponto observam-se situações de híper ou hipocaliémia (K^+ plasmático $<3,5$ mmol/L) em casos de acidose ou alcalose, respetivamente. A filtração glomerular diminuída é típica de falha renal, tendo como consequência a diminuição do fluxo aportado aos túbulos distais, que é um importante fator de retenção de K^+ observado na doença renal crónica.^[28,29,31]

F.3. Cloreto

O cloreto é anião extracelular mais representativo. Desta forma, similar ao Na^+ , o cloreto está envolvido na manutenção da distribuição da água, pressão osmótica, e equilíbrio anião-catião do espaço extracelular. Contrariamente à sua elevada concentração no ECF (≈ 103 mmol/L), a concentração de Cl^- no fluido intracelular dos eritrócitos é de 45 a 54 mmol/L; sendo na maioria do fluido intracelular dos restantes tecidos de apenas ≈ 1 mmol/L. Nas secreções gástrica e intestinal, o Cl^- é o anião mais abundante.

Os iões de cloreto são na sua quase totalidade absorvidos no espaço gastrointestinal. São filtrados a partir do plasma no glomérulo, e passivamente reabsorvidos juntamente com o Na^+ , nos túbulos proximais. Na ança de Henle ascendente, o Cl^- é ativamente reabsorvido pela bomba de cloreto. Os diuréticos da ansa, tais como a furosemida e ácido etacrínico, inibem o transportador simporte $Na^+-K^+-2Cl^-$.^[31,32]

G. Avaliação da função pancreática

Enquanto glândula digestiva, o pâncreas pesa cerca de 70 a 105 g com uma localização posterior à cavidade peritoneal ao nível das vertebrae L1 e L2. O pâncreas é composto por 2 tecidos morfológica e funcionalmente distintos: o tecido endócrino e tecido exócrino. O pâncreas endócrino (hormonal) é de tamanho muito inferior ao exócrino, sendo consistido pelos ilhéus de Langerhans, um agregado bem definido, esférico ou ovoide composto por

pelo menos 4 tipos celulares. Os ilhéus segregam pelo menos 4 hormonas na corrente sanguínea: insulina (células β), glucagina (células α), somatostatina (células δ), grelina (células ϵ) entre outras. O pâncreas exócrino (enzimático), segrega cerca de 1,5 a 2 litros por dia de fluído, rico em enzimas digestivas, nos ductos sendo posteriormente vertido no duodeno.

Este fluído digestivo é produzido pelas células acinares pancreáticas, que estão interligadas por ductos pequenos. Estes ductos reúnem-se em ductos progressivamente maiores, formando o ducto pancreático principal e acessório. O ducto pancreático principal conjuntamente com o ducto biliar comum abrem no duodeno através da papila duodenal (papila de Vater). O fluído pancreático normal, rico em proteínas, é de aspeto incolor com um pH que pode atingir 8,3 devido ao conteúdo rico em bicarbonato, sendo este último utilizado para neutralizar o ácido clorídrico do fluído gástrico proveniente do estômago.

O fluído pancreático tem aproximadamente o mesmo conteúdo em K^+ e Na^+ que o soro. As enzimas digestivas, ou as suas proenzimas, segregadas pelo pâncreas são capazes de digerir 3 grandes classes de alimentos (proteínas, hidratos de carbono, gorduras) e incluem (1) as enzimas proteolíticas tripsina, quimotripsina, elastase, colagenase, leucina aminopeptidase, e algumas carboxipeptidases; (2) enzimas lipídicas, principalmente lipase e lecitinase; (3) α -amílase pancreática; e (4) várias nucleases (ribonucleases). As proteases são segregadas em zimogénios inativos (tripsinogénio, quimotripsinogénio, proelastase, calicreinogénio, e procarboxipeptidases). O tripsinogénio é clivado e ativado por enteropeptidases no duodeno, gerando tripsina que ativa as outras proteases em cascata. O tecido pancreático protege-se de autodigestão pelos seguintes fatores:

- Enzimas digestivas são sintetizadas como proenzimas inativas (zimogénios), e integradas nos grânulos secretores.
- Restrição da ativação das proteases no duodeno.
- Inibidor da tripsina (*serine protease inhibitor Kazal type I*; SPINK1), segregada pelos grânulos secretores com tripsinogénio.
- O pH dos acinos e ductos é mantido de forma a conservar todas as enzimas em estado inativo, devido ao conteúdo em HCO_3^- .

A secreção exócrina do pâncreas é regulada principalmente por 2 hormonas (polipeptídeos) produzidas pelas células enteroendócrinas do intestino delgado: a colecistocinina (CCK; anteriormente designada de pancreozimina) estimula a secreção das células acinares; e a secretina promove a secreção de água e HCO_3^- pelas células dos ductos pancreáticos. A enervação pelo sistema autónomo (parassimpático) também estimula tanto as células acinares como dos ductos.^[33,34,35]

Enzimas pancreáticas

G.1. Amilase

A α -amilase (AMY) é uma enzima da classe das hidrolases que catalisa a hidrólise das ligações 1,4- α -glucosídicas dos polissacarídeos. Tanto os polissacarídeos lineares como a amilose, e os polissacarídeos ramificados como a amilopectina e glicogénio são hidrolisados, mas a velocidades distintas. A amilase é uma metaloenzima de cálcio, sendo este essencial para a sua integridade.

A enzima presente no soro normal e urina é predominantemente de origem pancreática (P-AMY) e das glândulas salivares (S-AMY). Estas isoenzimas são produtos de 2 *loci* intimamente ligados do cromossoma 1. Estas isoformas podem ser separadas tanto no soro como urina recorrendo à eletroforese. Indivíduos como deficiência isolada de P-AMY, uma condição rara, apresentam má-digestão de hidratos de carbono, distensão abdominal, fezes líquidas, e dificuldade em ganhar peso.

A atividade da AMY no sangue é fisiologicamente baixa e constante, tendo um incremento elevado na pancreatite aguda ou na inflamação das glândulas salivares. Na pancreatite aguda ocorre um aumento da AMY após 5 a 8 horas dos primeiros sintomas. A magnitude da elevação da atividade da enzima no soro não está relacionada com a severidade do envolvimento pancreático, contudo quanto maior o aumento maior a probabilidade de pancreatite aguda. Parte da AMY removida da circulação ocorre via excreção renal para a urina. Quando comparada com a amilase sérica, a amilase urinária atinge concentrações superiores e persiste por períodos mais prolongados. A especificidade clínica da AMY para o diagnóstico de pancreatite aguda é baixa (20 a 60%, dependendo da população), tendo em conta que podem ser observadas elevações da sua concentração noutras patologias, como patologias do trato biliar (colecistite), obstrução intestinal, ulcera péptica, aneurisma roto da aorta entre outros.

Em situações em que se observa uma diminuição da atividade sérica da P-AMY (inferior ao I.R.), esta revela com grande especificidade insuficiência exócrina pancreática, tornando desnecessárias provas funcionais para o pâncreas. Se, por outro lado, a P-AMY se encontrar normal não deve ser excluída a redução da função pancreática.^[6,33]

G.2. Lipase

A lipase pancreática humana (LPS) é uma glicoproteína de cadeia única com um peso molecular de 48,000 Da. O gene para a LPS reside no cromossoma 10. A concentração no pâncreas é cerca de 5000 vezes superior à dos outros tecidos. Para que a sua atividade

catalítica seja máxima e com maior especificidade, é necessária a presença de sais biliares e um cofator, segregado pelo pâncreas, designado de colipase.

As lípases definem-se como enzimas capazes de hidrolisar ésteres de glicerol dos ácidos gordos de cadeia longa. Apenas as ligações éster dos carbonos 1 e 3 (posições α) são atacadas, tendo como produto de reação 2 moles de ácidos gordos e 1 mole de 2-acilglicerol (β -monoglicerídeo).

A LPS atua na interface entre a água e o substrato, apenas quando este se encontra emulsificado. A sua velocidade catalítica depende da área de superfície, e os ácidos biliares asseguram que o substrato disperso se encontra livre de outras proteínas, incluído enzimas lipolíticas. A colipase liga a micela de sais biliares, formando o complexo colipase-sais biliares que reconfigura a estrutura da colipase com a subsequente exposição de um local de alta afinidade e especificidade para a LPS, ancorando-a à superfície do substrato e permitindo desta forma a sua atividade.

A maioria da atividade da LPS encontrada no soro deriva do pâncreas, contudo pode ser segregada pelas mucosas gástrica, pulmonar ou intestinal. Enquanto molécula de reduzidas dimensões a LPS é filtrada no glomérulo, sendo totalmente reabsorvida nos túbulos renais, motivo pelo qual não é fisiologicamente detetada na urina.

A medição sérica da LPS é usada no diagnóstico de pancreatite aguda, tendo uma sensibilidade clínica de 80 a 100% dependendo do *cutoff* utilizado ou população em estudo. Após o evento de pancreatite aguda, a LPS sérica aumenta em 4 a 8h apresentando o seu pico de atividade às 24h, surgindo diminuída nos 7 a 14 dias posteriores. O aumento da LPS sérica não é sinónimo de proporcionalidade em relação à severidade da patologia. A pancreatite aguda é muitas vezes difícil de diagnosticar uma vez que pode ser confundida com outras patologias, nomeadamente úlcera duodenal, obstrução intestinal ou obstrução vascular mesentérica.

No diagnóstico diferencial de pancreatite aguda, a elevação sérica da LPS superior a 3 vezes o limite superior do intervalo de referência, na ausência de falha renal, é mais específico do que o aumento da AMY sérica.

De realçar ainda que a concentração de LPS permanece elevada durante um período mais prolongado que o observado na AMY (Fig. 6) Desta forma, é recomendado que a LPS deva substituir a AMY como teste de diagnóstico inicial para a pancreatite aguda.^[6,33]

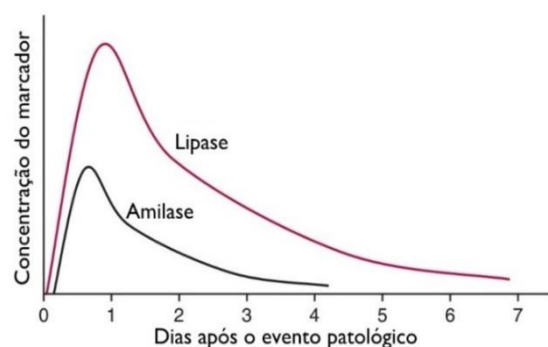


Fig. 6. Curso serológico da concentração da lipase e amilase em relação ao tempo.^[33]

H. Glicemia e diabetes

A diabetes *mellitus* (DM) refere-se a um grupo de desordens metabólicas comuns que partilham o fenótipo de hiperglicemia. Vários tipos distintos de DM são provocados por uma complexa interação de fatores tanto genéticos como ambientais. Dependendo da etiologia da DM, os fatores que contribuem para a hiperglicemia incluem secreção reduzida de insulina, e diminuição da utilização de glicose. A desregulação metabólica associada à diabetes, provoca alterações fisiopatológicas secundárias em múltiplos sistemas de órgãos, com um tremendo custo tanto para o indivíduo como para o sistema de saúde. A diabetes é a causa principal da doença renal em estado terminal, a causa mais frequente para amputações não traumáticas, e de cegueira nos adultos com idades compreendidas entre 20 a 74 anos. A neuropatia diabética ocorre em 60 a 70% dos diabéticos, contudo a maioria das mortes relacionadas com a diabetes devem-se à doença aterosclerótica. Indivíduos diabéticos têm entre 2 a 4 vezes maior probabilidade de desenvolver patologia cardio ou cerebrovascular do que os não diabéticos. Felizmente, em anos recentes, com o maior controlo da glicemia e pressão arterial, o uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina ou bloqueadores do recetor da angiotensina para promover uma melhor renoproteção, o uso de estatinas no sentido de diminuir o colesterol LDL, e de um melhor tratamento do pé diabético, as complicações associadas com a diabetes têm vindo a decrescer. Em todo caso, tendo em conta uma cada vez maior incidência mundial, é provável que no futuro a diabetes *mellitus* seja a principal causa de morbilidade e mortalidade.^[36,37]

H.1. Classificação

A Diabetes *Mellitus* é classificada tendo por base o processo patogénico que origina hiperglicemia, contrário ao anterior critério baseado na idade de desenvolvimento dos primeiros sintomas ou tipo de terapia. Existem duas amplas categorias, designadas de tipo 1 e tipo 2. Contudo, existe um crescente reconhecimento de outras formas de diabetes com um cada vez maior conhecimento da sua fisiopatologia. Estas formas de diabetes podem partilhar características da tipo 1 e /ou tipo 2. A DM tipo 1 resulta de uma deficiência total, ou próxima do total, em insulina. A tipo 2 é um grupo heterogéneo de desordens caracterizado por variados graus de resistência à insulina, e secreção insulínica alterada. Defeitos metabólicos e genéticos distintos na ação/secreção de insulina promovem a hiperglicemia, o fenótipo comum da diabetes tipo 2, apresentando um importante potencial como alvos terapêuticos tendo em conta que existem agentes farmacológicos específicos para estas anomalias metabólicas.^[36,38]

H.1.1. Diabetes Mellitus tipo 1

Aproximadamente 5 a 10 % de todos os casos de DM são incluídos nesta categoria. Comumente os pacientes apresentam uma manifestação abrupta dos sintomas (poliúria, polidipsia, perda rápida de peso). Apresentam insulinoopenia provocada pela perda de células β dos ilhéus de Langerhans e são dependentes da administração de insulina para sobreviver e prevenir a cetoacidose. A maioria dos pacientes tem anticorpos que permitem identificar um processo autoimune, contudo existem outros onde não surge evidência de autoimunidade, sendo por isso considerados de tipo 1 idiopático.^[36,38]

H.1.2. Diabetes Mellitus tipo 2

Neste grupo encontram-se cerca de 90% de todos os casos de diabetes. Os pacientes apresentam uma sintomatologia mínima, e não estão predispostos para cetoacidose. A concentração insulínica pode ser normal, diminuída ou aumentada, e na maioria das pessoas com esta forma de diabetes a insulina apresenta uma ação anômala (resistência periférica à insulina). A obesidade está vulgarmente associada. Contudo, muitos diabéticos tipo 2 podem necessitar de dieta específica, agentes orais hipoglicemiantes ou mesmo insulina para controlo da hiperglicemia.^[36,38]

H.1.3. Outros tipos específicos de diabetes

Esta subclasse inclui pacientes incomuns, nos quais a hiperglicemia é devida a uma desordem específica subjacente, como defeitos genéticos da função das células β ; defeitos genéticos na ação da insulina; doença do pâncreas exócrino; endocrinopatias (síndrome de Cushing, acromegalia, glucagonoma); administração de hormonas ou fármacos conhecidos por induzir disfunção (dilantina, pentamindina) ou desregular a ação da insulina (glucocorticoides, tiazidas, β -adrenérgicos); infeção; formas incomuns de diabetes autoimune; ou outras condições genéticas (síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, porfíria). Esta forma foi anteriormente designada de diabetes secundária.^[36,38]

H.1.4. Diabetes Mellitus gestacional

A diabetes *mellitus* gestacional (DMG) define-se como qualquer grau de intolerância à glucose primeiramente reconhecida durante a gravidez (mulheres diabéticas que eventualmente engravidem não se incluem nesta categoria). As estimativas da frequência de tolerância anormal à glucose durante a gravidez variam entre 1 a 14%, dependendo da população em estudo e da metodologia utilizada. As mulheres com DMG têm um risco aumentado de desenvolver diabetes tipo 2. Este risco é particularmente elevado em

mulheres que durante ou logo após a gravidez tenham hiperglicemia marcada, mulheres obesas, e naquelas em que foi diagnosticada DMG antes das 24 semanas de gestação. Todas as mulheres que apresentaram DMG devem ser avaliadas para a diabetes às 6 e às 12 semanas pós-parto. Caso não seja diagnosticada diabetes, devem ser reavaliadas com a regularidade de 3 anos.^[36,38]

H.2. Diagnóstico

Segundo despacho normativo da Direção-Geral da Saúde (DGS) para a classificação e diagnóstico da *Diabete Mellitus*, o diagnóstico da diabetes é feito tendo por base os seguintes valores e parâmetros para o plasma venoso na população em geral:

- a) Glicemia em jejum ≥ 126 mg/dl (ou $\geq 7,0$ mmol/l); ou
- b) Sintomas clássicos + glicemia ocasional ≥ 200 mg/dl (ou $\geq 11,1$ mmol/l); ou
- c) Glicemia ≥ 200 mg/dl (ou $\geq 11,1$ mmol/l) às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75g de glicose; ou
- d) Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$.

O diagnóstico da Diabetes Gestacional envolve 2 fases temporalmente diferentes: glicemia em jejum na primeira consulta, e prova de tolerância à glicose oral (PTGO) às 24-28 semanas de gestação. Os valores obtidos devem ser interpretados da seguinte forma:

- a) Um valor de glicemia plasmática em jejum <92 mg/dl (5,1 mmol/L) implica a realização, entre as 24-28 semanas de gestação, de PTGO com sobrecarga de 75 g de glicose.
- b) Um valor da glicemia plasmática em jejum ≥ 92 mg/dl (5,1 mmol/L) e <126 mg/dl (7,0 mmol/L) faz o diagnóstico de DG, não sendo necessário a realização de PTGO.
- c) Um valor de glicemia plasmática em jejum ≥ 126 mg/dl (7 mmol/L) ou um valor de glicemia plasmática ocasional >200 mg/dl (11,1 mmol/L), indicia provavelmente a existência de uma diabetes anterior à gravidez. Caso exista uma HbA1c $\geq 6,5\%$ ela deve ser interpretada como critério de diagnóstico de provável diabetes prévia.^[39]

H.3. Hemoglobina glicada.

A hemoglobina (Hb) de humanos adultos é normalmente consistida por HbA (97%), HbA₂ (2,5%) e HbF (0,5%). A HbA é uma estrutura quaternária composta de 4 cadeias polipeptídicas, 2 α - e 2 β -. Através da análise cromatográfica da HbA foram identificadas

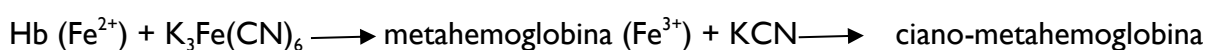
várias hemoglobinas menos relevantes, nomeadamente, a HbA_{1a}, HbA_{1b}, e a HbA_{1c}, que coletivamente se denominam de HbA₁, hemoglobinas rápidas (velocidade de migração num campo elétrico superior à HbA), glicohemoglobinas ou hemoglobinas glicadas. HbA_{1c} é formada pela condensação da glicose com o resíduo valina na posição N-terminal de cada cadeia β da HbA para formar uma base de Schiff instável. A base de Schiff pode dissociar ou sofrer um rearranjo Amadori para formar uma cetoamina estável, HbA_{1c}. A HbA_{1a1} e HbA_{1a2}, que compõem HbA_{1a}, têm frutose-1,6-difosfato e glicose-6-fosfato ligados ao terminal amínico da cadeia-β, respetivamente. A HbA_{1c} e outras frações da hemoglobina podem ser separadas através de HPLC, que se baseia na cromatografia de troca catiónica.^[38]

Hematologia

Hemograma

Na secção de hematologia uma das análises de rotina mais frequentemente solicitadas é sem dúvida o hemograma. Este consiste na avaliação quer qualitativa quer quantitativa dos elementos celulares sanguíneos. Atualmente este procedimento está automatizado e recorre a tecnologia de citometria de fluxo (Anexo H), permitindo a contagem e diferenciação das populações celulares (eritrócitos, leucócitos, plaquetas), determinação do hematócrito (percentagem de eritrócitos, na massa do sangue, após centrifugação, em % ou litro/litro) e respetivos índices eritrocitários (MCV, volume corpuscular médio; MCH, hemoglobina corpuscular média; MCHC, concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW, *Red Cell Distribution Width*), leucograma e contagem de reticulócitos. Para este procedimento utilizam-se habitualmente tubos de colheita com anticoagulantes, nomeadamente EDTA, citrato de sódio (quelantes de cálcio), e heparina (complexa com a antitrombina prevenindo a formação de trombina) (Anexo I). A avaliação do hemograma deve ser efetuada de forma global e integrada, em conjugação com a informação recolhida nas outras valências do LAC (i.e. Vitamina B12, Folato, Fe) permitindo antever a necessidade de testes complementares como a realização de esfregaço de sangue periférico.

A determinação da hemoglobina é baseada no método hemoglobinocianida como se exemplifica na reação seguinte, onde a absorvância de cianomethemoglobina a 540 nm é directamente proporcional à [Hb].



O volume corpuscular médio (MCV) reflete o volume médio dos eritrócitos, e é expresso em femtolitros (fL), ou 10^{-15} L:

$$\text{MCV} = \frac{\text{HCT (\%)} \times 10}{\text{RBC count} (\times 10^{12}/\text{L})}$$

A hemoglobina corpuscular média (MCH) é a massa média de hemoglobina presente num eritrócito, expressa em picogramas (pg), ou 10^{-12} g:

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

A concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) reflete a concentração média de hemoglobina em cada eritrócito. As unidades utilizadas são gramas por decilitro (anteriormente em percentagem):

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

O RDW (*Red Cell Distribution Width*) representa o índice de anisocitose eritrócitária (variação de tamanho), expresso em percentagem da variação dos volumes obtidos, manifestando a heterogeneidade da distribuição do tamanho dos eritrócitos. É particularmente útil no diagnóstico diferencial entre anemias de doença crónica, talassemia *minor*, e anemia ferripriva. O RDW (normal: $13,4 \pm 1,2\%$) é frequentemente superior na anemia ferripriva do que nas talassemias *minor*.^[40]

A. Hematopoiese

A hematopoiese é um processo regulado e contínuo da produção das células do sangue que inclui renovação, proliferação, diferenciação, e maturação celular (Anexo A). Destes processos resultam a formação, desenvolvimento, e especialização de todas as células funcionais sanguíneas, libertadas da medula óssea para a corrente sanguínea. O sistema hematopoiético serve como um modelo funcional para o estudo da biologia das células estaminais, proliferação, maturação e a sua contribuição para a doença e reparação tecidual. Esta hipótese é baseada na observação que as células sanguíneas apresentam uma duração limitada (120 dias para os eritrócitos), e existe uma população celular capaz de se renovar e manter o sistema. As células estaminais hematopoiéticas são capazes de se auto-renovar e diferenciar-se diretamente em todas as linhagens necessárias.

Nos adultos saudáveis a hematopoiese restringe-se primariamente à medula óssea. Durante o desenvolvimento fetal a distribuição sequencial das células inicia-se no saco vitelínico progride posteriormente para a região *aorta-gonad mesonephros* (fase mesoblástica), ulteriormente para o fígado fetal (fase hepática), e finalmente para a medula óssea (fase medular).^[41]

Fase mesoblástica

Considera-se que a hematopoiese tem início aproximadamente ao 19º dia de desenvolvimento embrionário após a fertilização. No desenvolvimento embrionário inicial, as células da mesoderme migram para o saco vitelínico. Algumas destas células formam eritroblastos primitivos na cavidade central do saco vitelínico, enquanto as restantes (angioblastos) delimitam a cavidade do saco vitelínico formando eventualmente os vasos sanguíneos. Estes eritroblastos primitivos, mas transientes, do saco vitelínico são importantes na embriogénese inicial no sentido de produzir hemoglobina (Gower-I, Gower-2, Portland), necessária para a distribuição de oxigénio aos tecidos embrionários em rápido desenvolvimento.

