



Ana Carolina Tinoco Marques

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

Ana Carolina Tinoco Marques

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

Este relatório não está escrito respeitando o Novo Acordo Ortográfico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar tenho de agradecer à Professora Doutora Leonor Almeida, Coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas da Universidade de Coimbra, e a toda a instituição de ensino, por me terem proporcionado, durante os dois últimos anos, a aquisição de tão vastos conhecimentos e a oportunidade de ter realizado este estágio, que tanto me enriqueceu.

Segue-se a minha gratidão para com o Dr. Mário Roque e para com todas as pessoas que trabalham no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, que sempre se mostraram disponíveis para me auxiliar e esclarecer qualquer dúvida, contribuindo também para a minha integração no serviço. Muito obrigada!

Agradeço também à Professora Doutora Armanda Santos, minha orientadora interna, pela disponibilidade prestada e pela ajuda na elaboração do relatório.

Por último, e não menos importante, deixo um agradecimento muito especial à minha família e aos meus amigos. Mãe, manos e avós, sem a vossa paciência e amor, nada disto seria possível. OBRIGADA!

ÍNDICE

Índice de figuras.	VII
Índice de tabelas.	VIII
Abreviaturas.	IX
Resumo.	XI
Abstract.	XI
1. INTRODUÇÃO.	1
2. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO.	2
3. CONTROLO DE QUALIDADE E CALIBRAÇÃO.	4
4. HEMATOLOGIA.	5
4.1. SANGUE E SUA CONSTITUIÇÃO.	5
4.2. HEMATOPOIESE.	6
<i>a)</i> MIELOPOIESE.	7
<i>b)</i> MONOPOIESE.	8
<i>c)</i> MEGACARIOPOIESE (OU TROMBOCITOPOIESE).	9
<i>d)</i> ERITROPOIESE.	9
<i>e)</i> LINFOPOIESE.	11
4.3. CEL-DYN [®] Ruby da Abbott Diagnostics.	13
4.3.1. HEMOGRAMA.	13
4.3.2. CONTAGEM DE RETICULÓCITOS.	15
4.4. CITOLOGIA.	16
4.4.1. CRITÉRIOS PARA A ELABORAÇÃO DE ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO.	16
4.5. GRUPO SANGUÍNEO (Sistema AB0 e Rhesus).	17
4.6. Hb A1c, Hb F e ADAMS A _{1c} [®] HA-8160 da ARKRAY.	17
4.7. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO E BD Vacutainer [®] Sedi-15 TM	18
4.8. HEMOSTASE.	19
4.8.1. ESTUDO DA COAGULAÇÃO E OPTION [®] 4 PLUS da bioMérieux.	22
4.9. CASO CLÍNICO I.	24
4.10. CASO CLÍNICO II.	26
5. IMUNOLOGIA.	28
5.1. SISTEMA IMUNOLÓGICO.	28
5.1.1. IMUNIDADE INATA.	29
5.1.2. IMUNIDADE ADQUIRIDA.	31
5.2. ARQUITECT [®] ci 8200 da Abbott Diagnostics.	33
5.3. MINIVIDAS [®] da bioMérieux.	33
5.4. MARCADORES DA ANEMIA.	34
Vitamina B12.	34
Folatos.	34
5.5. MARCADORES CARDÍACOS.	35
Troponina-I.	35
5.6. ESTUDO DA FUNÇÃO ENDÓCRINA.	35
<i>a)</i> FUNÇÃO TIROIDEIA.	35
TSH (Hormona Estimuladora da Tiróide).	36

Hormonas Tiroideias.	36
T3 livre e T3 total.	36
T4 livre e T4 total.	36
Anticorpos Anti-tiroideus (Ac Anti-TPO e Anti-TG). ...	37
b) FUNÇÃO SUPRARRENAL (OU ADRENAL).	37
Cortisol.	38
c) FUNÇÃO GONADAL.	39
FSH.	39
Progesterona.	40
hCG.	40
Testosterona.	40
5.7. MARCADORES TUMORAIS.	41
CA 19.9.	42
CEA.	42
PSA livre e PSA total.	42
5.8. SEROLOGIA DE INFECÇÕES VÍRICAS.	43
a) HEPATITE A.	43
Ac Anti-HAV IgM.	44
Ac Anti-HAV IgG.	44
b) HEPATITE B.	45
Ag HBs.	46
Ag HBe.	46
Ac Anti-HBc IgM.	46
Ac Anti-HBc (total).	46
Ac Anti-HBe.	47
Ac Anti-HBs.	47
c) HEPATITE C.	47
Ac Anti-HCV (total).	47
d) HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana).	48
Ag e Ac Anti-HIV.	48
5.9. SEROLOGIA DE INFECÇÕES BACTERIANAS.	48
a) SÍFILIS.	49
Sífilis TP.	49
5.10. ALERGIAS.	49
5.11. TESTES MANUAIS.	50
5.1.1. REACÇÃO DE WAALER-ROSE.	50
5.1.2. VDRL E RPR.	50
5.1.3. PESQUISA DE SANGUE OCULTO NAS FEZES.	51
5.1.4. TESTE DE GRAVIDEZ.	51
5.12. CASO CLÍNICO III.	52
5.13. CASO CLÍNICO IV.	53
6. BIOQUÍMICA.	55
7. MICROBIOLOGIA.	56
8. CONCLUSÃO.	57
9. BIBLIOGRAFIA.	58
ANEXOS.	63
ANEXO I.	63
ANEXO II.	64
ANEXO III.	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Células que constituem a linhagem granulocítica.	8
Figura 2: Células características da linhagem monocítica.	8
Figura 3: Células correspondentes à megacariopoiese.	9
Figura 4: Esfregaço sanguíneo contendo reticulócitos, corados pelo azul de Metileno.	10
Figura 5: Células que constituem a linhagem eritroide.	11
Figura 6: Células correspondentes à linhagem linfocítica.	12
Figura 7: Diferenciação das Células Hematopoiéticas.	12
Figura 8: Software do CELL-DYN® Ruby da Abbott Diagnostics.	15
Figura 9: Cascata da coagulação.	21
Figura 10: Hemograma (à esquerda), realçando os parâmetros eritrocitários, e gráfico referente à distribuição dos tamanhos dos eritrócitos (à direita).	24
Figura 9: Gráficos correspondentes à anisocitose existente nas amostras referentes à segunda (esquerda) e última (direita) admissões.	26
Figura 102: Curso serológico da infecção causada por HAV.	44
Figura 13: Curso serológico das infecções aguda (à esquerda) e crónica (à direita) causadas pelo HBV.	45
Figura 114: Curso serológico das infecções aguda (à esquerda) e crónica (à direita) causadas pelo HCV.	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Equipamentos existentes no LACCSMC, por sector, com as respectivas técnicas e funcionalidades.	3
Tabela 2: Critérios para a realização de esfregaços de sangue periférico.	16
Tabela 3: Alterações nos processos de hemóstase.	24
Tabela 4: Comparação dos parâmetros eritrocitários referentes às três admissões do paciente.	25
Tabela 5: Comparação dos parâmetros eritrocitários de duas admissões ao laboratório.	26
Tabela 6: Comparação dos parâmetros tiroideus em várias admissões ao laboratório.	52
Tabela 7: Comparação entre os resultados dos parâmetros hepáticos de várias admissões ao laboratório.	53
Tabela 8: Materiais necessários para o transporte das amostras, dependendo das análises a realizar.	63
Tabela 9: Valores de referência dos parâmetros referentes a um hemograma.	64
Tabela 10: Interpretação da quantificação da hemoglobina glicada, no diagnóstico e controlo da diabetes.	65

ABREVIATURAS

ALT (alanina-transaminase)
AST (aspartato-transaminase)
BALT (Tecido Linfóide Associado aos Brônquios)
Ca²⁺ (Ião Cálcio)
CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay)
DNA (Ácido Desoxirribonucleico)
EDTA (Ácido Etilenodiaminotetra-acético)
ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay)
F III (Factor III, Tecidular ou Tromboplasmina)
F IX (Factor IX)
F V (Factor V ou Proacelerina)
F VII (Factor VII ou Proconvertina)
F VIII (Factor VIII ou Anti-hemofílico)
F X (Factor X ou Factor Stuart-Prower)
F XI (Factor XI ou Antecedente da Tromboplastina Plasmática)
F XII (Factor XII ou Factor Hageman)
FvW (Factor de von Willebrand)
GALT (Tecido Linfóide Associado ao trato intestinal)
Hb A_{1c} (Hemoglobina Glicada)
Hb (Hemoglobina)
hHB (Hemoglobina humana)
HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Pressão)
INR (Razão Normalizada Internacional)
ISI (Índice de Sensibilidade Internacional)
LACCSMC (Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra)
LDL (Lipoproteínas de Baixa Densidade)
LPS (Lipopolissacarídeo)
MALT (Tecido Linfóide Associado às Mucosas)
MHC (Complexo Major de Histocompatibilidade)
NALT (Tecido Linfóide Associado à mucosa Nasal)
NO (Óxido de Azoto)
O₂ (Oxigénio)
PAI-I (Inibidor do Activador do Plasminogénio-I)
PLQ (plaquetas)
RBC (eritrócitos)
RLU's (Unidades Relativas de Luz)
RNA (Ácido Ribonucleico)
TLR ("Toll-Like" Receptors)
TP (Tempo de Protrombina)
TPA (Activador Tecidular do Plasminogénio)
TT (Tempo de Trombina)
TTPa (Tempo de Tromboplastina Parcial Activado)
Tx A₂ (Tromboxano A₂)
VALT (Tecido Linfóide Associado à mucosa Vulvo-vaginal)
VPA (Activador "urokinase-like" do Plasminogénio)
VS (Velocidade de Sedimentação)
VSE (Velocidade de Sedimentação Eritrocitária)
WBC (leucócitos)
γ-GT (γ-glutamyl-transpeptidase)

RESUMO

O presente relatório refere-se ao estágio realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Nele refere-se a importância das análises clínicas no diagnóstico e monitorização das doenças, assim como dos controlos de qualidade para a fiabilidade dos resultados. Ao longo do relatório são descritas, pormenorizadamente, todas as metodologias utilizadas nas áreas de hematologia e imunologia, havendo uma breve enumeração dos procedimentos existentes nos sectores da bioquímica e microbiologia.

ABSTRACT

This report refers to traineeship at the Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, under the Master in Clinical Analysis of Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. It refers to the importance of clinical analyses in diagnosis and monitoring of diseases, as well as the quality control for the reliability of the results. Throughout the report are described in detail all the methodologies used in the fields of hematology and immunology, with a brief listing existing procedures in biochemistry and microbiology sectors.

I. INTRODUÇÃO

Este relatório é referente ao estágio decorrido no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra (LACCSMC), tendo início em Dezembro de 2015 e término em Maio de 2016, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, tendo sido orientado pelo Dr. Mário João Roque. É de realçar que este local tem particular importância para toda a comunidade militar, assim como para os seus familiares, quer na prevenção, no diagnóstico ou no controlo das patologias.

O estágio teve como objectivo a aquisição de competências teóricas e técnicas relativas às actividades desenvolvidas num laboratório de Análises Clínicas, desde o atendimento dos utentes e a colheita/recepção das amostras até à validação dos resultados, passando pela execução das diferentes análises.

Adquiri novos conhecimentos no que respeita aos processos de calibração, controlo, operação e manutenção dos diversos equipamentos existentes no laboratório, tornando-me autónoma nos respectivos procedimentos e nas técnicas utilizadas.

Estruturalmente, o relatório está dividido em quatro partes principais: controlos de qualidade e calibração, descrição do laboratório, Hematologia e Imunologia. Inicialmente, irei mencionar a importância dos controlos de qualidade (internos e externos) e das calibrações dos equipamentos para que se verifique sempre a fiabilidade dos resultados. Depois, farei uma breve descrição do local do estágio. Posteriormente, irei abordar os sectores da hematologia, imunologia, bioquímica e microbiologia. Uma vez que nos foi pedido que escolhêssemos duas das quatro valências para aprofundar os conhecimentos, irei focar-me na descrição dos procedimentos e das técnicas utilizadas na Hematologia e Imunologia, tentando sempre enquadrar os conteúdos com o diagnóstico das respectivas patologias. Também menciono alguns casos clínicos, que ilustram conhecimentos mencionados anteriormente.

2. CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO

O Estágio teve lugar no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra. Este serviço é composto por uma sala de espera, uma recepção/secretaria, uma sala de colheitas e pelos sectores de Hematologia, Bioquímica/Imunologia e Microbiologia. A recepção/secretaria é onde existe o primeiro contacto com o paciente. Aqui, a cada utente é atribuído um número diferente e, consoante a requisição feita pelo médico, são impressos os códigos de barras que serão lidos pelos vários aparelhos, nas diferentes valências. O volume de amostras é de cerca de 30-40 por dia, exceptuando aqueles em que há Aprontamentos ou Provas de Aptidão Física, que podem ultrapassar a média em 60 unidades. Na sala de colheitas são feitas as colheitas sanguíneas (o tubo escolhido depende dos parâmetros a analisar). Também lá são recebidas todas as amostras biológicas provenientes de colheitas no exterior, como, por exemplo, urina (seja para exame sumário e/ou bacteriológico, para determinação da albumina de baixa concentração (amostra de 24h) ou para pesquisa de drogas de abuso), raspados de unhas, pele, exsudados purulentos, esperma e zaragatoas contendo material biológico (ver Anexo I), tendo em conta que todas as condições de transporte e conservação são respeitadas. Neste espaço, cada amostra é identificada com o respectivo código de barras e, posteriormente, é transportada para a correspondente área de análise.

Na Tabela I estão enumerados os equipamentos existentes no laboratório, por sector, assim como as técnicas respectivas e as funcionalidades:

Tabela I: Equipamentos existentes no LACCSMC, com as técnicas respectivas

	Técnica	Funcionalidade
HEMATOLOGIA		
CEL-DYN [®] Ruby da Abbott Diagnostics	Citometria de Fluxo	Hemograma
BD Vacutainer [®] Sedi-15 [™]	Westergren	Velocidade de Sedimentação
ADAMS A _{1c} [®] HA-8160 da ARKRAY	Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)	Determinação da Hemoglobina Glicada (HbA _{1c})
OPTION [®] 4 PLUS da bioMérieux	Turbidimetria	Testes de Coagulação
BIOQUÍMICA / IMUNOLOGIA		
Architect [®] ci 8200 da Abbott Diagnostics	Turbidimetria, Potenciometria, Espectrofotometria e Quimioluminescência	Análise de parâmetros Bioquímicos e Imunológicos
miniVidas [®] da bioMérieux	Imunoensaios	Análise de parâmetros Imunológicos
MICROBIOLOGIA		
URIT, Uritest-300	Espectrofotometria	Análise da Urina tipo II
Câmara de Fluxo Laminar	----	Tratamento e manipulação de amostras em ambiente asséptico

3. CONTROLO DE QUALIDADE E CALIBRAÇÃO

O controlo de qualidade é o processo estatístico utilizado para a monitorização e avaliação dos métodos analíticos que produzem os resultados. A qualidade deve estar presente desde a colheita até à obtenção do resultado (fases pré-analítica, analítica e pós-analítica).

Para garantir que todos os resultados são fidedignos, há que realizar controlos de qualidade internos e externos, tendo como finalidade saber se os resultados do laboratório são reais. Para a avaliação dos mesmos, são usados os conhecimentos das cartas de Levey-Jennings.

Os controlos de qualidade internos caracterizam-se por serem os procedimentos do laboratório que permitem a avaliação da precisão dos resultados das análises do laboratório, quando estas são executadas. Estes controlos podem ser diários ou semanais, dependendo do equipamento e teste em questão, e são constituídos por dois ou três níveis (um controlo normal e um ou dois patológicos (nível 1 e/ou 2)). O controlo da qualidade interno permite a redução da imprecisão e é sempre analisado quando um kit ou lote novos são utilizados. É importante que os controlos sejam analisados nas mesmas condições que as das amostras, para haver validação analítica dos resultados dos pacientes. Os resultados dos controlos podem ser estudados numérica ou graficamente.

Relativamente aos controlos de qualidade externos, estes são importantes porque o laboratório analisa amostras com valores desconhecidos, provenientes de entidades externas acreditadas, permitindo avaliar a exactidão dos resultados. No caso do LACCSMC, o programa de controlo externo da qualidade é elaborado em parceria com o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, recorrendo ao RIQAS (Randox International Quality Assessment). Estes controlos executam-se quinzenalmente ou mensalmente, sendo os resultados enviados para a entidade competente. O programa de controlo de qualidade externo permite também comparar os resultados com os de outros laboratórios (com as mesmas tecnologias e reagentes), valorizando, assim, a exactidão do laboratório (Livro Explicativo do PNAEQ, 2016).

Tão importante quanto a qualidade é a calibração. A calibração possibilita o ajuste aos valores reais das análises, obtendo-se uma recta de calibração. Realiza-se sempre que há mudança do lote e quando os valores referentes aos controlos de qualidade não estão adequados.

4. HEMATOLOGIA

A Hematologia é a área da ciência que estuda o sangue e as patologias a ele associadas. Neste sector avaliam-se qualitativa e quantitativamente os elementos presentes no sangue periférico (eritrócitos (RBC), leucócitos (WBC), plaquetas (PLQ) e reticulócitos). Também se estuda a hemostase (através da determinação dos tempos de coagulação), quantifica a hemoglobina glicada e determina a velocidade de sedimentação eritrocitária. Igualmente neste sector se determina o grupo sanguíneo, pelo sistema AB0.

Neste sector tive a oportunidade de realizar todo o tipo de tarefas, desde a manipulação dos equipamentos, realização de esfregaços sanguíneos, sua coloração e observação microscópica dos elementos presentes no sangue até à realização dos procedimentos referentes ao controlo de qualidade, assim como à manutenção dos aparelhos.

A execução técnica e a interpretação dos resultados são efectuadas por pessoal com formação específica, mas sempre sujeitas a validação pelo Director Técnico e Responsável pelo Laboratório.

4.1. SANGUE E SUA CONSTITUIÇÃO

O sangue é formado pelo plasma (cerca de 60%) e pelos elementos celulares leucócitos, eritrócitos e plaquetas (aproximadamente 40%).

O plasma corresponde à parte líquida do sangue e é constituído, essencialmente, por água, glicose, lípidos, proteínas e sais. Os leucócitos têm um papel importante na resposta imunológica, como referido mais à frente no capítulo da Imunologia. Os eritrócitos não possuem núcleo e, devido à sua forma de disco bicôncavo, são muito flexíveis e conseguem facilmente atravessar os vasos sanguíneos. Contêm hemoglobina, uma proteína composta por quatro subunidades, cada uma com um grupo heme ligado à globina. Dependendo das características das cadeias polipeptídicas, as subunidades da hemoglobina podem ser do tipo α , β , δ ou γ . Um indivíduo saudável possui cerca de 96% de hemoglobina do tipo A, ou seja, duas cadeias são α e duas são β ; também podem ser encontradas as hemoglobinas do tipo F (Hb F) (duas cadeias α e duas γ) e do tipo A₂ (Hb A₂) (duas α e duas δ). No centro da estrutura da hemoglobina há um íão de Ferro (no estado ferroso Fe²⁺), que, por sua vez, se vai ligar ao oxigénio, trocando-o pelo dióxido de carbono, promovendo, assim, a oxigenação

do sangue. As plaquetas são fragmentos celulares irregulares e estão envolvidas nos processos de coagulação, como veremos mais à frente.

Os constituintes do sangue são responsáveis, principalmente, pelo transporte de oxigénio e nutrientes aos diferentes tecidos do organismo, pela formação de coágulos para impedir uma perda excessiva de sangue (aquando de uma hemorragia, por exemplo), pelo transporte de células e anticorpos para o combate às infecções e de produtos do metabolismo para os rins e fígado, que irão filtrar o sangue, além de assegurar a circulação de mensageiros químicos (como hormonas) e proteínas que auxiliam no processo de manutenção do equilíbrio hidroelectrolítico (AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; DEAN, 2005).

4.2. HEMATOPOIESE

A hematopoiese é o processo que envolve a formação e maturação das células sanguíneas. No feto, o fígado e o baço são os principais órgãos hematopoiéticos, assim como a placenta. A partir dos seis meses de gestação e até aos primeiros anos de vida, a medula de praticamente todos os ossos é a única responsável pelo desenvolvimento das células sanguíneas. Devido à progressiva deposição de adipócitos, com consequente diminuição da hematopoiese, na idade adulta, é essencialmente a medula do esterno e dos ossos longos (fémur e úmero) que desempenha esta função; em situação de doença, também alguns órgãos pertencentes ao sistema imunitário, como o baço e os gânglios linfáticos, participam na hematopoiese extramedular (HOFFBRAND, 2016).