As células com origem mesodérmica também migram para a região *aorta-gonad mesonephros* (AGM), dando origem às células estaminais hematopoiéticas (HSC) para a hematopoiese permanente ou definitiva nos adultos. A região AGM foi anteriormente considerada o único local de hematopoiese definitiva durante o desenvolvimento embrionário. Contudo, evidências recentes revelam que as HSC se desenvolvem, e a hematopoiese definitiva ocorre no saco vitelínico. Desta forma, a origem precisa das HSC do adulto permanece por esclarecer.^[41]

Fase hepática

A fase hepática da hematopoiese inicia-se às 5 a 7 semanas de gestação e é caracterizada pelo reconhecimento de clusters evidentes de eritroblastos, granulócitos, e monócitos em processo de colonização do fígado fetal, timo, baço, placenta, e finalmente o espaço medular ósseo no final da fase medular. Estes nichos variados suportam o desenvolvimento de HSC que migram para eles. Os eritroblastos em desenvolvimento sinalizam o início da hematopoiese definitiva com um declínio da hematopoiese primitiva no saco vitelínico. Surgem também as primeiras células linfoides. A hematopoiese durante esta fase ocorre extravascularmente, com o fígado a permanecer o principal local da hematopoiese durante o segundo trimestre da gravidez. No fígado fetal a hematopoiese tem o seu pico ao 3º mês de desenvolvimento fetal, com um declínio gradual após o 6º mês, e mantendo atividade residual até à segunda semana após o nascimento. Os órgãos em desenvolvimento como o baço, rim, timo, e nódulos linfáticos contribuem para o processo hematopoiético durante esta fase. O timo, o primeiro órgão completamente desenvolvido no feto, surge como o principal local de produção de células T, produzindo o fígado e baço células B.

A produção de megacariócitos tem também início durante a fase hepática. O baço diminui gradualmente a produção granulocítica assumindo apenas a linfopoiese. Durante a fase hepática, a hemoglobina fetal (Hb F) é a hemoglobina predominante, podendo, contudo, existir níveis detetáveis de hemoglobina adulta (Hb A).^[41]

Fase medular (mieloide)

Antes do quinto mês de desenvolvimento fetal, a hematopoiese inicia-se na cavidade da medula óssea. Esta transição é designada de hematopoiese medular uma vez que ocorre na medula ou parte interior do osso. Durante a fase mieloide, as HSC e as células mesenquimatosas migram para o cerne do osso. As células mesenquimatosas, um tipo de tecido embrionário, diferenciam-se em elementos estruturais (células do estroma, tais como

células endoteliais e células adventícias reticulares) que suportam as células sanguíneas em desenvolvimento. A atividade hematopoiética, especialmente a mieloide, é evidente durante esta fase de desenvolvimento, e a razão mieloide/eritroide gradualmente aproxima-se de 3:1 (nível no adulto). Após as 24 semanas de gestação, a medula óssea aparece como o principal local da hematopoiese. Nesta altura podem ser detetados níveis mensuráveis de eritropoietina (EPO), fator estimulante de colónias de granulócitos (G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*), factor estimulante de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), e hemoglobina F e A. Podem ainda ser observadas células em vários estádios de maturação de todas as linhagens celulares.^[41]

A.1. Tecidos hematopoiéticos no adulto

Nos adultos, o tecido hematopoiético localiza-se na medula óssea, nódulos linfáticos, baço, fígado e timo. A medula óssea contem as linhagens celulares eritroide, mieloide, megacariocítica e linfoide. O desenvolvimento da linhagem linfoide ocorre nos órgãos linfoides primários. O tecido linfoide primário está presente na medula óssea e timo. O tecido linfoide secundário, local onde as células interagem e respondem a antígenos estranhos, está presente no baço, nódulos linfáticos, e tecido linfoide associado a mucosas (MALT, *mucosa-associated lymphoid tissue*).

A.1.1. Medula óssea

A medula óssea normal contem 2 principais componentes: a medula vermelha, medula hematopoieticamente ativa consistindo de células em desenvolvimento e diferenciação e seus progenitores, e a medula amarela, inativa hematopoieticamente composta principalmente de adipócitos, células mesenquimatosas indiferenciadas e macrófagos. Durante a infância, todos os ossos no corpo contêm principalmente medula vermelha. Entre os 5 e 7 anos de idade há uma substituição progressiva por medula amarela nos ossos longos. Este processo de substituição por adipócitos designa-se de retrogressão, resultando eventualmente na restrição, no adulto, da medula óssea ativa ao esterno, vertebrae, pélvis, crânio, e porção proximal dos ossos longos. A medula amarela tem a capacidade de reverter para medula ativa em casos de necessidade aumentada de produção celular, tais como situações de perda de sangue ou hemólise.

A medula óssea contem células hematopoiéticas, células do estroma, e vasos sanguíneos (artérias, veias, e sinus vasculares). As células do estroma têm origem nas células mesenquimatosas que migram para a cavidade central do osso. Estas incluem as células endoteliais, adipócitos, osteoblastos, e células adventícias reticulares (fibroblastos). As

células endoteliais regulam o fluxo de partículas que entram e abandonam os espaços hematopoéticos dos sinus vasculares. Os adipócitos despenham um papel na regulação do volume da medula óssea onde a hematopoiese ativa ocorre. Segregam ainda citocinas e fatores de crescimento que podem estimular as HSC e promover a homeostase do osso. Os macrófagos funcionam como fagócitos e tanto estes como os linfócitos segregam várias citocinas que regulam a hematopoiese. As células do estroma segregam uma matrix extracelular semifluida que serve de ancoragem para as células hematopoiéticas. Esta matrix é composta por variadas substâncias como a fibronectina, laminina, trombospondina e proteoglicanos (Hialuronato, sulfato de condroitina). As células do estroma desempenham um papel essencial na regulação sobrevivência e diferenciação das células estaminais hematopoiéticas.

O microambiente indutivo hematopoiético, ou nicho, desempenha um papel central na nutrição e proteção das HSC, bem como na regulação do equilíbrio entre a quiescência, autorrenovação e diferenciação. Determinadas células do estroma, como os osteoblastos, células endoteliais, as células estaminais mesenquimatosas, as células reticulares CXCL12, e também os macrófagos desempenham um papel central no suporte das HSC nos nichos da medula óssea. As HSC existem num estado predominantemente quiescente, através da interação íntima com os osteoblastos produtores de trombopoietina.^[41]

As células estaminais hematopoiéticas por definição têm a capacidade de autorrenovação, são pluripotentes e dão origem a uma progénie diferenciada, sendo ainda capazes de reconstituir o sistema hematopoiético do hospedeiro. As HSCs indiferenciadas podem subsequentemente diferenciar-se em células progenitoras comprometidas tanto com a linhagem linfóide como mieloide. Estas células progenitoras específicas de linhagem como o progenitor linfóide comum, que prolifera e se diferencia nas linhagens de linfócitos T e B, NK (natural killer), e células dendríticas; e o progenitor mieloide comum, que prolifera e se diferencia nas linhagens eritrocítica, granulocítica, monocítica e megacariocítica. Embora exista na medula óssea um número limitado de HSCs, são produzidas cerca de 6 mil milhões de células hematopoiéticas por quilograma de peso todos os dias. A maioria das células da medula óssea são precursoras em vários estádios de maturação.

As HSCs são direcionadas para um de três possíveis destinos: auto-renovação, diferenciação ou apoptose. A regulação extrínseca envolve sinais de proliferação e diferenciação a partir de nichos especializados hematopoiéticos. Algumas citocinas regulam a proliferação e diferenciação, tais como ligando KIT, a trombopoietina (TPO) e ligando FLT3. A regulação intrínseca envolve genes como o TAL1, que é expresso nas células do hemangioblasto, uma célula progenitora bipotencial de origem mesodérmica que dá origem

às linhagens endotelial e hematopoiética; e o gene GATA2, que é expresso tardiamente nas HSCs. A identificação e origem das HSCs pode ser determinada por análise imunofenotípica recorrendo a citometria de fluxo. As primeiras HSCs humanas identificáveis são as CD34⁺, CD38⁻, HLA-DR^{low}, Thy₁^{low}, e Lin⁻.

No decorrer da diferenciação das células hematopoiéticas, surgem associadas alterações morfológicas, incluindo diminuição do volume celular, diminuição da relação núcleo/citoplasma. Podem surgir alterações adicionais, como a perda do nucléolo, diminuição do diâmetro do núcleo, condensação da cromatina nuclear, com possível alteração da forma nuclear ou mesmo da sua perda. No citoplasma, ocorre diminuição da basofilia com possível apresentação de grânulos.^[41]

A.2. Eritropoiese

A eritropoiese ocorre na medula óssea, e é um processo complexo e altamente regulado para a manutenção de um número adequado de eritrócitos no sangue periférico. As CFU-GEMM dão origem às primeiras colônias identificáveis de eritrócitos, designadas de BFU-E (*burst-forming unit-erythroid*). Estas produzem colônias de grandes dimensões agregadas em multiclusters. As BFU-Es contêm poucos recetores para a EPO, e o seu ciclo não é influenciado significativamente pela EPO exógena. Contudo, sob a influência de IL-3, GM-CSF, TPO e ligando KIT desenvolvem-se em colônias CFU-E. Estas por sua vez têm inúmeros recetores para a EPO, sendo imperativa a sua ação. A EPO serve como um fator de diferenciação e provoca a diferenciação das CFU-E em pronormoblastos, o primeiro precursor reconhecível na medula óssea.

A EPO é uma glicoproteína específica de linhagem, produzida nas células intersticiais peritubulares renais, contudo alguma EPO pode ser produzida no fígado. A disponibilidade de oxigénio no rim serve de estímulo para ativar a produção e secreção de EPO. Esta exerce o seu efeito através da ligação de recetores transmembranares, expressos nos precursores e progenitores eritroides, promove o recrutamento de CFU-E, previne a apoptose de progenitores eritroides, e induz a síntese de hemoglobina.

A proliferação eritroblástica (normoblástica), semelhante a outras linhagens celulares, é um processo que envolve replicação (mitoses) para aumentar o número de células, desenvolvendo-se de estádios imaturos para maturação celular (Fig. 7). O Proeritroblasto, capaz de se dividir, com cada uma das células filhas dando origem ao estádio seguinte, o eritroblasto basofílico (Anexo B). Este por sua vez sofre nova divisão dando origem a duas células filhas que originam o eritroblasto policromático. Na linha celular eritroide existem 3 e ocasionalmente 5 divisões, com a subsequente maturação nuclear e citoplasmática,

formando desta forma entre 8 a 32 eritrócitos maduros a partir de um proeritroblasto (pronormoblasto).^[42,43]

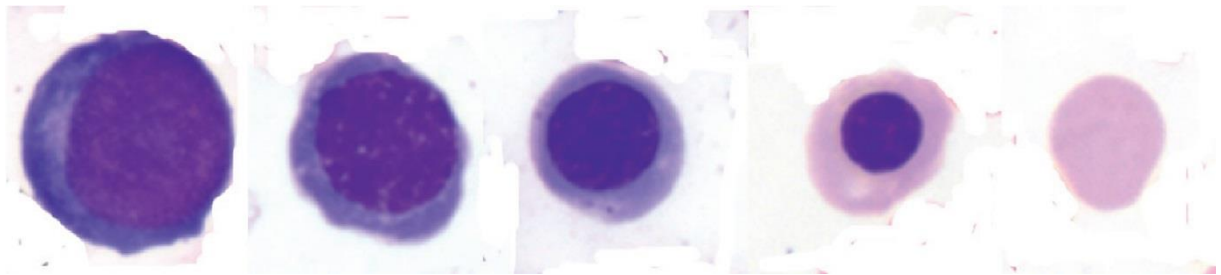


Fig. 7. Sequência maturativa eritroblástica. Proeritroblasto; Eritroblasto basofílico; Eritroblasto policromático; Eritroblasto ortocromático; Reticulócito. Eritrócito não representado.^[44]

A.3. Leucopoiese

A leucopoiese (Anexo A; C; E) pode ser subdividida em 2 grandes categorias: a mielopoiese e linfopoiese. Os fatores que promovem a diferenciação de CFU-GEMM em neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos incluem GM-CSF, G-CSF, M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*), IL-3, IL-5, IL-11, e ligando KIT. A GM-CSF estimula a proliferação e diferenciação de colônias de neutrófilos e macrófagos. A IL-3 é um fator estimulante multilinhagem, promovendo a formação de células eritroides, granulócitos, monócitos e megacariócitos.

Os eosinófilos requerem GM-CSF, IL-5, e IL-3 para a sua diferenciação. A diferenciação dos basófilos permanece menos clara, mas é provável depender da presença de IL-3 e ligando KIT. Os fatores promotores da diferenciação linfóide incluem IL-2, IL-7, IL-12 entre outros.^[42,45]

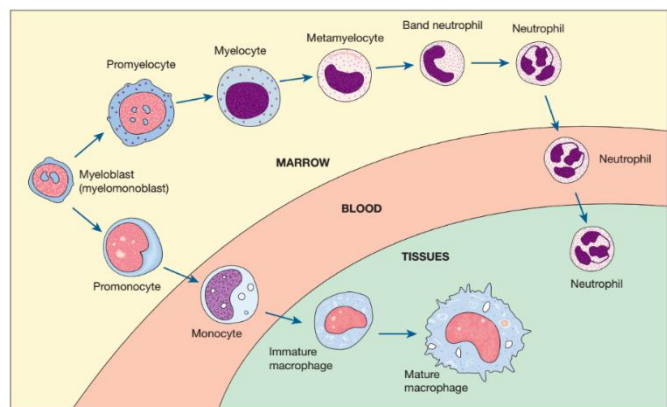


Fig.8. Representação esquemática da maturação mielomonocítica.^[45]

Destaca-se a granulopoiese da linhagem neutrofílica com a sequência maturativa celular e seus representantes. Os restantes representantes mielóides granulocíticos (basófilos, eosinófilos, monócitos) têm um progenitor comum e características maturativas idênticas (com exceção dos monócitos) (Fig.9) com diferenças nos representantes celulares em fase mais avançada do processo maturativo, como a composição dos grânulos citoplasmáticos, número de lóbulos nucleares, representação percentual no sangue periférico, e funções imunológicas atribuídas (Anexo D). Segue-se, como exemplo, a sequência maturativa da linhagem mielóide neutrofílica.

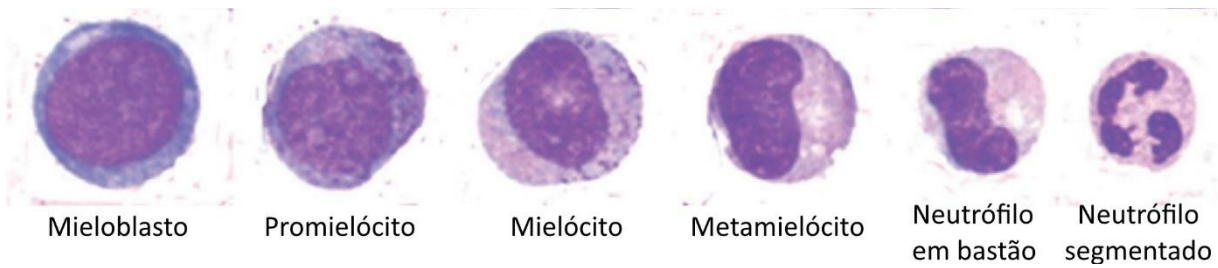


Fig. 9. Granulopoiese neutrofilica.[46]

Os neutrófilos integram o sistema imunitário inato tendo como principal função a fagocitose e destruição de microrganismos e material estranho. Este processo envolve a procura (quimiotaxia, mobilidade e diapedese) e a destruição (fagocitose e digestão) de agentes ou material estranho. Através de recetores membranares os neutrófilos reconhecem diretamente agentes patogénicos, células apoptóticas, e partículas, ou por outro lado reconhecem moléculas opsónicas ligadas ao material estranho, como anticorpos ou componentes do complemento. Após o reconhecimento, a partícula estranha é envolvida por pseudópodes formando-se o fagossoma que permite a associação do complexo NADH oxidase, ligado à membrana do fagossoma, que vai gerar ROS tais como H_2O_2 , que é convertido a hipoclorito pela mieloperoxidase, processo globalmente designado por *respiratory burst*. A fusão dos grânulos primários e secundários com o fagossoma permite a libertação de enzimas hidrolíticas e moléculas bactericidas.[45]

A.4. Megacariopoiese

A megacariopoiese é influenciada inicialmente por GM-CSF, IL-3, IL-6, ligando KIT e TPO. O fator estimulante hormonal TPO (também designado de ligando MPL) juntamente com a IL-11, controlam a produção e libertação de plaquetas (Fig.10.). O fígado é o principal local de produção de TPO.

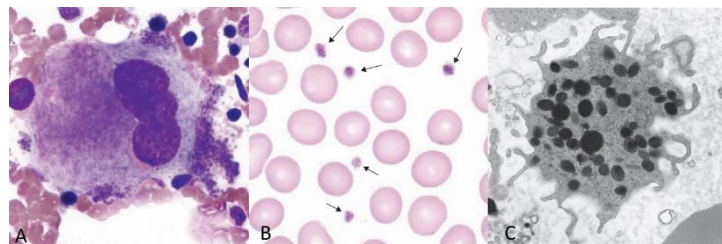


Fig.10. (A) Megacariócito MK III M.O.; Plaquetas S.P. (B), microscopia eletrónica (C)[43]

As plaquetas têm 3 funções principais durante a resposta hemostática: adesão, agregação e reações de libertação e amplificação. A agregação estabelece-se entre as moléculas plaquetares GPIIb/IIIa, expressas à sua superfície, e o fibrinogénio por ligações cruzadas intermediadas pelo fator de von Willebrand (vWF).[43,45]

B. Anemia

A anemia é definida funcionalmente como uma insuficiência na massa de eritrócitos, para fornecer adequadamente oxigênio aos tecidos periféricos, tendo presente a idade, gênero e etnia. Em termos práticos, qualquer uma das 3 medições de concentração, efetuadas no sangue total, podem ser utilizadas para estabelecer a presença de anemia: concentração de hemoglobina (Hb), tipicamente expressa em g/dL; hematócrito, que significa a proporção de sangue representada pelos eritrócitos, expressa em porcentagem; e a concentração de hemácias por litro.^[45,47,48]

A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu a anemia nos adultos para valores de hemoglobina <13 g/dL em homens (hematócrito [Hct] ~ 39), e para as mulheres hemoglobina <12 g/dL (Hct ~ 36).^[47,48]

Os sistemas de classificação para a anemia enfatizam por um lado o volume das hemácias e por outro o mecanismo subjacente à redução do número de células eritrocitárias. Os esquemas morfológicos agrupam a anemia em 3 classes, baseadas no volume corpuscular médio (MCV): (1) normocíticas (MCV 90-100); (2) macrocíticas (MCV >100); e (3) microcíticas (MCV <80). Em algumas patologias as hemácias podem variar consideravelmente. No hipotireoidismo, por exemplo, os eritrócitos podem ser normocíticos ou macrocíticos (Fig. 11).

As anemias microcíticas representam anomalias na síntese de hemoglobina, por ferro inadequado, formação anômala das globinas, ou deficiências na síntese do heme e porfirina que ocorrem em determinados tipos de anemias sideroblásticas, como o envenenamento por chumbo ou deficiência de piridoxina. A causa mais comum para anemia microcítica é devida à deficiência de ferro. A segunda causa mais frequente é a doença crônica, com uma ocorrência de microcitose em cerca de 30% dos casos. Uma das componentes fisiopatológicas desta desordem é a redução na transferência de ferro dos macrófagos da medula óssea para o plasma. A formação anômala de globinas que origina anemia microcítica ocorre em casos de talassemia e em algumas hemoglobinopatias, como a hemoglobina C e E.

As anemias macrocíticas podem ocorrer devido a vários mecanismos. A síntese anormal de DNA, devida mais comumente a deficiências de ácido fólico e vitamina B12, provoca precursores eritroides anormalmente grandes (megaloblastos) na medula óssea. Outras etiologias são as desordens na síntese de DNA ou fármacos que interfiram com ela. A anemia macrocítica ocorre frequentemente nas síndromes mielodisplásicas devido à alteração da maturação dos eritrócitos, provocada pela expansão clonal anormal das HSC. A Macrocitose (MCV 100-110 fL), com ausência de anemia, está presente em 60% dos

alcoólicos. A causa não é a deficiência em ácido fólico ou vitamina B12 mas sim o efeito direto do etanol na medula óssea. Uma outra fonte de anemia macrocítica é a hemólise ou hemorragia, pelo facto dos eritrócitos libertados pela medula óssea não terem atingido a maturação desejada, podendo ser encontrados reticulócitos e eritrócitos ortocromáticos no sangue periférico.

A anemia normocítica pode ter causas muito dispares. Em situações de hemorragia ou hemólise aguda, a medula óssea responde maximamente através do aumento da produção de eritrócitos, libertando-os de forma prematura. Contudo, noutras formas de anemia macrocítica a resposta da medula óssea surge reduzida devido a patologias intrínsecas, ferro insuficiente, e efeito da EPO inadequado. As desordens intrínsecas da medula óssea incluem: (1) diminuição dos precursores eritroides, em casos de anemia aplástica ou pós quimioterapia; (2) infiltração de tecido anormal na medula óssea, tal como na fibrose e leucemia; e (3) desordens mielodisplásicas, onde a maturação anormal dos eritrócitos leva à sua morte ainda na medula óssea. Na deficiência de ferro, a anemia normocítica ocorre normalmente antes da progressão para a microcitose. O efeito inadequado da EPO pode desenvolver-se por: (1) produção diminuída na doença renal; (2) estimulação reduzida, em alguns casos de hipotiroidismo e hipogonadismo; ou (3) interferência tanto na produção como no seu efeito na medula óssea, provocada pela presença de citocinas inflamatórias, integrantes da patogénese da anemia na doença crónica.^[45,47,48]

B.1. Mecanismos de anemia

Existem 3 grandes categorias que levam a anemia: por perda de sangue, anemia hipoproliferativa, e anemia hemolítica. Quando o sangue é perdido através de hemorragia aguda, podem decorrer várias horas para que ocorra um declínio na concentração da hemoglobina, devido ao tempo necessário para a restauração do equilíbrio e volume do plasma. Podem ainda decorrer vários dias para que seja notada reticulocitose. A hemorragia crónica leva em última análise a anemia hipoproliferativa devido à deficiência em ferro inerente (Fig.11.).