Na medula óssea existem células precursoras de todos os tipos de células sanguíneas, as células estaminais multipotentes, que são capazes de se dividir e originar células-filhas semelhantes às células-mães ou células estaminais monopotentes (mielóides ou linfóides). Os factores de transcrição induzem a síntese das proteínas específicas de cada linhagem. Os factores de crescimento regulam a proliferação e diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas em células sanguíneas maduras, assim como previnem a apoptose. As células desenvolvem-se na medula (ou no timo, no caso dos linfócitos T), e, após maturação, passam para o espaço sinusal, para a microcirculação medular e, finalmente, para a circulação periférica. Num indivíduo saudável, apenas as células diferenciadas ou os elementos delas resultantes se encontram em circulação.

A hematopoiese engloba cinco linhagens distintas: mielopoiese, monopoiese, megacariopoiese, eritropoiese e linfopoiese, que correspondem, respectivamente, à diferenciação dos mielócitos (ou granulócitos), dos monócitos, das plaquetas, dos eritrócitos e dos linfócitos (HOFFBRAND, 2016).

a) **MIELOPOIESE**

O processo de formação dos granulócitos (ou polinucleares) inicia-se com o mieloblasto, célula imatura com uma elevada relação núcleo/citoplasma, que possui nucléolos visíveis e citoplasma escasso e basófilo. Esta célula constitui menos de 5% dos elementos nucleados da medula óssea. O mieloblasto torna-se hipergranular, com os grânulos primários em cima e fora do núcleo, e o citoplasma mais abundante, dando origem ao promielócito. Este diferencia-se em mielócito, cujo núcleo é redondo e excêntrico e não possui nucléolos. O mielócito pode ser basófilo, neutrófilo ou eosinófilo, dependendo dos grânulos específicos ou secundários presentes no citoplasma (um pouco mais abundante). Estes grânulos são de forma e tamanho variados no mielócito basófilo, pequenos, finos e dispersos no neutrófilo e esféricos e de contorno nítido no eosinófilo. A próxima célula deste processo é o metamielócito (basófilo, neutrófilo ou eosinófilo), cujo núcleo reniforme começa a sofrer maturação, originando o granulócito com núcleo em bastão (uma pequena quantidade pode passar para o sangue). Finalmente, ocorre a segmentação nuclear, gerando polimorfonucleares basófilos, neutrófilos e eosinófilos, com, respectivamente, três, três a cinco e dois lóbulos, que passam para a circulação periférica. A mielopoiese dura cerca de oito a dez dias (CADERNO DE FARMÁCIA, 2013; HOFFBRAND, 2016; KHANNA-GUPTA, 2013). Na Figura I estão identificadas as células acima referidas.

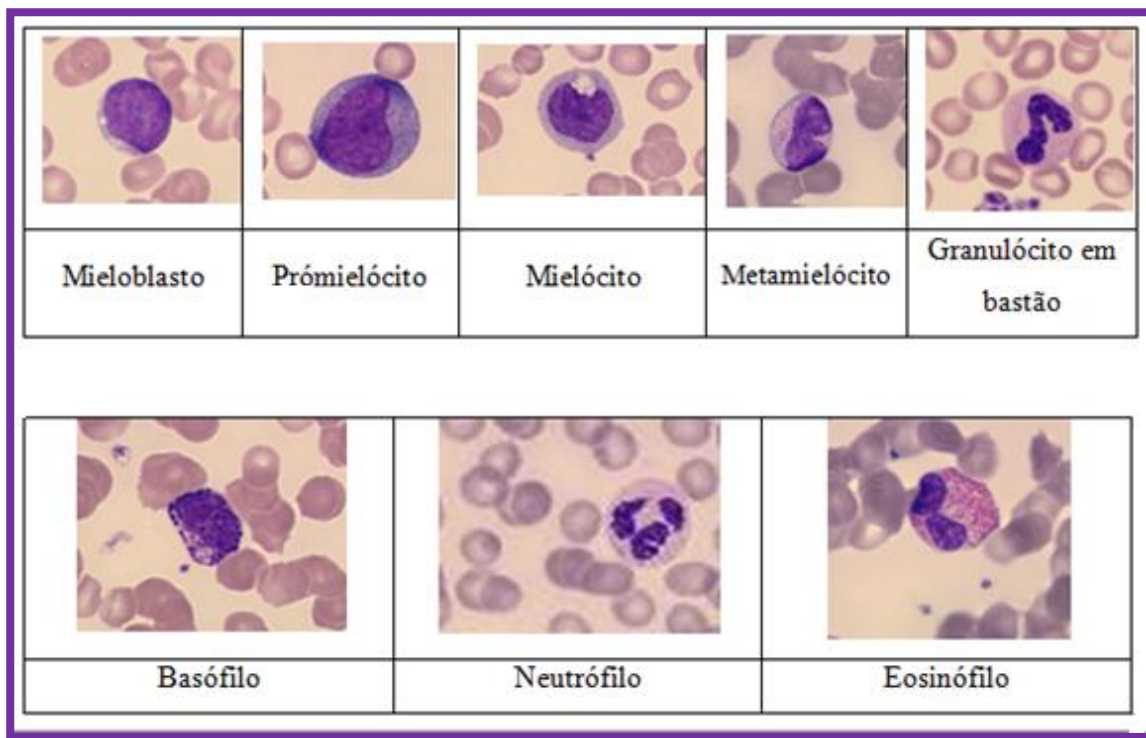


Figura 1: Células que constituem a linhagem granulocítica (adaptado de CELLAVISION).

b) MONOPOIESE

A monoipoese tem início no monoblasto, célula com núcleo oval, excêntrico, com um ou dois nucléolos e um citoplasma basófilo e sem grânulos. Esta dá origem ao promonócito, que apresenta um núcleo irregular, podendo ter ou não nucléolos, e um citoplasma com grânulos finos. Por sua vez, o promonócito diferencia-se em monócito, com o núcleo oval ou reniforme, sem nucléolos e com ou sem vacúolos no citoplasma, que atinge a circulação periférica (HOFFBRAND, 2016; KHANNA-GUPTA, 2013). Na Figura 2 encontram-se as células citadas.

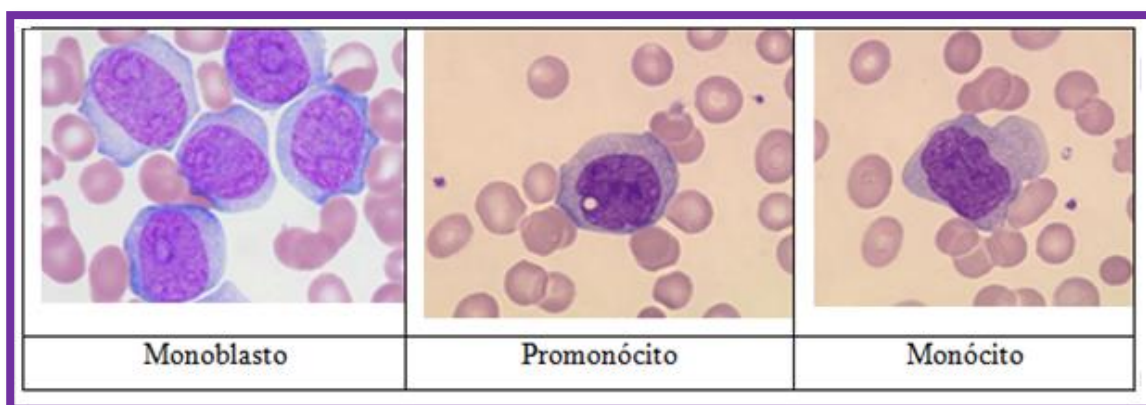


Figura 2: Células características da linhagem monocítica (adaptado de CELLAVISION).

c) MEGACARIOPOIESE (OU TROMBOCITOPOIESE)

O megacarioblasto é a célula progenitora da megacariopoiese. Esta vai originar o megacariócito, uma célula grande, poliplóide e, essencialmente, reside na medula óssea. Sofre alterações a nível da capacidade de diferenciação, do tamanho (que aumenta devido ao facto de ocorrerem divisões sucessivas do núcleo sem divisão do citoplasma, facto conhecido como endomitose), do conteúdo nuclear e emerge também a biogénese de organelos, o desenvolvimento membranar e o rearranjo do citosqueleto. As plaquetas (ou trombócitos) formam-se quando há fragmentação do citoplasma (cada megacariócito pode originar entre 4000 e 5000 plaquetas) e, na circulação periférica, duram cerca de 10 dias. O principal regulador da formação de plaquetas é a trombopoietina, produzida no fígado (CANTOR, 2013). Na Figura 3 estão representadas as células acima mencionadas.

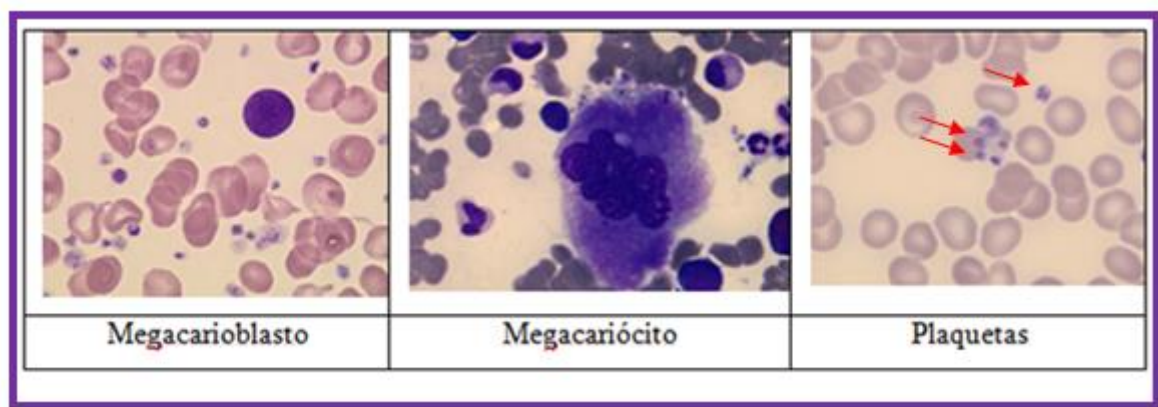


Figura 3: Células correspondentes à megacariopoiese (adaptado de CELLAVISION).

d) ERITROPOIESE

O conjunto dos eritrócitos e seus precursores designa-se eritrão e, na medula óssea, representam entre 10 e 20% dos elementos nucleados. Para que a eritropoiese ocorra com normalidade, é necessário que a medula óssea disponha de quantidades adequadas de ferro, vitamina B12 e ácido fólico. Devido ao estímulo provocado pela eritropoietina (uma hormona formada a nível renal) e outros factores, a célula estaminal mielóide inicia o processo de proliferação e diferenciação da série vermelha. O precursor eritróide é o proeritroblasto (ou pronormoblasto). Esta célula apresenta uma elevada relação núcleo/citoplasma, basofilia citoplasmática (correspondente aos ribossomas), nucléolos semelhantes e núcleo central. Após sofrer 4 mitoses, originará 16 eritrócitos. Depois de perder os vacúolos, a célula passa a designar-se eritroblasto basófilo. Posteriormente, vai

ocorrer condensação da cromatina e degradação de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), devido à diminuição da actividade nuclear; a entrada de ferro e a participação de várias enzimas é fundamental para a formação de hemoglobina, conferindo à célula, agora chamada eritroblasto policromático, um citoplasma acidófilo. Esta célula dá origem ao eritroblasto ortocromático, cujo núcleo picnótico tende a aproximar-se da membrana citoplasmática. O reticulócito (ou eritrócito policromático) é o elemento seguinte do processo de maturação eritrocitária; não possui núcleo, o citoplasma é policromatófilo e apresenta filamentos de RNA (HOFFBRAND, 2016; PAPAYANNOPOULOU, 2013). Na Figura 4 estão representados alguns reticulócitos.

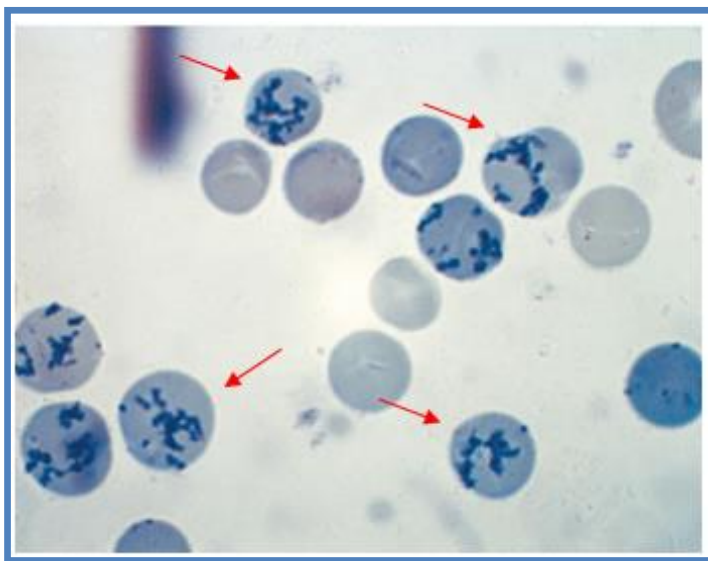


Figura 4: Esfregaço sanguíneo contendo reticulócitos, corados pelo azul de Metileno (adaptado de CELLAVISION).

O eritrócito (formado a partir do reticulócito, ao fim de 24 horas) é o último elemento da maturação da série vermelha e apresenta uma forma de disco bicôncavo. Possui viscoelasticidade, característica que lhe permite atravessar facilmente os capilares sanguíneos, uma relação área/volume constante e uma duração média de vida de 120 dias. A eritropoiese dura entre cinco e oito dias; no entanto, este processo pode ser acelerado se as circunstâncias assim o exigirem, como, por exemplo numa situação de hemorragia, com conseqüente perda de eritrócitos (HOFFBRAND, 2016). Na Figura 5 estão identificadas todas as células envolvidas na eritropoiese.

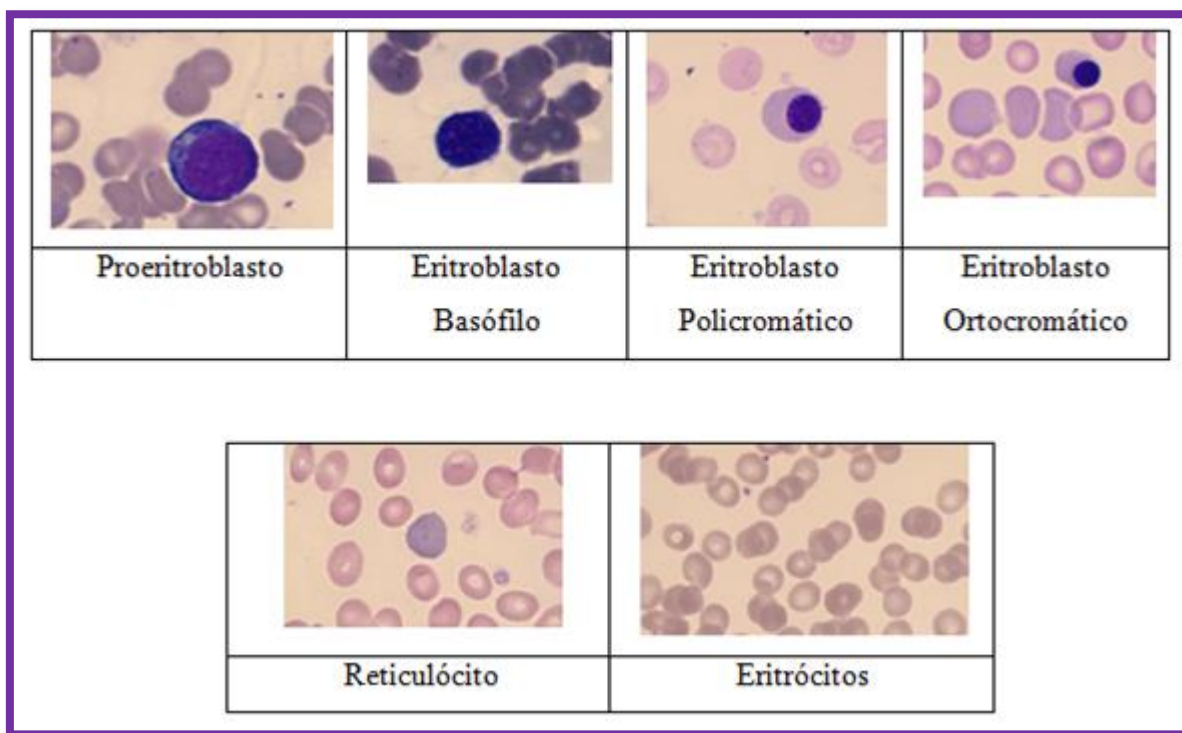


Figura 5: Células que constituem a linhagem eritróide (adaptado de CELLAVISION).

e) LINFOPOIESE

A linfopoiese é o processo pelo qual se formam os linfócitos B, T e NK (“Natural Killer”). A célula estaminal linfóide dá origem a um linfoblasto, célula com um núcleo redondo ou oval, com nucléolos, e citoplasma basófilo, sem grânulos. Os linfoblastos da linhagem T seguem para o timo, onde vão sofrer todo o processo de diferenciação; os da linhagem B maturam na medula óssea e, posteriormente, são lançados na circulação periférica e transportados para os órgãos linfóides secundários, como as amígdalas, baço e gânglios linfáticos; os da linhagem NK permanecem na medula e lá completam a sua maturação. O linfoblasto, por sua vez, gera o pró-linfócito, muito semelhante à célula anterior, que pode conter ou não nucléolos. O pró-linfócito origina o linfócito, que é uma célula pequena com o núcleo ovalado (cromatina densa dentro de uma membrana nuclear fina) e citoplasma azul claro. Os linfócitos T, no timo, diferenciam-se em T-auxiliares, T-supressores e T-citotóxicos. Representam entre 65 e 75% dos linfócitos presentes no sangue e, visualmente, não se distinguem dos B. Os linfócitos B, quando entram em contacto com um determinado antígeno, são activados e, após sofrerem expansão clonal, originam plasmócitos (que produzem anticorpos) e linfócitos B de memória. Morfologicamente, o linfócito activado é uma célula de grandes dimensões, de citoplasma abundante e microvacuolizado, com condensação da basofilia na periferia; o núcleo pode apresentar

formas variadas, ser excêntrico e possuir nucléolos. O plasmócito possui um núcleo redondo e excêntrico, apresenta um halo perinuclear e citoplasma fortemente basófilo. Os linfócitos B correspondem a cerca de 5-10% dos linfócitos sanguíneos, enquanto os NK rondam os 10-15% (HOFFBRAND, 2016). Na Figura 6 estão representadas as células acima referidas.

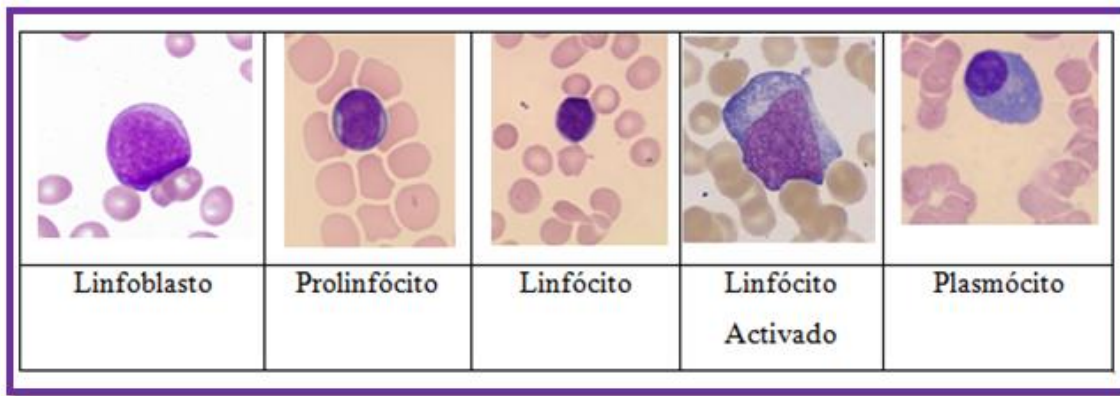


Figura 6: Células correspondentes à linhagem linfocítica (adaptado de CELLAVISION).