O termo anemia hipoproliferativa refere-se à incapacidade de produzir um número adequado de eritrócitos em resposta a sinais apropriados. Embora existam diferentes causas, a característica típica da anemia hipoproliferativa é a redução da contagem de reticulócitos. A etiologia subjacente pode estar relacionada com hipoproliferação dos precursores na medula óssea, como quando ocorre invasão celular da medula óssea por elementos estranhos (mielofitose) com afeção funcional (infecção, neoplasia), ou em situações de

maturação anormal dos precursores na medula óssea, em situações de anemia megaloblástica (deficiência em folato, deficiência em vitamina B12, síndrome mielodisplásico).

Como referido anteriormente, a causa mais frequente para anemia hipoproliferativa é a deficiência em ferro (hipocrômica), nas crianças surge principalmente por dieta deficitária, e em cerca de 4% das mulheres a conjugação de dieta deficitária juntamente com a menstruação ou o parto, agrava o curso da ferropenia. Em idosos a deficiência em ferro tem como causa principal a perda de sangue a nível gastrointestinal. A inflamação crónica ou aguda bem como a doença renal são etiologias comuns para anemia hipoproliferativa. Situações de insuficiência medular ou da sua substituição (mieloftise), provocadas por patologias hematológicas ou tumores sólidos, são causas menos frequentes de anemia, e são muitas vezes acompanhados de outras manifestações hematológicas, como leucopenia ou trombocitopenia.

As causas de anemia hemolítica são diversas e podem ser congénitas ou adquiridas. A característica padrão deste tipo de anemia é a contagem de reticulócitos elevada. Outros aspetos frequentemente associados à anemia hemolítica incluem a elevação da lactato

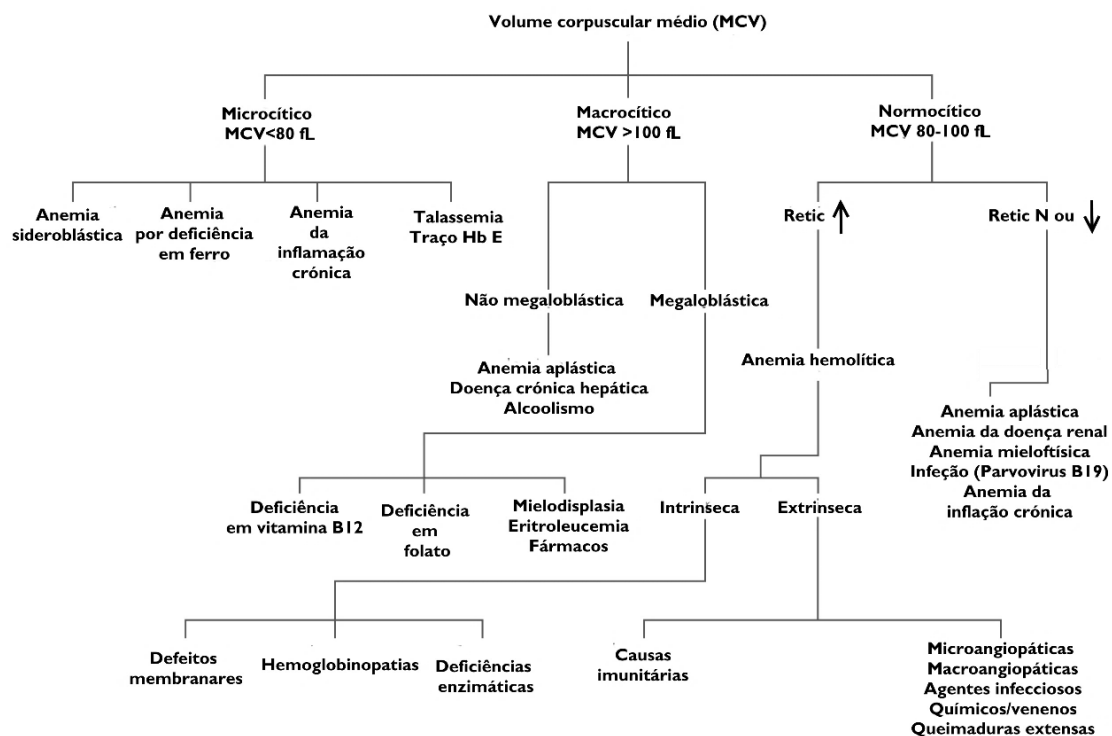
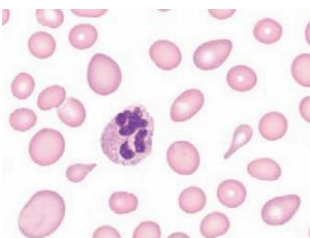
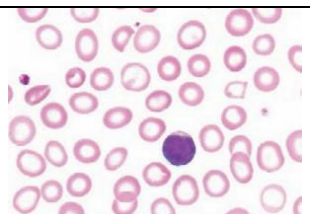
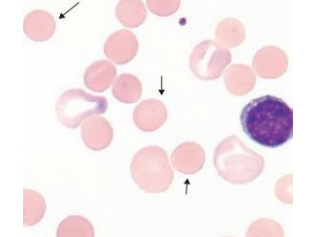

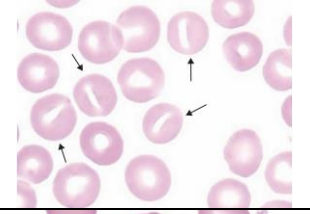
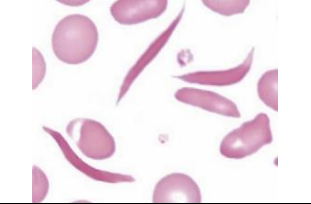



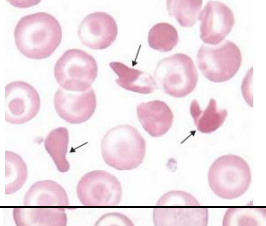
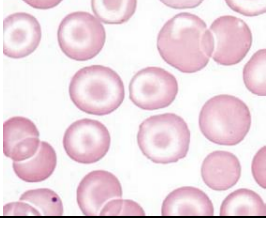
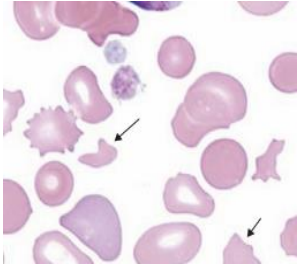
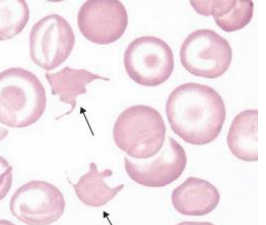
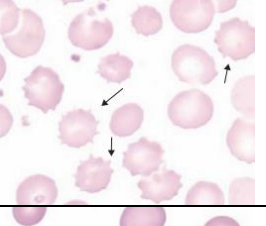
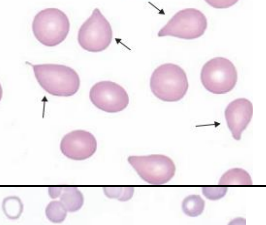

Fig. 1.1. Algoritmo para o diagnóstico diferencial de anemias.^[50]

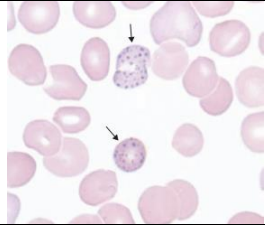
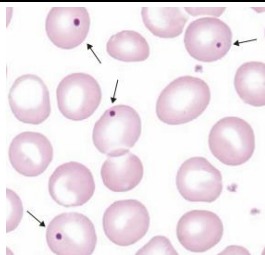
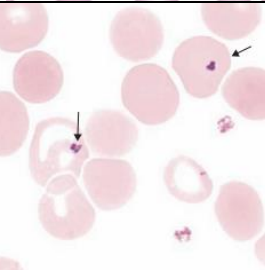
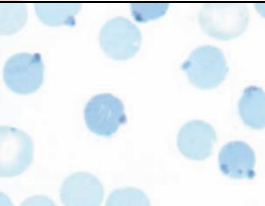
desidrogenase (LDH), aumento da bilirrubina não conjugada (indireta), e diminuição de haptoglobina. A anemia hemolítica pode também manifestar alterações distintas no esfregaço de sangue periférico. As causas congénitas incluem as hemoglobinopatias, enzimopatias (deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase [G6PD] etc.), e anomalias na estrutura membranar do eritrócito. Nas causas adquiridas destacam-se a anemia hemolítica

autoimune, anemia hemolítica microangiopática, hemólise relaciona com agentes infecciosos, e a hemoglobinúria paroxística noturna.^[48,49]

Na tabela 2 demonstram-se as alterações observadas no esfregaço de sangue periférico e as patologias a elas associadas. Descreve-se a técnica para a realização do esfregaço de sangue periférico em Anexo G.

Tabela 2. Alterações eritrocitárias^[42,43]		
Alteração do eritrócito	Observação no S.P.	Patologias Associadas
<p>Macrócito (diâmetro >8 µm; MCV > 100 fL; presença de neutrófilos hipersegmentados na anemia megaloblástica)</p>		<p>Anemia megaloblástica Síndrome mielodisplásico Doença hepática crônica Reticulocitose</p>
<p>Micrócito (diâmetro <6 µm; MCV < 80 fL)</p>		<p>Anemia por deficiência em ferro Anemia da inflamação crônica Anemia sideroblástica Talassemia/traço Hb E</p>
<p>Esferócitos (eritrócitos pequenos, densos; ausência de halo central)</p>		<p>Esferocitose hereditária Anemia hemolítica imune Queimaduras extensas (apresenta esquizócitos)</p>
<p>Eliptócito, ovalócito</p>		<p>Eliptocitose ou ovalocitose hereditária Anemia por deficiência em ferro Talassemia major Anemias mieloftísicas</p>
<p>Estomatócitos</p>		<p>Estomatocitose hereditária Síndrome de Rh nulo Estomatocitose adquirida (alcooolismo, doença hepática) Artefacto</p>
<p>Drepanócito (células falciformes compostas por polímeros de Hb S)</p>		<p>Anemia de células falciformes β-talassemia/Hb S (β⁰/β^s)</p>

Cristal de Hb C		Hemoglobinopatia C
Cristal de Hb SC		Hemoglobinopatia SC
Codócito (célula em alvo)		Doença hepática Hemoglobinopatias Talassemias
Esquizócitos		Anemia hemolítica microangiopática (púrpura trombocitopénica trombótica, SHU) Anemia hemolítica macroangiopática Queimaduras extensas (presença de microesferócitos)
Acantócitos		Doença hepática severa Neuroacantocitose (abetalipoproteinemia, síndrome de McLeod)
Equinócito		Uremia Deficiência em piruvato cinase
Dacriócito (células em lágrima)		Mielofibrose primária Anemia mieloftísica Talassemia Anemia megaloblástica
Formação em rouleaux		Doença inflamatória crônica/aguda Mieloma múltiplo Linfoma linfoplasmácitico

Pontuado basófilo (Precipitação de RNA)		Envenenamento por chumbo Talassemia Hemoglobinopatias Anemia megaloblástica Síndrome mielodisplásico
Corpo de Howel-Jolly (fragmento nuclear, DNA)		Hipoesplenismo Pós-esplenotomia Anemia megaloblástica Anemia hemolítica Talassemia
Corpos de Pappenheimer (Ferro; grânulos sideróticos)		Anemia sideroblástica Hemoglobinopatias Talassemias Síndrome mielodisplásico Anemia megaloblástica
Corpos de Heinz (hemoglobina desnaturada) coloração supravital		Deficiência em G6P-desidrogenase Hemoglobinas instáveis

C. Hemóstase e trombose

A hemóstase é um processo fisiológico complexo que mantém o sangue circulante num estado fluido, e no caso de ocorrer agressão, produz um coágulo para terminar a hemorragia resultante, circunscrevendo-o ao local da agressão, com ulterior dissolução do mesmo no decorrer do processo de cicatrização. Quando o sistema hemostático não se encontra em equilíbrio pode resultar em hemorragia ou trombose. A ausência de um procoagulante plasmático pode provocar hemorragia anatómica, inflamação crónica, e tornar dependente o paciente de transfusão sanguínea. Contrariamente, a ausência de proteínas de controlo permite que o processo de coagulação decorra sem verificação e resultar em trombose, AVC, embolismo pulmonar, trombose venosa, e eventos cardiovasculares.

O conhecimento dos sistemas principais de hemóstase (vasos sanguíneos, plaquetas, proteínas plasmáticas) é essencial para melhor interpretar os resultados dos testes laboratoriais e desta forma prevenir, prever, diagnosticar e controlar a doença hemostática.

A hemóstase envolve a interação entre a vasoconstrição, adesão e agregação plaquetar, e a ativação de enzimas de coagulação para terminar o processo hemorrágico. O sistema de coagulação, semelhante a outros mecanismos de amplificação humorais, tem como elementos celulares chave para a hemóstase as células da íntima vascular, fator tecidual extravascular, e plaquetas. Os componentes do plasma são as proteínas de coagulação e fibrinólise e os seus inibidores respetivos.

A hemóstase primária refere-se ao papel dos vasos sanguíneos e plaquetas em resposta à agressão vascular, ou descamação das células endoteliais em processo necrótico. Os vasos sanguíneos contraem para selar a lesão ou reduzir o fluxo sanguíneo (vasoconstrição). As plaquetas são ativadas e aderem ao local de agressão, segregando o conteúdo dos seus grânulos, e estabelecendo pontes com outras plaquetas para formar um agregado (intermediadas pelo fator de von Willebrand). A vasoconstrição e a formação do agregado de plaquetas compreende a resposta inicial, rápida e de curta duração aos vasos danificados, existindo necessidade de reforçar o agregado pela deposição de fibrina. Os defeitos na hemóstase primária tais como anomalias no colagénio, trombocitopenia, ou a doença de von Willebrand podem provocar hemorragias debilitantes e por vezes fatais.

A hemóstase secundária descreve a ativação de um conjunto proteínas de coagulação no plasma, a maioria protéases serínicas, para formar o coágulo de fibrina. Estas proteínas circulam como zimogénios inativos (proenzimas) que surgem ativadas durante o processo de coagulação, formando complexos que irão ativar outros zimogénios para em última análise gerar trombina, uma enzima que converte o fibrinogénio num coágulo de fibrina localizado. O evento final da hemóstase é a fibrinólise, a digestão gradual e remoção do coágulo de fibrina no decorrer da cicatrização.

Embora a íntima vascular e as plaquetas estejam associadas com a hemóstase primária, e a coagulação e fibrinólise associadas com a hemóstase secundária, todos os sistemas interagem tanto em eventos hemostáticos iniciais como tardios. Por exemplo, as plaquetas, uma componente chave da hemóstase primária, também secretam fatores de coagulação armazenados nos seus grânulos e fornecem fosfolípidos membranares essenciais sobre os quais os complexos de coagulação se formam.^[48,49,51,52]

C.1. Cascata de coagulação

Um coágulo sanguíneo é um agregado de plaquetas, ligadas e estabilizadas por fibras proteicas consistindo maioritariamente por fibrina. A fibrina é derivada de um zimogénio solúvel designado fibrinogénio. Após a albumina e as globulinas, o fibrinogénio é em geral a terceira proteína mais abundante do plasma. A formação do coágulo sanguíneo fornece um

exemplo extensamente estudado de uma cascata regulatória, um mecanismo que permite uma resposta muito sensível, e a amplificação de um sinal molecular.

O fibrinogénio é um dímero de héterotrimeros ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) com 3 diferentes tipos de subunidades mas evolutivamente relacionadas. O fibrinogénio é convertido a fibrina, através da remoção proteolítica de 16 aminoácidos do terminal amínico de cada subunidade α , e 14 a.a. do mesmo terminal na subunidade β . Esta remoção peptídica é catalisada pela trombina, uma protéases serínicas. Os terminais amínicos expostos nas subunidades α e β asseguram uma ligação apropriada nos terminais globulares carboxílicos das subunidades β e γ , respetivamente. Estas interações são estabilizadas por ligações covalentes cruzadas, geradas pela condensação entre resíduos de lisina e glutamina, e catalisadas pelo factor XIIIa, uma transglutaminase. A fibra resultante (fibrina) assegura a manutenção da coesão do coágulo sanguíneo.

A produção de fibrina pela ativação do fibrinogénio é o resultado de duas cascatas regulatórias paralelas mas interligadas (Fig. 12). Uma é referida como via de ativação por contacto (refere-se à interação dos componentes chave do sistema, com os fosfolípidos aniónicos presentes na superfície das plaquetas no local da agressão), também designada de via intrínseca visto que todos os componentes estão presentes no sangue. A segunda via é designada por via extrínseca ou via do fator tecidual. Um componente principal desta via, a proteína fator tecidual (TF), não se encontra na corrente sanguínea. Grande parte dos fatores destas vias são serina proteases (semelhantes a quimiotripsina), com precursores zimogénios sintetizados no fígado e exportados para o plasma. Tanto a via intrínseca como extrínseca apenas se verificam *in vitro*, uma vez que *in vivo* o processo de coagulação é dinâmico e interdependente sem distinção de vias.

A agressão aos tecidos permite que as moléculas de colagénio, presentes sob o epitélio dos vasos sanguíneos, fique exposta ao sangue. A ativação das plaquetas é despoletada principalmente pela interação com o colagénio. Esta ativação leva à apresentação de fosfolípidos (fosfatidilserina) aniónicos na superfície de cada plaqueta, e à libertação de moléculas sinalizadoras como os tromboxanos (TxA_2 ; protrombótico e vasoconstritor). As plaquetas ativadas agregam-se no local do ferimento formando um coágulo que necessita de ser estabilizado pela polimerização de fibrina.

O tecido danificado expõe o plasma ao TF, incorporado maioritariamente nas membranas dos fibroblastos e células do músculo liso. Forma-se um complexo inicial entre o TF e o fator VII presente no plasma. O fator VII é um zimogénio de uma protéase serínica, e o TF serve como proteína regulatória necessária para o seu funcionamento. O fator VII é

convertido posteriormente na sua forma ativa, o fator VIIa, por clivagem proteolítica pelo fator Xa. O complexo TF-VIIa cliva o fator X gerando a sua forma ativa, o fator Xa. Existem quantidades mínimas de VIIa (fisiológica) circulantes na corrente sanguínea, necessárias para a formação do complexo TF-VIIa após agressão tecidual, permitindo desta forma gerar Xa. Ao aumentarem os níveis de Xa (complexado com o fator regulatório Va) este irá clivar a protrombina para formar trombina ativa que, por sua vez, cliva o fibrinogénio.

Contudo, o complexo TF-VIIa é prontamente inibido pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI). A formação do coágulo é sustida pela ativação das componentes da via intrínseca. O fator IX é convertido na sua forma ativa, fator IXa, pela protéase TF-VIIa durante a iniciação da coagulação. O fator IXa complexado com o fator regulatório VIIIa, é relativamente estável e fornece um via alternativa para a conversão do fator X em Xa.

Caso este sistema não fosse controlado, poderiam ocorrer eventos de coagulação que por sua vez poderiam levar a enfartes do miocárdio ou AVC. A trombina, para além de clivar o fibrinogénio, forma um complexo com a trombomodulina, uma proteína presente nas células do endotélio. Este complexo trombina-trombomodulina cliva o zimogénio de proteína C, e a forma ativa desta proteína complexa com a proteína reguladora S, clivando e inativando os fatores Va e VIIIa, para em última análise levar à supressão da cascata no geral. A antitrombina III (ATIII), um inibidor de protéases serínicas, complexa covalentemente em particular com a trombina e fator Xa, inibindo-os.

Defeitos genéticos nos genes codificantes de proteínas necessárias à coagulação, são referidos como hemofilias (coagulopatias). A hemofilia A e B são anomalias genéticas (recessivas ligadas ao cromossoma X) que resultam na deficiência dos fatores VIII e IX respetivamente.^[51,52] Os fatores de coagulação são descritos no Anexo F.

C.2 Fibrinólise

O trombo de fibrina, resultante da cascata de coagulação, é dissolvido pela plasmina, uma protéase serínica presente no plasma. O plasminogénio, um precursor zimogénio da plasmina, é clivado proteoliticamente por enzimas presentes em variados tecidos, para poder ser ativado. Este grupo de enzimas inclui o ativador do plasminogénio do rim (urocinase), e o ativador do plasminogénio tecidual (t-PA) presente no endotélio vascular. Contrariamente, a proteína plasmática α_2 -antiplasmina liga a plasmina ativa inibindo-a, e desta forma inibe o processo fibrinolítico.

A urocinase, a t-PA, e a estreptocinase (protéase bacteriana com atividade semelhante) são utilizadas clinicamente para a dissolução de trombos após enfarte do

miocárdio. Todas estas proteínas são expressas em bactérias por tecnologia de DNA recombinante.^[53]

C.3. Testes da fase de coagulação

Com a exceção de um ensaio para os produtos de degradação da fibrina, todos os testes de coagulação são realizados em plasma com citrato, mais comumente obtido usando o tubo de colheita de vácuo com topo azul, na relação de nove partes de sangue para uma de citrato. O ião citrato não entra no eritrócito, consequentemente a concentração plasmática de citrato é anormalmente elevada quando sangue com um elevado hematócrito (>55%) é colhido usando concentrações usuais para este anticoagulante. Este facto pode produzir artificialmente o prolongamento dos testes de coagulação, em particular PTT.

(Anexo I)

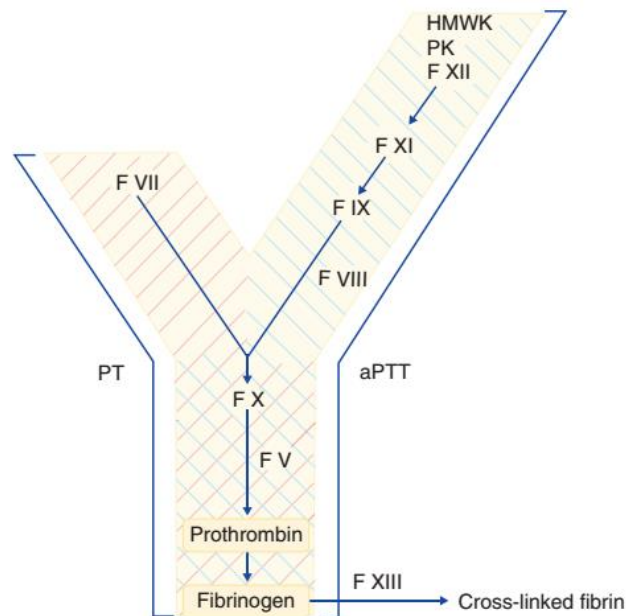


Fig.12. Cascata de coagulação in vitro. PT- tempo de protrombina; aPTT- tempo de tromboplastina parcial ativada; PK – Precalcreína; HMWK - Cinogênio de alto peso molecular.^[54]

C.3.1. Tempo de tromboplastina parcial ativada

O tempo de tromboplastina parcial ativada (PTT) é um teste simples das vias de coagulação intrínseca e comum (Fig. 12). Quando uma mistura de plasma e um substituto de fosfolípidos plaquetares são incubados com ião cálcio, a fibrina forma-se à velocidade normal apenas quando os fatores envolvidos na via intrínseca (pré-caliceína, Cinogênio de alto peso molecular, e os fatores XII, XI, IX e VIII) e na via comum (fatores X e V, protrombina, e fibrinogênio) estão presentes em quantidades apropriadas. Existem substitutos plaquetares variados que podem ser utilizados, tais como frações de cefalina e fosfatídeos de soja (inosítídeos). No ensaio PTT, estes substitutos são fornecidos em excesso, não sendo este teste afetado pelas plaquetas plasmáticas remanescentes. Os substitutos plaquetares apenas são tromboplastinas parciais, sendo incapazes de ativar a via extrínseca, que requer tromboplastina tecidual completa (fator tecidual). Desta forma, o PTT evita a via extrínseca e não é afetada pela deficiência em fator VII. O teste PTT é utilizado na detecção

de deficiência de fatores de coagulação, na detecção de anticoagulante lúpico, e para monitorização a terapêutica por heparina.

O PTT é mais sensível na detecção de deficiências dos fatores VIII e IX que dos fatores XI e XII ou fatores envolvidos na via comum. No método original, a ativação por contacto era fornecida pelo tubo de vidro, mas com a adição de ativadores, tais como ácido elágico, ou silicatos (celite ou caolino) é assegurada uma ativação ótima e padronizada. O PTT é o ensaio de rotina na avaliação da coagulação intrínseca.^[40] Os fatores cuja deficiência está associada a eventos hemorrágicos, e refletem um prolongamento do PTT são, por ordem de reação, XI, IX, VIII, X e V; protrombina; e fibrinogénio, quando o fibrinogénio é ≤ 100 mg/dL. O PTT apresenta-se prolongado na presença do fator lúpico, uma imunoglobulina com afinidade para fosfolípidos ligados a proteínas, anticorpo anti-factor VIII, anticorpo para o fator IX e outros fatores de coagulação, bem como com heparina terapêutica.^[49]

C.3.2. Tempo de protrombina

A produção de fibrina pela via extrínseca e comum requer fator tecidular e fator VII, na presença dos fatores X e V, protrombina e fibrinogénio (Fig. 12). Estas vias são medidas pelo tempo de protrombina (PT), onde o plasma é incubado com ião cálcio na presença de fator tecidular em excesso. Este teste não requer ativação por contacto e ultrapassa a via intrínseca e os fatores a ela associados. Devido ao facto das tromboplastinas tecidulares conterem fosfolípidos que atuam como substitutos das plaquetas, o teste não é afetado pela presença destas. Dos cinco fatores de coagulação medidos pelo PT (fatores V, VII, e X, protrombina e fibrinogénio), três (protrombina e fatores VII e X) são dependentes de vitamina K, sendo diminuídos por compostos cumarínicos (anticoagulantes que interferem com o metabolismo da vitamina K). O PT encontra-se também prolongado por inibidores de qualquer um dos fatores essenciais e pela heparina, mas é menos sensível à sua ação anticoagulante que o PTT.

Várias técnicas modificadas e tromboplastinas, incluindo tromboplastinas humanas recombinantes, foram desenvolvidas no sentido de melhorar a eficácia do PT no controlo da terapia com anticoagulantes cumarínicos (Coumadin). O PT efetuado com tromboplastina de cérebro bovino é anormal em pacientes com determinadas variantes genéticas de deficiência em fator IX, mas apresenta-se normal na forma mais comum da patologia. O veneno da víbora de Russell contém enzimas que iniciam a coagulação através da ativação direta do fator X, não requerendo por isso o fator VII. O “tempo de protrombina” realizado com este

veneno (tempo de Stypven) permite a distinção entre deficiências em fator VII e deficiências em fator X.^[49,51,53]

Tendo em conta as variações inerentes entre reagentes de tromboplastina, a maioria dos laboratórios reportam a razão normalizada internacional ou INR (*international normalized ratio*), usando a fórmula infracitada para padronizar o controlo com anticoagulantes orais (cumarínicos):

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{PT}_{\text{paciente}}}{\text{PT}_{\text{controlo; média geométrica}}} \right)^{\text{ISI}}$$

Estabelece a razão entre o PT do paciente e o PT do controlo, elevado ao índice de sensibilidade internacional (ISI; *international sensitivity index*), apresentando valores normais entre 0,9 e 1,1. Na terapêutica com cumarínicos (varfarina) são efetuados ajustes na dosagem para se obter um INR desejável de 2 a 3 ou eventualmente de 2,5 a 3,5 caso o paciente possua uma válvula cardíaca protética. Um INR com um valor superior a 4 está associado a um risco hemorrágico aumentado, e deve ser comunicado imediatamente ao clínico. Os ajustes na dosagem de cumarínicos são efetuados progressivamente uma vez que o INR requer 4 a 7 dias para estabilizar.^[55,56]

C.3.3. Fibrinogénio

O método de Clauss da coagulação é recomendado para estimar os níveis funcionais de fibrinogénio. Ao adicionar reagente de trombina bovina ao plasma livre de plaquetas diluído, catalisa-se a reação de conversão de fibrinogénio em polímero de fibrina. O plasma em estudo é diluído na razão 1:10 com o tampão de Owren. Existe uma relação inversa entre o intervalo de formação do coágulo e a concentração de fibrinogénio funcional. Pelo facto do reagente de trombina ser concentrado e o plasma diluído, a relação é linear para concentrações de fibrinogénio entre 100 e 400 mg/dL. A diluição do plasma também minimiza o efeito antitrombótico da heparina, e paraproteínas. O intervalo de formação do coágulo é comparado com os resultados para os calibradores do fibrinogénio. A curva de calibração deve ser preparada em cada laboratório e ser atualizada regularmente.

A hipofibrinogenemia, valores de fibrinogénio inferiores a 220 mg/dL, está associada a coagulação intravascular disseminada, e doença hepática severa. A gravidez, e a doença inflamatória crónica podem promover a elevação da concentração do fibrinogénio para níveis superiores a 498 mg/dL. A afibrinogenemia congénita leva ao prolongamento dos tempos de coagulação, estando associada com eventos hemorrágicos.^[53,55,56]

D. Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) dos eritrócitos é um teste comum, mas inespecífico, usado frequentemente como indicador de doença ativa. Reflete a tendência dos eritrócitos sedimentarem mais rapidamente em determinados estados patológicos, usualmente devido ao aumento de fibrinogénio, imunoglobulinas, e outras proteínas de fase aguda. Por outro lado, as alterações da forma dos eritrócitos ou do seu número também podem afetar a velocidade de sedimentação. As células falciformes e desordens policitémicas tendem a diminuir a VS, e situações de anemia podem aumentá-la. A VS aumenta também com a idade (embora tenda a diminuir em adultos com idade superior a 75 anos) mesmo em indivíduos saudáveis sendo superior para o género feminino. Indivíduos com patologia hepática podem apresentar uma VS baixa devido à incapacidade do organismo produzir proteínas de fase aguda.

Os processos infecciosos representam um fator comum para a elevação da VS, mas deve ser excluída a gamapatia monoclonal em pacientes com elevação persistente inexplicada. É também observada elevação da VS na gravidez, cancro, doença vascular do colagénio, febre reumática e outras doenças crónicas incluindo VIH. A velocidade de sedimentação é um teste de diagnóstico pobre em indivíduos assintomáticos, detetando elevações em 4 a 8% de adultos saudáveis, não devendo por isso ser utilizado para o rastreio de patologias em doentes assintomáticos. O teste é provavelmente melhor utilizado como ferramenta para o acompanhamento do curso clínico de determinadas doenças como a artrite temporal, artrite reumatoide, polimialgia reumática, ou linfomas.^[40,57]

Atualmente o método Westergren modificado é o mais comumente utilizado no LAC. Os valores normais para o homem são 0-15 mm/h, e para as mulheres 0-20 mm/h.^[45]

E. Leucemias agudas

As leucemias agudas são tumores hematológicos com aumento do número de blastos linfoides ou mieloides. Historicamente, o termo “agudo” refere-se à rápida progressão e ao seu desfecho fatal, mas atualmente indica a natureza relativamente indiferenciada das células leucémicas. A classificação destas anomalias é complicada visto poderem ser categorizadas tendo por base características morfológicas, alterações genéticas, etiologia proposta, origem celular, imunofenotipagem e características clínicas. Existem dois grandes sistemas de classificação, um idealizado por um grupo de hematologistas Franceses, Americanos e Britânicos (FAB), e outro sistema proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS), onde

são agrupadas as características distintivas de forma diferente, mas ambas dividem fundamentalmente as leucemias agudas nos tipos mieloide e linfoide, dependendo da origem das células blásticas (Tabelas 3; 4).

A etiologia na maioria dos casos é desconhecida, mas em alguns pacientes houve exposição prévia a radiação ionizante, agentes quimioterapêuticos citotóxicos, ou benzeno, que são causas a considerar. Em determinadas situações congênitas como a síndrome de Down, a síndrome de Bloom, e a síndrome de Turner, existe uma incidência aumentada de leucemia mieloide aguda (AML), bem como em situações de falha medular como anemia de Fanconi e síndrome de Blackfan-Diamond. Indivíduos com patologias mieloproliferativas e mielodisplásicas, apresentam também risco elevado de desenvolver AML. Os fumadores crônicos surgem com incidência aumentada.

Quando o diagnóstico surge, a maioria dos pacientes com leucemia aguda apresentam sintomas inespecíficos, como fadiga, letargia, e perda de peso. Algumas queixas, como a dispnéia, angina, e tonturas provêm da anemia. A febre pode manifestar-se tendo como causa a própria doença ou agentes infecciosos, relacionado com a neutropenia. Pode também ocorrer epistaxe ou equimoses cutâneas, originadas pela trombocitopenia ou pela coagulação intravascular disseminada, principalmente em pacientes com leucemia promielocítica aguda. Na leucemia mieloide aguda, principalmente nos tipos monocíticos, pode ocorrer intumescência das gengivas por infiltração leucêmica.

Tabela 3. Classificação FAB das AML

M0 – AML, minimamente diferenciada	M1 – AML, sem maturação
M2 – AML, com maturação	M3 – Leucemia promielocítica aguda, hipergranular
M3v - Leucemia promielocítica aguda, variante, microgranular	M4 – leucemia mielomonocítica aguda
M4eo - leucemia mielomonocítica aguda com eosinofilia	M5a – Leucemia monoblastica aguda, fracamente diferenciada
M5b – Leucemia monoblastica aguda, diferenciada	M6 – Eritroleucemia aguda
M7 – leucemia megacarioblástica aguda	

O esfregaço sanguíneo revela tipicamente diminuição dos eritrócitos e plaquetas, com a contagem leucocitária a variar entre leucopenia e valores extremamente elevados. É comum uma diminuição do número de neutrófilos maduros, sendo os blastos circulantes tipicamente visualizáveis. A Leucemia aleucêmica, onde os blastos não são evidentes, é mais frequente em AML do que em ALL. Com a coagulação disseminada intravascular, que ocorre principalmente na leucemia promielocítica aguda, podem surgir características microangiopáticas, incluindo fragmentos de eritrócitos, policromatofilia marcada, micrócitos, e trombocitopenia profunda (tabela 2). Em pacientes com síndromes mielodisplásicas precedentes as características desta desordem são tipicamente evidentes, como neutrófilos

hipolobulares e hipogranulares, plaquetas gigantes agranulares, e macrocitose e poiquilocitose eritrocitária.

Em todos os pacientes com suspeita de leucemia deve ser realizado medulograma e biopsia da medula óssea, com análise citogenética, histoquímica e imunofenotipagem.

Tabela 4. Classificação das AML pela OMS

AML com anomalias genéticas recorrentes:

- AML com t(8;21)(q22;q22)
- AML com eosinófilos medulares anormais inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)
- Leucemia promielocítica aguda – AML com t(15;17)(q22;q12) e variantes
- AML com anomalias 11q23

AML com displasia multilineagem

- Após síndrome mielodisplásico ou desordem mieloproliferativa
- Sem antecedentes de síndrome mielodisplásico

AML e síndrome mielodisplásico relacionado com terapia

- Agentes alquilantes
- Inibidores de Topoisomerase tipo II

AML não categorizada

- AML minimamente diferenciada
- AML sem maturação
- AML com maturação
- Leucemia mielomonocítica aguda
- Leucemia monocítica ou monoblástica aguda
- Leucemia eritroide aguda
- Leucemia megacarioblástica aguda
- ...

Habitualmente, a presença de leucemia é evidente no medulograma, que é tipicamente hiper celular, com abundantes blastos em substituição das células normais em maturação das linhagens eritroides, mieloide e megacariocítica. A presença no citoplasma de bastonetes de Auer, estruturas com forma de agulha que se pensa serem agregados dos grânulos primários, indicam mieloblastos. Devem por outro lado ser utilizados corantes específicos para a atividade da mieloperoxidase ou para os grânulos mieloides, como o preto do Sudão, e corantes que detetam células monocíticas, como o acetato α -naftílico. Se a presença de blastos for inferior a 3%, pelo uso destas técnicas, deve ser utilizada citometria de fluxo para uma apropriada distinção entre AML e ALL minimamente diferenciadas, detecção de leucemia megacarioblástica, e para a discriminação entre formas de ALL de células B ou T.^[57,58,59,60]

Embora o LACCSMC não disponha de citometro que permita a imunofenotipagem das populações leucocitárias, será feita referência aos marcadores comumente associados.

E.1. Leucemia mieloide aguda

Estas desordens são definidas pela expansão clonal de blastos mieloides, maioritariamente no sangue e medula, mas ocasionalmente em massas tumorais (sarcomas mieloides ou granulocítico) noutros tecidos, como a pele e nódulos linfáticos. A classificação pela OMS (tabela 4) separa a AML em 4 grupos gerais: (1) AML com anomalias genéticas recorrentes; (2) AML com displasia multilinhagem; (3) AML associada a síndromes mielodisplásicas e terapia; (4) AML não categorizada. Uma classificação precedente, a FAB, divide a AML em oito grandes subtipos, desde M0 a M7, definidos pela natureza das células blásticas e o seu grau de diferenciação e maturação. A classificação FAB (Tabela 3) reconhece 3 tipos de blastos mieloides: Tipo I, onde os grânulos citoplasmáticos são ausentes, mas possuem nucléolos proeminentes, núcleo central e cromatina não condensada; Tipo II, são similares mas apresentam já alguns grânulos primários azurófilos; Tipo III têm > 10 grânulos azurófilos, não apresentando contudo uma zona do Golgi (halo perinuclear), que é característico de promielócitos.^[57,58]São exemplificados alguns exemplos de AML mais frequentemente observadas na secção de hematologia, embora com prevalência reduzida.

E.1.1. Leucemia mieloide aguda, minimamente diferenciada (FAB – M0)

Este tipo de leucemia caracteriza-se morfologicamente pela presença de blastos agranulares de grandes dimensões, observados tanto na M.O. como no S.P. Os testes citoquímicos, mieloperoxidase, Sudan Black B, e esterase inespecífica surgem como negativos. Imunofenotipicamente são característicos os marcadores: CD13⁺, CD33⁺, CD117⁺, HLA-DR[±], CD34[±], CD38⁺.^[43,58]

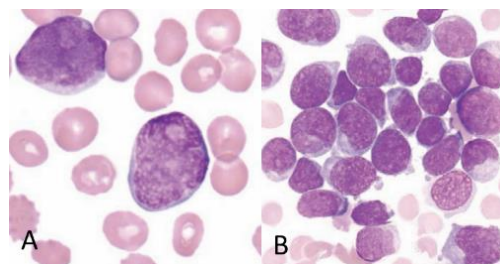


Fig.13. (A) sangue periférico (1000x); (B) medula óssea (500x)^[43]

E.1.2. Leucemia mieloide aguda sem maturação (FAB – M1)

Neste tipo de leucemia surgem frequentemente blastos no sangue periférico com inclusões citoplasmáticas designadas de bastonetes de Auer (provenientes da fusão dos grânulos primários). Na M.O. os blastos são abundantes, representando $\geq 90\%$ das células não eritroides. São habitualmente positivos para a mieloperoxidase e Sudan Black B, e esterase inespecífica negativos. Como marcadores imunofenotípicos surgem: CD13⁺, CD33⁺, CD34[±], HLA-DR[±], CD117⁺.^[43,58]

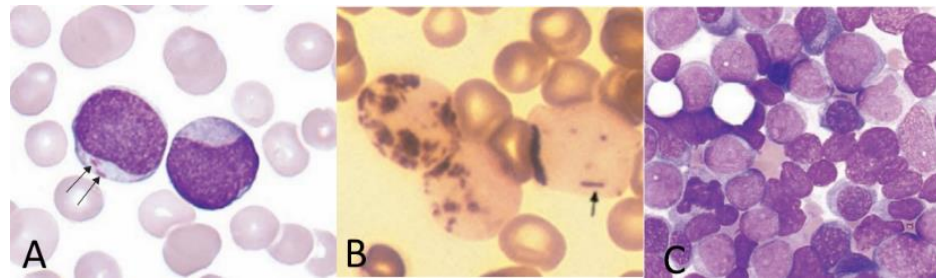


Fig.14. (A) Bastonetes de Auer (setas) num mieloblasto, sangue periférico (1000x); (B) positividade na mieloperoxidase; (C) medula óssea (500x)^[43]

E.1.3.

Leucemia promielocítica aguda

Neste tipo de leucemia pode existir tanto uma redução como uma pequena elevação do leucograma. No esfregaço de sangue periférico é comum a visualização de blastos promielócitos hipergranulares, com núcleo típico em dobra ou bilobado. No citoplasma é frequente a presença de bastonetes de Auer múltiplos, com possível agregação (células Faggot), sendo ainda de notar a presença de esquisócitos. Na coloração citoquímica destacam-se reações fortemente positivas tanto para a mieloperoxidase como para o Sudan Black B.

A existência de t(15;17) é suficiente para diagnóstico como AML com anomalias genéticas, independentemente da contagem de blastos ou promielócitos, apresentando frequentemente um imunofenótipo de CD13[±], CD33⁺, CD34⁻, HLA-DR⁻.

A leucemia promielocítica aguda pode encontrar-se associada com coagulopatia intravascular disseminada.^[43,57,58]

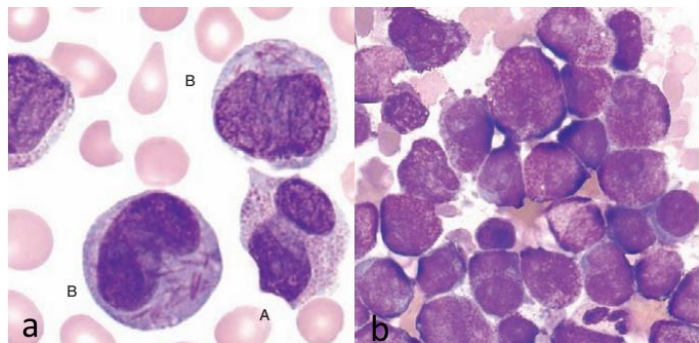


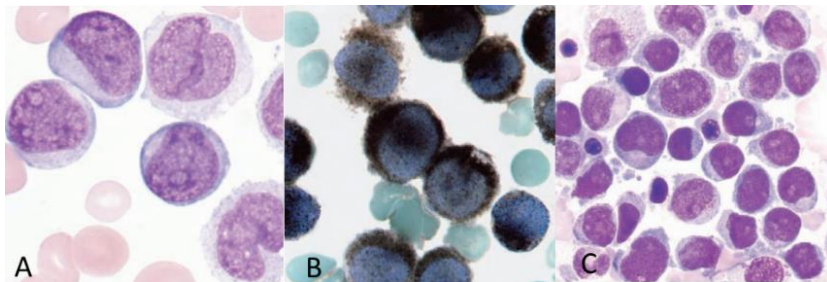
Fig.15. (a) sangue periférico. A, promielócito hipergranular; B, células Faggot (1000x). (b) medula óssea (500x)^[43]

E.1.4. Leucemia mielomonocítica aguda (FAB M4)

No sangue periférico é distintiva a presença de mieloblastos, promielócitos, e outros precursores mieloides imaturos, bem como monoblastos, promonócitos e monócitos (frequentemente num estado de maturação mais avançado que o observado na medula óssea). A presença de bastonetes de Auer pode ou não existir. Na medula óssea os monoblastos são de grandes dimensões com citoplasma moderadamente basófilo, com núcleo em dobra e com 1 ou mais nucléolos proeminentes. Os promonócitos surgem com núcleo irregular, citoplasma ligeiramente basófilo, podendo ainda existir a presença ocasional de vacúolos e bastonetes de Auer. Tanto os granulócitos e seus precursores, como os

monócitos e seus precursores contribuem cada um com pelo menos 20% da componente celular.

Na citoquímica é de notar a positividade para a mieloperoxidase, a naftol-AS-D cloroacetato esterase (específica) é positiva para granulócitos e ligeiramente positiva para



monócitos, no caso da α -naftil acetato esterase (inespecífica) observa-se positividade para monócitos. Por imunofenotipagem são de realçar os seguintes marcadores: CD13⁺, CD33⁺, CD14⁺, CD4⁺, CD11b⁺, CD64⁺, CD15⁺, CD36⁺. Deve ter-se em consideração que as alterações genéticas inv(16) ou t(16;16) bem como a presença de eosinófilos anormais, devem ser excluídas desta categoria.^[43,58]

E.2. Leucemias linfoblásticas agudas

A classificação da OMS subdivide este tipo de leucemias em 2 grupos, dependendo se a célula precursora é pertencente aos linfócitos T ou B. A distinção entre leucemia e linfomas depende, nestes casos, da presença de células anormais no sangue e medula óssea,

Fig.16. (A) sangue periférico(1000x). (B) positividade em monócitos para a α -naftil acetato esterase. (C) medula óssea (500x)^[43]

ou se estas aparecem principalmente nos nódulos linfáticos ou em locais extranodais fora da medula óssea.

Cerca de 75% dos casos de leucemia linfoblástica aguda de células B ocorrem em crianças com menos de 6 anos, sendo 85% dos casos das ALL deste tipo. A presença de nódulos linfáticos aumentados, hepatomegalia e esplenomegalia são frequentes. A contagem leucocitária é variável, e no esfregaço de sangue periférico os linfoblastos são pleomórficos e variam de tamanho, com nucléolos que podem ser proeminentes ou imperceptíveis. No citoplasma a presença de grânulos pode surgir.