Na Figura 7 está esquematizado, resumidamente, o processo de diferenciação das células hematopoiéticas.

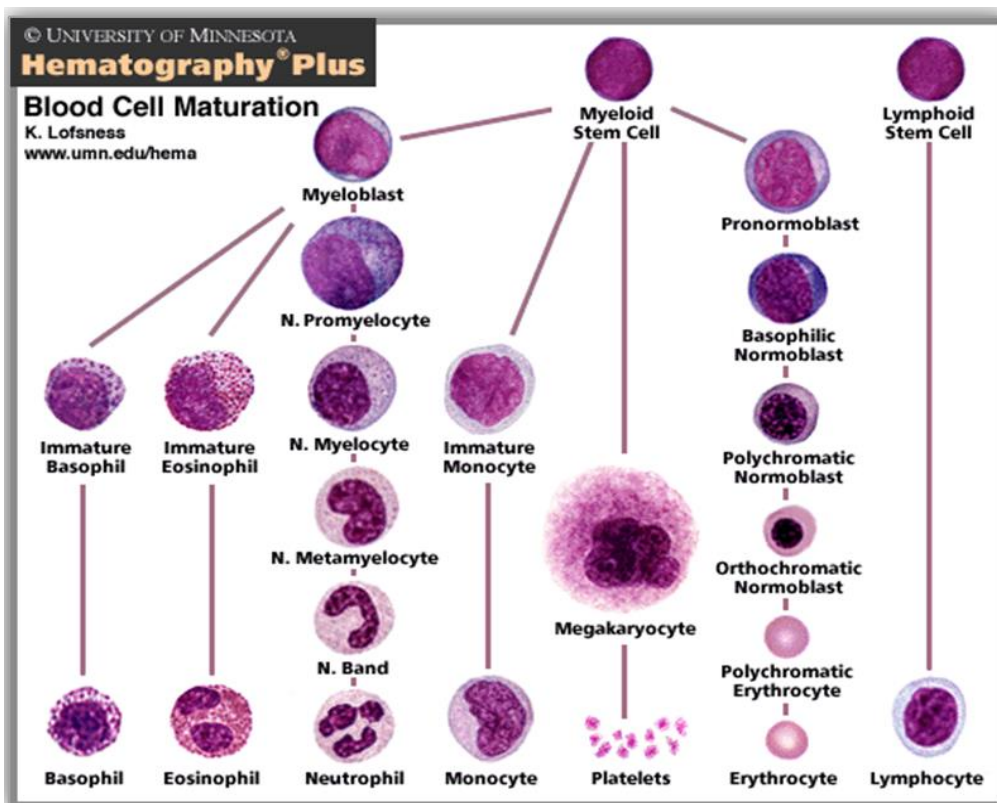


Figura 7: Diferenciação das Células Hematopoiéticas (adaptado de University of Minnesota, Hematography[®]).

4.3. CEL-DYN® Ruby da Abbott Diagnostics

O CELL-DYN® Ruby da Abbott Diagnostics é um contador hematológico automatizado. Para a contagem de eritrócitos e plaquetas é utilizado o método de impedância, isto é, cada partícula (o facto de possuírem uma membrana lipídica impede-as de conduzir adequadamente electricidade), ao passar através de uma pequena abertura, causa uma mudança na resistência eléctrica da solução salina na qual estão suspensas; este impulso é detectado (a impedância eléctrica aumenta proporcionalmente com o tamanho da partícula), amplificado e registado. A determinação da hemoglobina realiza-se por espectrofotometria: as hemácias são lisadas e a concentração de hemoglobina é quantificada a 540 nm. Para a contagem dos glóbulos brancos este aparelho utiliza a tecnologia MAPSS (Multi-Angle Polarized Scatter Separation), recorrendo à citometria de fluxo. Este equipamento é constituído por vários componentes: sistema hidráulico (que proporciona a circulação de um fluxo contínuo monocelular), luz laser (no qual há um laser de radiação monocromática que, ao incidir em cada leucócito em suspensão, vai provocar dispersão da luz segundo diferentes ângulos), sistema óptico e electrónico (que recolhe a radiação dispersada) e sistema informático (responsável pelo processamento dos dados). A amostra com leucócitos é injectada por fluxo laminar, de forma a que as células se alinhem e passem através de um laser, ocorrendo dispersão da luz a diferentes ângulos (os eritrócitos não interferem com esta contagem porque absorvem água do reagente *sheath*, ficando com o mesmo índice de refacção deste e tornando-se invisíveis ao laser). A intensidade da luz refractada é medida a 0° (informa sobre o volume celular), a 10° (indica a complexidade da estrutura celular) e a 90° (medição da granularidade interna e do número de lóbulos).

Deste modo, o Cell-Dyn Ruby permite uma análise rápida de uma grande quantidade de amostras e o estudo individual de cada partícula. O hemograma é o exame complementar de diagnóstico mais solicitado fornecido por este aparelho. A contagem de reticulócitos também é efectuada pelo Cell-Dyn Ruby (COSTA, 1996; SHAPIRO, 2003).

4.3.1. HEMOGRAMA

O hemograma permite o estudo da função hematopoiética, uma vez que compreende a contagem das células presentes no sangue periférico (eritrócitos, leucócitos e plaquetas), a contagem diferencial dos glóbulos brancos e o cálculo dos índices hematimétricos.

O eritrograma corresponde à porção do hemograma que analisa a série vermelha, podendo mostrar alterações patológicas desta linhagem celular, como por exemplo, no caso das anemias. Os parâmetros eritrocitários avaliados são os seguintes:

- **Contagem de Glóbulos Vermelhos:** número de partículas presentes em cada unidade de volume de sangue total, expressa em $10^6/\mu\text{L}$.
- **Concentração de Hemoglobina:** massa de hemoglobina presente em cada unidade de volume de sangue, expressa em g/dL.
- **Hematócrito:** percentagem do volume dos eritrócitos no volume total de sangue. Este valor depende, maioritariamente, do número, forma e tamanho dos eritrócitos.
- **Volume Corpuscular (ou Globular) Médio:** volume médio dos glóbulos vermelhos, expresso em fL. Este índice hematimétrico é importante para classificar as anemias em microcíticas, normocíticas ou macrocíticas.
- **Hemoglobina Corpuscular (ou Globular) Média:** massa de hemoglobina presente, em média, em cada eritrócito, expressa em pg. Da análise deste parâmetro pode-se referir se há hipocromia, normocromia ou hiperchromia, dependendo se o valor está diminuído, normal ou aumentado, respectivamente.
- **Concentração Média da Hemoglobina Corpuscular:** massa de hemoglobina, em média, que ocupa cada eritrócito, expressa em g/dL.
- **Distribuição do diâmetro dos Eritrócitos (RDW):** percentagem de variação dos volumes das hemácias. Este índice representa a anisocitose eritrocitária, ou seja, a variação do tamanho dos glóbulos vermelhos.

O leucograma compreende a análise diferencial da série leucocitária, isto é, são avaliados o número e a percentagem de **Neutrófilos**, **Linfócitos**, **Monócitos**, **Eosinófilos** e **Basófilos**, assim como o total dos leucócitos, por unidade de volume de sangue (expressos em $10^9/\text{L}$ e %, respectivamente). Este estudo é necessário para despistar eventuais anormalidades nesta linhagem celular, tal como uma simples inversão de fórmula (maior percentagem de linfócitos do que de neutrófilos).

Também no hemograma estão registados a contagem de **Plaquetas**, por unidade de volume de sangue (expressa em $10^9/\text{L}$), e o volume plaquetar médio (HENRY, 1999).

Os valores de referência de um adulto para os parâmetros acima referidos encontram-se no Anexo II.

No que respeita às alterações no hemograma, as mais frequentes são inversões de fórmula (IF), diminuição da concentração de Hb (anemia) e número reduzido de plaquetas.

Na Figura 8 está representado o *software* do Cell-Dyn, onde são visíveis os parâmetros hematológicos e os gráficos referentes ao tamanho/complexidade e granularidade/lobularidade leucocitárias e à distribuição dos tamanhos dos eritrócitos e das plaquetas.

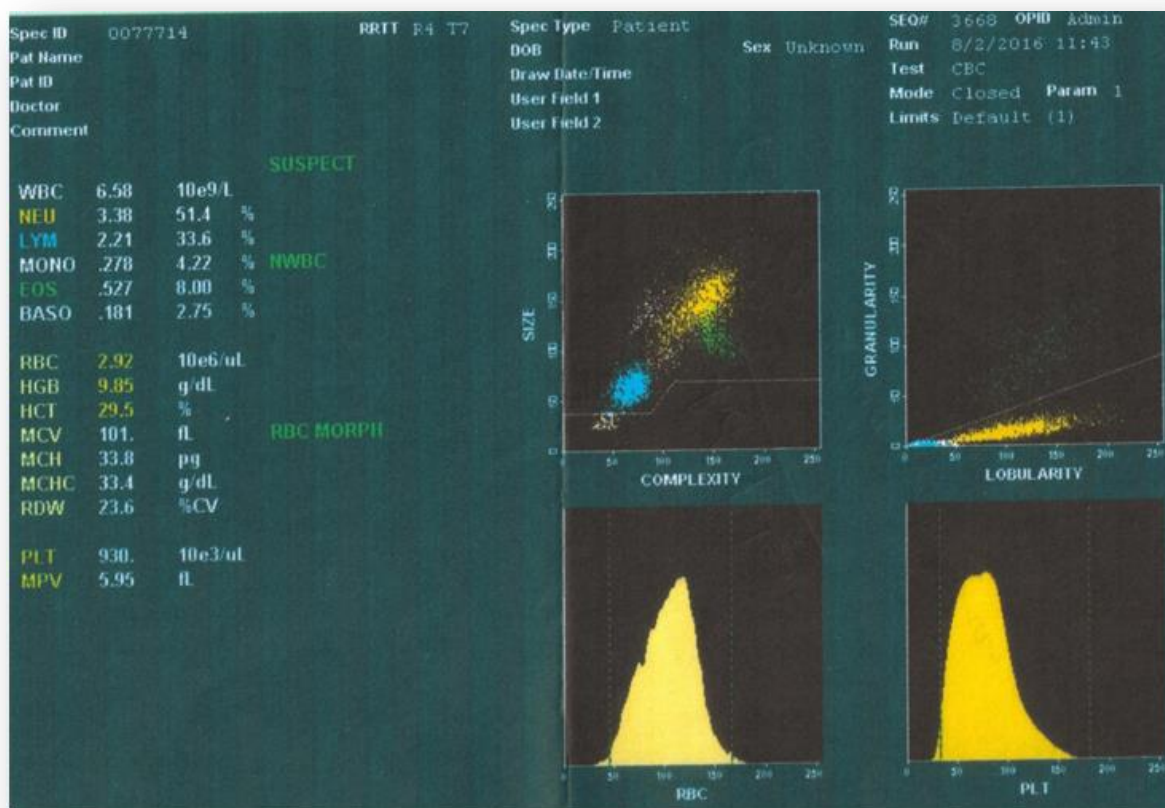


Figura 8: Software do CELL-DYN® Ruby da Abbott Diagnostics.

4.3.2. CONTAGEM DE RETICULÓCITOS

A quantificação de reticulócitos é particularmente importante quando a concentração de hemoglobina no sangue está diminuída (anemia). Se o valor obtido for superior ao de referência, significa que a medula está a aumentar a produção da série vermelha, para compensar a perda que está a ocorrer, quer seja devido a hemólise ou a perda de sangue. Se, por outro lado, a concentração de reticulócitos estiver diminuída, então indica que a

medula óssea não está a formar hemácias suficientes ou não está a responder aos estímulos provocados pela eritropoietina (HOFFBRAND, 2016).

4.4. CITOLOGIA

A citologia é o estudo morfológico das células de um determinado tecido; neste caso, analisam-se os elementos celulares presentes no sangue periférico. Esta avaliação é particularmente importante, pois confirma os resultados fornecidos pelos analisadores automáticos e auxilia no prognóstico e diagnóstico clínicos. A citologia apresenta um baixo custo para o laboratório, é uma análise relativamente rápida e oferece eficácia nos resultados, uma vez que possibilita a distinção entre infecções, inflamações e doenças proliferativas e neoplásicas.

A técnica de coloração maioritariamente utilizada para corar esfregaços de sangue periférico é a de May Grünwald – Giemsa, permitindo a visualização de todos os elementos sanguíneos presentes. Esta mistura de corantes cora os eritrócitos, as plaquetas e os núcleos e citoplasmas dos glóbulos brancos de tons avermelhados (quando ácidos) ou azulados (quando básicos). A coloração de May Grünwald – Giemsa também é usada para corar esfregaços de medula óssea (GRAÇA, 2007; PIATON, 2015).

4.4.1. CRITÉRIOS PARA A ELABORAÇÃO DE ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO

Na Tabela 2 estão registados os critérios para a elaboração de um esfregaço de sangue periférico:

Tabela 2: Critérios para a realização de esfregaços de sangue periférico.

Leucocitose ($WBC > 16000 \times 10^9/L$)
Qualquer IF com $WBC > 8 \times 10^9/L$
IF com $ \text{neutrófilos-linfócitos} \geq 10\%$
Monócitos $\geq 15\%$
Basófilos $\geq 3\%$
Anemia ($Hb < 10 \text{ g/dL}$)
$RDW \geq 15\%$ (ou entre 14 e 15% se houver anemia)
Plaquetas $< 150 \times 10^9/L$ (sem histórico)

4.5. GRUPO SANGUÍNEO (SISTEMAS AB0 E Rhesus)

No LACCSMC, a determinação do grupo sanguíneo faz-se recorrendo aos sistemas AB0 e Rh, que são os mais importantes. Esta determinação é essencial para assegurar uma eventual transfusão ou transplante futuros, de modo a não se verificarem incompatibilidades.

O sistema AB0 refere-se aos antigénios A e B, que podem ou não estar presentes na membrana dos glóbulos vermelhos. A presença ou ausência destes antigénios eritrocitários (assim como a de outros relativos a outros sistemas sanguíneos) resulta da expressão genética de alelos herdados dos dois progenitores. Assim, os fenótipos possíveis para o sistema AB0 são A (AA ou 0A), B (BB ou 0B), AB ou 00, caso as hemácias possuam antigénios só do tipo A, só do tipo B, dos tipos A e B ou não apresentem antigénios A nem B na superfície membranar, respectivamente. Naturalmente, os anticorpos anti-A e/ou anti-B, imunoglobulinas do tipo M (IgM) (ocasionalmente do tipo G (IgG)), estão presentes quando, no sangue, não existem os antigénios correspondentes. Estes anticorpos provocam hemaglutinação tanto a 37°C como a 4°C (anticorpos “frios”) e, devido à forma pentamérica, não têm a capacidade de atravessar a barreira hemato-placentária.

O sistema Rhesus (ou factor Rh) está relacionado com dois genes envolvidos na expressão, na membrana eritrocitária, de proteínas de suporte dos antigénios D (gene RhD), Cc e Ee (gene RhCE). O gene RhD pode estar ou não presente, dando origem ao fenótipo RhD+ ou RhD-, respectivamente. Relativamente ao gene RhCE, cada uma das duas proteínas de suporte expressas liga-se ao antigénio C ou c e ao E ou e. É raro os anticorpos anti-Rh aparecerem naturalmente no organismo; habitualmente, desenvolvem-se como resultado de uma transfusão ou gravidez. Inicialmente, o sistema imunitário produz Ac anti-Rh do tipo IgM; depois, apenas há produção de IgG. Estes últimos são capazes de atravessar a barreira hemato-placentária e são responsáveis, quando há incompatibilidades materno-fetais, de provocar hemólise no feto (CAQHET, 2004).

4.6. Hb A_{1c}, HbF E ADAMS A_{1c}[®] HA-8160 da ARKRAY

A HbA_{1c} é formada a partir de reacções não enzimáticas e irreversíveis entre a hemoglobina e a glicose. Está presente nos eritrócitos e a sua quantificação fornece informação sobre o controlo da glicémia nos últimos 120 dias. De facto, quanto maior for a exposição da hemoglobina a concentrações elevadas de glicose, maior será a percentagem de

hemoglobina glicada formada. Em indivíduos diabéticos, a quantidade de HbA_{1c} é superior, devido aos elevados valores de glicémia média que apresentam.

A HbF está presente no sangue fetal durante a gravidez, pois possui maior afinidade para o oxigénio. Num ambiente pobre em oxigénio, como a placenta, é o mecanismo mais eficaz para captação e oxigenação do sangue fetal. A HbF é a principal Hb presente nos recém-nascidos e, no segundo ano de vida, uma criança sem patologias associadas à Hb apresenta uma percentagem de HbA (maioritária nos humanos) semelhante à de um adulto. A percentagem desta variante de Hb está também aumentada em situações patológicas, como nas talassémias minor (entre 5 e 15%) e major (de 30 a 90%), anemias aplásticas, esferocitose hereditária, doenças mieloproliferativas e anemia falciforme.

O ADAMS A_{1c}[®] HA-8160 da ARKRAY é um analisador automático que determina, por HPLC (a coluna é composta por uma resina de troca iónica de carácter catiónico de fase reversa), a quantidade de Hb A_{1c} e de HbF presentes numa amostra, podendo os resultados serem apresentados em mmol Hb A_{1c}/mol HbA ou em %. É o teste mais indicado no controlo da glicémia e na quantificação do risco de complicações crónicas em pacientes diabéticos. Esta técnica apresenta uma elevada resolução de variantes de Hb, o ensaio é relativamente rápido e a quantificação de fracções de Hb é exacta.

No Anexo III está a interpretação dos resultados da quantificação de Hb A_{1c}, quer para se realizar o diagnóstico, quer para a monitorização da diabetes.

4.7. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO E BD Vacutainer[®] Sedi-15[™]

A velocidade de sedimentação eritrocitária (VSE) é determinada, como o próprio nome indica, com base no tempo que os glóbulos vermelhos demoram a sedimentar, num tubo contendo sangue. No Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, o aparelho automatizado responsável por esta determinação é o BD Vacutainer[®] Sedi-15[™], que se baseia no método de Westergren. O resultado é dado em mm/h e, quando aumentado, geralmente indica a presença de um processo inflamatório, que pode estar associado a infecções, tumores ou doenças auto-imunes. Deste modo, a VSE não é um parâmetro específico, mas pode ser avaliada para monitorização de um indivíduo com uma doença já diagnosticada.

A VSE está directamente relacionada com os parâmetros eritrocitários e plasmáticos.

O tamanho e a massa das hemácias influencia esta determinação, visto que os macrócitos, por serem elementos maiores, sedimentam mais rapidamente e apresentam valores mais elevados de VSE, enquanto os micrócitos exibem resultados inferiores. Normalmente, os eritrócitos estão afastados entre si devido às cargas negativas da membrana citoplasmática. Quando há alterações nesta membrana, dependendo se a carga se torna mais ou menos negativa, os eritrócitos tendem a não sedimentar (por exemplo, nas talassémias) ou a formar agregados em *rouleaux*, depositando-se mais rapidamente, respectivamente.

Também a formação de agregados em *rouleaux* pode estar relacionada com certas patologias que aumentam a concentração de algumas proteínas plasmáticas, associando-se às hemácias e tornando-as menos negativas.

Os valores normais da VSE dependem do género e vão aumentando com a idade. Para uma criança, uma mulher e um homem saudáveis, os valores de referência não ultrapassam 10, 20 e 15 mm/h, respectivamente (BROWN, 1993).

4.8. HEMOSTASE

A hemostase compreende um conjunto de mecanismos fisiológicos por meio dos quais ocorre a paragem de uma hemorragia, quando há uma lesão num vaso sanguíneo. Esta resposta depende directamente da integridade do endotélio vascular, das plaquetas em circulação, dos factores de coagulação sanguínea e dos inibidores da coagulação (proteínas plasmáticas) e do processo de fibrinólise, tendo, para isso, de haver um equilíbrio dinâmico entre eles. Quando este equilíbrio está comprometido podem ocorrer hemorragias excessivas ou formação exagerada de coágulos, com conseqüente risco de trombose.

Esta resposta de protecção do sistema vascular pode ser dividida em três etapas principais, nomeadamente, a hemostase primária (quando ocorre a formação do trombo plaquetar), a hemostase secundária ou coagulação (caracterizada pelo desenvolvimento do coágulo de fibrina insolúvel) e a fibrinólise (quando há a dissolução do coágulo).