A leucemia linfoblástica aguda de células T representa cerca de 15% das ALL na infância e 25% das ALL nos adultos. A

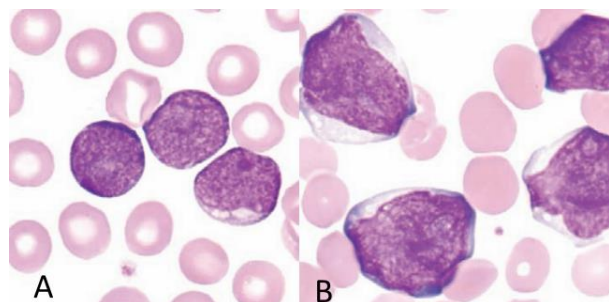


Fig.17. (A) pequenos blastos no sangue periférico (1000x). (B) Grandes blastos no sangue periférico (1000x).^[43]

contagem leucocitária é marcadamente elevada, com a presença frequente de uma massa no mediastino. Os linfoblastos são semelhantes aos encontrados na ALL de células B, com variação morfológica ampla.^[57,58]

F. Síndromes mielodisplásicas.

As síndromes mielodisplásicas são desordens provocadas pela expansão clonal das células estaminais hematopoiéticas, com maturação anormal (displásica) e produção ineficiente, resultando na destruição das células antes destas alcançarem a circulação sistêmica. A anemia é típica nestas situações, vulgarmente acompanhada de trombocitopenia e/ou neutropenia. Alguns casos são despoletados pela exposição a radiação ionizante ou quimioterapia, habitualmente por agentes alquilantes, e nestas circunstâncias a medula óssea é tipicamente hipocelular e parcialmente fibrótica. Frequentemente, estas patologias surgem como primárias em idosos, com uma média de idade na altura do diagnóstico de 70 anos. Nestes indivíduos, a medula óssea é usualmente hiperclular.

Os blastos podem apresentar elevação nas síndromes mielodisplásicas, mas não devem exceder 20% da contagem diferencial. A displasia pode envolver uma ou mais linhagens na medula óssea, podendo estar também presente no esfregaço de sangue periférico. No esfregaço de S.P. pode apresentar macrocitose, anisocitose, pontuado basófilo, e corpos de Pappenheimer. A poiquilocitose é frequente e inclui células em alvo, acantócitos, eliptócitos, estomatócitos e fragmentos eritrocitários. Na M.O. a observação nos precursores eritroides remete para anomalias nucleares e citoplasmáticas. A presença de mais de um núcleo por célula (cariorréxis), pontes internucleares, cromatina anormal (tanto condensada como descondensada) e alterações megaloblástica (atraso da maturação do núcleo em relação ao citoplasma) são frequentes. As anomalias citoplasmáticas incluem a vacuolização e sideroblastos em anel, com ≥ 10 grânulos de ferritina em redor de pelo menos 1/3 do núcleo.

A evidência de granulopoiese anormal no esfregaço de sangue periférico inclui neutropenia, neutrófilos hipersegmentados, corpos de Döhle, diminuição ou ausência de grânulos, e a presença de células imaturas, incluindo blastos. O núcleo pode apresentar cromatina agregada densamente, e em muitos casos hipolobulados, com um lóbulo único ou 2 lóbulos interligados por um filamento fino de cromatina, similar ao encontrado na síndrome de Pelger-Hüet. A presença deste tipo de células pseudo Pelger-Hüet é fortemente sugestiva de síndromes mielodisplásicas (Fig 18).

As anomalias na trombopoiese no esfregaço de S.P. manifestam-se pela presença de trombocitopenia, plaquetas gigantes e com grânulos diminuídos ou mesmo ausentes.

As alterações citogenéticas são comuns nestas síndromes, e todos apresentam um risco aumentado de desenvolver leucemia, principalmente mieloide. A organização mundial de saúde estabeleceu 8 tipos de mielodisplasia: anemia refratária; anemia refratária

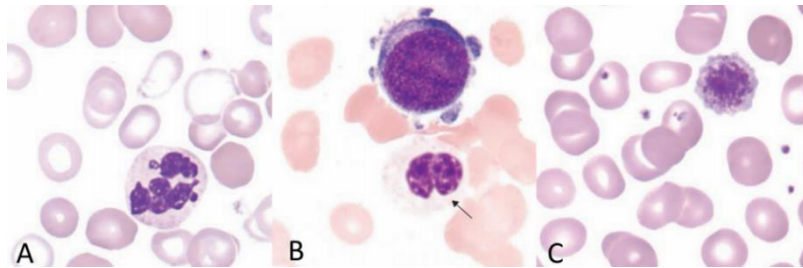


Fig.18. (A) neutrófilo com núcleo hipersegmentado; (B) Micromegacariocito circulante, neutrófilo hiposegmentado pseudo-Pelger-Huët (seta); (C) Plaqueta gigante.^[43]

com sideroblastos em anel; citopenia refratária com displasia multinhagem; anemia refratária com excesso de blastos; síndrome mielodisplásicos não classificados; síndrome 5q-^[43,60]

G. Neoplasmas mieloproliferativos

As doenças mieloproliferativas crónicas são desordens clonais das células estaminais hematopoiéticas, e usualmente a M.O. apresenta hiper celularidade, podendo progredir para leucemia, como acontece com as síndromes mielodisplásicas. Difere, contudo, dos últimos, pelo facto da displasia medular ser ausente, sendo a maturação normal, e a produção de células efetiva, provocando elevação nos níveis de uma ou mais linhagens celulares (eritrocitose, leucocitose, trombocitose). Os pacientes tendem a apresentar hepatoesplenomegalia, devido ao sequestro das células sanguíneas, hematopoiese extramedular ou por infiltração de células neoplásicas. Diferem das leucemias agudas pelo seu aparecimento lento e curso prolongado, que pode decorrer durante meses a anos.

As síndromes mieloproliferativas têm como elemento comum a mielofibrose, provavelmente originada pela libertação de citocinas e fatores de crescimento pelos megacariócitos e outras células medulares, provocando a proliferação dos fibroblastos e produzindo colagénio e fibronectina. Em muitos dos casos a patologia evolui por incrementos no processo fibrótico, levando a mielofibrose em estágio terminal. Noutras situações pode ocorrer elevação do número de blastos progredindo através de uma “fase de aceleração” (10%-19% de blastos na medula óssea), desembocando em leucemia aguda ($\geq 20\%$ blastos).

Uma mutação pontual no gene que regula a Janus kinase 2, uma proteína-tirosina cinase citoplasmática que é importante na sobrevivência e proliferação celular, ocorre na maioria dos pacientes com policitemia vera, e em aproximadamente metade daqueles com trombocitemia essencial ou mielofibrose idiopática crónica. Esta mutação ($JAK2^{V617F}$) raramente está presente na leucemia mieloide crónica, ou na população normal.^[60,62]

A organização mundial de saúde (*Classification of Tumors of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues*) dividiu estas desordens em 4 grandes categorias: (I) leucemia mieloide

crónica (BCR-ABLI; CML); (2) policitemia vera (PV); (3) trombocitemia essencial (ET); (4) mielofibrose primária (PMF).

Estes neoplasmas têm em comum várias características clínicas, dados laboratoriais, e semelhanças patogénicas (Tabela 5).^[60,61,62]

Tabela 5. Características laboratoriais dos neoplasmas mieloproliferativos

Parâmetro	CML	PV	ET	PMF
WBC	Elevado	Normal ou elevado	Normal ou ligeiramente elevado	Normal, elevado ou diminuído
RBC	Normal ou diminuído	Elevado	Normal ou ligeiramente diminuído	Normal ou diminuído
Plaquetas	Normal ou elevado	Normal ou elevado	Elevado	Normal, elevado ou diminuído
Anomalias moleculares	BCR-ABLI	JAK2 V617F ou outra mutação em JAK2	± JAK2	± JAK2

G.1. Leucemia mieloide crónica

A leucemia mieloide crónica BCR-ABL+ (CML) é uma desordem clonal de uma célula estaminal pluripotente. Esta doença representa cerca de 15% de todas as leucemias e pode ocorrer em qualquer faixa etária. O diagnóstico é relativamente fácil e caracteriza-se pela presença do cromossoma de Philadelphia (cromossoma 22; Ph). Este resulta de t(9;22)(q34;q11) uma translocação entre o cromossoma 9 e 22, resultando na transferência parcial do oncogene ABLI para o gene BCR no cromossoma 22, e parte do cromossoma 22 transita para o 9 (Anexo J) . O resultado quimérico BCR-ABLI codifica uma proteína de fusão que apresenta atividade tirosina cinase excessiva em relação ao produto normal de ABLI. A translocação Ph pode também ser observada numa minoria de caso de leucemia linfoblástica aguda (ALL) com quebra de BCR no mesmo local do verificado na CML.

Na maioria dos pacientes o cromossoma Ph pode ser observado no cariotipo das células tumorais, contudo em algumas situações esta observação está impossibilitada e existe a necessidade de recorrer a técnicas moleculares mais sensíveis, como a FISH ou PCR por transcriptase reversa (RT-PCR).

A CML passa habitualmente por 3 estádios: fase crónica, fase de aceleração, e fase blástica, sendo a transformação em fase blástica a principal causa de morte desta patologia. Na fase crónica, observa-se tipicamente anemia moderada e leucocitose que excede habitualmente $25 \times 10^9/L$, compreendendo principalmente neutrófilos em vários estádios de maturação. Verifica-se ainda eosinofilia e basofilia, com contagem de plaquetas normal ou

elevada podendo exceder $1,000 \times 10^9/L$. Devido à excessiva proliferação celular tanto o ácido úrico como a LDH estão comumente elevados.

De acordo com os critérios da OMS a fase de aceleração é definida pelo preenchimento de pelo menos um dos critérios: (1) esplenomegalia e leucocitose; (2) trombocitopenia persistente ($<100 \times 10^9/L$) ou trombocitose ($>1000 \times 10^9/L$); (3) blastos presentes na medula óssea ou sangue periférico com valores de 10% a 19%; (4) basofilia no sangue periférico ($\geq 20\%$) e (5) evidência de evolução clonal.

A fase blástica é definida por uma ou mais das seguintes características: (1) blastos $\geq 20\%$ no sangue periférico ou M.O.; (2) proliferação de blastos em locais extramedulares como a pele, nódulos linfáticos ou baço; (3) grandes agregados blásticos na medula óssea. Os blastos são majoritariamente da linhagem mieloide, mas em cerca de 20% a 30% podem ser linfoides. Ocasionalmente, podem coexistir simultaneamente.

A leucocitose é a característica laboratorial prevalecte podendo atingir níveis superiores a $200 \times 10^9/L$. No esfregaço do sangue periférico são observadas células da linhagem mieloide em todos os estados de maturação (Fig. 19).^[60]

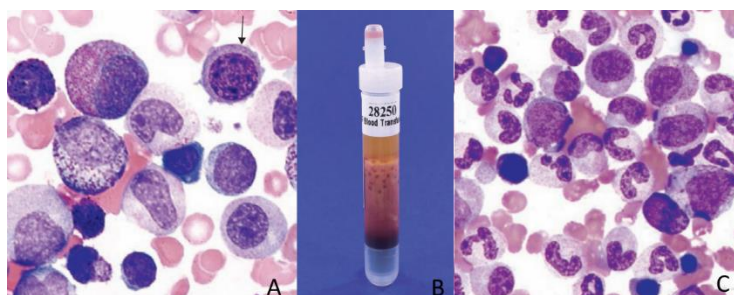


Fig.19. Leucemia mieloide crônica BCR-ABL positiva; (A) Micromegacariócito (seta), sangue periférico (1000x); (B) Tubo de colheita com elevada leucocitose; (C) Medula óssea (500x).^[43]

G.2. Policitemia vera.

A policitemia vera (PV) é predominantemente uma doença de indivíduos de meia idade ou idosos. Os problemas clínicos correlacionam-se com aumento do volume sanguíneo, da sua viscosidade, e com o hipermetabolismo associado à mieloproliferação. Clinicamente manifesta-se por pletora, letargia, dispneia, retenção de fluidos, e prurido generalizado, com esplenomegalia frequente.^[60,61,62]

A PV é uma neoplasia mieloproliferativa clonal que se manifesta habitualmente com panmielose na medula óssea, e no sangue periférico ocorre elevação nos eritrócitos, granulócitos e plaquetas.^[61]

Na policitemia vera (PV) o aumento do volume eritrócitário é originado por anomalia clonal de uma célula estaminal medular. A patologia resulta de uma mutação somática de uma única célula estaminal hematopoiética, com a resultante descendência a verificar vantagem proliferativa. A mutação JAK2V617f está presente em 97% dos pacientes. Embora

o aumento dos eritrócitos seja de valor diagnóstico em muitos pacientes existe também uma sobreprodução nos granulócitos e plaquetas.

A PV apresenta elevações no hematócrito, hemoglobina ($\text{♂} > 18,5 \text{ g/dL}$; $\text{♀} > 16,5 \text{ g/dL}$) e contagem eritrocitária (eritrocitose absoluta). Na maioria dos pacientes é observada leucocitose neutrofílica e em alguns verifica-se também basofilia, sendo a medula tipicamente hipercelular. A eritropoietina sérica é baixa com elevações plasmáticas de ácido úrico.^[43]

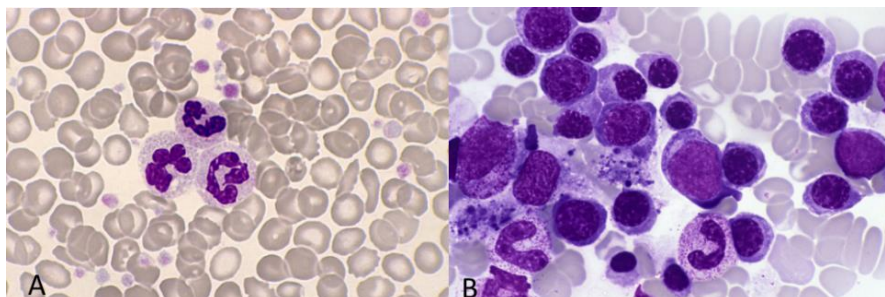


Fig.20.(A) Policitemia vera sangue periférico (1000x); (B) PV medula óssea (1000x) ^[63]

G.3. Trombocitemia essencial

Nesta patologia verifica-se um aumento persistente na contagem de plaquetas devido à proliferação megacariocítica e à subsequente sobreprodução de plaquetas. O hematócrito é normal e o cromossoma de Philadelphia ou rearranjos BCR-ABL1 estão ausentes. Uma contagem persistente de plaquetas superior a $450 \times 10^9/\text{L}$ é central para o diagnóstico, mas outros casos para a elevação de plaquetas (deficiência de ferro, doença inflamatória, mielodisplasia) devem ser primeiramente excluídos.

A mutação JAK2(V617F) ocorre em cerca de 50% a 60% dos pacientes, esta mutação afeta a função plaquetar levando a um estado pró-trombótico. Mutações no gene CALR são observadas em cerca de 75% dos indivíduos com

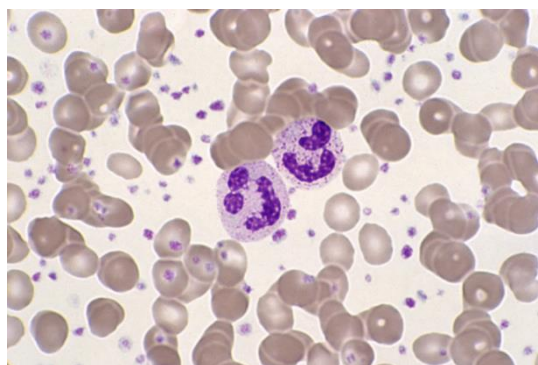


Fig. 21. Trombocitemia essencial, de notar a trombocitose marcada, sangue periférico (1000x) ^[63]

trombocitemia essencial JAK2-negativos, e estes tendem a ser habitualmente mais jovens com uma maior contagem plaquetar mas um menor risco de trombose.^[45,62,63]

G.4. Mielofibrose primária.

A característica predominante desta patologia é a fibrose reativa, progressiva e generalizada da medula óssea, associada com o desenvolvimento da hematopoiese no baço e fígado (metaplasia mieloide). Clinicamente progride para anemia e esplenomegalia massiva, e

em alguns pacientes verifica-se osteoesclerose. A fibrose medular é secundária à hiperplasia de megacariócitos anormais. Os fibroblastos são estimulados por fator de crescimento derivado de plaquetas, TNF- α , e interleucinas I α e I β , secretados pelos megacariócitos e plaquetas. As mutações JAK2, CALR e MPL ocorrem em cerca de 55%, 25% e 10% dos pacientes, respetivamente. Aproximadamente 1/3 dos pacientes são diagnosticados durante a fase pré-fibrótica, tendo como características típicas a anemia, trombocitose e leucocitose moderada. O esfregaço do sangue periférico pode apresentar ocasionalmente eritrócitos nucleados, dacriócitos, granulócitos imaturos e plaquetas gigantes.^[45,61,62]

Conclusão

No término de mais esta etapa, cumpre-me referir que de facto o estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas se reveste de particular importância, pela proximidade e pelo contacto que permite ao contexto profissional. Este contacto permitiu de forma integrada implementar à realidade laboratorial os conceitos teóricos obtidos, a aquisição de fundamentos técnicos e dos princípios de instrumentação, permitiu ainda a avaliação e interpretação dos resultados analíticos obtidos, com a garantia de qualidade sempre presente. Embora que com o progresso tecnológico exista uma crescente automatização dos processos e técnicas implementadas no LAC, é de premente necessidade o conhecimento aprofundado dos fundamentos teóricos e práticos do processo analítico, no sentido de minimizar e corrigir o erro associado às fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, bem como identificar as implicações fisiopatológicas associadas. Reconhecendo por isso a dotação formativa que o Mestrado em Análises Clínicas me proporcionou, e em particular o estágio realizado de que este relatório é alvo.

No final deste ciclo de estudos, certamente surjo pessoal e profissionalmente agraciado e motivado para a prossecução da minha atividade na área das análises clínicas.

Bibliografia

1. Dufour R., *Liver Disease*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2012), pp 1637-1693.
2. Pincus M., Tierno P., Gleeson E., Bowne W., *Evaluation of Liver Function*. McPherson R.A., Pincus M.R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 23rd Ed. (2016), pp 289-305.
3. Higgins T., Eckfeldt J., Barton J., Doumas B., *Hemoglobin, Iron, and Bilirubin*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2012), pp 985-1024.
4. Wolkoff A., *The Hyperbilirubinemias*. In Kasper D., Fauci A., Hauser S., Longo D., Jameson J., Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill Education, New York, 19th Ed. (2012), pp 1999-2004.
5. Hortin J., *Amino Acids, Peptides, and Proteins*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2012), pp 509-559.
6. Panteghini M., Bais R., *Serum Enzymes*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2012), pp 565-596.
7. Chiasera J., Xu X., *Liver Function*. In Bishop M., Fody E., Schoeff L., *Clinical Chemistry Principles, Techniques, Correlations*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 7th Ed. (2013), pp 519-540.
8. Delaney M., Price C., Lamb E., *Kidney Disease*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2012), pp 1523-1596.
9. Briefel G., Oh M., *Evaluation of Renal Function, Water, Electrolytes, and Acid-base Balance*. McPherson R.A., Pincus M.R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 23rd Ed. (2016), pp 162-187.
10. Price C., Lamb E., *Kidney Function Tests*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2012), pp 669-699.

11. Wu A., Lynch K., *Renal Function*. In Bishop M., Fody E., Schoeff L., *Clinical Chemistry Principles, Techniques, Correlations*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 7th Ed. (2013), pp 568-588.
12. Neilson E., Lewis J., *Glomerular Diseases*. In Kasper D., Fauci A., Hauser S., Longo D., Jameson J., Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill Education, New York, 19th Ed. (2012), pp 1031-1056.
13. Maitra A., *The Endocrine System*. In Kumar V., Abbas A., Aster J., *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 9th Ed. (2015), pp 1073-1137.
14. Hussain M., Zhou L., Xen X., *Lipids and Dyslipoproteinemia*. McPherson R.A., Pincus M.R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 23rd Ed. (2016), pp 221-243.
15. Warnick G., Rifai N., Remaley A., *Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Other Cardiovascular Risk Factors*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2012), pp 731-796.
16. Bock J., *Cardiac Injury, Atherosclerosis, and Thrombotic Disease*. McPherson R.A., Pincus M.R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 23rd Ed. (2016), pp 244-252.
17. Jaffe A., Goetze J., Apple F., *Cardiac Function*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2012), pp 1457-1510.
18. Willis M., Jensen B., Durando M., *Laboratory Markers of Cardiac Damage and Function*. In Bishop M., Fody E., Schoeff L., *Clinical Chemistry Principles, Techniques, Correlations*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 7th Ed. (2013), pp 545-563.
19. Nelson D., Cox M., *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman, USA, 6th Ed. (2012).
20. Mitchell R., Schoen F., *The Heart*. In Kumar V., Abbas A., Aster J., *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 9th Ed. (2015), pp 523-577.
21. Willis M., Jensen B., Durando M., *Laboratory Markers of Cardiac Damage and Function*. In Bishop M., Fody E., Schoeff L., *Clinical Chemistry Principles, Techniques, Correlations*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 7th Ed. (2013), pp 545-563.

22. Risteli L., Kleerekoper M., Winter W., *Bone and Mineral Metabolism*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2012), pp 1733-1793.
23. Klein M., Klemm K., *Biochemical Markers of Bone Metabolism*. McPherson R.A., Pincus M.R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 23rd Ed. (2016), pp 188-204.
24. Abraham D., Abraham J., *Calcium Homeostasis and Hormonal Regulation*. In Bishop M., Fody E., Schoeff L., *Clinical Chemistry Principles, Techniques, Correlations*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 7th Ed. (2013), pp 502-517.
25. Kronenberg H., Krane S., Demay M., Bringhurst F., *Bone and Mineral Metabolism in Health and Disease*. In Kasper D., Fauci A., Hauser S., Longo D., Jameson J., Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill Education, New York, 19th Ed. (2012), pp 2454-2466.
26. Hilal-Dandand R., *Renin and Angiotensin*. In Brunton L., Knollman B., Chabner B., *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill Education, New York, 12th Ed. (2011), pp 721-741.
27. Mount D., *Fluid and Electrolyte Disturbances*. In Kasper D., Fauci A., Hauser S., Longo D., Jameson J., Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill Education, New York, 19th Ed. (2012), pp 295-312.
28. Scott M., Hood J., Winter W., *Physiology and Disorders of Water, Electrolyte, and Acid-Base Metabolism*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2012), pp 1609-1634.
29. Kokko J., *Water and Sodium Regulation in Health and Disease*. *Encyclopedia of Life Sciences*. (2007) 25243-25248.
30. Winter W., Path F., Jialal I., *The Adrenal cortex*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2012), pp 1847-1895.
31. Burtis D., Bruns D., Roberts W., *Reference Information for the Clinical Laboratory*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2012), pp 2131-218.
32. Reilly R., Jackson E., *Regulation of Renal Function and Vascular Volume*. In Brunton L., Knollman B., Chabner B., *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill Education, New York, 12th Ed. (2011), pp 672-717.

33. Fodi E., *Pancreatic Function and Gastrointestinal Function*. In Bishop M., Fody E., Schoeff L., *Clinical Chemistry Principles, Techniques, Correlations*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 7th Ed. (2013), pp 590-601.
34. Hruban R., Donahue C., *The Pancreas*. In Kumar V., Abbas A., Aster J., *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 9th Ed. (2015), pp 883-895.
35. Mescher A., *Junqueira's Basic Histology, Text and Atlas*. McGraw-Hill, USA, 13th Ed (2013).
36. Mount D., *Fluid and Electrolyte Disturbances*. In Kasper D., Fauci A., Hauser S., Longo D., Jameson J., Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill Education, New York, 19th Ed. (2012), pp 295-312.
37. Weinstock R., Nadkarni P., *Carbohydrates*. McPherson R.A., Pincus M.R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 23rd Ed. (2016), pp 205-220.
38. Sachs D., *Diabetes Mellitus*. In Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2012), pp 1415-1450.
39. Norma da Direcção-Geral da Saúde, Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus, N° 002/2011, 14/01/2011.
40. Clark K., Hippel T., *Manual, Semiautomated ,and Point-of-Care Testing in Hematology*. In Keohane E., Simth L., Walenga J., *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2016), pp 187-205.
41. Meagher R., *Hematopoiesis*. In Keohane E., Simth L., Walenga J., *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2016), pp 76-91.
42. Doig K., *Erythrocyte Production and Destruction*. In Keohane E., Simth L., Walenga J., *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2016), pp 95-109.
43. Rodak B., Carr J., *Clinical Hematology Atlas*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2016).
44. Marks P., *Approach to Anemia in the Adult and Child*, In Hoffman R., Benz E., Heslop H., Weitz J., Anastasi J., *Hematology Basic Principles and Practice*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2013), pp 418-426.
45. Hoffbrand A., Moss P., *Hoffbrand's Essential Haematology*, Willey Blackwell, West Sussex, UK, 7th Ed. (2016).

46. Khanna-Gupta A., Berliner N., *Granulocytopoiesis and Monocytopoiesis*, In Hoffman R., Benz E., Heslop H., Weitz J., Anastasi J., *Hematology Basic Principles and Practice*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 6th Ed. (2013), pp 280-290.
47. Means R., Glader B., *Anemia: General Considerations*, In Greer J., Arber D., Glader B., List A., Means R., Rodgers G., *Wintrobe's Clinical Hematology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 13th Ed. (2014), pp 587-614.
48. Hirshmann J., Barth D., *Anemia*, In Hirshmann J., Tkachuk D., *Wintrobe's Atlas of Clinical Hematology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1st Ed. (2007), pp 1-47.
49. Lehman C., Rodgers G., *Diagnostic Approach to the Bleeding Disorders*. In Greer J., Arber D., Glader B., List A., Means R., Rodgers G., *Wintrobe's Clinical Hematology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 13th Ed. (2014), pp 1043-1056.
50. Manchanda N., *Anemias: Red Blood Cell Morphology and Approach to Diagnosis*, In Keohane E., Simth L., Walenga J., *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2016), pp 284-294.
51. Fritsma G., *Laboratory Evaluation of Hemostasis*, In Keohane E., Simth L., Walenga J., *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2016), pp 760-785.
52. Hirshmann J., Barth D., *Anemia*, In Hirshmann J., Tkachuk D., *Wintrobe's Atlas of Clinical Hematology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1st Ed. (2007), pp 1-47.
53. Koolman J., Roehm K., *Color Atlas of Biochemistry*, Thieme, New York, 2nd Ed. (2005).
54. Schafer A., *Approach to the Patient with Bleeding and Thrombosis*. In Goldman L., Schafer A., *Goldman-Cecil Medicine*, Saunders Elsevier, Philadelphia, 25th Ed. (2016), pp 1154-1159.
55. Fritsma G., *Antithrombotic Therapies and Their Laboratory Assessment*, in Keohane E., Simth L., Walenga J., *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2016), pp 790-804.
56. Fritsma G., Fristma G., *Normal Hemostasis and Coagulation*, In Keohane E., Simth L., Walenga J., *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2016), pp 642-663.
57. Smock K., Perkins S., *Examination of the Blood and Bone Marrow*, In Greer J., Arber D., Glader B., List A., Means R., Rodgers G., *Wintrobe's Clinical Hematology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 13th Ed. (2014), pp 1-17.

58. Hirshmann J., Tkachuk D., *Acute Leukemias*, In Hirshmann J., Tkachuk D., *Wintrobe's Atlas of Clinical Hematology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1st Ed. (2007), pp 48-93.
59. George T., *Acute Leukemias*, In Hirshmann J., Tkachuk D., *Wintrobe's Atlas of Clinical Hematology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1st Ed. (2007), pp 105-136.
60. Kini A., Diffalha S., Roquiz W., *Leukocyte Development, Kinetics, and Functions*, In Keohane E., Simth L., Walenga J., *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2016), pp 149-163.
61. Hoffbrand A., Pettit J., Vyas P., *Color Atlas of Clinical Hematology*, Mosby Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 4th Ed. (2010).
62. Randolph T., *Myeloproliferative Neoplasms*, In Keohane E., Simth L., Walenga J., *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2016), pp 561-585.
63. Rozenberg G., *Microscopic Haematology a Practical Guide for the Laboratory*. Saunders Elsevier, Australia, 3rd Ed. (2011).
64. Michal G., Schomburg D., *Biochemichal Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2nd Ed. (2012).
65. Longanbach S., Miers M., *Automated Blood Cell Analysis*, in Keohane E., Simth L., Walenga J., *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 5th Ed. (2016), pp 208-227.
66. Pincus M., Lifshitz M., Bock J., *Analysis: Principles of Instrumentation*. McPherson R.A., Pincus M.R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, 23rd Ed. (2016), pp 43-59.

Anexo A

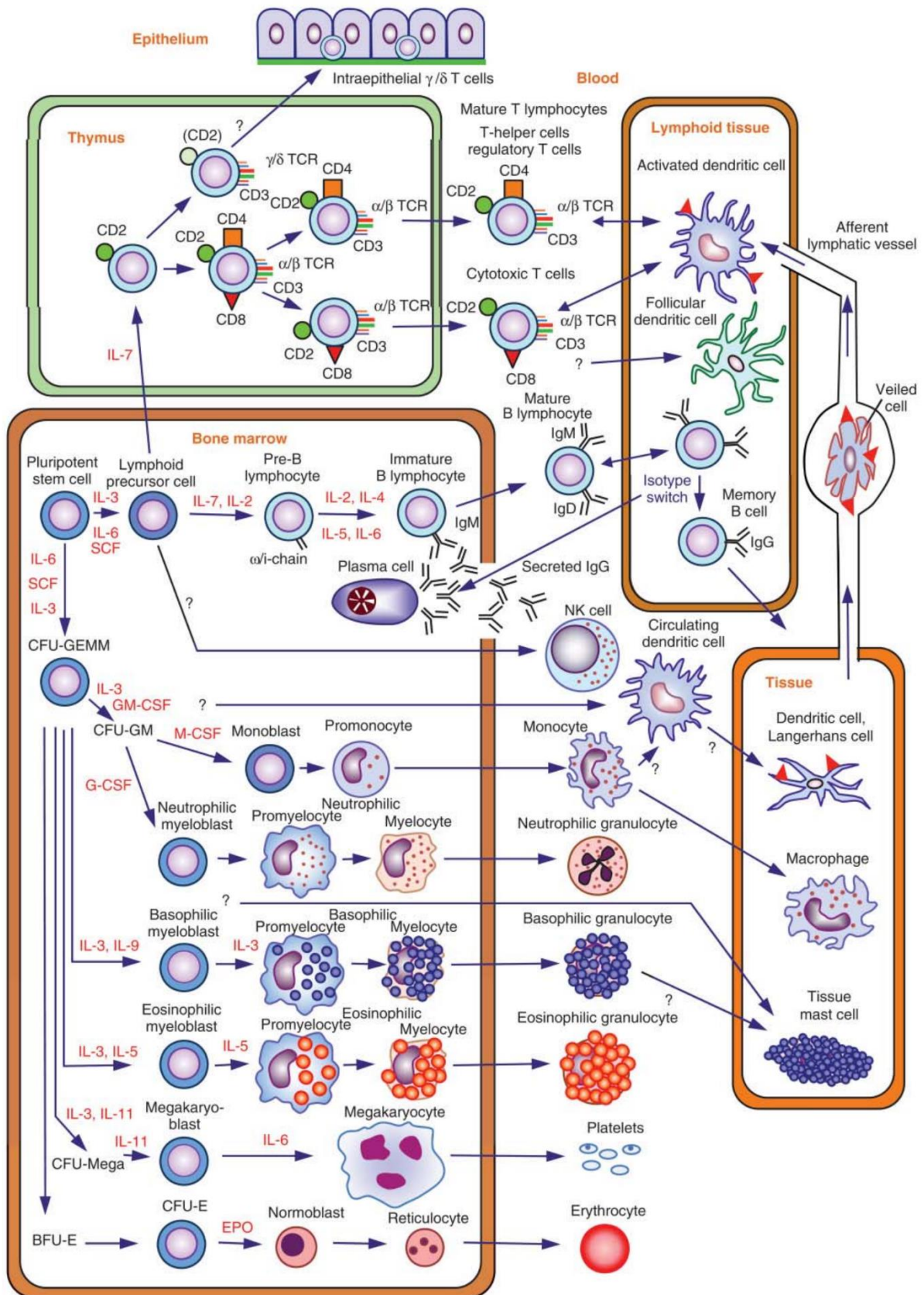


Fig. 22. Diagrama pormenorizado da hematopoiese, com os seus elementos mais representativos e respetivos precursores. [64]

Anexo B

Sequência maturativa eritropoiética (eritropoiese). Figuras A e B por microscopia ótica e eletrônica respectivamente.^[43]

Proeritroblasto (pronormoblasto, rubriblasto)

Tamanho: 12 a 20 μm

Núcleo: redondo a oval

Nucléolos: 1 ou 2

Cromatina: fina

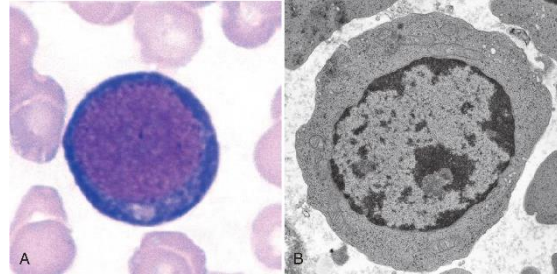
Citoplasma: azul escuro, pode apresentar Golgi proeminente

Ratio N:C: 8:1

Intervalo de referência:

Medula óssea: 1%

Sangue periférico: 0%



Eritroblasto basofílico (normoblasto basofílico, prorubricito)

Tamanho: 10 a 15 μm

Núcleo: redondo a oval

Nucléolos: 0 a 1

Cromatina: ligeiramente condensada

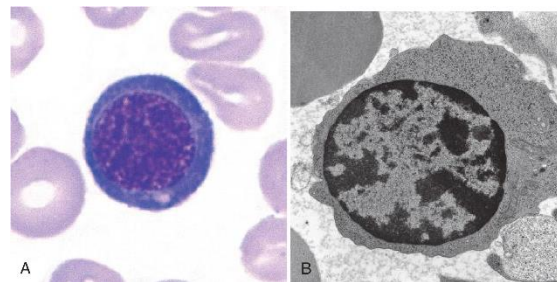
Citoplasma: azul escuro

Ratio N:C: 6:1

Intervalo de referência:

Medula óssea: 1% a 4%

Sangue periférico: 0%



Eritroblasto policromático (normoblasto policromático, rubricito)

Tamanho: 10 a 12 μm

Núcleo: redondo

Nucléolos: ausentes

Cromatina: condensada

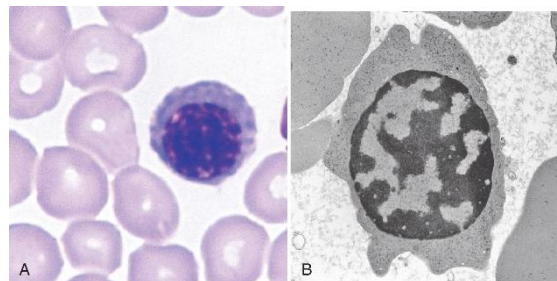
Citoplasma: azul acinzentado (resultado da hemoglobinizacão)

Ratio N:C: 4:1

Intervalo de referência:

Medula óssea: 10% a 20%

Sangue periférico: 0%



Eritroblasto ortocromático (normoblasto ortocromático, metarubricito)

Tamanho: 8 a 10 μm

Núcleo: redondo

Nucléolos: ausentes

Cromatina: completamente condensada

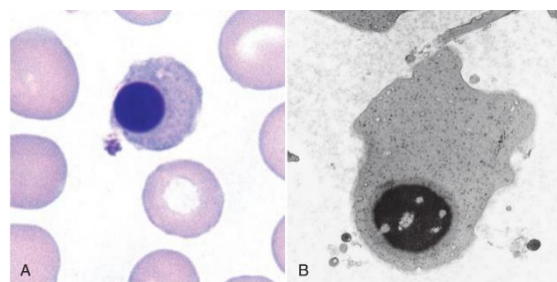
Citoplasma: rosa ou salmão, azul tênue

Ratio N:C: 0,5:1

Intervalo de referência:

Medula óssea: 5% a 10%

Sangue periférico: 0%



Eritrócito policromático (reticulócito)

Tamanho: 8 a 8,5 μm

Núcleo: ausente

Nucléolos: NA

Cromatina: NA

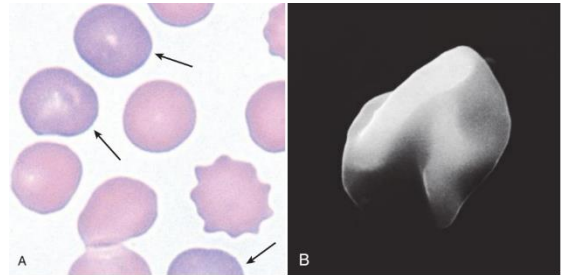
Citoplasma: mais azul/púrpura que o eritrócito maduro

Ratio N:C: NA

Intervalo de referência:

Medula óssea: 1%

Sangue periférico: 0,5% a 2%



Eritrócito

Tamanho: 7 a 8 μm

Núcleo: ausente

Nucléolos: NA

Cromatina: NA

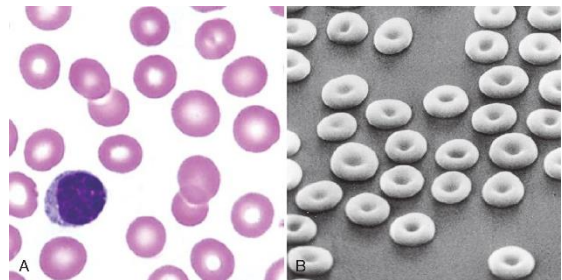
Citoplasma: salmão com centro pálido, com 1/3 do diâmetro da célula.

Ratio N:C: NA

Intervalo de referência:

Medula óssea: NA

Sangue periférico: Tipo celular predominante.



Anexo C

Leucopiose neutrofilica. Figuras A e B por microscopia ótica e eletrônica respectivamente.^[43]

Mieloblasto

Tamanho: 15 a 20 μm

Núcleo: redondo a oval

Nucléolos: 2 a 5

Cromatina: fina

Citoplasma: Basófila moderada

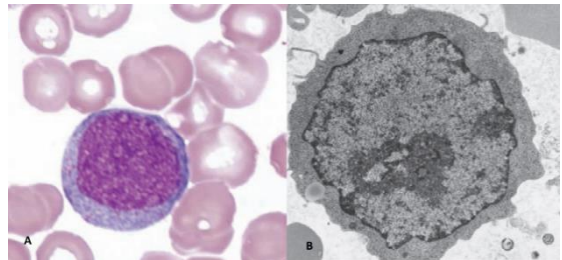
Grânulos: ausentes ou até 20

Ratio N:C: 4:1

Intervalo de referência:

Medula óssea: 0% a 2%

Sangue periférico: 0%



Promielócito

Tamanho: 14 a 24 μm (ligeiramente maior que o mieloblasto)

Núcleo: redondo a oval

Nucléolos: 1 a 3 ou mais

Cromatina: fina, mas mais grosseira que no mieloblasto

Citoplasma: Basófilo

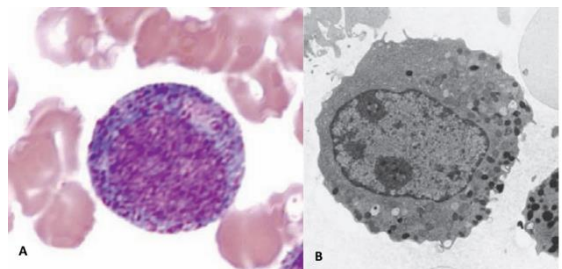
Grânulos: superiores a 20, vermelhos ou púrpura

Ratio N:C: 3:1

Intervalo de referência:

Medula óssea: 2% a 5%

Sangue periférico: 0%



Mielócito neutrofílico

Tamanho: 12 a 18 μm

Núcleo: redondo a oval; ligeiramente excêntrico; face achatada

Nucléolos: normalmente invisíveis.

Cromatina: grosseira e mais condensada que no promielócito

Citoplasma: ligeiramente basófilo

Grânulos:

Primários: alguns a moderados.

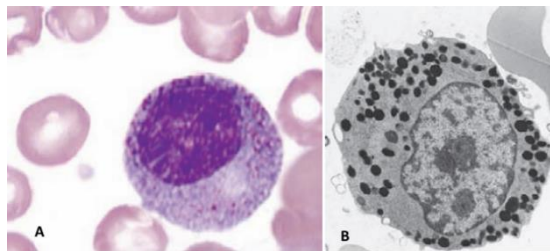
Secundários: número variável, predominantes com a maturação

Ratio N:C: 2:1

Intervalo de referência:

Medula óssea: 5% a 19%

Sangue periférico: 0%



Metamielócito neutrofílico

Tamanho: 10 a 15 μm

Núcleo: indentado; forma de rim

Nucléolos: invisíveis.

Cromatina: moderadamente agregada

Citoplasma: rosa-pálido a incolor

Grânulos:

Primários: poucos

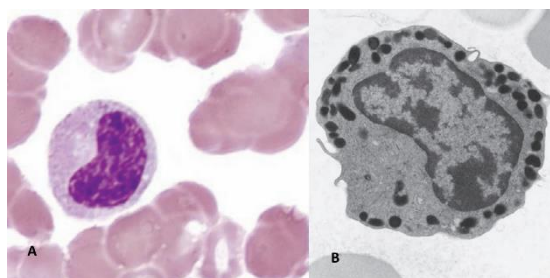
Secundários: muitos

Ratio N:C: 1,5:1

Intervalo de referência:

Medula óssea: 13% a 22%

Sangue periférico: 0%



Neutrófilo em banda

Tamanho: 10 a 15 μm

Núcleo: indentado com grande constrição

Nucléolos: invisíveis.

Cromatina: grosseira, agregada

Citoplasma: rosa-pálido a incolor

Grânulos:

Primários: poucos

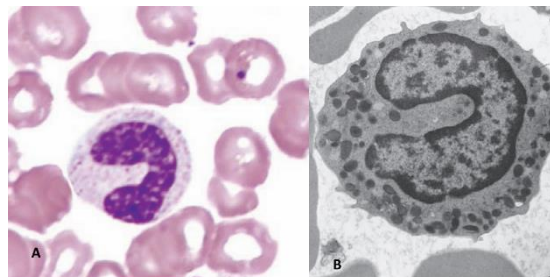
Secundários: abundantes

Ratio N:C: citoplasma predominante

Intervalo de referência:

Medula óssea: 17% a 33%

Sangue periférico: 0% a 5%



Neutrófilo segmentado (polimorfonuclear)

Tamanho: 10 a 15 μm

Núcleo: 2 a 5 lóbulos interligados por filamento fino, cromatina invisível

Nucléolos: invisíveis.

Cromatina: grosseira, agregada

Citoplasma: rosa-pálido a incolor

Grânulos:

Primários: raros

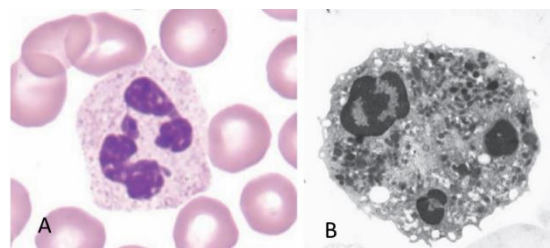
Secundários: abundantes

Ratio N:C: citoplasma predominante

Intervalo de referência:

Medula óssea: 3% a 11%

Sangue periférico: 50% a 70%



Anexo D

Leucócitos da linhagem mieloide (neutrófilos não representados) em estado maturativo terminal e respectivas funções. Figuras A e B por microscopia ótica e eletrônica respectivamente.^[43,45]

Eosinófilo

Tamanho: 12 a 17 μm

Núcleo: 2 a 3 lóbulos interligados por filamento fino, cromatina invisível

Nucléolos: invisíveis.

Cromatina: grosseira, agregada

Citoplasma: pode apresentar contornos irregulares

Grânulos:

Primários: raros

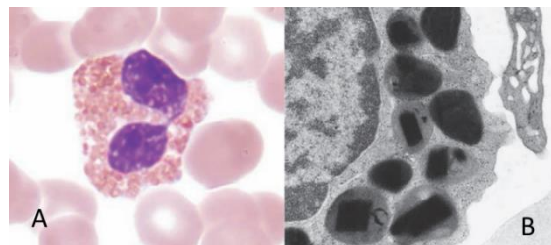
Secundários: abundantes e retráteis

Ratio N:C: citoplasma predominante

Intervalo de referência:

Medula óssea: 0% a 3%

Sangue periférico: 0% a 5%



Os eosinófilos têm múltiplas funções. Os grânulos dos eosinófilos contêm um grande número de proteínas previamente sintetizadas, incluindo citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, e proteínas catiónicas. Desempenham um importante papel na regulação imunitária, podem transmigrar para o timo dos recém-nascidos e pensa-se estar envolvidos na remoção dos tímócitos duplos positivos (CD4+, CD8+). Os eosinófilos são capazes de atuar como células apresentadoras de antígenos, promovendo a proliferação de linfócitos T efectores. Estão também implicados na iniciação das repostas imunitárias tipo I ou tipo 2 pela sua capacidade de rapidamente secretar citocinas preformadas de forma estímulo-específica. Os eosinófilos regulam a função dos mastócitos pela libertação da proteína básica principal (MBP, major basic protein), que provoca a desgranulação dos mastócitos e a produção de citocinas, produzem também fator de crescimento nervoso que promove a sobrevivência e ativação dos mastócitos.

A produção eosinofílica encontra-se aumentada em infeções parasitárias por helmintas, existindo estudos in vitro que demonstram que os eosinófilos são capazes de destruir helmintas parasitas dos tecidos através da secreção de MBP e proteínas catiónicas bem como pela produção de ROS. Pensa-se que os eosinófilos possam desempenhar um papel na prevenção da reinfeção.