Na hemostase primária, depois de o endotélio vascular ter sofrido a lesão, ocorre, imediatamente, vasoconstrição, com a finalidade de diminuir o fluxo sanguíneo. Há exposição do colagénio e formação de trombina, devido à activação do factor tecidual (ou

tromboplasmina ou F III). Em segundos, surge a adesão plaquetar e a sua agregação, graças a glicoproteínas (mediadas pelo factor de von Willebrand (FvW)) e fosfolípidos presentes na membrana externa das plaquetas e células endoteliais. Estes mecanismos potenciam a mobilização plaquetar e a agregação local, formando-se, assim, o trombo hemostático primário, instável.

Na hemostase secundária ocorre, primeiramente, a activação do sistema procoagulante. Nele está envolvido um conjunto de proteínas, os factores de coagulação, que actuam de modo integrado e interagem com os respectivos cofactores, com o auxílio de Ca^{2+} e de fosfolípidos presentes nas superfícies celulares. Estas reacções ocorrem em cascata e podem ser divididas em duas vias: a Via Intrínseca e a Via Extrínseca; ambas convergem para uma Via Comum. A Via Intrínseca tem início quando o sangue entra em contacto com o colagénio, após haver lesão endotelial; todos os elementos que participam nesta via da coagulação estão presentes no sangue, sob a forma inactiva. O factor XII (ou factor Hageman ou F XII), depois de ser activado, vai activar o factor XI (ou Antecedente da tromboplastina plasmática ou F XI) e as reacções seguem em cascata, como esquematizado na Figura 9, até à activação do factor X (ou factor de Stuart-Prower ou F X) (início da Via Comum). Na Via Extrínseca a activação ocorre quando há lesão tecidual, libertando-se o factor tecidual. Este vai activar o factor VII (ou proconvertina ou F VII) que, por sua vez, vai permitir a activação do F X. A Via Comum permite, por activação do F X, juntamente com o factor V (ou proacelerina ou F V), a conversão de protrombina em trombina, que, por sua vez, vai participar na transformação do fibrinogénio em fibrina. Forma-se, assim, o trombo hemostático secundário, estável (COELHO, 2001; HOFFBRAND, 2016; KING, 2012).

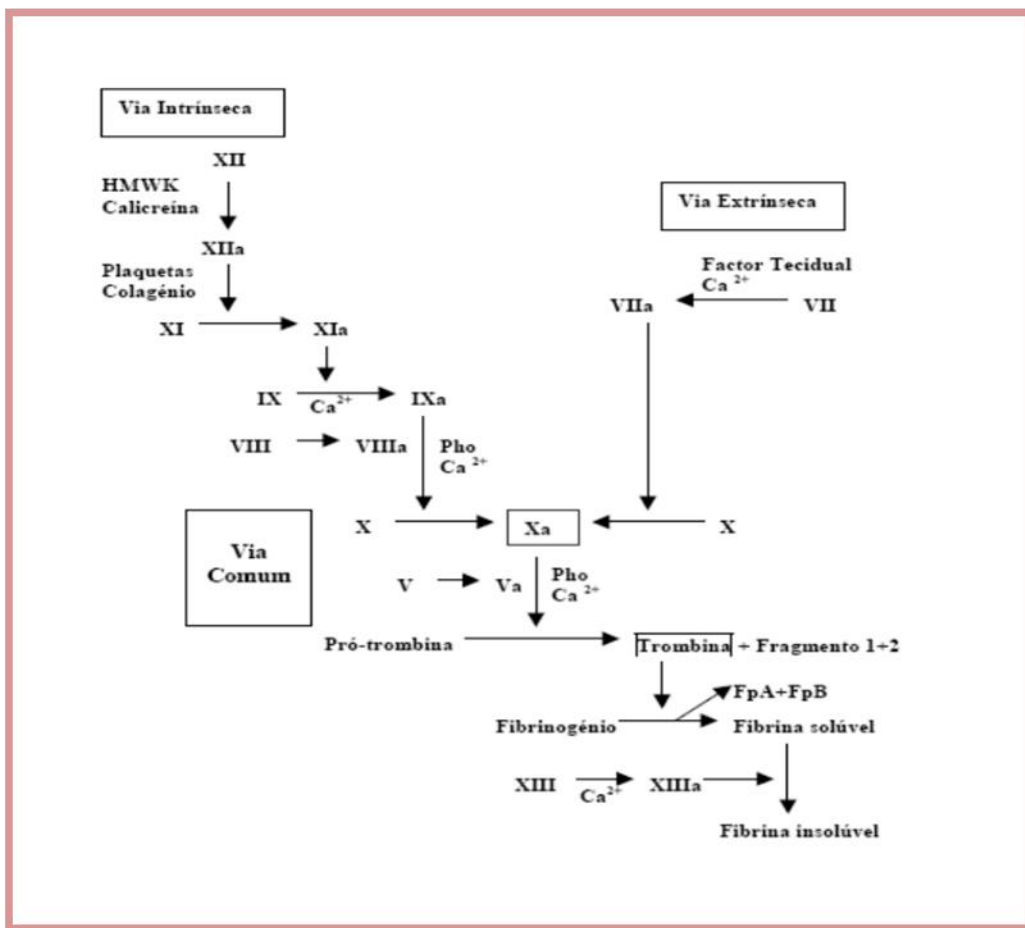


Figura 9: Cascata da coagulação (adaptado de COELHO, 2001).

Os mecanismos anti-trombóticos fisiológicos impedem a activação excessiva do sistema procoagulante, evitando a formação de oclusões vasculares. O próprio fluxo sanguíneo, o endotélio vascular (que promove a adsorção dos factores de coagulação às superfícies celulares), os anticoagulantes naturais (inibidor da via do factor tecidual, antitrombina e proteínas C e S) e a fibrinólise são inibidores da coagulação. A trombina, além de pivot da coagulação, também é responsável pela activação dos anticoagulantes naturais e da fibrinólise. O complexo enzimático formado pelas proteínas C e S, activado, permite a inactivação dos F V e factor VIII (ou factor anti-hemofílico ou F VIII), assim como a do inibidor do activador do plasminogénio – I (PAI-I). Deste modo, o activador tecidual do plasminogénio (TPA) e o activador ‘urokinase-like’ do plasminogénio (UPA) convertem o plasminogénio em plasmina e esta, por sua vez, degrada a fibrina em produtos solúveis, ocorrendo a lise do coágulo (BATES, 2005; HOFFBRAND, 2016).

4.8.1. ESTUDO DA COAGULAÇÃO E OPTION® 4 PLUS da bioMérieux

No laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra realizam-se os seguintes testes de primeira linha relativos à coagulação: Tempo de Protrombina, Tempo de Tromboplastina Parcial Activado e Doseamento de Fibrinogénio, além da contagem plaquetar (hemograma) e da citologia (morfologia no esfregaço de sangue periférico).

O Tempo de Protrombina (TP) mede o tempo de coagulação na presença de uma concentração óptima de extracto tecidual (tromboplastina) e indica a eficiência global da Via Extrínseca. Deste modo, determina deficiências congénitas ou adquiridas nos factores das Vias Extrínseca (F VII) e Comum (F X, F V, protrombina e fibrinogénio). A elevação do TP, isoladamente, é indicativa de uma deficiência no F VII. Os resultados podem ser expressos em segundos (os valores de referência situam-se entre 10 e 14 s) ou como razão normalizada internacional (INR), que é a razão entre o TP do doente e o TP de controlo, elevado ao índice de sensibilidade internacional (ISI):

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

Os valores de referência da INR estão compreendidos entre 0,9 e 1,1. Esta determinação é essencialmente utilizada para a monitorização da terapêutica com anticoagulantes orais, sendo que os valores esperados se encontram entre 2 e 3.

O Tempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPa) mede o tempo de coagulação do plasma, após a activação dos factores procoagulantes nele presentes (sem adição de factor tecidual), indicando a eficácia global da Via Intrínseca. Assim, detecta deficiências congénitas ou adquiridas nos factores das Vias Intrínseca (F XII, F XI, factor IX (ou F IX) e F VIII) e Comum (F X, F V, protrombina e fibrinogénio). O valor de referência para o TTPa é entre 30 e 40 segundos. Este teste é realizado para monitorizar a terapêutica com heparina clássica e para a pesquisa do Anticoagulante Lúpico (especificidade anti-protrombina).

O Doseamento de Fibrinogénio é um método que determina a taxa de conversão do fibrinogénio em fibrina, na presença de um excesso de trombina. Numa amostra de plasma diluído, a concentração de fibrinogénio será inversamente proporcional ao tempo de

coagulação. Os valores de referência de fibrinogénio no plasma humano são de 200 a 400 mg/dL (HOFFBRAND, 2016).

Estas três quantificações são realizadas no OPTION® 4 PLUS da bioMérieux, aparelho semi-automático que actua a 37°C, através de métodos coagulimétricos. Este equipamento quantifica, por turbidimetria, a luz dispersa pela formação do coágulo no meio reaccional. Estas determinações constituem métodos rápidos, sensíveis e precisos.

Além destas, há outras metodologias que estudam a coagulação sanguínea, como por exemplo o Tempo de Trombina (adicionando trombina ao plasma, o tempo de coagulação é resultado da quantidade de fibrinogénio presente na amostra) e a Avaliação da Função Plaquetar (agregometria, que determina o tempo que demora a agregação plaquetar; e imunofenotipagem, que avalia as glicoproteínas da membrana, entre outros parâmetros).

É importante referir que os estudos da hemostase poderão necessitar de análises bioquímicas que permitam o estudo da função hepática.

A síntese de protrombina, dos F VII, F IX, F X e das proteínas C e S envolvem mecanismos dependentes de vitamina K. A deficiência desta vitamina, devido a subnutrição ou a alteração na sua absorção, vai originar proteínas não funcionais e, portanto, modificações nos processos de coagulação e anticoagulação.

Genericamente, as alterações nos processos de hemostase podem ser divididas em dois grandes grupos, hemorragia e trombose, como está descrito na Tabela 3 (BUNN, 2011; KONKLE, 2010).

Tabela 3: Alterações nos processos de hemostase.

HEMORRAGIA	Anomalias vasculares
	Trombocitopenia (deficiência na síntese ou destruição plaquetar).
	Deficiências na função plaquetar
	Deficiências na coagulação (como a Hemofilia A, B e a Doença de von Willebrand, as quais apresentam deficiência de F VIII, F IX e F vW ou factores anormais, respectivamente).
TROMBOSE	Venosa (factores de risco hereditários (mutações nos factores procoagulantes ou anticoagulantes) ou adquiridos (como a idade, obesidade, neoplasias malignas e diabetes)).
	Arterial (a inflamação na parede vascular proporciona um aumento do número de plaquetas activadas; se houver polimorfismos que afectem as GP plaquetares, maior o risco de trombose arterial).
	Anticoagulante Lúpico (auto Ac; compete com factores de coagulação para as superfícies catalíticas, promovendo uma diminuição da fibrinólise).

4.9. CASO CLÍNICO I

Um homem de 70 anos de idade, com a pele pálida, apresentava na requisição uma análise aos parâmetros eritrocitários. Foi realizado o hemograma, resultados que estão representados na Figura 10:

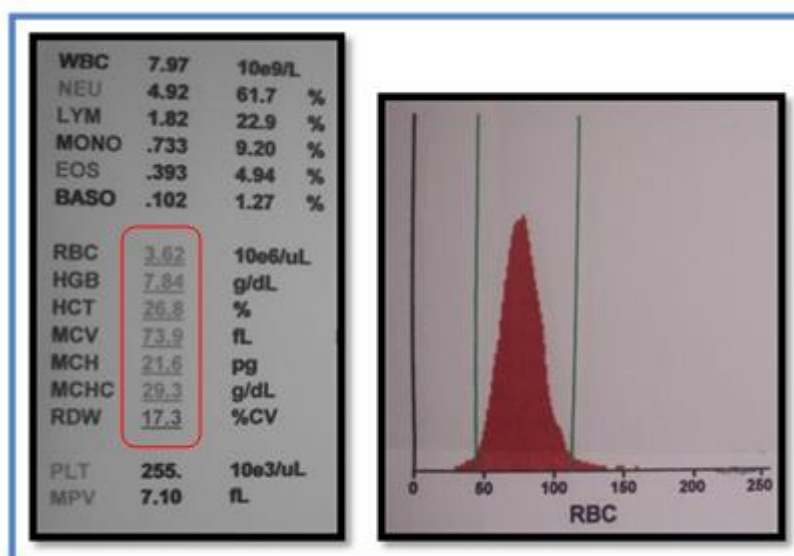


Figura 10: Hemograma (à esquerda), realçando os parâmetros eritrocitários, e gráfico referente à distribuição dos tamanhos dos eritrócitos (à direita).

A observação dos parâmetros eritrocitários, juntamente com o facto de as restantes populações sanguíneas não apresentarem alterações, indica que o paciente está anémico (Hb <13g/dL). Nestes casos, há anisopoiquilocitose, ou seja, eritrócitos com diferentes tamanhos e formas (RDW > 15% CV).

A análise do esfregaço de sangue periférico evidenciou a presença de hipocromia microcítica (de facto, o MCV é inferior a 80 fL e a MCH é inferior a 27 pg). Perante as evidências, é possível tratar-se de uma Anemia Ferropénica.

Outras análises poderiam ter sido solicitadas, para esclarecer se a falta de ferro se devia a má nutrição (através da avaliação da ferritina, transferrina e ferro sérico, por exemplo, que, neste caso, estariam diminuídos) ou a perda de sangue (num homem, as perdas de sangue mais frequentes ocorrem nos sistemas digestivo e urinário, assim, deveriam ser realizados os exames: endoscopia, colonoscopia, exame parasitológico de fezes, pesquisa de sangue oculto nas fezes e sumária de urina).

O paciente foi submetido a uma transfusão de sangue, devido aos valores extremamente baixos de Hb, e repetiu a colheita sanguínea uma semana depois e passados 20 dias da primeira admissão. Na Tabela 4, estão comparados os resultados dos três hemogramas:

Tabela 4: Comparação dos parâmetros eritrocitários referentes às três admissões do paciente.

	1 ^a admissão	Após 1 semana	Após 20 dias	unidades
RBC	↓ 3.62	4.87	4.65	10 ⁶ /μL
HGB	↓ 7.84	↓ 11.4	↓ 11.4	g/dL
HCT	↓ 26.8	37.0	↓ 36.2	%
MCV	↓ 73.9	↓ 76.1	↓ 77.8	fL
MCH	↓ 21.6	↓ 23.4	↓ 24.4	pg
MCHC	↓ 29.3	↓ 30.7	↓ 31.4	g/dL
RDW	↑ 17.3	↑ 18.1	↑ 20.3	%CV

Da análise dos parâmetros eritrocitários, constata-se que, embora continuem abaixo dos valores de referência, os resultados apresentam melhoria relativamente à primeira admissão no laboratório. É de salientar o facto de o RDW ter valores tão elevados (grande anisocitose), visto que no sangue do paciente estão as hemácias do próprio (hipocrómicas e microcíticas) e as resultantes da transfusão (normocrómicas e normocíticas). Na Figura 11

estão os gráficos referentes à distribuição dos tamanhos dos eritrócitos das duas últimas admissões, onde são visíveis dois 'picos' na curva.

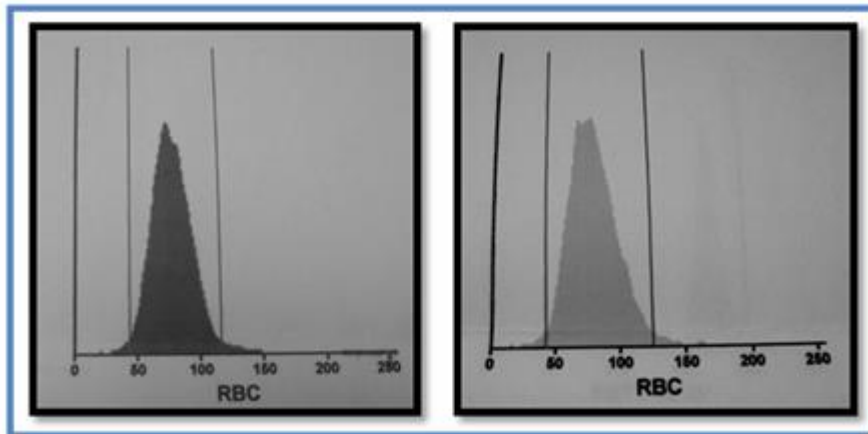


Figura 11: Gráficos correspondentes à anisocitose existente nas amostras referentes à segunda (esquerda) e última (direita) admissões.

Na última admissão, a requisição para a realização do hemograma também solicitava quantificação de reticulócitos. Os resultados, em percentagem e em valor absoluto, foram os seguintes: 1,2% e $47,4 \times 10^3/\mu\text{L}$ (dentro dos valores de referência) (ADAMSON, 2010; HOFFBRAND, 2016).

4.10. CASO CLÍNICO II

Um homem de 52 anos foi diagnosticado com β -talassémia menor. Os resultados de dois hemogramas realizados em Setembro de 2015 e Maio de 2016 estão expressos na Tabela 5, evidenciando policitemia (aumento do número de eritrócitos), microcitose e hipocromia:

Tabela 5: Comparação dos parâmetros eritrocitários de duas admissões ao laboratório.

	Setembro / 2015	Maio / 2016	unidades
RBC	↑ 7.22	↑ 7.27	$10^6/\mu\text{L}$
HGB	13.0	13.1	g/dL
HCT	41.7	41.4	%
MCV	↓ 57.7	↓ 56.9	fL
MCH	↓ 18.1	↓ 18.0	pg
MCHC	31.3	31.7	g/dL
RDW	13.2	13.1	%CV

As talassémias são doenças hereditárias caracterizadas pela deleção de um ou mais genes responsáveis pela codificação das cadeias globínicas, presentes na Hb. Resultam, deste modo, em deficiências na síntese de uma ou mais cadeias (alterações quantitativas da Hb), gerando glóbulos vermelhos microcíticos e hipocrômicos. As talassémias podem ser classificadas em minor, intermédias e major, dependendo dos perfis genotípicos e fenotípicos. Num indivíduo adulto, saudável, a hemoglobina presente em maior quantidade nos eritrócitos, cerca de 97%, é a HbA ($\alpha_2\beta_2$); seguem-se a HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$), com valores entre 2 e 3%, e a HbF ($\alpha_2\gamma_2$), com uma incidência menor que 1%.

Nesta β -talassémia minor, em particular, não há anemia (há casos que podem apresentar uma ligeira anemia) porque, por um lado, as cadeias α produzidas em excesso vão ligar-se às γ , dando origem a HbA₂ (que, provavelmente, apresentará uma concentração aumentada); por outro, há uma maior produção de eritrócitos, compensando, assim, a falta de HbA. Também é frequente observar-se um pontuado basófilo nos eritrócitos, que correspondem a restos nucleares provenientes de eritroblastos orto e policromáticos, cuja maturação foi abreviada pelo aumento da eritropoiese. O diagnóstico deste tipo de patologias faz-se recorrendo a hemogramas, esfregaços de sangue periférico, doseamento de HbA₂ e HbF e electroforese de HbA e HbA₂ (HOFFBRAND, 2016).

O diagnóstico diferencial de anemias microcíticas é complexo. Para contornar este problema, são utilizados índices eritrocitários, como o Índice de Mentzer, para diferenciar síndromes talassémicas de deficiências em ferro (causas mais comuns de anemias microcíticas), uma vez que envolvem implicações clínicas e terapêuticas distintas. O Índice de Mentzer é calculado através da razão VGM / RBC. Considera-se que estamos perante um síndrome talassémico se este índice for inferior a 13; no caso de ser superior a 13, o utente está anémico devido a uma deficiência em ferro. O Índice de Mentzer, além da rapidez e do baixo custo, apresenta grande utilidade, visto ser uma ferramenta de rastreio inicial, detectando amostras com elevada probabilidade de pertencerem a portadores de talassémia. Deste modo, evita-se submeter a electroforese de hemoglobinas um número elevado de amostras (MONIZ, 2016).

5. IMUNOLOGIA

A Imunologia é a área da ciência que estuda o sistema imunológico. Esta valência, fundamentalmente, auxilia no diagnóstico de doenças, avalia a eficácia de vacinações e permite a monitorização de tratamentos. É nesta área que se realiza não só a pesquisa de certos anticorpos (Ac) e antígenos (Ag), como também de proteínas e hormonas, através de ensaios imunoenzimáticos. Para isso, no LACCSMC recorre-se aos equipamentos Architect[®] ci 8200 da Abbott Diagnostics e miniVidas[®] da bioMérieux, além dos testes manuais Waller-Rose, Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) e Rapid Plasma Reagin (RPR), pesquisa de sangue oculto nas fezes e teste de gravidez.

Nesta valência, pus em prática vários dos conhecimentos adquiridos ao longo do Mestrado em Análises Clínicas, assim como aprendi muitos outros relativamente ao funcionamento dos equipamentos e à execução dos testes manuais, tal como às respectivas interpretações dos resultados. Também assimilei e desempenhei as metodologias de calibrações e controlos, internos e externos.

Nesta área, também as análises são executadas por pessoal habilitado para tal e são sempre sujeitas a validação pelo Director do Serviço e Responsável pelo Laboratório.

5.1. SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico, para além de outras funções, é responsável pelo reconhecimento e pela resposta contra agentes potencialmente patogénicos, compreendendo uma rede complexa de mecanismos. Quando existem deficiências nas defesas de um indivíduo, uma infecção facilmente resolvida numa pessoa saudável pode tornar-se letal para um imunodeprimido.

Os antígenos são componentes específicos dos invasores que são reconhecidos pelos receptores de antígenos presentes nos linfócitos B e T, que são células que medeiam a resposta imunológica adquirida.

A primeira linha de defesa contra um invasor são as barreiras físicas (defesa externa), que compreendem a pele e as mucosas, as secreções de auto-limpeza (tosse e espirros, por exemplo), a ciliatura, a acidez gástrica e a flora bacteriana normal. Quando esta não é capaz de eliminar o agente patogénico, a segunda linha de defesa é accionada, depois de terem sido detectadas estruturas de origem microbiana (defesa interna); é composta por células

(fagócitos, eosinófilos, mastócitos e linfócitos NK) e substâncias químicas (sistema do complemento e antimicrobianos), que estão localizadas onde é mais provável ocorrer uma invasão microbiana. Estes mecanismos e os de defesa externa constituem a imunidade inata. Se o sistema inato não for capaz de resolver a invasão, entra em acção o adquirido, que representa a terceira linha de defesa. Este é um sistema mais eficaz e especializado e é constituído por linfócitos B e T e anticorpos (ABBAS, 2015).

5.1.1. IMUNIDADE INATA

Entre outras funções, a resposta imunológica inata é direccionada para a eliminação de agentes patogénicos, e o seu reconhecimento como elemento estranho ao hospedeiro baseia-se no facto de os microrganismos invasores diferirem quimicamente dos componentes do organismo. A sua função é controlar o crescimento e a disseminação dos microrganismos e possui especificidade limitada, isto é, reconhece agentes que expressam determinado padrão molecular, mas não os diferencia entre si. O tempo de resposta é imediato e este sistema não apresenta memória.

As células epiteliais presentes nas mucosas e na pele constituem uma barreira para o agente patogénico. A pele, quando intacta, constitui uma barreira que impede a entrada de microrganismos. Também os ácidos gordos produzidos pelas glândulas sebáceas são eficazes contra muitas bactérias, assim como a secreção de peptídeos antimicrobianos (como por exemplo as β -defensinas), responsáveis pela destruição membranar e inibição da síntese de DNA/RNA e de proteínas dos microrganismos (DE SMET, 2005). Relativamente às mucosas, o muco nelas existente arrasta os microrganismos, não os deixando aderir.

Os processos de auto-limpeza, ou seja, tosse, espirros, fluxo de muco, vómitos, diarreia e fluxo de urina, expulsam os agentes potencialmente patogénicos do organismo.

Os cílios, através do seu movimento e juntamente com o muco, ajudam a arrastar os microrganismos.

O suco gástrico, devido ao reduzido pH, destrói a maioria dos invasores.

A flora bacteriana normal existente nas mucosas, particularmente do intestino, e na pele também protege o organismo de patogénios, uma vez que exerce competição e produz substâncias antimicrobianas.

Para além das barreiras anatómicas, as células do sistema imunológico inato têm uma função importante na protecção contra microrganismos que tenham penetrado no organismo do hospedeiro. Os fagócitos, após chegarem ao local da infecção, vão fagocitar o microrganismo; o processo de opsonização facilita a fagocitose, ocorrendo o reconhecimento das opsoninas por receptores específicos presentes na superfície dos fagócitos.

Os neutrófilos possuem poucas mitocôndrias, logo, têm uma reserva pequena de energia, daí terem uma durabilidade muito curta (alguns dias) e apresentarem uma acção transitória. As proteínas pré-formadas contidas nos grânulos primários (mieloperoxidase, lisozima, proteases neutras e hidrolases ácidas) e secundários (lisozima, colagenase e lactoferrina) são usadas na sua acção imunológica. Além da fagocitose e da destruição dos microrganismos ingeridos, os neutrófilos produzem moléculas que amplificam a resposta imune adquirida (quimiocinas e citocinas) (ROITT, 2011).

Os monócitos, consoante a sua localização, desenvolvem diferentes estruturas; quando saem de circulação e migram para os tecidos diferenciam-se em macrófagos. Os macrófagos estão presentes no tecido conjuntivo e na membrana basal dos vasos sanguíneos de menor calibre; encontram-se em elevado número nas sinusóides do baço, nos nódulos linfáticos e na medula óssea. Ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos possuem capacidade de auto-substituição (proliferação local) e podem sobreviver durante muito tempo depois da fagocitose, graças ao elevado número de mitocôndrias (ROITT, 2011). Além dos receptores para as opsoninas, os macrófagos possuem outro tipo de receptores: de manose (resíduos presentes apenas na parede de microrganismos), “scavenger” (ligação a lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas ou acetiladas e a estruturas microbianas), integrinas (ligação a microrganismos), CD14 (reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias Gram negativas) e *Toll-like receptors* (TLR) (reconhecimento de estruturas microbianas, como o LPS e proteoglicanos) (TAYLOR, 2005). Os macrófagos complementam a acção dos neutrófilos e produzem lisozima (quebra do peptidoglicano das bactérias) e proteínas pertencentes ao sistema do complemento (destruição do microrganismo por lise osmótica), que são secretadas continuamente após a sua activação. Durante a fagocitose, os macrófagos produzem e libertam proteases lisossomáticas (que, juntamente com a produção de radicais livres de O₂ (explosão respiratória) e de óxido nítrico são responsáveis pela destruição do microrganismo), colagenase, elastase e activadores do plasminogénio, que também são importantes na remodelação e reparação dos tecidos. Para amplificar a resposta inflamatória (e adquirida, quando é activada), também

há produção de citocinas. Quando activados, apresentam maior tamanho e mobilidade, actividade bactericida e expressão de moléculas do Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) II (que, como veremos, são muito importantes na indução da resposta imunológica adquirida) (ABBAS, 2015; ROITT, 2011).

Quando os invasores são microrganismos de maiores dimensões (como os helmintas, que não são fagocitados pelos macrófagos) os eosinófilos libertam enzimas para o meio, por desgranulação e após activação, que vão provocar poros no alvo, culminando na morte do invasor.

Os mastócitos (juntamente com os macrófagos) participam na iniciação da resposta inflamatória, aumentando a permeabilidade dos vasos sanguíneos através da libertação do conteúdo dos seus grânulos citoplasmáticos, como por exemplo a histamina.

Os linfócitos NK são importantes na destruição de células tumorais e células infectadas por microrganismos (ABBAS, 2015; ROITT, 2011).

5.1.2. IMUNIDADE ADQUIRIDA

Quando o sistema imunológico inato não consegue resolver uma infecção e há persistência do agente invasor, entra em acção o terceiro nível de defesa: o sistema imunológico adquirido, constituído por linfócitos B e T e componentes solúveis (anticorpos). Os linfócitos expressam receptores que são capazes de detectar pequenas diferenças estruturais entre antígenos. Esta imunidade é específica, mais eficaz e, após a destruição dos invasores, permanecem no organismo células de memória que permitem ao hospedeiro desencadear uma resposta mais rápida e mais forte num segundo encontro com o mesmo agente. A imunidade adquirida também é responsável pela detecção e eliminação de células tumorais (ABBAS, 2015; ROITT, 2011).

A activação da imunidade adquirida ocorre quando há apresentação de Ag aos linfócitos B e/ou aos linfócitos T. No caso dos linfócitos T auxiliares, há necessidade de processamento intracelular do antígeno pelas células apresentadoras de Ag (APC's), que são os macrófagos, os linfócitos B e as células dendríticas, ocorrendo depois a exposição das moléculas antigénicas ligadas às moléculas MHC classe II. Os linfócitos T citotóxicos também reconhecem o antígeno após processamento e associação às moléculas MHC (neste caso, da classe I). A variabilidade das moléculas MHC permite que um dado indivíduo apresente

diferentes moléculas de MHC que reconhecem diversos grupos de Ag. Contudo, estas moléculas possuem também domínios não polimórficos, que serão importantes na interacção com os linfócitos T: o MHC I está presente em todas as células nucleadas e interage com a glicoproteína CD8 (expresso nos linfócitos T citotóxicos); o MHC II está presente, principalmente, em APC's e estabelece ligação com o CD4 (expresso nos linfócitos T auxiliares). As moléculas MHC não distinguem peptídeos próprios de estranhos, portanto, são os linfócitos T que, após a apresentação, irão fazer a distinção entre os dois tipos de peptídeos. A expressão de MHC nas células pode ser aumentada por citocinas inflamatórias, produzidas na resposta inata (ABBAS, 2015; ROITT, 2011).

Os antígenos são apresentados pelas APC's aos linfócitos T auxiliares, nos gânglios linfóides secundários (baço, gânglios linfáticos e tecido linfóide associado às mucosas (MALT), que pode estar presente nos tratos intestinal (GALT), respiratório (BALT e NALT) e urogenital (VALT)). Os antígenos presentes nos epitélios e tecido conjuntivo são capturados pelas APC's, principalmente pelas células dendríticas, que são transportadas através da linfa para o MALT e os gânglios linfáticos. Os antígenos que entram na circulação sanguínea vão até ao baço, onde são capturados pelas APC's locais. Os linfócitos T e B, após estimulação antigénica, deslocam-se para perto um do outro. Depois de interagirem, os linfócitos T entram em circulação e os linfócitos B vão para os centros germinativos (onde irá haver proliferação e selecção dos centrócitos com receptores específicos para o antígeno) ou para a medula dos gânglios linfáticos onde os plasmócitos permanecem a produzir anticorpos. Os anticorpos entram depois na circulação sanguínea. Estas moléculas bloqueiam a adesão de bactérias aos tecidos do hospedeiro, neutralizam exotoxinas (impedindo que se liguem ao seu receptor e exerçam o efeito) e vírus (evitam a sua entrada na célula hospedeira) e são importantes na aglutinação de microrganismos. Os anticorpos contribuem para a eliminação dos microrganismos ao actuarem como opsoninas (o revestimento dos microrganismos com anticorpos promove a sua fagocitose). Além disto, a citotoxicidade mediada por células e dependente de anticorpos (as células com anticorpos ligados na sua superfície são destruídas por células citotóxicas, como os linfócitos NK e os eosinófilos (estes últimos reconhecem microrganismos revestidos por IgE)) constitui também um importante mecanismo de defesa (ABBAS, 2015; ROITT, 2011).

5.2. ARQUITECT® ci 8200 da Abbott Diagnostics

O ARQUITECT® ci 8200 da Abbott Diagnostics é um aparelho automatizado dividido em dois sectores, a química clínica e a imunologia, baseado na tecnologia de Quimioluminescência com Micropartículas (CMIA). Inicialmente, a amostra é incubada com o diluente (específico para cada teste) e com as micropartículas paramagnéticas revestidas de antigénios, anticorpos ou outras moléculas capazes de se ligarem à substância alvo. Depois da ligação destas partículas com o alvo, é realizada uma lavagem para remoção do material que não reagiu. Posteriormente, é adicionado um anticorpo secundário conjugado com acridina (mais solúvel e estável) que irá estabelecer ligação com os complexos anteriormente formados, caso existam. Seguidamente, e após outro ciclo de lavagem, há adição das soluções pré-activadora e activadora, responsáveis pela oxidação do derivado de acridina. Esta oxidação causa um evento excitatório e os sinais quimioluminescentes da acridina são quantificados pelo sistema óptico do equipamento, em RLU's (Unidades Relativas de Luz) (QUINN, 2005).

Os testes que se realizam no sector do Architect correspondente à imunologia, no Laboratório, são os seguintes: Ac Anti-HBc, Anti-HBc IgM, Anti-HBe, Anti-HBs, Anti-HCV, Anti-TG, Anti-TPO, Vitamina B12, Folatos, T3 livre, T4 livre, T3 Total, T4 Total, Ac Anti-HAV IgG, Anti-HAV IgM, Ag HBe, HBs, Ag e Ac anti-HIV, Syphilis TP, PSA livre, PSA total, Troponina-I e TSH.

5.3. MINIVIDAS® da bioMérieux

O miniVidas® da bioMérieux é um imunoanalisador automatizado, multiparamétrico, baseado no método imunoenzimático sandwich com detecção final por fluorescência (técnica ELFA). Inicialmente, a amostra é transferida para um poço reaccional que contém anticorpos específicos marcados com fosfatase alcalina (conjugada); esta mistura é aspirada e dispensada várias vezes pelo cone para aumentar a velocidade da reacção. Nesta operação as partículas alvo, caso estejam presentes, ligar-se-ão às imunoglobulinas fixadas no cone e ao conjugado, formando assim uma “sandwich”. Posteriormente são realizadas várias lavagens para eliminar os componentes não ligados. Na fase final, o substrato 4-metil-umbeliferil fosfato é adicionado ao meio reaccional. A enzima do conjugado catalisa a hidrólise deste substrato no produto 4-metil-umbeliferona, cuja fluorescência emitida é quantificada pelo sistema óptico do aparelho, a 450nm (YOLKEN, 1979).

No local do estágio, os testes que se efectuam neste equipamento são os seguintes: painel de Ag específicos de alergias, hCG, CA 19.9, CEA, Cortisol, FSH, Progesterona e Testosterona.

5.4. MARCADORES DA ANEMIA

Como já foi referido no capítulo da Hematologia, o ferro, a vitamina B12 e o ácido fólico são extremamente importantes para a normal síntese das células da linha eritróide. Quando há uma deficiência num ou mais destes co-factores, o indivíduo desenvolve uma anemia. No sector da imunologia do local do estágio, apenas a vitamina B12 e os folatos são quantificados:

- **Vitamina B12**

A cianocobalamina (vitamina B12) é absorvida no intestino delgado distal/íleo, devido à ligação ao factor intrínseco, produzido nas células parietais do estômago. Esta vitamina é essencial para o metabolismo celular, principalmente do sistema gastrointestinal, medula óssea e tecido nervoso. Está envolvida na síntese de ácidos nucleicos e participa no metabolismo dos hidratos de carbono e dos lípidos.

- **Folatos**

Os folatos são absorvidos no intestino delgado proximal, actuam como co-enzimas em várias reacções metabólicas e desempenham um papel importante no metabolismo dos aminoácidos. Também participam na síntese de ácidos nucleicos de células sanguíneas e do tecido nervoso.

Quando há deficiência de vitamina B12 ou de folatos vai haver um atraso na maturação do núcleo dos eritrócitos em relação ao citoplasma, desenvolvendo-se uma Anemia Macroítica Megaloblástica, normocrómica. Esta carência também produz efeitos noutras linhagens celulares sanguíneas, podendo ocorrer neutropenia, com granulócitos de grande tamanho e hipersegmentados, e trombocitopenia. Uma vez que ocorrem alterações na síntese de DNA, os tecidos mais afectados são os que apresentam maior taxa de renovação celular, como é o sistema hematopoiético. Também se podem verificar neuropatias em caso de deficiência de folatos (ADAMSON, 2010).

5.5. MARCADORES CARDÍACOS

A determinação dos marcadores biológicos de necrose coronária é importante para o diagnóstico precoce (ou exclusão) de enfarte agudo do miocárdio. Actualmente, estão disponíveis na prática clínica marcadores de necrose do miocárdio (creatina fosfoquinase, creatina fosfoquinase MB, troponinas T e I e mioglobina), de activação neuro-humoral (peptídeo natriurético cerebral (BNP) e fracção N terminal do pró-BNP) e de inflamação (proteína C reactiva). No sector da Imunologia, apenas se determina a troponina I:

• Troponina-I

A troponina I (assim como a troponina T) possui isoformas cardioespecíficas, diferenciando-se das produzidas no músculo-esquelético, que podem ser detectadas quando se recorre a Ac monoclonais. Os indivíduos com enfarte agudo do miocárdio apresentam uma elevação da troponina I no sangue às 4-6 horas, com um pico de libertação às 12 horas, devido à proteólise progressiva do aparelho contráctil dos miócitos. As troponinas são os melhores marcadores para o diagnóstico de enfarte do miocárdio, uma vez que são muito sensíveis e específicas. Este marcador cardíaco também pode estar elevado em situações de lesão miocárdica não isquémica, como miocardite, tromboembolismo pulmonar e aneurisma dissecante da aorta, patologias estas que também se caracterizam por dor torácica (HENRIQUES, 2006).

5.6. ESTUDO DA FUNÇÃO ENDÓCRINA

O sistema endócrino envolve a interacção entre o hipotálamo (glândula terciária), a hipófise (glândula secundária) e a glândula endócrina primária, compreendendo mecanismos de feedback negativo ou positivo. A comunicação do sistema endócrino realiza-se por meio de sinais químicos, as hormonas, que são libertadas na corrente sanguínea.

α) FUNÇÃO TIROIDEIA

A tiróide possui dois lóbulos e é constituída por dois tipos de células: as foliculares, responsáveis pela secreção de tri-iodotironina (T3) e tetra-iodotironina (T4), e as

parafoliculares, que secretam calcitonina. Esta glândula capta e armazena iodo, essencial para a síntese das hormonas tiroideias. As hormonas da tiróide têm dois efeitos sobre o metabolismo: estimular quase todos os tecidos do corpo a produzir proteínas e aumentar a quantidade de oxigénio que as células utilizam.

Para o diagnóstico de patologias associadas à tiróide faz-se a quantificação das hormonas com ela relacionadas e/ou de auto-anticorpos a ela dirigidos (DEMERS, 2008).

- **TSH (Hormona Estimuladora da Tiróide)**

A actividade da tiróide está dependente da acção da TSH, produzida pela hipófise que, por sua vez, é influenciada pela TRH (hormona libertadora de tirotropina), sintetizada e libertada pelo hipotálamo, dependendo de mecanismos de feedback negativo. Esta hormona é o principal marcador de hipertiroidismo e hipotiroidismo primários (DEMERS, 2008).

- **Hormonas Tiroideias**

As células foliculares captam iodo da corrente sanguínea, na forma de iodeto, promovendo a iodinação de moléculas de tirosina da tiroglobulina, resultando na formação de mono-iodotirosina (MIT) e di-iodotirosina (DIT). A T4 é formada por dois resíduos de DIT, enquanto a T3 tem origem num resíduo de MIT e noutro de DIT.

A tiróide liberta sobretudo T4, no entanto, a T3 é muito mais activa. Cerca de 40% da T4 é convertida em T3, através de desiodinação, no fígado e rins.

- **T3 Livre e T3 Total**

Na circulação sanguínea, a T3 encontra-se na sua maioria ligada a uma proteína de transporte, a globulina ligadora de tiroxina (TBG). Apenas uma pequena percentagem circula na forma livre, a única metabolicamente activa.

- **T4 Livre e T4 Total**

A T4 circula no plasma ligada a proteínas de transporte: cerca de 70% ligada à TBG, 20% à transtirretina e 10% à albumina. Uma pequena percentagem circula na forma livre, a única metabolicamente activa (DEMERS, 2008).

No que respeita às patologias que envolvem a tiróide, o hipertiroidismo e o hipotiroidismo são, sem dúvida, as mais frequentes (os nódulos e a Síndrome Doente Eutiróide, na qual a T4 não é transformada em T3, mas numa T3 reversa, constituem casos raros). No hipertiroidismo há um aumento da produção das hormonas tiroideias que, na maior parte das situações, se deve à existência de Ac contra os receptores da TSH, diminuindo a concentração desta hormona no plasma. Estas IgG são estruturalmente semelhantes às moléculas de TSH e, portanto, vão contribuir para a estimulação da tiróide (possibilidade de desenvolvimento de bócio), aumentando a produção de T3 e T4. Estamos perante hipertiroidismo primário ou Doença de Graves-Basedow, uma patologia de natureza auto-imune. Quanto ao hipotiroidismo, se a tiróide for disfuncional (causa primária), a diminuição da síntese de hormonas tiroideias implica que, por mecanismos de feedback negativo, haja maior produção de TSH por parte da hipófise ($[TSH] > 25 \mu UI/mL$) e TRH pelo hipotálamo, para estimular a tiróide. Neste caso, a estimulação exagerada da tiróide pode desencadear o desenvolvimento de bócio; o hipotiroidismo primário sem tiromegália é caracterizado por perda ou atrofia do tecido tiroidiano. A tiroidite de Hashimoto é a causa mais frequente de hipotiroidismo primário (tema que será aprofundado no Caso Clínico III) (DEMERS, 2008).