A eosinofilia é a característica mais relevante nas desordens alérgicas, de onde se destaca a asma. O número de eosinófilos em circulação e na expetoração correlacionam-se com a severidade da doença. Os eosinófilos são uma das causas conducentes à inflamação das vias aéreas e da destruição das células das mucosas através da secreção ou produção de uma combinação de proteínas básicas, mediadores lipídicos, ROS e citocinas tais como a IL-

5. O tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-5 diminui a exacerbação em determinados pacientes asmáticos. A acumulação dos eosinófilos no trato gastrointestinal ocorre em patologias alérgicas, tais como alergia alimentar, colite alérgica, e em situações inflamatórias como no caso da doença de Crohn e a colite ulcerosa.

Basófilo

Tamanho: 10 a 14 μm

Núcleo: 2 lóbulos interligados por filamento fino, cromatina invisível

Nucléolos: invisíveis.

Cromatina: grosseira, agregada

Citoplasma: lavanda a incolor

Grânulos:

Primários: raros

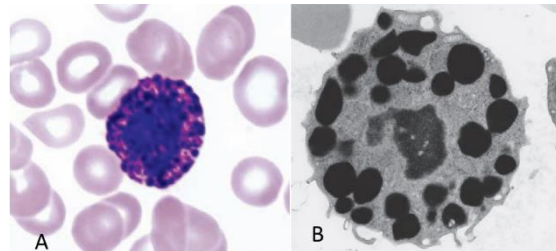
Secundários: grandes, número variável (púrpura escuro)

Ratio N:C: citoplasma predominante

Intervalo de referência:

Medula óssea: <1%

Sangue periférico: 0% a 1%



O conhecimento atual sobre as funções desempenhadas pelos basófilos é limitado, pelo facto de circularem em número reduzido e pela ausência de modelos animais deficientes em basófilos. No passado, os basófilos eram reconhecidos como “parentes afastados” dos mastócitos e intervenientes menores na inflamação alérgica, devido ao facto de apresentarem à superfície da membrana citoplasmática receptores Ig E, que quando ligados cruzadamente por antigénios resulta na libertação dos seus grânulos. Atualmente sabe-se que os basófilos são capazes de libertar citocinas em grande quantidade como a IL-4 e a IL-13, que regulam as respostas imunitárias pelos linfócitos T_H2 . Os basófilos também induzem os linfócitos B a sintetizar IgE. Se os mastócitos são as células efectoras na inflamação alérgica crónica mediada por IgE, os basófilos funcionam como iniciadores da inflamação alérgica pela libertação de citocinas preformadas. A ativação dos basófilos não se encontra restringida à ligação cruzada de antigénios específicos a IgE de superfície, e pode ser despoletada por antigénios parasitários, lectinas, e superantigénios virais ligados a anticorpos IgE inespecíficos.

O conteúdo dos grânulos dos basófilos é relativamente desconhecido, e inclui histamina, fator de ativação de plaquetas, leucotrienos C_4 entre outros. Os basófilos podem ser induzidos a produzir mediadores de inflamação alérgica conhecidos como granzima B. Os mastócitos podem induzir os basófilos a produzir e libertar ácido retinoico, um regulador das células imunitárias e residentes nas doenças alérgicas. Os basófilos desempenham ainda um papel na angiogénese pela expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) e dos seus recetores.

Juntamente com os eosinófilos, os basófilos estão envolvidos no controlo de infeções por helmintas. Promovem a eosinofilia, estão associados ao processo de diferenciação dos macrófagos ativados alternativamente no pulmão. Existem estudos que apontam para o seu envolvimento na mediação de imunidade adquirida contra carraças.

Monócito

Tamanho: 12 a 20 μm

Núcleo: variável; redondo, forma de ferradura ou rim

Nucléolos: invisíveis.

Cromatina: laxa

Citoplasma: azul-cinza; pode apresentar pseudópodes

Grânulos: abundantes grânulos finos

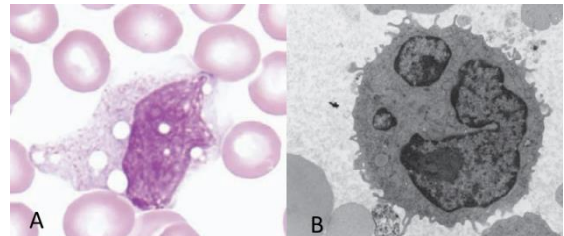
Vacúolos: ausentes ou abundantes

Ratio N:C: variável

Intervalo de referência:

Medula óssea: 2%

Sangue periférico: 3% a 11%



Os monócitos permanecem na circulação durante aproximadamente 3 dias, e apresentam diferentes padrões de recetores de quimiocinas tendo por isso diferentes funções e tecidos alvos. Uma vez nos tecidos, os monócitos diferenciam-se em macrófagos, osteoclastos, ou células dendríticas, dependendo do microambiente no tecido local. Os macrófagos dos tecidos apresentam períodos de vida diferentes dependendo se estão a responder a inflamação ou infeção, ou se por outro lado são macrófagos “residentes” como as células de Kupffer (fígado) ou os macrófagos alveolares.

Os monócitos/macrófagos desempenham enumeras funções. Estas podem ser subdivididas em funções relacionadas com a imunidade inata, imunidade adaptativa, e funções *housekeeping*.

- **Imunidade Inata:** Os monócitos/macrófagos reconhecem uma vasta gama de patógenos bacterianos através de receptores de reconhecimento de padrão (receptores *toll-like*) que estimulam a produção de citocinas inflamatórias e a fagocitose. Os macrófagos podem sintetizar óxido nítrico, que é citotóxico contra vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintas e células tumorais. Tanto os monócitos como os macrófagos têm recetores Fc e recetores do complemento. Desta forma, são capazes de fagocitar organismos ou materiais estranhos que foram revestidos por anticorpos ou componentes do complemento.
- **Imunidade adaptativa:** Tanto os macrófagos como as células dendríticas degradam antígenos e podem apresentar fragmentos antigénicos na sua superfície (células apresentadoras de antígenos), embora as células dendríticas sejam mais eficientes e

potentes nesta função. Interação e ativam tanto os linfócitos T como linfócitos B de forma a iniciar a resposta imunitária adaptativa.

- Funções *Housekeeping*: Nesta categoria inclui-se a remoção de detritos e células mortas nos locais de infecção ou dano nos tecidos, destruição de eritrócitos senescentes e manutenção da pool de ferro para a eritropoiese, e síntese de uma vasta gama de proteínas, incluindo fatores de coagulação, componentes do complemento, interleucinas, fatores de crescimento, e enzimas.

Anexo E

Prólinfócito

Tamanho: 9 a 18 μm

Núcleo: redondo ou indentedo

Nucléolos: 0 a 1, usualmente único e proeminente

Cromatina: ligeiramente agregada

Citoplasma: azul-claro

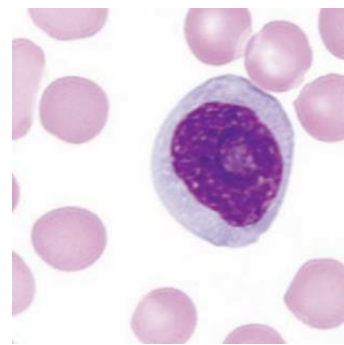
Grânulos: ausentes

Ratio N:C: 3 a 4:1

Intervalo de referência:

Medula óssea: não definido

Sangue periférico: ausentes



Linfócitos

Tamanho: 7 a 18 μm

Núcleo: redondo a oval

Nucléolos: ocasionais

Cromatina: condensada; ligeiramente agregada

Citoplasma: azul claro; pode apresentar vacúolos.

Grânulos: ausentes em linfócitos pequenos;

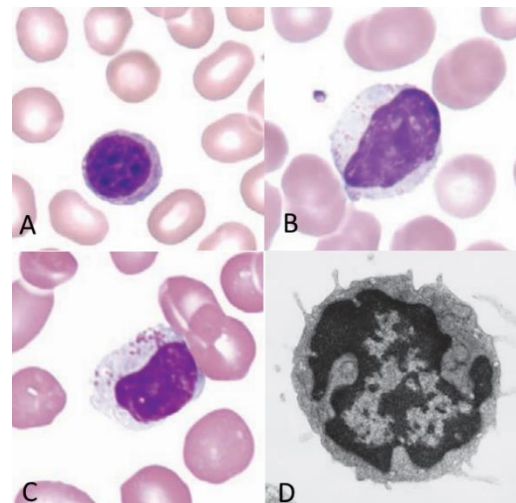
pode apresentar grânulos azurófilos nos linfócitos grandes

Ratio N:C: 5:1 a 2:1

Intervalo de referência:

Medula óssea: 5% a 15%

Sangue periférico: 20% a 40%



Plasmócitos

Tamanho: 8 a 20 μm

Núcleo: redondo a oval; excêntrico

Nucléolos: ausentes

Cromatina: condensada

Citoplasma: basófilo; halo perinuclear frequente

Grânulos: ausentes

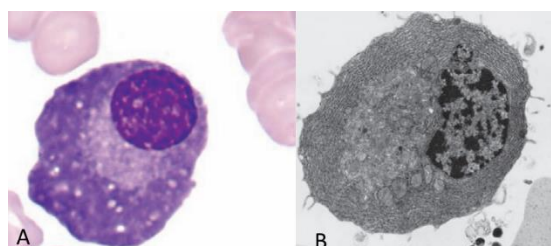
Vacúolos: ausentes/vários

Ratio N:C: 2:1 a 1:1

Intervalo de referência:

Medula óssea: 0% a 1%

Sangue periférico: 0%



A sequência ilustrada em cima refere-se à linfopoiese de células B com plasmócitos como célula terminal mais diferenciada. O plasmócito é um tipo celular especializado na produção de imunoglobinas, quando em exposição prévia a determinado antígeno estranho ao organismo. A sequência maturativa da linhagem T é em tudo idêntica à maturação da linhagem B, sendo o plasmócito exclusivo dos linfócitos B.^[43,45]

Anexo F

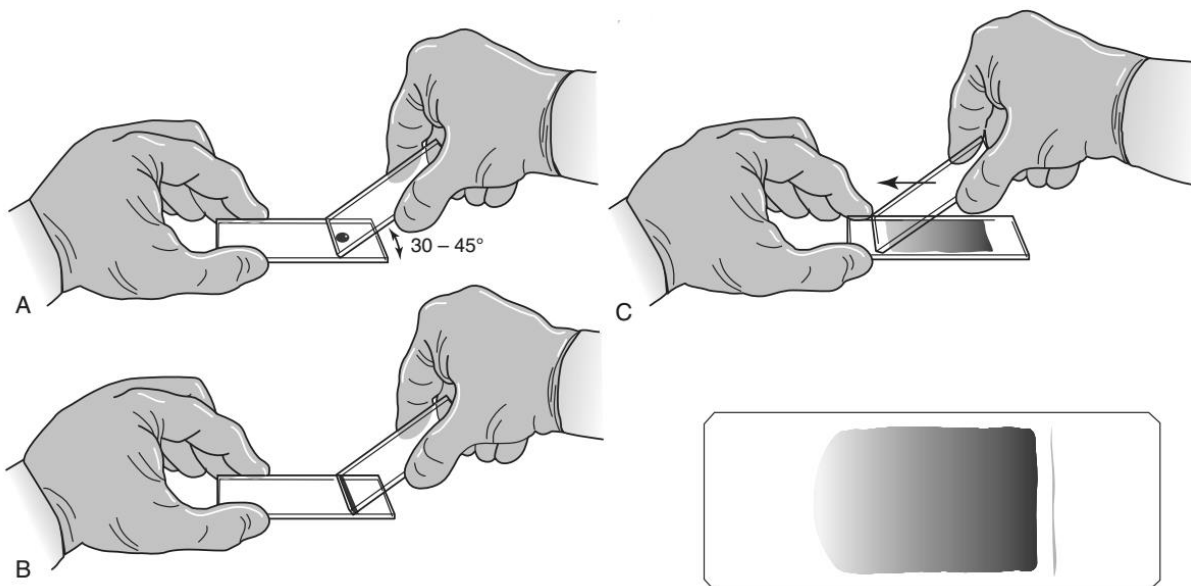
Fatores de coagulação.^[51]

Factor	Nome	Função	Peso molecular (Daltons)	Concentração plasmática média
I	Fibrinogénio	Substrato da trombina, polimerizar para formar fibrina	340,000	200-400 mg/dL
II	Protrombina	Protease serina	71,600	10 mg/dL
III	Factor tecidual	Cofactor	44,000	Ausente
IV	Cálcio iónico	Mineral	40	8-10 mg/dL
V	Factor lábil	Cofactor	330,000	1 mg/dL
VII	Factor estável	Protease serina	50,000	0,05 mg/dL
VIII	Factor antihemofílico	Cofactor	260,000	0,01 mg/dL
VWF	Factor de von Willebrand	Transportador do factor VIII; promove adesão plaquetar	600,000-20,000,000	1 mg/dL
IX	Factor Christmas	Protease serina	57,000	0,3 mg/dL
X	Factor Stuart-Power	Protease serina	58,800	1 mg/dL
XI	Antecedente da tromboplastina plasmática	Protease serina	143,000	0,5 mg/dL
XII	Factor Hageman	Protease serina	84,000	3 mg/dL
Precalcreína	Factor Fletcher, pre-K	Protease serina	85,000	35-50 µg/mL
Cinogénio de alto peso molecular	Factor Fitzgerald, HMWK	Cofactor	120,000	5 mg/dL
XIII	Factor estabilizador de fibrina	Transglutaminase, transamidase	320,000	2 mg/dL
Factor de plaquetas 3	Fosfolípidos, fosfatidilserina	Molécula de montagem		

Anexo G

Para a realização de esfregaço de sangue periférico o LACCSMC utiliza a coloração May-Grunwald-Giemsa.^[40] Estão estabelecidos determinados critérios para a sua prossecução, devendo o hemograma obedecer a um dos critérios infracitados:

- Inversão de fórmula \geq a 10%;
- Monócitos $>$ 15%;
- Basófilos $>$ 3%;
- RDW $>$ 15;
- RDW $>$ 14 se determinadas constantes eritrocitárias estão alteradas;
- Trombocitopenias (Plaquetas $<$ $150 \times 10^3/\mu\text{L}$).
- Trombocitoses
- Leucócitos $>$ $8 \times 10^9 /\text{L}$
- Ou outras situações identificadas no leucograma, como leucocitoses elevadas (neutrofilias $>$ 85%)



Anexo H

Princípios instrumentais de análise.

CELL-DYN Ruby®

O laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra dispõe na secção de hematologia de um citómetro fornecido pela Abbot Laboratories®. O CELL-DYN Ruby® é um sistema automatizado para a prossecução do hemograma. Apresenta 3 canais de medição independentes para a determinação e diferenciação do hemograma: um canal ótico para a contagem e diferencial leucocitário (WBC), um canal de impedância para eritrócitos (RBC) e plaquetas, e um canal de hemoglobina, para a determinação da hemoglobina. Os parâmetros WBC, RBC, hemoglobina e plaquetas consideram-se de determinação direta. Existe uma abertura de 60-70 µm no transdutor RBC/plaquetas para a contagem e caracterização volumétrica dos eritrócitos e plaquetas, pelo método de impedância eletrónica. Existe uma placa de von Behrens na câmara de contagem de RBC/plaquetas de forma a minimizar o efeito da recirculação das células. Os pulsos são registados e diferenciados por 256 canais dependendo da sua amplitude: partículas com um volume entre 1 a 35 fL são agrupadas como plaquetas, e partículas com um volume superior a 35 fL são contadas como eritrócitos. O MCV é o volume médio de RBC derivado dos dados da sua distribuição volumétrica. A hemoglobina é medida diretamente recorrendo ao método hemoglobinacianida modificado que mede a sua absorvância a 540 nm. O hematócrito, MCH, e MCHC são calculados de parâmetros medidos diretamente ou derivados. O RDW é um valor relativo, derivado do histograma de RBC pela utilização dos percentis 20 e 80. A análise de plaquetas tem por base a contagem ótica de duas dimensões recorrendo a tecnologia de fluorescência, a mesma tecnologia aplicada na contagem de eritrócitos nucleados, através da adição de um fluoróforo vermelho. Na contagem de reticulócitos o sistema implementa o método azul de metileno novo, um corante supravital.^[65]

A contagem de leucócitos (WBC) e o seu diferencial, deriva do canal ótico utilizando a tecnologia patenteada MAPSS (*multiangle polarized scatter separation*) com tecnologia de fluorescência de 3 cores, integrada na gama CELL-DYN. Um feixe de luz, laser de argon, é incidido sobre a amostra que flui numa corrente hidrodinâmica. A luz dispersa é medida em múltiplos ângulos: a medição de *forward light scatter* (0 graus) é utilizada na determinação do volume celular, a medição da luz dispersa com um ângulo de 90° (*orthogonal light scatter*) é utilizada na determinação da lobularidade celular, a luz dispersa com um ângulo de 7° é utilizada na avaliação da complexidade celular, e a medição de luz despolarizada com um ângulo de 90° é utilizada na avaliação de granularidade celular. A dispersão da luz ortogonal é

dividida em duas componentes, sendo uma porção direcionada para um tubo fotomultiplicador de 90°, e a outra porção direcionada através de um polarizador para um tubo fotomultiplicador despolarizado. Várias combinações destas 4 medições são aplicadas de forma a quantificar e diferenciar as 5 principais subpopulações de leucócitos: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. A figura 23 ilustra a tecnologia MAPPS da gama CELL-DYN. Os sinais da luz dispersa são convertidos em sinais elétricos, agrupados nos 256 canais tendo por base a amplitude de cada ângulo de luz medido, sendo apresentados em histogramas.^[40,65]

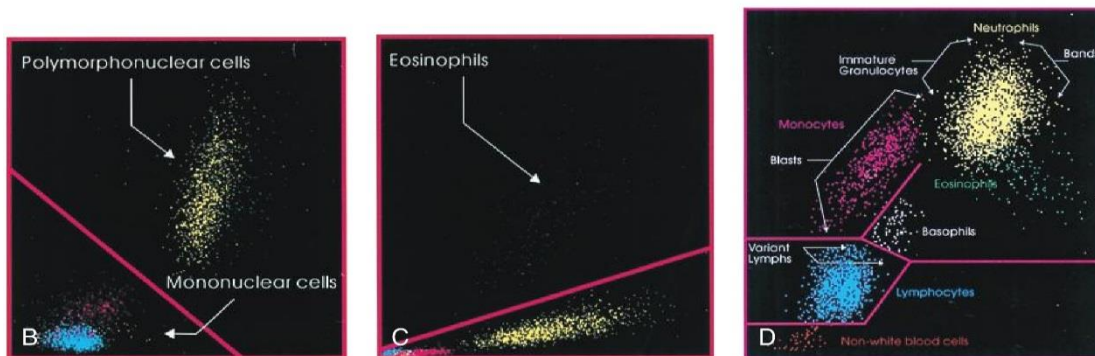
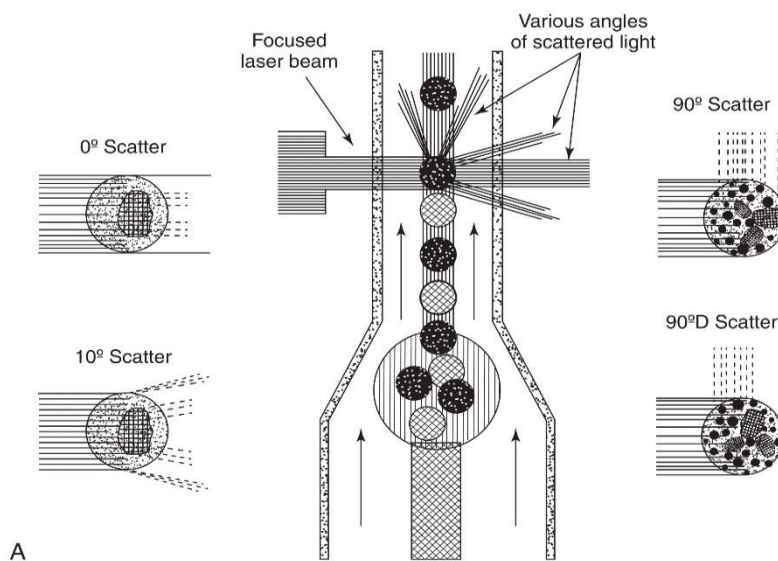


Fig. 23. **A**, Tecnologia MAPPS (*multiangle polarized scatter separation*). As células são medidas e caracterizadas em histogramas de dispersão provenientes da dispersão da luz em 4 ângulos. **B**, Dispersão de células mononucleares e polimorfonucleares, a dispersão de 10° (complexidade) é distribuída no eixo dos xx e a dispersão da luz em 90° (lobularidade) é distribuída no eixo dos yy. O sistema utiliza algoritmos para posterior separação das 2 populações apresentando os mononucleares no canto inferior esquerdo, e os polimorfonucleares no canto superior direito. **C**, Separação e apresentação em histogramas de polimorfonucleares em neutrófilos e eosinófilos. A dispersão de 90° (lobularidade) é apresentada no eixo dos xx e a dispersão da luz polarizada em 90° (90D) nos eixos dos yy. **D**, Dispersão de todas as populações de WBC pela tecnologia MAPPS, a dispersão de 10° (complexidade) é apresentada no eixo dos xx, e a dispersão de 0° (tamanho e volume) no eixo dos yy. Atualmente é utilizado um ângulo de 7° para a complexidade.^[65]

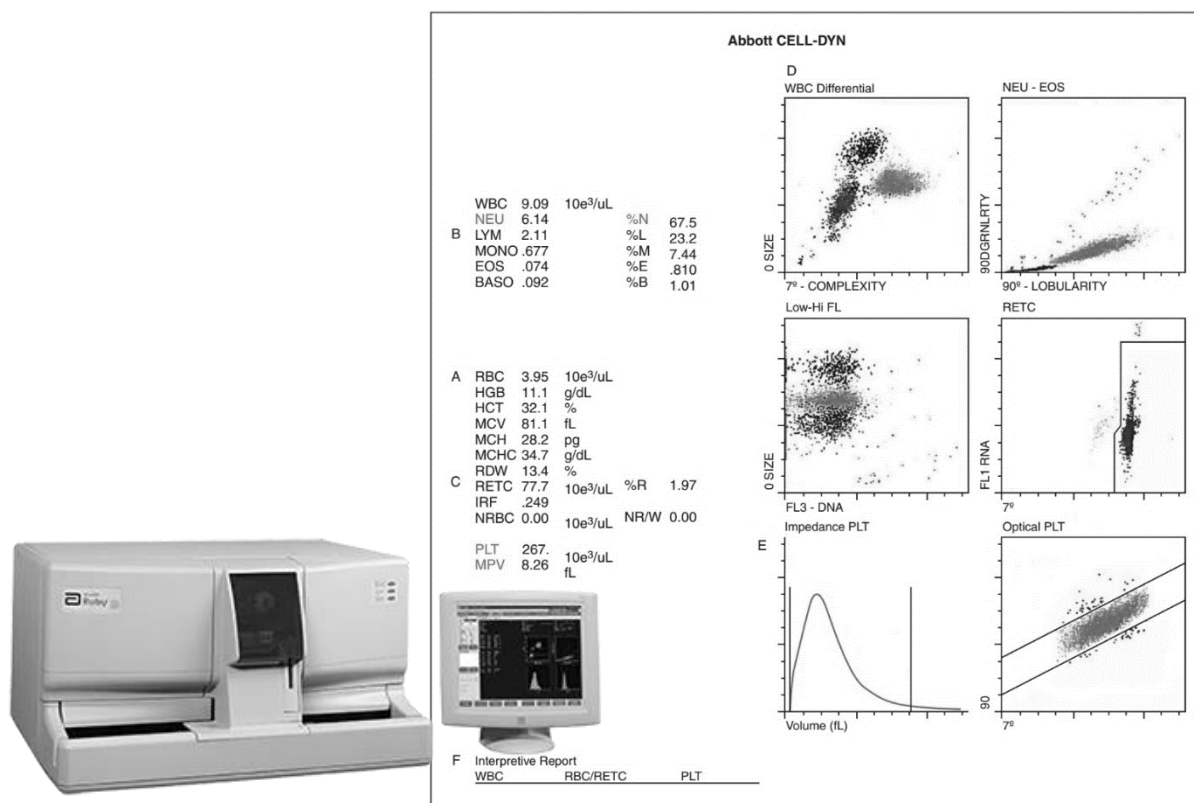


Fig. 24. CELL-DYN Ruby® com respetivo histograma.[65]

Adams AIC-HA-8160®

Na determinação das várias hemoglobinas, particularmente HbA_{1c}, recorre-se habitualmente a tecnologia cromatográfica. O LACCSMC está equipado com um equipamento automático para a determinação de hemoglobina glicada, o Adams AIC-HA-8160, fornecido pela Arkray®. Este equipamento tem a capacidade de separar a HbA_{1c} bem como outras hemoglobinas, particularmente a HbF, recorrendo a cromatografia líquida de alta precisão (HPLC).