- **Anticorpos Antitiroideos (Ac anti-TPO e Ac anti-TG)**

Os anticorpos anti-peroxidase (Ac anti-TPO) e anti-tiroglobulina (Ac anti-TG), produzidos quando há um distúrbio auto-imune, impedem que haja captação do iodeto presente no plasma e, por isso, a produção de T3 e T4 está comprometida. Estes auto-Ac estão associados ao hipotiroidismo crónico autoimune (tiroidite de Hashimoto), sendo a presença de Ac anti-TPO mais frequente. No entanto, é de referir que estes auto-Ac não são específicos de hipotiroidismo autoimune; podem apresentar uma concentração elevada ou baixa na Doença de Graves e há casos de hipotiroidismo primário com níveis destes Ac diminuídos (CATUREGLI, 2014; DEMERS, 2008).

B) FUNÇÃO SUPRARRENAL (OU ADRENAL)

As glândulas suprarrenais estão localizadas sobre o pólo superior de cada rim e cada uma delas é constituída por uma zona cortical (produção de hormonas esteróides, ou seja, mineralocorticóides, glicocorticóides e esteróides sexuais, sendo que o colesterol é o

precursor de todas elas) e uma zona medular (síntese de catecolaminas). Os mineralocorticóides regulam a homeostasia de sais (conservação de sódio e perda de potássio, minerais muito importantes no equilíbrio dos líquidos do organismo) e, portanto, também controlam o volume extracelular. A aldosterona é o mineralocorticóide endógeno de acção mais potente e é exclusivamente produzida na zona glomerular do córtex, devido à actividade da enzima aldosterona-sintetase. Os glicocorticóides são importantes no metabolismo dos hidratos de carbono, das proteínas e dos lípidos. O cortisol é o principal glicocorticóide sintetizado nas zonas fasciculada e reticular do córtex suprarrenal. Nas zonas fasciculada e/ou reticular ocorre também a síntese de hormonas sexuais, isto é, de estrogénios, progesterona e androgénios (como mais importantes destacam-se a desidroepiandrosterona e a androstenediona). Os androgénios aumentam a síntese proteica e, deste modo, promovem o aumento da massa muscular. Têm maior significado nas mulheres, contribuindo para a manutenção da pilosidade púbica e axilar e estimulação da eritropoiese, visto que nos homens há muito maior produção a nível testicular. As catecolaminas (dopamina, adrenalina e noradrenalina) têm origem nos aminoácidos tirosina ou fenilalanina e são essenciais para a manutenção da homeostase e para a resposta ao stress, através do controlo das actividades cardiovasculares, metabólicas, glandulares e viscerais (DEMERS, 2008).

• **CORTISOL**

Em situações de hipoglicémia e/ou stress, o hipotálamo liberta CRH (hormona libertadora de corticotropina) que, por sua vez, vai actuar na hipófise e estimular a síntese de ACTH (hormona adrenocorticotrófica). Esta última, por acção nas glândulas adrenais, vai promover a síntese de cortisol. Deste modo, a concentração sérica de cortisol é regulada segundo mecanismos de feedback negativo. A libertação do cortisol está sujeita a um ritmo circadiano, no qual a concentração é mais elevada de manhã e menor por volta da meia-noite. A determinação da concentração do cortisol pode ser efectuada no soro, no plasma ou na urina das 24h.

Genericamente, as patologias que envolvem a secreção de cortisol podem ser divididas em duas categorias: Síndrome de Cushing (hipercortisolismo) e insuficiência adrenocortical (destruição ou hipofunção do córtex, ocorrendo hipocortisolismo). A Síndrome de Cushing caracteriza-se pela perda do ritmo circadiano da CRH/ACTH, levando a uma cortisolémia elevada e constante. Pode ser dependente de ACTH, isto é, o aumento

desta hormona hipofisária, provocado por adenomas na hipófise (doença de Cushing) ou de secreção ectópica, promove o aumento da secreção de cortisol pelas glândulas suprarrenais, ou independente de ACTH, ou seja, o excesso de produção de cortisol deve-se à existência de tumores adrenocorticais, hiperplasia nodular ou até à terapêutica crónica com glicocorticóides, estando a concentração de ACTH no plasma diminuída. Relativamente à insuficiência adrenocortical, esta pode ser primária (a Doença de Addison é um exemplo, na qual a incapacidade de produção hormonal em quantidade suficiente leva a que a concentração de ACTH esteja aumentada) ou secundária (deficiência na produção de ACTH) (DEMERS, 2008; EISENHOFER, 2008).

c) **FUNÇÃO GONADAL**

O estudo da função gonadal é frequente quando se verifica hipogonadismo ou suspeita de disfunção testicular no homem e quando há distúrbios menstruais, problemas de fertilidade, hirsutismo ou virilização na mulher. O doseamento da hormona luteinizante (LH), da hormona folículo-estimulante (FSH), da progesterona, da testosterona, do estradiol e da gonadotrofina coriónica humana (hCG) são as determinações hormonais mais frequentes. No LACCSMC apenas se quantificam a FSH, progesterona, hCG e testosterona.

A GnRH (hormona libertadora de gonadotropina), libertada pelo hipotálamo, é responsável pela estimulação da produção de FSH e LH, na hipófise. Estas hormonas, por sua vez, vão influenciar a síntese de estrogénios, progesterona e testosterona, nos ovários e testículos. Estas glândulas-alvo exercem mecanismos de feedback negativo e positivo (na ovulação) no hipotálamo e hipófise (GRONOWSKI, 2008).

- **FSH**

Na mulher, a FSH assegura a maturação folicular e a secreção de estrogénios, devido ao estímulo das células da granulosa. No homem, a FSH tem alguma importância no desenvolvimento gonadal e estimula a espermatogénese nas células de Sertoli dos túbulos seminíferos.

A concentração de FSH no sangue varia consoante o género, a idade e a altura do ciclo menstrual em que a mulher se encontra. Quando os níveis plasmáticos de FSH estão aumentados, na mulher, os diagnósticos possíveis são: hipofunção ovárica, menopausa, síndrome do ovário poliquístico ou anomalia cromossómica (como a síndrome de Turner).

No homem, concentrações elevadas podem indicar síndrome de Klinefelter ou danos testiculares (causados por alcoolismo ou quimioterapia, por exemplo), associados a diminuição da função gonadal. Se os níveis desta hormona estão abaixo dos valores de referência, então podemos estar perante uma patologia no eixo hipotalâmico-hipofisário. Também o stress e um peso excessivamente baixo podem induzir uma diminuição na produção da FSH (GRONOWSKI, 2008).

- **Progesterona**

A progesterona, juntamente com os estrogénios, regula as funções do sistema reprodutivo, durante o ciclo menstrual. É extremamente importante no estabelecimento da gravidez e da sua manutenção, sendo que as principais fontes desta hormona são o corpo lúteo e a placenta. As glândulas adrenais e os testículos também sintetizam esta hormona, mas em menor quantidade.

A concentração plasmática de progesterona está aumentada na hiperplasia adrenal congénita, assim como na gravidez. A deficiente produção desta hormona implica que hajam ciclos menstruais irregulares e com abundante fluxo sanguíneo, sendo a causa mais provável a síndrome do ovário poliquístico (GRONOWSKI, 2008).

- **hCG**

O papel fisiológico da hCG é a manutenção do corpo amarelo, permitindo a sua transformação em corpo amarelo gestacional, após ter ocorrido a fecundação, e estimular a produção de progesterona e estrogénios durante o primeiro trimestre da gravidez. Decorrido esse tempo, a hCG passa a ter biossíntese principalmente no sinciotrofoblasto placentário. Esta hormona também pode ser produzida por alguns tecidos tumorais, principalmente os de origem trofoblástica, como o coriocarcinoma.

Os valores de hCG esperados, numa população saudável e sem patologias tumorais, são inferiores a 3 mUI/mL nos homens, a 4 mUI/mL nas mulheres em idade fértil e a 13 mUI/mL em mulheres menopáusicas (ROSEN, 2011).

- **Testosterona**

A testosterona é a principal hormona sexual responsável pelo desenvolvimento do sistema reprodutivo masculino. Além de ser importante

na espermatogénese, também é fundamental para o crescimento muscular e ósseo, assim como para a sua manutenção.

Em homens com hipogonadismo, níveis baixos de testosterona devem-se, essencialmente, a problemas testiculares ou a disfunções hipofisárias. Em mulheres, níveis elevados de testosterona podem causar irregularidades na menstruação, acne, infertilidade, hirsutismo e virilização. Aumentos na concentração desta hormona também se associam à síndrome do ovário poliquístico (CRNAEGIE, 2004).

5.7. MARCADORES TUMORAIS

Os recentes avanços no estudo da genética molecular vieram permitir um melhor conhecimento da génese do cancro. Resumidamente, a carcinogénese ocorre quando há alterações nos mecanismos de regulação da proliferação celular. Estas alterações podem envolver a expressão de oncogenes (por activação de proto-oncogenes), a inactivação de genes supressores tumorais e/ou alteração de genes de correcção de erros na reparação ou duplicação do DNA.

Um marcador tumoral é uma substância produzida pelas células neoplásicas e libertada para fora do tumor ou sintetizada pelo organismo em resposta à presença do tumor. Os marcadores tumorais podem ser antigénios celulares, hormonas, enzimas ou proteínas séricas. Consoante o marcador, o seu doseamento pode ser efectuado nas células, no sangue ou em secreções.

Um marcador tumoral ideal deveria ser específico do respectivo tumor, libertado proporcionalmente ao volume do tecido tumoral, detectável num estágio precoce da doença e doseável com fiabilidade. Porém, como essa substância ideal não existe na prática clínica, o valor clínico de um marcador tumoral depende da sua especificidade e sensibilidade. O marcador será tanto mais específico quanto mais baixa for a probabilidade de fornecer resultados falsos positivos e tanto mais sensível quanto maior for a probabilidade de fornecer resultados positivos nos casos confirmados de tumor.

O facto de os marcadores tumorais apresentarem baixas especificidade e sensibilidade limita a sua aplicação no diagnóstico clínico (à excepção do PSA e da calcitonina). Os valores dos marcadores tumorais podem diminuir após o tratamento e

voltar a aumentar quando ocorre uma recaída. São utilizados para complementar o prognóstico e o seguimento dos tratamentos anti-cancerígenos (SHARMA, 2009).

- **CA 19.9**

Os determinantes antigénicos 1116-NS-19.9 estão presentes nos epitélios gástrico, intestinal e pancreático fetais. No adulto, podem ser encontrados, em muito baixas concentrações, nos tecidos hepático, pulmonar e pancreático. A quantificação do antigénio hidrocarbonado 19.9 (CA 19.9) é definida pelo uso de anticorpos monoclonais específicos (1116N-NS-19.9).

Valores elevados dos determinantes antigénicos 1116-NS-19.9 reactivos associam-se, sobretudo, ao cancro pancreático, embora valores normais não excluam esse diagnóstico. Também se podem detectar elevações do CA 19.9 em situações como o cancro do estômago, colo-rectal ou estase biliar. Valores aumentados e constantes dos níveis de CA 19.9 indicam, geralmente, evolução tumoral e má resposta ao tratamento. Não há correlação entre a massa tumoral e os resultados obtidos no teste, contudo, níveis séricos acima de 1000 U/mL, geralmente, indicam a existência de metástases (YAMASHITA, 2009).

- **CEA**

O antigénio carcino-embriónico (CEA) humano é produzido pelas células durante a vida fetal. A sua produção é interrompida após o nascimento, no entanto, podem ser detectadas concentrações muito baixas em indivíduos sem qualquer patologia. Este marcador associa-se ao cancro colo-rectal, contudo, os níveis de CEA também podem estar aumentados no cancro do esófago, estômago, pulmão, mama e meningioma. Apresenta uma boa correlação com a massa tumoral inicial e com o aparecimento posterior de metástases (YAMASHITA, 2009).

- **PSA livre e PSA total**

O PSA (Ag específico da próstata) é uma proteína produzida pelas células da glândula prostática. Este marcador associa-se, sobretudo, ao cancro da próstata, embora valores normais não afastem esse diagnóstico. O facto de o PSA ser sensível e específico permite que este teste seja usado como

rastreio neste tipo de tumor. Também se podem registar valores elevados na hipertrofia benigna da próstata, na prostatite e no cancro da mama (no homem). Este marcador não distingue tecido normal de tumoral, no entanto, quanto mais elevados forem os valores do PSA, maior a probabilidade de existir um adenocarcinoma na próstata. A quantificação do PSA pode ser efectuada na fracção livre (que não está ligada a proteínas) ou na total, podendo determinar-se a razão $PSA_{\text{livre}} / PSA_{\text{total}}$. Alguns estudos sugerem que uma fracção de PSA_{livre} diminuída pode estar relacionada com uma maior agressividade do tumor (GJERTSON, 2011).

5.8. SEROLOGIA DE INFECÇÕES VÍRICAS

Os vírus são estruturas de um único ácido nucleico (DNA ou RNA), contido numa cápside proteica. São organismos intracelulares obrigatórios (de células metabolicamente activas), que se reproduzem unicamente a partir do seu material genético, por replicação do ácido nucleico.

O diagnóstico das infecções virais pode ser efectuado recorrendo a métodos directos (pesquisa da partícula ou de componentes virais) ou indirectos (pesquisa de Ac específicos) (NIZET, 2009).

α) HEPATITE A

Há vírus que podem provocar hepatite (alteração difusa no parênquima hepático, com inflamação e alteração do hepatócito), no entanto, a agressividade é variável, dependendo se a cura é espontânea, se o vírus tem possibilidade de provocar infecção crónica ou se é oncogénico (aumentando o risco de cancro hepático).

O vírus da Hepatite A (HAV) é de transmissão por via fecal-oral, quer por contacto directo pessoa a pessoa, quer por ingestão de água ou alimentos contaminados; a transmissão por via parenteral é rara. Tem um período de incubação de cerca de 30 dias, em média, e as infecções podem ser assintomáticas ou severas (maior probabilidade de complicações com o aumento da idade). As manifestações clínicas mais evidentes são a presença de icterícia, urina escura e fezes descoradas. A hepatite A nunca evolui para doença crónica.

Na Figura 12 pode observar-se o curso serológico da infecção causada por este vírus. Os Ac do tipo IgM são os primeiros a serem produzidos, durante o pródrómo (sinais e/ou sintomas que podem indicar o início de uma doença, antes do aparecimento dos sintomas específicos), produção essa que termina após algumas semanas, no período de convalescença. Logo após o início da síntese de IgM há produção de IgG, que persistem no sangue mesmo após a resolução da infecção (HOLLINGER, 2013).

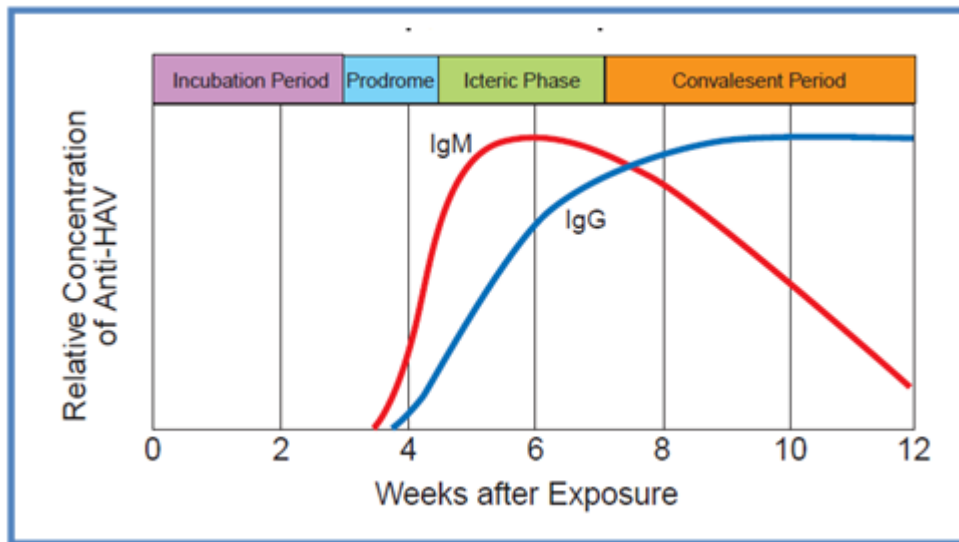


Figura 12: Curso serológico da infecção causada por HAV (adaptado de HOLLINGER, 2013)

- **Ac Anti-HAV IgM**

A presença de Ac do tipo IgM específicos para o HVA indica que o indivíduo foi recentemente infectado pelo vírus, podendo encontrar-se na fase aguda da infecção ou no período de convalescença (estes Ac podem persistir até 6 meses), dependendo do valor obtido na quantificação.

- **Ac Anti-HAV IgG**

Os Ac do tipo IgG específicos para o HAV, após o contacto com o vírus, permanecem no sistema imunológico. Deste modo, a presença de Ac anti-HAV do tipo IgG, juntamente com os Ac anti-HAV IgM, significa que a infecção é recente; caso apenas os Ac anti-HAV IgG estejam presentes, então estamos perante uma infecção passada ou vacinação (HOLLINGER, 2013).

b) HEPATITE B

O vírus da Hepatite B (HBV), actualmente, é transmitido por via sexual, perinatal (no parto, visto que este vírus não atravessa a placenta) e percutânea. O período de incubação é de 2 a 3 meses e os indivíduos infectados, além do mal-estar, dor no hipocôndrio direito, icterícia, urina escura e fezes descoradas, apresentam um aumento nos níveis das transaminases. Este vírus possui um envelope (membrana exterior à cápside), constituído, essencialmente, por Ag HBs. A cápside é formada, maioritariamente, pelo Ag HBc (indetectável no soro); também produz Ag HBe, que é uma proteína solúvel, sendo secretada para o soro. A infecção aguda apresenta uma taxa de 90 a 95% de cura; cerca de 5-10% das infecções evoluem para doença crónica.

Na Figura 13 estão representados os cursos serológicos das infecções aguda e crónica, assim como os níveis da alanina-transaminase (ALT). Relativamente à infecção aguda, os Ac anti-HBc são os primeiros a ser produzidos (inicialmente IgM e depois IgG). Devido aos Ag HBe e HBs sintetizados pelo vírus, dois a três meses após o contacto com o agente infeccioso, são detectáveis Ac específicos (anti-HBe e anti-HBs, respectivamente) produzidos pelo sistema imunológico, produção essa que continuará mesmo após a resolução da infecção (durante algum tempo). Enquanto a infecção durar, haverá presença de DNA viral no sangue do hospedeiro. No caso de a infecção se tornar crónica, há persistência de Ag HBe e HBs no soro; há produção de Ac a eles dirigidos, contudo, não se consegue fazer a sua detecção. Também os níveis da ALT e de DNA viral permanecem aumentados durante vários meses (SEEGGER, 2013).

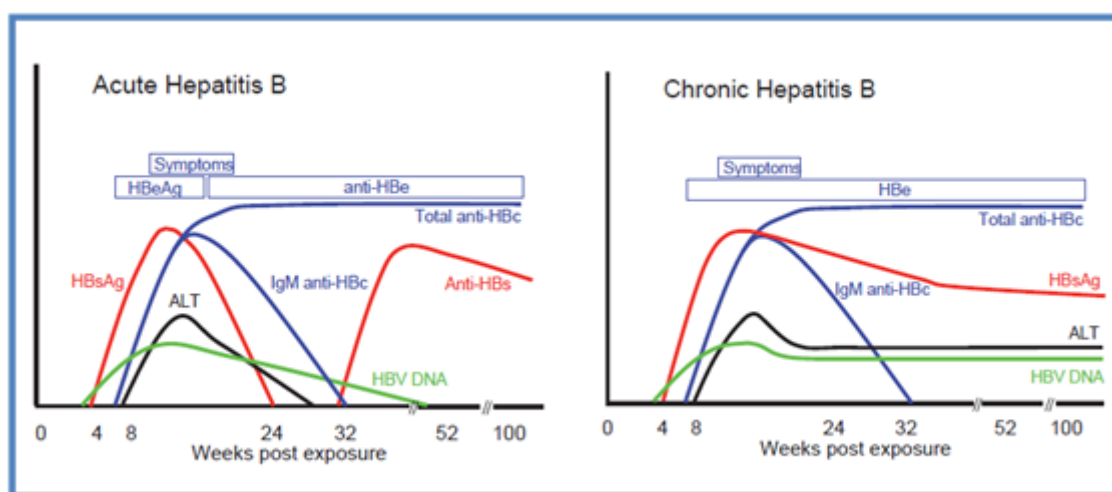


Figura 13: Curso serológico das infecções aguda (à esquerda) e crónica (à direita) causadas pelo HBV (adaptado de SEEGGER, 2013).

Para o diagnóstico e monitorização da hepatite B podem ser efectuados os seguintes testes:

- **Ag HBs**

O Ag HBs surge no soro 1 a 10 semanas após a exposição ao vírus (em paralelo com o Ag HBc) e é um marcador de infecção. Este Ag persiste durante a fase aguda, até à convalescença. Quando a presença do AgHBs no soro excede os 6 meses, a infecção evolui para crónica. Este teste é qualitativo e é usado para monitorizar o estágio da infecção (quando combinado com outros marcadores), screening pré-natal e prevenção perinatal (SEEGER, 2013).

- **Ag HBe**

O Ag HBe pode ser detectado no soro nos primeiros 3 meses da infecção, quando a carga viral atinge os valores mais elevados (devido à acentuada replicação viral). Quando a infecção é crónica, este Ag persiste no soro durante longos meses, sendo um importante marcador de alta infecciosidade (presença de DNA viral). O Ag HBe deixa de ser detectável no soro quando se inicia a produção de Ac anti-HBe. Este teste é quantitativo (SEEGER, 2013).

- **Ac Anti-HBc IgM**

Os Ac anti-HBc do tipo IgM são produzidos pelo sistema imunitário depois da presença, no soro, do Ag HBc. Estes Ac estão presentes na fase aguda e os níveis vão diminuindo lentamente após a resolução, até se tornarem indetectáveis (SEEGER, 2013).

- **Ac Anti-HBc (total)**

Os Ac anti-HBc são dirigidos aos Ag do core e, como são produzidos no início da fase aguda e persistem no soro (os do tipo IgG), não especificam se a infecção é recente ou passada (SEEGER, 2013).

- **Ac Anti-HBe**

Os Ac anti-HBe são detectáveis na fase precoce, após contacto do hospedeiro com os Ag correspondentes, e persistem no soro do indivíduo uma vez infectado (SEEGER, 2013).

- **Ac Anti-HBs**

Os Ac anti-HBs são os últimos a serem produzidos pelo sistema imunitário, sendo que apenas são detectáveis no soro após deixar de haver formação de Ac anti-HBc IgM (estes mantêm níveis detectáveis após o desaparecimento do Ag HBs, que vão diminuindo ao longo do tempo). Este teste é usado, fundamentalmente, para monitorizar o sucesso da vacinação contra a hepatite B.

Resumindo, um indivíduo que já tenha sido infectado pelo HBV pode apresentar só Ac anti-HBc total (ou ainda não ocorreu a produção de Ac anti-HBs (fase aguda) ou a infecção já aconteceu há 10-20 anos), só Ac anti-HBs, ambos (Ac anti-HBc total e anti-HBs) ou nenhuns. Isto verifica-se porque a produção de Ac anti-HBs pode cessar primeiro que a de Ac anti-HBc em certas pessoas; noutras, pode acontecer o contrário (SEEGER, 2013).

c) **HEPATITE C**

O vírus da Hepatite C (HCV) transmite-se por via parenteral, sexual e da mãe para o feto. O período de incubação varia entre 1 a 3 meses e, normalmente, a infecção é assintomática. Menos de 20% dos indivíduos infectados por HCV apresentam icterícia. Após a exposição, 80% dos casos evoluem para hepatite crónica, dos quais 65% mostram progressão da doença (manifestações que podem variar entre alguma lesão hepática, evolução lenta da cirrose, carcinoma hepatocelular e morte).

- **Ac Anti-HCV (total)**

Os Ac anti-HCV do tipo IgM surgem no soro após 2 meses o início da infecção; a produção destes cessa e dá lugar à de Ac anti-HCV do tipo IgG, que persistem durante tempo indeterminado no soro. Quando se verifica a presença destes anticorpos, deve proceder-se (segundo indicação clínica) à pesquisa de RNA viral, para se esclarecer se a infecção é recente ou passada (ou ainda se está activa).

É importante referir que há uma prevalência de cerca de 34% da co-infecção HIV-HCV, sendo a via de transmissão mais importante a percutânea (indivíduos utilizadores de drogas intravenosas). Nestes casos, há uma maior carga viral de HCV no soro, a progressão para doença hepática é mais rápida, há maior risco de cirrose hepática e a taxa de mortalidade é mais elevada (RAY, 2013).

d) HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana)

O HIV pode ser transmitido pelas vias parentérica, sexual, da mãe para o filho (seja durante a gravidez, no parto ou aquando da amamentação). O HIV apenas infecta linfócitos T e macrófagos. É durante a fase aguda da infecção (cerca de 1 ano), que ocorre 1 a 4 semanas após a exposição ao agente viral, que a probabilidade de contágio é maior, devido à elevada carga viral presente no soro do indivíduo. É também nesta fase que se verificam elevados níveis de Ag (especialmente o Ag p24) e início da produção de Ac específicos contra o vírus. A fase assintomática ou de latência clínica tem início quando a carga viral atinge valores muito baixos (devido à resposta imune) e pode durar até 10 anos. Neste período, não há manifestações clínicas inerentes à baixa replicação viral, no entanto, a evolução para o Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) depende da relação entre a carga viral e a diminuição dos linfócitos T CD4. Durante esta última fase da infecção, a qual resulta da perda em número e eficácia dos linfócitos T CD4, o indivíduo pode adquirir infecções oportunistas ou até neoplasias. Clinicamente, o diagnóstico de SIDA é confirmado quando há presença de Ac anti-HIV no soro, juntamente com um dos três seguintes parâmetros: menos de 200 linfócitos T CD4 / mm³ de soro, número de linfócitos T CD4 inferior a 14% do total de linfócitos ou evidência de uma doença associada à SIDA.

- **Ag e Ac Anti-HIV**

Este teste detecta qualitativa e simultaneamente a presença do Ag p24 do HIV (presente na cápsula viral) e de anticorpos anti-HIV-1 e/ou anti-HIV-2. É um teste primário que auxilia no diagnóstico de infecções por HIV-1/HIV-2 (incluindo na fase aguda) (KURITZKES, 2013).

5.9. SEROLOGIA DE INFECÇÕES BACTERIANAS

As bactérias são organismos procariotas, isto é, são unicelulares, não têm núcleo (não possuem membrana nuclear e apresentam no citoplasma uma grande molécula de

DNA) e possuem os organelos dispostos no citoplasma. Estão rodeadas por uma parede celular, que tanto oferece protecção celular como constitui um factor de virulência. As bactérias causam danos no hospedeiro através da produção de toxinas, por invasão tecidual e/ou por indução de uma forte resposta inflamatória (NIZET, 2009).

A) SÍFILIS

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível, cujo agente etiológico é o *Treponema pallidum*. No primeiro estágio da infecção, ocorre multiplicação bacteriana no local de entrada, produzindo úlceras (cancro duro). Esta fase dura entre 4 e 6 semanas e é contagiosa. No segundo estágio, há disseminação bacteriana noutros tecidos, verificando-se manchas em todo o corpo, principalmente nas palmas das mãos e nas plantas dos pés. Este período pode durar até 2 anos e é muito contagioso. O terceiro estágio da doença caracteriza-se pelo agravamento das lesões, consoante os órgãos atingidos durante a disseminação bacteriana. Esta fase pode ocorrer muitos anos após a infecção primária e não é contagiosa.

A pesquisa de Ac anti-*Treponema pallidum* é a técnica mais usada no diagnóstico laboratorial da sífilis. Os Ac produzidos pelo organismo em resposta a esta infecção classificam-se como treponémicos ou específicos e não-treponémicos (SINGH, 1999).

- **SÍFILIS TP**

Este teste é um método treponémico que detecta no soro, qualitativamente, anticorpos anti-*Treponema pallidum*, que, caso existam, se irão ligar às micropartículas revestidas com antígenos recombinantes do *Treponema pallidum* (TpN15, TpN17 e TpN47).

5.10. ALERGIAS

A alergia define-se como uma reacção de hipersensibilidade mediada por mecanismos imunológicos, ou seja, verifica-se o aparecimento de sinais ou sintomas (resposta imune exagerada ou inapropriada) que são desencadeados pela exposição a uma substância antigénica, numa dose tolerada por indivíduos normais. As alergias são reacções frequentes, ocorrendo em cerca de 20% da população, sendo que a maioria dos casos corresponde a alergias respiratórias. A hipersensibilidade do tipo I (imediate) é mediada por Ac IgE e os sintomas mais comuns são a asma, a rinite, o eczema e a conjuntivite. A detecção do Ag

responsável pelos sintomas clínicos é importante para o diagnóstico precoce e consiste na pesquisa de IgE circulantes específicos de alérgenos definidos. Os testes realizados no local do estágio são semi-quantitativos e detectam IgE específicos para o pólen de Parietária, de Panasco e de Rabo de Gato e para os ácaros *Dermatophagoïdes pteronyssinus* e *Dermatophagoïdes farinae*, auxiliando no diagnóstico de alergias respiratórias (ABBAS, 2015).

5.11. TESTES MANUAIS

5.11.1. REACÇÃO DE WAALER-ROSE

A artrite reumatóide, assim como outras doenças reumáticas inflamatórias, está associada à produção de um grupo de imunoglobulinas, designadas por factores reumatóides (FR). Estes auto-Ac são dirigidos contra os determinantes antigénicos das moléculas de IgG. A reacção de Waaler-Rose é uma técnica de hemaglutinação, qualitativa e semi-quantitativa, que permite a detecção do factor reumatóide, através da utilização de eritrócitos sensibilizados e de um anti-soro com IgG, ocorrendo aglutinação na presença de FR. Este teste é importante para o diagnóstico de artrite reumatóide; cerca de 80% destes doentes apresentam positividade para o FR, contudo, a negatividade não exclui este diagnóstico. O FR também pode ser produzido pelo organismo noutras situações, reumáticas ou não (SPIRITUS, 2004).

5.11.2. VDRL E RPR

O VDRL e o RPR são testes não-treponémicos usados no diagnóstico da sífilis, que detectam a presença de Ac no soro, por aglutinação, que reagem com a cardiolíipina e reaginas, respectivamente. São pouco sensíveis, uma vez que só há positividade após a segunda ou terceira semana da infecção (não detectam precocemente a doença), e não são específicos, dado que as reaginas são produzidas quando há destruição celular.

No VDRL o soro tem de ser aquecido num banho de água a 57°C durante 30 minutos, para remoção dos inibidores não específicos (como partículas do complemento). No caso de a amostra conter Ac que reagem com a cardiolíipina, irá verificar-se a presença de floculação no cartão de teste (após a adição deste lípido), que apenas é visível com o auxílio da microscopia (em objectiva de 100X). No RPR, as reaginas presentes no soro (caso a amostra seja proveniente de um paciente infectado por *Treponema pallidum*) irão formar complexos com antigénios (constituídos por partículas de cardiolíipina, lecitina e colesterol) conjugados

com carvão activado, no cartão teste. Neste caso, a aglutinação é visível macroscopicamente. Estes ensaios são qualitativos (quando apenas se pretende observar a presença ou ausência destes Ac) e quantitativos (quando se procede à diluição do soro, anotando-se o título de diluição mais elevado onde ocorreu reactividade). Os ensaios quantitativos são importantes na monitorização da terapêutica. Nos casos positivos, deve sempre ser feita uma confirmação por testes treponémicos (métodos específicos) (NAYAK, 2012).

5.11.3. PESQUISA DE SANGUE OCULTO NAS FEZES

A pesquisa de sangue oculto nas fezes é importante na investigação de doenças gastrointestinais com perda de sangue, principalmente no caso do cancro colo-rectal.

Este teste é um ensaio imunocromatográfico, qualitativo e sensível para a globina não degradada da hemoglobina humana (hHb). Inicialmente, é adicionada uma pequena amostra de fezes a um tubo contendo uma solução tampão; após agitação, são introduzidas algumas gotas da mistura na zona de reacção, na cassette. A globina, caso esteja presente na amostra, irá migrar por capilaridade e formar imunocomplexos com os anticorpos monoclonais anti-hHb conjugados com ouro coloidal, presentes na membrana do teste. Se a concentração de hemoglobina na amostra for superior a 50 ng/mL, na zona de teste irá aparecer uma tira colorida (acastanhada), que representa a ligação dos imunocomplexos aos anticorpos monoclonais anti-hHb fixados. Para controlo do procedimento, deve sempre registar-se uma linha corada na zona de controlo, devendo-se ao facto de os anticorpos monoclonais anti-hHb conjugados se terem ligado a IgG fixadas nessa zona.

Esta reacção apresenta elevada especificidade, é rápida e simples de executar (LIEBERMAN, 2001).

5.11.4. TESTE DE GRAVIDEZ

O teste de gravidez qualitativo também se baseia na imunocromatografia, sendo utilizada uma amostra de urina. Logo após ter ocorrido a fecundação, o embrião inicia a síntese de hCG que, quando atinge concentrações elevadas no sangue materno, é eliminada pelo sistema urinário. Deste modo, este teste ajuda no diagnóstico rápido de uma gravidez. Inicialmente, a amostra é introduzida na área de teste e, por capilaridade, a hCG (caso esteja presente) irá formar imunocomplexos com anticorpos monoclonais anti-hCG conjugados com ouro coloidal presentes na membrana da cassette. Nas amostras positivas aparecerá uma linha rosada na zona teste, que representa a ligação dos imunocomplexos aos

anticorpos monoclonais anti-hCG fixados. Tal como no teste anterior, para controlo do procedimento, deverá aparecer sempre uma linha rosada na zona de controlo, que corresponde à ligação entre os anticorpos monoclonais anti-hCG conjugados e as IgG fixadas nessa região da membrana (CHARD, 1992).

5.12. CASO CLÍNICO III

Uma senhora de 58 anos, diagnosticada há alguns anos com Tiroidite de Hashimoto, apresentava na requisição a determinação dos marcadores da função tiroideia, entre outras análises de rotina. O histórico indicava uma alteração destes parâmetros tiroideus com início em 2011, resultados esses que estão registados na Tabela 6:

Tabela 6: Comparação dos parâmetros tiroideus em várias admissões ao laboratório.

	02/2011	11/2011	12/2015	01/2016	02/2016	03/2016	04/2016	Valores de Referência
Ac Anti-TG	↑243	↑249	↑ 88,75	↑ 73,44	↑ 80,02	↑ 76,16	↑ 51,24	<34 UI/mL
Ac Anti-TPO (microsomais)	↑123	↑ 127,40	↑235,44	↑ 193,05	↑ 154	↑ 139,49	↑ 117,75	<12 UI/mL
TSH	↑ 4,38	↑ 4,88	↓ 0,22	↓ 0,41	↑ 6,75	0,55	↓ 0,27	0,50-4,20 μUI/mL
T3 Livre	----	4,61	----	----	----	----	----	2,2-5,4 pmol/L
T3 Total	1,10	----	1,10	----	----	----	----	0,95-2,50 nmol/L
T4 Livre	----	13,15	----	----	----	----	----	9-24 pmol/L
T4 Total	80	----	140	106	90	↑ 158	146	58-154 nmol/L

Constata-se que, no início das alterações, os níveis de Ac anti-TPO e anti-TG estão muito aumentados, verificando-se também uma ligeira elevação na concentração de TSH. Nesta patologia, um caso de hipotiroidismo primário, os níveis de T3 e T4 não estão diminuídos (como seria de esperar), provavelmente, devido à terapêutica farmacológica a que a utente foi submetida. Nos últimos meses, verifica-se uma diminuição dos níveis de Ac anti-TG (valores próximos dos de referência) e uma elevação constante dos níveis de Ac anti-TPO (a presença destes últimos é mais frequente nesta patologia, como referido anteriormente). A TSH, no mesmo período, apresentou aumentos e diminuições nas concentrações séricas, possivelmente, resultado da terapêutica.

A Tiroidite de Hashimoto é considerada a doença autoimune mais comum e afecta predominantemente mulheres. Esta patologia caracteriza-se pela infiltração de células mononucleares hematopoiéticas, principalmente linfócitos, no interstício entre os folículos tiroideus, resultando na atrofia da glândula da tiróide. A maioria dos casos evolui para hipotiroidismo, cujo diagnóstico clínico se realiza, fundamentalmente, pela presença, em circulação, de anticorpos anti-TG e anti-TPO (dirigidos contra antígenos da tiróide) e pela diminuição da ecogenicidade na ecografia desta glândula. Também se pode recorrer à quantificação, no soro, da TSH e da T4 livre (que deverão apresentar níveis elevados e diminuídos, respectivamente) e à biópsia da tiróide (para o diagnóstico dos casos mais difíceis) (CATUREGLI, 2014).

5.13. CASO CLÍNICO IV

Uma senhora de 69 anos de idade realizou várias análises de rotina, juntamente com marcadores hepáticos (ALT, aspartato-transaminase (AST) e γ -glutamyl-transpeptidase (γ -GT)) e pesquisa de Ac anti-HBc, anti-HBs, anti-HCV, Ag HBs e HCV-RNA viral. A paciente revelou que estas análises específicas se deviam ao facto de ter mudado recentemente de médico de família, o qual queria esclarecer o motivo da alteração dos parâmetros hepáticos há já 1 ano. O histórico desses mesmos resultados está registado na Tabela 7:

Tabela 7: Comparação entre os resultados dos parâmetros hepáticos de várias admissões ao laboratório.

	02/2013	04/2015	07/2015	11/2015	02/2016	Valores de Referência
AST	19	↑ 102	↑ 60	↑ 60	↑ 55	5-34 UI/L
ALT	20	↑ 200	↑ 99	↑ 104	↑ 104	<5 5 UI/L
γ -GT	19	↑ 95	↑ 62	↑ 75	↑ 68	9-36 UI/L
Fosfatase Alcalina	----	58	43	49	57	40-150 UI/L
Bilirrubina Total	0,50	↑ 1,30	0,90	0,70	----	0,20-1,20 mg/dL
Bilirrubina Directa	0,19	↑ 0,61	0,41	0,39	----	<0,5 mg/dL

Da análise dos valores, verificamos que os níveis das transaminases (AST e ALT) e da γ -GT estão elevados, o que indica haver dano hepatocelular. Isto ocorre devido à citólise, que é o mecanismo imunitário responsável pela eliminação do HCV. As concentrações de bilirrubina total e directa, no início das alterações, também se encontravam aumentadas, sinal de que estaria a haver alguma colestase.

A pesquisa de Ac anti-HBc e do Ag HBs revelou não existir reactividade. A quantificação do Ac anti-HBs não acusou a presença deste Ac específico. Relativamente ao Ac anti-HCV, o teste mostrou existir reactividade, e quanto à pesquisa de RNA viral de HCV (por Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)), detectou-se positividade. Conclui-se, portanto, tratar-se de um caso de Hepatite C, sendo que a infecção está activa.

Há uma flutuação dos valores das transaminases e da γ -GT, consistentes com o curso normal da doença. Na Figura 14, pode observar-se o curso serológico das infecções aguda e crónica causadas pelo HCV, assim como a presença dos sintomas e os níveis da ALT.