A cromatografia é um método de separação baseado nas diferentes interações dos compostos em análise com a fase móvel e com a fase estacionária, no decorrer do seu percurso através do meio de suporte. Os compostos que interajam com maior afinidade com a fase estacionária são retidos durante mais tempo do que aqueles que favorecem a fase móvel. As técnicas cromatográficas podem ser classificadas tendo por base a sua fase móvel: Cromatografia gasosa ou cromatografia líquida.[38,66]

O sistema de HPLC típico consiste de uma fase móvel, um injetor de amostra (manual ou automático), uma bomba mecânica, uma coluna, detetor, e um registador de dados. A fase líquida móvel é bombeada a partir de um reservatório de solvente (eluente) através da coluna. A bomba mecânica deve fornecer um fluxo preciso, funcionando a

pressões elevadas (tipicamente a 6000 PSI; 41,364 MPa). Existem 2 tipos básicos de detetores, um baseado na medição diferencial de uma propriedade física comum à amostra e à fase móvel (Índice de refração, condutividade); o outro baseia-se na medição de uma propriedade física que é típica da amostra, com ou sem a fase móvel (absorvância, detetores de fluorescência).

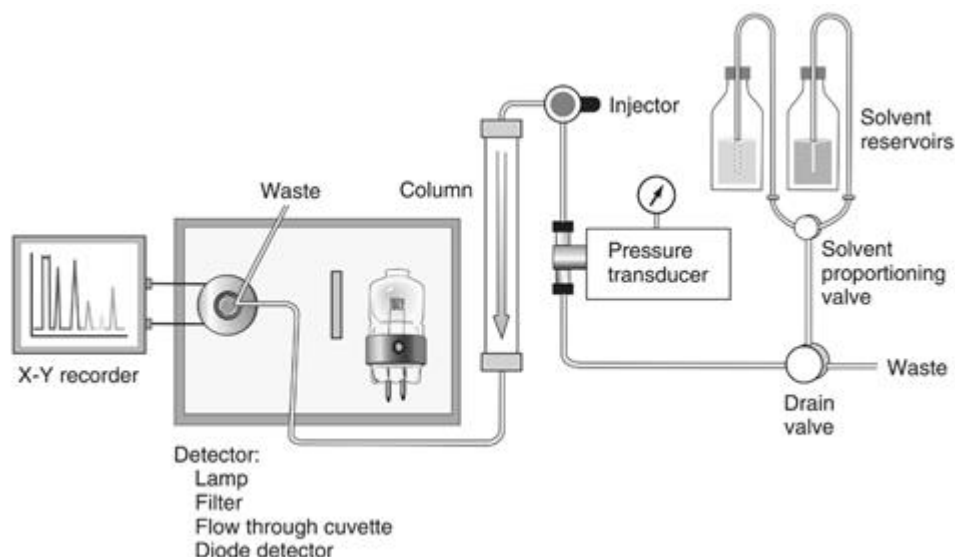
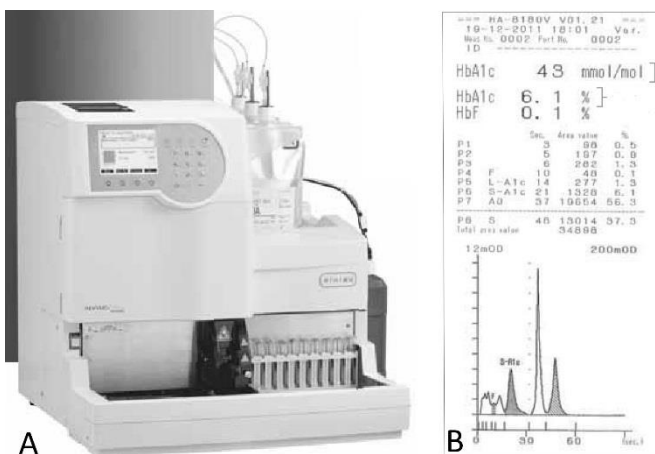


Fig. 25. Componentes integrantes de um sistema de HPLC.^[66]

Como referido a HbA_{1c} e outras frações de hemoglobina podem ser separadas por HPLC, baseada em tecnologia de cromatografia por troca iónica. O ensaio requer apenas 14 µL de amostra de sangue total. O sangue colhido em tubos com anticoagulante (EDTA K3) é diluído com reagente de hemólise na presença de borato. Alguns equipamentos requerem que as amostras sejam incubadas durante 30 minutos a 37 °C no sentido de remover a base de Schiff, contudo outros equipamentos separam cromatograficamente a A_{1c} labil, eliminando desta forma o passo de remoção da base de Schiff. A deteção é realizada a 420 e 500 nm, e os resultados são quantificados pela integração da área sob os picos, com um tempo de análise rápido, na ordem dos 2 min.^[66]

Fig. 26. (A) Adams A1C-HA-8160, e resultado (B) vulgarmente obtido na determinação de HbA_{1c}, com valores expressos tanto em percentagem como em mmol/mol (Hb F com resultado expresso).



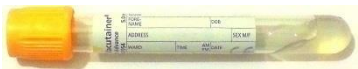



Architect *ci8200*[®]

Na secção de bioquímica o Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra dispõe de um autoanalisador fornecido pela Abbott Diagnostics[®], o Architect *ci8200*[®]. Este equipamento é composto por dois módulos, o da bioquímica *c8000* e o da imunologia *i200SR*. No primeiro são processadas amostras com várias origens: soro, plasma, urina e líquido cefaloraquídeo, e tem por base métodos analíticos potenciométricos, turbidimétricos e fotométricos. O módulo *i200SR* tem a capacidade de processar amostras com várias proveniências: soro, plasma, sangue total e urina, recorrendo aos métodos imunométricos para a avaliação e determinação dos parâmetros a processar.



Fig. 27. Architect *ci8200*[®]

Anexo I

Tipo de tubo	Aditivo	Produto	Prova
Tubos de separação sérico. 	Polímero de separação em gel /partículas de Sílica como ativador.	Soro (centrifugação necessária)	Bioquímica Endocrinologia Toxicologia Imunologia
Tubos de sangue total/plasma 	EDTA K3 (aditivo líquido); 1,5 +/- 0,25 mg/mL sangue	Sangue Total	Hematologia HbA _{1c}
Tubos de sangue total/plasma 	Citrato de Sódio; 3,2%; 9 vol sangue/1 vol anticoagulante.	Sangue Total (centrifugação necessária)	Provas de coagulação
Tubos de sangue total/plasma 	Citrato de Sódio; 3,2%; 4 vol sangue/1 vol anticoagulante.	Sangue Total	Velocidade de Sedimentação

Anexo J

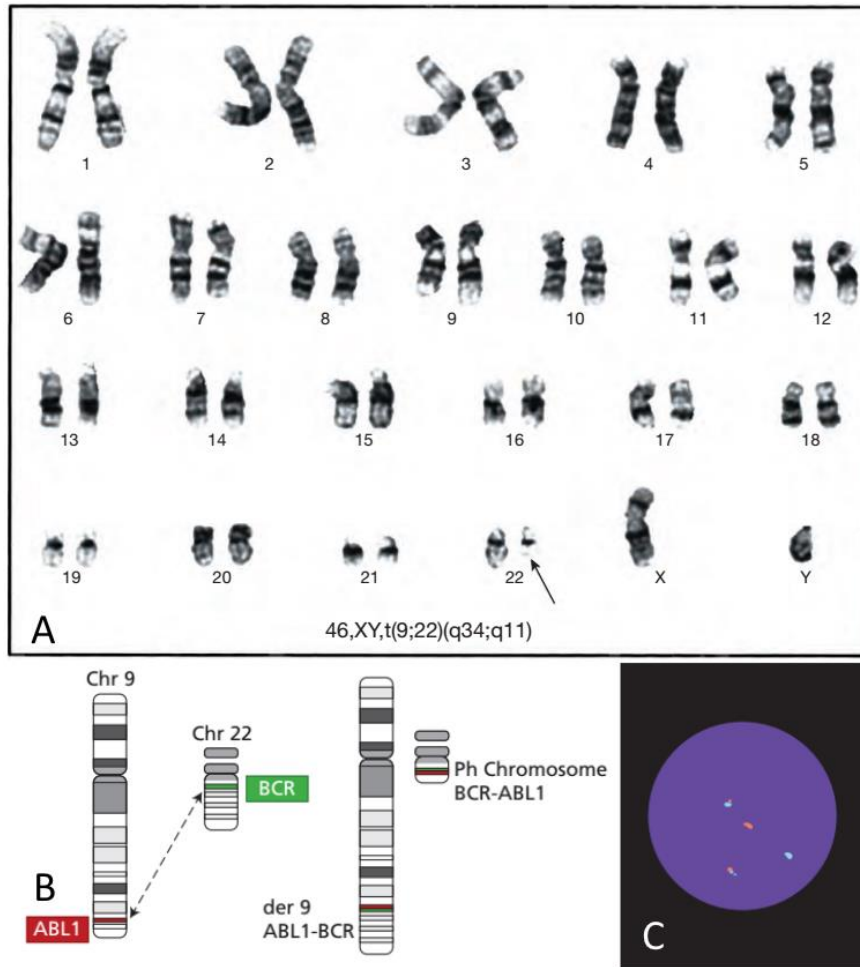


Fig. 28. (A) Cariotipo de um paciente com CML onde é evidente a translocação $t(9;22)(q34;q11)$, também designado de cromossoma de Philadelphia (Ph) indicado pela seta. (B) A translocação $t(9;22)(q34;q11)$ leva a uma justaposição de material genético dos cromossomas 9 e 22, com a formação de dois genes de fusão BCR-ABL1 e ABL1-BCR, sendo o primeiro crucial para a patogênese da CML e da ALL Ph+. (C) Hibridização *in-situ* de fluorescência (FISH; fluorescence *in-situ* hybridization). A hibridização de uma sequência de um oligonucleótido complementar ao gene BCR marcado com um fluoróforo (verde neste caso) leva à sua localização nos cromossomas em metáfase. O mesmo pode ser efetuado para o gene ABL1 (vermelho). Uma célula normal tem dois sinais vermelhos e verdes. A translocação $t(9;22)$ irá justapor os fluoróforos verde e vermelho, um de BCR-ABL1 e outro de ABL1-BCR (os dois sinais mais à esquerda na figura C). Os sinais verde e vermelho remanescentes têm origem em cromossomas normais, uma vez que não sofrem rearranjo.^[43]

Anexo K

Intervalos de referência do hemograma (adultos)		
Ensaio	Unidades	Intervalo de referência
RBC, ♂	$\times 10^6/\mu\text{L}$ ($\times 10^{12}$ /L)	4,20-6,00
RBC, ♀	$\times 10^6/\mu\text{L}$ ($\times 10^{12}$ /L)	3,80-5,20
HGB, ♂	g/dL (g/L)	13,5-18,0 (135-180)
HGB, ♀	g/dL (g/L)	12,0-15,0 (120-150)
HCT, ♂	% (L/L)	40-54 (0,40-0,54)
HCT, ♀	% (L/L)	35-49 (0,35-0,49)
MCV	fL	80-100
MCH	pg	26-34
MCHC	g/dL	32-36
RDW	%	11,5-14,5
RETIC	$\times 10^3/\mu\text{L}$ ($\times 10^9$ /L)	20-115
RETIC	%	0,5-2,5
WBC	$\times 10^3/\mu\text{L}$ ($\times 10^9$ /L)	3,6-10,6
NEUT	%	50-70
NEUT (Absolutos)	$\times 10^3/\mu\text{L}$ ($\times 10^9$ /L)	1,7-7,5
LYMPH	%	18-42
LYMPH	$\times 10^3/\mu\text{L}$ ($\times 10^9$ /L)	1,0-3,2
MONO	%	2-11
MONO	$\times 10^3/\mu\text{L}$ ($\times 10^9$ /L)	0,1-1,3
EO	%	1-3
EO	$\times 10^3/\mu\text{L}$ ($\times 10^9$ /L)	0-0,3
BASO	%	0-2
BASO	$\times 10^3/\mu\text{L}$ ($\times 10^9$ /L)	0-0,2
PLT	$\times 10^3/\mu\text{L}$ ($\times 10^9$ /L)	150-450
MPV	fL	7,0-12,0

Intervalos de referência para outros testes vulgarmente requisitados (adultos)		
Ensaio	Unidades	Intervalo de referência
VS, ♂	mm l hora	0-15 (0-50 anos); 0-20 (>50 anos)
VS, ♀	mm l hora	0-20 (0-50 anos); 0-30 (>50 anos)
Ferro sérico	$\mu\text{d/dL}$	50-160
TIBC	$\mu\text{d/dL}$	250-400
Saturação da transferrina	%	20-55
Ferritina sérica, ♂	ng/mL	40-400
Ferritina sérica, ♀	ng/mL	12-160
Vitamina B ₁₂ sérica	pg/mL	200-900
Folato sérico	ng/mL	> 4,0
Haptoglobina	mg/dL	30-200

Intervalos de referência para as frações da hemoglobina

Fração	I.R. no adulto (%)	I.R. em recém-nascidos (%)
Hb A	>95	10-40
Hb F	0-2,0	60-90
Hb A ₂	0-3,5	

Valores e intervalos de referência em bioquímica

EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético			
Hep	Heparina			
H	Homem			
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine			
M	Mulher			
P	Plasma			
S	Soro			
ST	Sangue Total			
U	Urina			
U 24h	Urina de 24 horas			
Intervalo de referência				
Analito	Espécimen	Faixa etária	Unidades convencionais	Unidades do SI
Alanina aminotransferase (ALT, SGPT) IFCC, 37 °C	S	Adulto H	U/L	µkat/L
		Adulto M	<45	<0,77
		Adulto M	<34	<0,58
Albumina	S	4 dias-14 anos	g/dL	g/L
		14-18 anos	3,8-5,4	38-54
		Adulto (20-60 anos)	3,2-4,5	32-45
		60-90 anos	3,5-5,2	35-52
		>90 anos	3,2-4,6	32-46
		>90 anos	2,9-4,5	29-45
Amilase IFCC, 37 °C	S	Adulto	mg/d	mg/d
		Adulto	3,9-24,4	3,9-24,4
Aspartato aminotransferase (AST, SGOT) IFCC, 37 °C	S	Adulto H	U/L	µkat/L
		Adulto M	28-100	0,48-1,70
		Adulto M	<35	<0,60
Azoto ureico	S	Crianças	U/L	µkat/L
		Adulto	<31	<0,53
		Adulto >60 anos	mg/dL	mmol/L
		Adulto	5-18	1,8-6,4
		Adulto	6-20	2,1-7,1
U, 24h	Adulto >60 anos	8-23	2,9-8,2	
	U, 24h		g/d	mol/d

				10-20	0,43-0,71
Bilirrubina total				mg/dL	µmol/l
	S	Adulto		0-2,0	0-34
	U			Negativo	Negativo
Bilirrubina conjugada (directa)	S			mg/dL	µmol/l
				0,0-0,2	0,0-3,4
Cálcio, ionizado (livre)	S, P (Hep)	Adultos		mg/dL	mmol/l
				4,6-5,3	1,15-1,33
Cálcio, total	S, P (Hep)	Adultos		mg/dL	mmol/l
				8,6-10,2	2,15-2,55
Cloreto (Cl)	S, P	Adulto		mEq/L	mmol/L
		>90 anos		98-107	98-107
				98-111	98-111
Cloreto (Cl); conti	U, 24h	Adulto		110-250	110-250
		>60 anos		95-195	95-195
Creatina cinase (CK) IFCC, 37 °C	S	Adulto	H	U/L	µkat/L
		Adulto	M	46-171	0,78-290
				34-145	0,58-2,47
CK2 (MB)	S			<5,0 µg/L	<5,0 µg/L
Fosfato	S, P (Hep)	Crianças		mg/dL	mmol/L
		Adultos		4,0-7,0	1,29-2,26
				2,5-4,5	0,81-1,45
	U, 24h	Adultos		g/d	mmol/d
				0,4-1,3	12,9-42,0
Fosfatase alcalina	S	4-15 anos	H	U/L	µkat/L
			M	54-369	0,91-6,23
		20-50 anos	H	54-369	0,91-6,23
			M	53-128	0,90-2,18
			M	42-98	0,71-1,67
		>60 anos	H	56-119	0,95-2,02
			M	53-141	0,90-2,40
Glucose	S, jejum	Criança		mg/dL	mmol/L
		Adulto		60-100	3,3-5,6
		>60 anos		74-100	4,1-5,6
		>90 anos		82-115	4,6-6,4
				75-121	4,2-6,7
	ST (Hep)	Adulto		65-95	3,5-5,3
	U			1-15	0,1-0,8
	U, 24h			<0,5 g/d	<2,8 mmol/d
γ-gama-glutamil-transferase (GGT) IFCC, 37 °C	S	Adulto	H	U/L	µkat/L
		Adulto	M	<55	<0,94
				<38	<0,65
Hemoglobina glicada (HbA _{1c})	ST (EDTA, Hep)			% Hb total	Fracção Hb
		"cut off"		<6,5	<6,5

				4-5,6	4-5,6
HDL-C	S			mg/dL	mmol/L
				percentil 5-95	percentil 5-95
		5-9 anos	H	38-75	0,99-1,94
			M	36-73	0,93-1,89
		10-19 anos	H	30-74	0,78-1,92
			M	35-74	0,91-1,92
		20-59 anos	H	30-71	0,78-1,84
			M	33-91	0,86-2,36
		60-69 anos	H	30-75	0,78-1,95
			M	38-96	0,99-2,49
		>69 anos	H	31-75	0,80-1,95
			M	33-92	0,86-2,39
Lactato desidrogenase				U/L	µkat/L
IFCC, 37 °C	S	24 meses-12 anos		180-360	3,1-6,1
		12-60 anos		125-220	2,1-3,7
Lípase, 37 °C	S			U/L	µkat/L
		Adulto		<38	<0,65
LDL-C	S			mg/dL	mmol/L
				percentil 5-95	percentil 5-95
LDL-C		5-9 anos	H	63-129	1,63-3,34
			M	68-140	1,76-3,63
		10-19 anos	H	64-130	1,66-3,37
			M	68-137	1,76-3,55
		20-59 anos	H	66-203	1,53-5,26
			M	57-210	1,48-5,44
		60-69 anos	H	83-210	2,15-5,44
			M	100-221	2,59-5,73
		>69 anos	H	88-186	2,28-4,82
			M	96-206	2,49-5,34
		Risco de doença coronária.		mg/dL	mmol/L
		Ótimo		<100	<2,59
		Ligeira elevação		100-129	2,59-3,34
		Elevado "borderline"		130-159	3,37-4,12
		Elevado		160-189	4,15-4,90

			Muito elevado	>189	>4,90
Magnésio, livre	S			mmol/L	mmol/L
				0,45-0,60	0,45-0,60
5'-Nucleotidase, 37 °C	S, P (Hep)			U/L	µkat/L
		Adultos		3-9	0,051-0,153
Potássio (K)	S			mEq/L	mmol/L
		Crianças		3,4-4,7	3,4-4,7
		Adultos		3,5-5,1	3,5-5,1
	P (Hep)				
			H	3,5-4,5	3,5-4,5
			M	3,4-4,4	3,4-4,4
	U, 24h			mEq/d	mmol/d
		6-10 anos	H	17-54	17-54
			M	8-37	8-37
		10-14 anos	H	22-57	22-57
			M	18-58	18-58
		Adulto		25-125	25-125
Proteínas totais	S			g/dL	g/L
		>2 anos		6,0-8,0	60-80
		Adulto		6,4-8,3	64-83
	U, 24h			mg/dL	mg/L
		Adulto		1-14	10-140
		Excreção		mg/d	g/d
		Adulto		<100	0,1
		Gravidez		<150	0,15
Proteína C-reativa (CRP)	S			mg/dL	mg/L
		Adultos (20-60 anos)		<0,5	<5
Proteína C-reativa de alta sensibilidade (hsCRP)	S			mg/L	mg/L
		Europeus	H	0,3-8,6	0,3-8,6
			M	0,3-8,8	0,3-8,8
Sódio (Na)	P			mEq/L	mmol/L
		Crianças		138-145	138-145
		Adultos		136-145	136-145
		>90 anos		132-146	132-146
	U, 24h			mEq/d	mmol/L
		6-10 anos			
			H	41-115	41-115
			M	20-69	20-69
		10-14 anos			
			H	63-177	63-177
			M	48-168	48-168
		Adulto			
			H	40-220	40-220

		M	27-287	27-287
Triacilgliceróis	S		mg/dL	mmol/L
			percentil 5-95	percentil 5-95
		5-9 anos	H 28-85	0,32-0,96
			M 32-126	0,36-1,43
		10-19 anos	H 33-143	0,38-1,62
			M 39-126	0,44-1,43
		20-59 anos	H 44-261	0,50-2,95
			M 37-279	0,42-3,16
		60-69 anos	H 56-256	0,64-2,90
			M 57-260	0,65-2,94
		>69 anos	H 63-239	0,71-2,25
			M 60-289	0,68-3,27
	Pontos de "cutoff" recomendados.		mg/dL	mmol/L
		Normal	<150	<1,70
		Elevado	150-199	1,70-2,25
		Hipertrigliceridémico	200-499	2,26-5,64
		Muito elevado	>499	>5,64