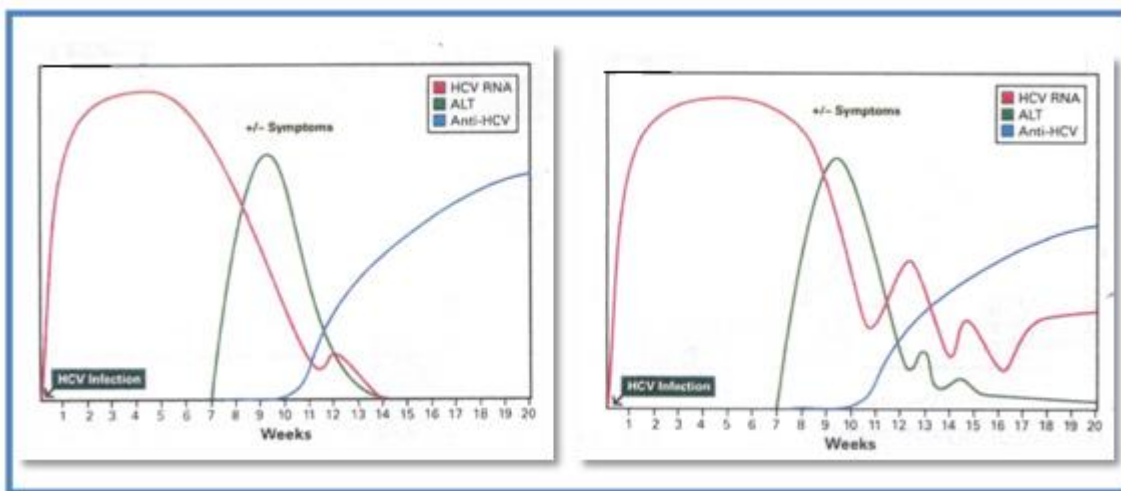


Figura 14: Curso serológico das infecções aguda (à esquerda) e crónica (à direita) causadas pelo HCV (adaptado de RAY, 2013).

Quando não há instituição de terapêutica adequada nos 12 meses que se seguem ao início da infecção, dificilmente os mecanismos de imunidade conseguem extinguir a infecção. Como referido anteriormente, uma grande percentagem dos casos de infecção por HCV evoluem para doença crónica (RAY, 2013).

6. BIOQUÍMICA

A bioquímica é a área da ciência que estuda as vias metabólicas e as alterações a elas associadas, que podem originar patologias. Nesta área também adquire variadas competências técnicas, além de ter consolidado alguns conhecimentos anteriormente obtidos. No LACCSMC, as análises bioquímicas realizam-se recorrendo ao equipamento Architect® ci 8200 Abbott Diagnostics e ao URIT, Uritest-300 (no caso da sumária de urina). As amostras usadas são o soro ou a urina e efectua-se as seguintes determinações:

- **Estudo da função hepática:** bilirrubinas total e directa, transaminases (ALT e AST), γ -GT, Fosfatase Alcalina e Albumina (e Protrombina);
- **Estudo da função renal:** análise sumária de urina (ou urina tipo II), ureia, creatinina, microalbuminúria e ácido úrico;
- **Estudo da função pancreática:** amilase e lipase;
- **Estudo do metabolismo lipídico:** colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (HDL), LDL e triglicéridos;
- **Avaliação dos marcadores de inflamação:** proteína C reactiva;
- **Quantificação da glicémia**
- **Avaliação do equilíbrio hidroelectrolítico:** sódio, potássio e cloreto;
- **Avaliação do metabolismo mineral e ósseo:** cálcio, fosfato, magnésio e ferro;
- **Avaliação muscular:** creatina quinase e Lactato Desidrogenase (LDH);
- **Estudo de doenças infecciosas:** Ac anti-estreptolisina O (ASO);
- **Pesquisa de drogas de abuso:** canabinóides, opiáceos, anfetaminas e cocaína.

É importante referir que também esta área está sob a orientação de pessoal técnico e especializado, sendo todas as análises clínicas validadas pelo Director do Serviço.

7. MICROBIOLOGIA

A microbiologia é a especialidade que diagnostica e estuda as infecções, sejam elas causadas por vírus, bactérias, fungos ou parasitas. Nesta área adquire autonomia na realização de culturas bacteriológicas (nos meios adequados), exames parasitológicos das fezes, identificação bacteriológica e os respectivos antibiogramas.

No local do estágio, os exames mais solicitados são as uroculturas, coproculturas, exame parasitológico de fezes e cultura bacteriana de exsudados nasais. Contudo, embora com menor frequência, também se realizam culturas bacterianas de outros fluidos biológicos (como, por exemplo, de exsudados purulentos e esperma) e pesquisa de fungos em raspados de pele e unhas.

8. CONCLUSÃO

A realização do estágio foi, sem dúvida, a melhor experiência ao longo de todo o mestrado. Tive a oportunidade de aplicar variadíssimos conhecimentos teóricos anteriormente adquiridos à prática clínica e laboratorial, aprendendo novos conceitos, procedimentos, métodos e técnicas, graças ao facto de toda a equipa se mostrar sempre pronta a ajudar e ensinar.

Para que os resultados sejam fidedignos, o laboratório é avaliado segundo programas de controlo de qualidade internos e externos.

É de realçar que, para um correcto e adequado diagnóstico, é importante que, na interpretação dos resultados, sejam tidos em conta valores anteriormente obtidos (histórico do paciente), nas várias análises requisitadas.

Nas análises clínicas é essencial que os conhecimentos sejam renovados ao longo do tempo, adquirindo-se novas aprendizagens, visto ser uma área em constante evolução, na qual vão surgindo técnicas e procedimentos que possibilitam uma melhor resposta na prevenção, diagnóstico e monitorização das patologias.

A título de melhorar a qualidade do serviço prestado e, simultaneamente, de reduzir custos, o laboratório irá, brevemente, implementar novas medidas e procedimentos que visem esse efeito.

9. BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S.; *Cellular and Molecular Immunology*; Elsevier Saunders; Eighth Edition; 2015.

ADAMSON, J. W. et al, *Anamia and Plicythemia*. In LONGO, D. L., *Harrison's Hematology and Oncology*; The McGraw-Hill Companies; 17th Edition; 2010; pp. 10-21.

ADAMSON, J. W., *Iron deficiency*. In LONGO, D. L., *Harrison's Hematology and Oncology*; The McGraw-Hill Companies; 17th Edition; 2010; pp. 70-80.

American Society of Hematology. Disponível em: <http://imagebank.hematology.org/atlas-images/list/#selectedFacetIds=633|642|654|665|666|669|670> (acedido em 6/4/2016).

American Society of Hematology; disponível em: <http://www.hematology.org/Patients/Basics/> (acedido em 6/4/2016).

BACHA, Flávio; *Atlas Citológico de Conclusão do Curso de Citologia Clínica e Laboratorial da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto-sp*; 2012.

BATES, Shannon M.; WEITZ, Jeffrey I.; *Coagulation Assays*; Clinical Update; 2005. Disponível em: <http://circ.ahajournals.org/content/112/4/e53.full> (acedido em 14/5/2016).

BROWN, Barbara A. *Hematology: Principles and Procedures*, Lea & Ferbiger, Malvern, Pennsylvania (1993).

BUNN, H. F. and Aster, J. C.; *Pathophysiology of Blood Disorders*; The McGraw-Hill Companies, 2011; pp. 629-667.

Caderno de Farmácia, disponível em: <http://cadernodefarmacia.blogspot.pt/2013/01/pratica-de-celulas-sanguineas.html> (acedido em 9/4/2016).

CANTOR, A. B.; *Thrombocytopoiesis*. In HOFFMAN, R.; Benz, E. J.; Silberstein, L. E.; Heslop, H.; Weitz, J.; Anastasi, J. (Eds.); *Hematology – Basic Principles and Practice*; Sixth Edition; Elsevier Saunders; 2013; pp. 292-306.

CAQUET, René – *Guia Prático Climepsi de Análises Clínicas*. Lisboa: Climepsi, 2004.

CATUREGLI, P. et al, Hashimoto thyroiditis: Clinical and diagnostic criteria, *Autoimmun Rev* (2014). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.007> (acedido em 21/7/2016).

CELLAVISION. Disponível em: <http://www.cellavision.com/en/cellavision-cellatlas/hematopoiesis-cellatlas>(acedido em 6/4/2016).

CHARD, T.; *Pregnancy tests: a review*; Human Reproduction (Oxford, England); 1992 May;7(5):701-10.

COELHO, T.; Moreira, A.; *Função hemostática e sua avaliação*; 2001; Faculdade de Medicina da Universidade do Porto – Serviço de Fisiologia; 1: 3-12.

COSTA, M. João A., et al; *Avaliação do Cell-Dyn 3500*; Acta Médica Portuguesa, 1996; 9: 309-318.

CRNAEGIE, C.; *Diagnosis of Hypogonadism: Clinical Assessments and Laboratory Tests*; Reviews in Urology; 2004; 6(Suppl 6): S3-S8.

DE SMET, K.; *Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins*; Biotechnol Lett. 2005 Sep;27(18):1337-47.

DEAN, Laura; *Blood Groups and Red Cell Antigens*; Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2263/> (acedido em 25/3/2016).

DEMERS, L. M. et al; *Distúrbios Adrenocorticais*. In BURTIS, C. A. et al; *Tietz-Fundamentos de Química Clínica*, 6ª Edição ; Elsevier Saunders ;2008; p.767-784.

DEMERS, L. M. et al; *Doenças Tireoidianas*. In BURTIS, C. A. et al; *Tietz-Fundamentos de Química Clínica*, 6ª Edição ; Elsevier Saunders ;2008;p.785-798.

EISENHOFER, G. et al; *Catecolaminas e Serotonina*. In BURTIS, C. A. et al; *Tietz-Fundamentos de Química Clínica*, 6ª Edição ; Elsevier Saunders ;2008; p.473-488.

GIARDINA, P. J.; Rivella, S.; *Thalassemia Syndromes*. In HOFFMAN, R.; Benz, E. J.; Silberstein, L. E.; Heslop, H.; Weitz, J.; Anastasi, J. (Eds.); *Hematology – Basic Principles and Practice*; Sixth Edition; Elsevier Saunders; 2013; pp. 505-535.

Gjertson, C. K. et al; *Use and assessment of PSA in prostate cancer*; Med Clin North Am. 2011 Jan;95(1):191-200.

GRAÇA, Roberta Fraga; *Citologia para clínicos: como utilizar esta ferramenta diagnóstica*; Acta Scientiae Veterinariae. 35(Supl 2): s267-s269, 2007.

GRONOWSKI, A. M; *Distúrbios Reprodutivos*. In BURTIS, C. A. et al; *Tietz-Fundamentos de Química Clínica*, 6ª Edição ; Elsevier Saunders ;2008; pp. 800-820.

HENRIQUES, S. et al; *Biomarcadores cardíacos nas síndromes coronárias agudas*; Artigos de Revisão; vol.3, nº21, 2006.

HENRY, John Bernard – *Diagnósticos Clínicos e tratamento por Métodos Laboratoriais*, 19ª edição, Editora Manole, 1999.

HOFFBRAND , A. Victor; Moss, Paul A. H. ; *Hoffbrand's Essential Haematology*; Seventh Edition, Wiley Blackwell, 2016.

HOLLINGER ,F. B. and MARTIN, A.; *Hepatitis A Virus*. In KNIPE, D. M. and HOWLEY, P. M.; *Fields Virology*; 6ª Edição; LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER business; 2013; p. 550-581.

KASPER, D. L., et al; *Harrison's Principles of Internal Medicine*; Nineteenth Edition; The McGraw-Hill Education; 2015.

KHANNA-GUPTA, A.; Berliner, N.; *Granulocytopoiesis and Monocytopoiesis*. In HOFFMAN, R.; Benz, E. J.; Silberstein, L. E.; Heslop, H.; Weitz, J.; Anastasi, J. (Eds.); *Hematology – Basic Principles and Practice*; Sixth Edition; Elsevier Saunders; 2013; pp. 280-291.

KING, Michael W.; *Introduction to blood coagulation*; 2012 (última modificação em 2016). Disponível em: <http://www.themedicalbiochemistrypage.org/blood-coagulation.php> (acedido em 14/5/2016).

KONKLE, B. A.; *Bleeding and Thrombosis*. In LONGO, D. L., *Harrison's Hematology and Oncology*; The McGraw-Hill Companies; 17th Edition; 2010; pp. 22-31.

KUMAR, Vinay, et al; *ROBBINS AND COTRAN PATHOLOGIC BASIS OF DISEASE*; Ninth Edition; Elsevier; 2015.

KURITZKES, D. R. et al; *HIV-1: Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment*. In KNIPE, D. M. and HOWLEY, P. M.; *Fields Virology*; 6ª Edição; LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER business; 2013; p. 1561-1583.

LIEBERMAN, D. A. and WEISS, D. G.; *One-time screening for colorectal cancer with combined fecal occult-blood testing and examination of the distal colon*; The New England Journal of Medicine; 2001 Aug 23;345(8):555-60.

Livro Explicativo do PNAEQ, disponível em:
<http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ApoioTecnico/PNAEQ/Documents/LivroExplicativoPNAEQ2016.pdf> (acedido em 24/6/2016).

MONIZ, C. et al; *Utilidade dos índices de Mentzer, England and Fraser e %GRmicrocíticos / %GRhipocrómicos na avaliação laboratorial das anemias microcíticas*; Acta Farmacêutica Portuguesa 2016, vol. 5, n.1, pp. 68-74.

NAYAK, S. and B.; VDRL Test and its Interpretation; Indian Journal of Dermatology. 2012 Jan-Feb; 57(1): 3-8.

NIZET, V. et al; *Bacterial and Viral Infections*. In VARKI, A. et al; *Essentials of Glycobiology*. 2ª Edição. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

Norma da Direcção Geral de Saúde, disponível em:
<https://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjznrKYpf3NAhVRlxQKHZGiBvcQFggdMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.dgs.pt%2Fdirectrizes-da-dgs%2Fnormas-e-circulares-normativas%2Fnorma-n-0632011-de-30122011-atualizada-a-12092013-png.aspx&usg=AFQjCNGwTuwtJDEBuFZ-NQ2wDT-Dm5tcZO>
(acedido em 9/4/2016).

PAPAYANNOPOULOU, T.; Migliaccio, A. R.; *Biology of Erythropoiesis, Erythroid Differentiation and Maturation*. In HOFFMAN, R.; Benz, E. J.; Silberstein, L. E.; Heslop, H.; Weitz, J.; Anastasi, J. (Eds.); *Hematology – Basic Principles and Practice*; Sixth Edition; Elsevier Saunders; 2013; pp. 258-279.

PIATON, E. et al; *Technical recommendations and best practice guidelines for May-Grünwald-Giemsa staining: literature review and insights from the quality assurance*; Ann Pathol. 2015 Aug;35(4):294-305.

QUINN, Frank A.; *Architect[®] i2000[®] and i2000_{SR}[®]*. In WILD, David; *The immunoassay handbook*, 3rd Edition , Elsevier, 2005.

RAY, S. C. et al; Hepatitis C Virus. In KNIPE, D. M. and HOWLEY, P. M.; *Fields Virology*; 6ª Edição; LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER business; 2013; p. 795-824.

ROITT, I. M.; Delves, P. J.; Martin, S. J.; Burton, D. R.; *Roitt's Essential Immunology*, Wiley-Blackwell, Twelfth Edition; 2011.

ROSEN, M. P. et al; *Female Reproductive Endocrinology & Infertility*. In GARDNER, D. G. et al; *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology*; The McGraw-Hill Companies, 9th Edition; 2011.

SEEGER, C. et al; *HepDNAavirusis*. In KNIPE, D. M. and HOWLEY, P. M.; *Fields Virology*; 6^a Edição; LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER business; 2013; p. 2185-2221.

SHAPIRO, H. M.: *Practical flow cytometry*. New York: Alan R Liss, 1988.

SHAPIRO, Howard M.; *Practical Flow Cytometry*; Fourth Edition; Wiley-Liss; 2003; 1: 1-12.

SHARMA, S.; *Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines*; Indian J Med Paediatr Oncol. 2009 Jan-Mar; 30(1): 1-8.

SINGH, A. E. et al; *Syphilis: Review with Emphasis on Clinical, Epidemiologic, and Some Biologic Features*; Clinical Microbiology Reviews; 1999 Apr; 12(2): 187-209.

SPIRITUS, T. et al; *Diagnostic characteristics of a gelatin based Waaler-Rose assay (Serodia-RA) for the detection of rheumatoid factor*; Ann Rheum Dis 2004;63:1169-1171.

TAYLOR, P. R., et al; *Macrophage receptors and immune recognition*; Annu Rev Immunol. 2005;23:901-44.

University of Minnesota, Hematology[®]. Disponível em: <http://www1.umn.edu/hema/pages/matchart.html> (acedido em 20/3/2016).

VIVES J. and Aguilar J.; *Manual de técnicas de laboratório en hematologia*. 2^a edição. Masson. p.172-181, 274-277.

YAMASHITA, K. et al; *Clinical significance of tumor markers and an emerging perspective on colorectal cancer*; Cancer Sci; 2009 Feb;100(2):195-9.

YOLKEN, Robert H. and STOPA, Peter J.; *Enzyme-linked fluorescence assay: Ultrasensitive solid-phase assay for detection of human rotavirus*; Journal of Clinical Microbiology, 1979, vol.10, n^o3, p. 317-321.

ANEXO I

Quando as análises se realizam em sangue total ou plasma é necessário recorrer a tubos que contenham anticoagulantes, que interrompem a cascata de coagulação. Quando se pretende estudar o soro (análises bioquímicas, imunológicas e serológicas) não. Uma vez que não há um anticoagulante ideal para todos os exames laboratoriais, a escolha do tubo a usar é importante e depende do material biológico a analisar. Na Tabela 8 estão mencionados não só os vários tubos para as colheitas sanguíneas, dependendo da análise, como também os restantes materiais necessários para o transporte das amostras.

Tabela 8: Materiais necessários para o transporte das amostras, dependendo das análises a realizar.

ANÁLISE	MATERIAL	OBSERVAÇÕES
Hemograma, quantificação da hemoglobina glicada e estudo morfológico	Tubo com EDTA	O EDTA impede a agregação plaquetar e preserva a morfologia celular
Estudo da Hemostase	Tubo com citrato de sódio	
VS	Tubo com solução de citrato de sódio	A solução de citrato de sódio aumenta a sensibilidade para detectar processos inflamatórios
Estudos Bioquímicos e Serológicos	Tubo com activador de formação do coágulo e gel de separação	O gel de separação torna o trabalho laboratorial mais eficiente
Urocultura, sumária de urina, expectoração, exsudados, líquidos biológicos e raspados	Frasco esterilizado de 200 mL	
Urina de 24h	Frasco esterilizado de 2000 mL, com ou sem HCl	
Cultura microbiana a partir de zaragatoa	Zaragatoa de algodão	
Cultura microbiana a partir de seringa	Seringa esterilizada	
Coprocultura, exame parasitológico e pesquisa de sangue oculto nas fezes	Frasco esterilizado de 150 mL com espátula	

ANEXO II

Na Tabela 9 estão representados os valores de referência relativos aos parâmetros hematológicos analisados no CELL-DYN® Ruby da Abbott Diagnostics.

Tabela 9: Valores de referência dos parâmetros referentes a um hemograma (adaptado de Norma da Direcção Geral de Saúde).

Valores de Referência dos Parâmetros Eritrocitários	
Glóbulos Vermelhos	♂ 4,5 – 6,5 × 10 ¹² /L ♀ 3,9 – 5,6 × 10 ¹² /L
Hemoglobina	♂ 13,6 – 18,0 g/dL ♀ 11,5 – 16,0 g/dL
Hematócrito	♂ 39,8 – 52,0% ♀ 36,0 – 48,0%
Volume Corpuscular Médio	80 – 97 fL
Hemoglobina Corpuscular Média	26 – 34 pg
Concentração Média da Hemoglobina Corpuscular	32 – 36 g/dL
Reticulócitos	0,5 – 2,5% (25 – 125 × 10 ⁹ /L)
Valores de Referência dos Parâmetros Plaquetares	
Plaquetas	150 – 400 × 10 ⁹ /L
Volume Plaquetar Médio	6,5 – 12,4 fL
Valores de Referência dos Parâmetros Leucocitários	
Glóbulos Brancos	4,0 – 11,0 × 10 ⁹ /L
Neutrófilos	1,8 – 8,0 × 10 ⁹ /L
Linfócitos	0,8 – 4,0 × 10 ⁹ /L
Monócitos	0,2 – 1,2 × 10 ⁹ /L
Eosinófilos	0,04 – 0,3 × 10 ⁹ /L
Basófilos	0,01 – 0,3 × 10 ⁹ /L

ANEXO III

Na Tabela 10 está a interpretação da quantificação da Hb A1c, no diagnóstico e no controlo da patologia de Diabetes.

Tabela 10: Interpretação da quantificação da hemoglobina glicada, no diagnóstico e controlo da diabetes.

Diagnóstico de Diabetes	< 5,7%	Ausência de Diabetes
	5,7 - 6,4%	Pré-diabetes
	≥ 6,5%	Diabetes
Controlo glicémico de pacientes com Diabetes	4 - 6%	Diabetes controlada
	6 - 7%	Diabetes moderadamente controlada
	> 7%	Diabetes não controlada