



Isabel Abrunhosa de Brito Gonçalves Mariz

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Mário João Roque e pelo Professor Doutor José Barata Custódio e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Imagem de capa: https://www.google.pt/search?biw=1280&bih=928&tbm=isch&q=analises+clinicas+sangue&sa=X&ved=0ahUKEwjPypagpqfWAhWFrxoKHVBFD-cQhyYllw#imgrc=wAahwm_6iHWHSM: (acedido a 14 Setembro de 2017)

**Relatório de estágio realizado no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas pela
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**

Centro de Saúde Militar de Coimbra

Laboratório de Análises Clínicas

Sob orientação do Dr. Mário João Roque

Estágio com início a 12 Dezembro 2016 e término a 30 Junho 2017

Áreas de Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível graças à colaboração de várias pessoas, sempre disponíveis neste meu percurso, a saber:

À Professora Doutora Leonor Almeida que sempre me apoiou ao longo do Mestrado de Análises Clínicas, mostrando-se disponível em qualquer ocasião.

Ao Professor Doutor José Custódio que durante todo este ano letivo me acompanhou, estando sempre pronto a ajudar e guiar na elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Mário João Roque, meu orientador no Hospital Militar de Coimbra, pela sabedoria e dedicação que demonstrou ao longo do estágio.

À Marina Murta, Ana Cardoso, Mónica Barbosa, Ana Andrade, Manuel Ferraz e Luísa Roque, por proporcionarem um excelente ambiente de trabalho, por me ajudarem nesta aprendizagem e pela amizade criada ao longo destes meses.

Ao CUMN (Centro Universitário Manuel da Nóbrega), casa que me acolheu desde o primeiro dia e lugar que foi o meu refúgio durante a minha passagem por Coimbra.

A todos os amigos que fiz em Coimbra, apoio incondicional para quem está fora de casa.

Aos amigos do Porto, que mesmo longe continuaram presentes na minha vida.

Aos avós, pela presença ativa na minha vida assim como na vida académica, pelo exemplo de dedicação, preocupação e espírito de família que demonstram todos os dias.

Aos meus pais e irmãos, por serem o meu amparo e por estarem presentes nos momentos cruciais.

A todos os que de uma forma ou de outra tornaram possível este trabalho, deixo o meu sincero agradecimento.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO	2
3 – HEMATOLOGIA	4
3.1 – Hemograma	6
3.1.1 - Analisador automático	7
3.1.2 - Eritrócitos	10
3.1.3 - Células polimorfonucleares e mononucleares	10
3.1.4 - Plaquetas	14
3.1.5 - Reticulócitos	15
3.2 – Morfologia	15
3.2.1 - Critérios para realização de esfregaços	15
3.2.2 - Coloração	17
3.2.3 - Alterações nos Eritrócitos	17
3.3 – Hemoglobina glicada (HbA1c)	22
3.4 – Testes de coagulação	22
3.4.1 - Tempo de protrombina (TP)	24
3.4.2 - Tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA)	25
3.4.3 - Quantificação do fibrinogénio	25
3.5 – Velocidade de sedimentação	26
3.6 – Exemplo de um caso clínico	27
3.7 – Controlo de qualidade interno e externo	28

4 – BIOQUÍMICA	31
4.1 – Analisador de química clínica	31
4.2 – Estudo da função lipídica	32
4.3 – Estudo da função hepática	36
4.4 – Estudo do equilíbrio hidro-eletrolítico	38
4.5 – Estudo da função renal	41
4.6 – Estudo da função pancreática	43
4.7 – Estudo do metabolismo do ferro	44
4.8 – Marcadores de lise muscular e lesão cardíaca	45
4.9 – Glicose e diagnóstico de diabetes	46
5 – CONCLUSÃO	49
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
7 – ANEXOS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema Geral da Hematopoiese. (TURGEON, M. - *Clinical Hematology – Theory and procedures*. Fifth Edition: Wolters Kluwer (2012))

Figura 2 – Cell Dyn Ruby™

Figura 3 – Diferencial Leucocitário

Figura 4 – Neutrófilo. (BAIN, B. *et al.* – *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11ª Ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone (2011))

Figura 5 – Eosinófilo.

[https://www.google.pt/search?q=eosin%C3%B3filos&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiCmNDi9erUAhXJtRQKHW-
YAiAQ_AUIBigB&biw=1366&bih=638#tbn=isch&q=eosin%C3%B3filo&imgrc=3qQeDOyvUJ
19mM:](https://www.google.pt/search?q=eosin%C3%B3filos&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiCmNDi9erUAhXJtRQKHW-
YAiAQ_AUIBigB&biw=1366&bih=638#tbn=isch&q=eosin%C3%B3filo&imgrc=3qQeDOyvUJ
19mM:)

Figura 6 – Basófilo. https://www.google.pt/search?q=eosinofilos+e+basofilos&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjAk6Wp9OrUAhXHXhQKHXRrOAg4Q_AUICigB&biw=1366&bih=638#imgrc=EedHIlvWOxA39M

Figura 7 – Monócito. (BAIN, B. *et al.* – *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11ª Ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone (2011))

Figura 8 – Linfócito. (BAIN, B. *et al.* – *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11ª Ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone (2011))

Figura 9 – Plaquetas. (BAIN, B. *et al.* – *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11ª Ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone (2011))

Figura 10 – Técnica de execução de um esfregaço sanguíneo (TURGEON, M. - *Clinical Hematology – Theory and procedures*. Fifth Edition: Wolters Kluwer (2012))

Figura 11 – Esfregaço sanguíneo ideal (TURGEON, M. - *Clinical Hematology – Theory and procedures*. Fifth Edition: Wolters Kluwer (2012))

Figura 12 – Alterações nos eritrócitos (BAIN, Barbara J. - *A Beginner's Guide to Blood Cells*, Blackwell Publishing, Australia, 2nd Ed. 2004.; BAIN, Barbara J. - *Blood cells, a practical guide*, Blackwell Publishing, Australia, 4th Ed. (2006))

Figura 13 – ADAMS AC-HA8160

Figura 14 – Modelo da coagulação (TURGEON, M. - Clinical Hematology – Theory and procedures. Fifth Edition: Wolters Kluwer (2012))

Figura 15 – Option 4 Plus

Figura 16 – BD Sedi-15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alterações das populações leucocitárias.

Tabela 2 – Critérios para realização dum esfregaço de sangue periférico.

Tabela 3 – Algumas alterações no tamanho, cor e forma dos eritrócitos e respetivas patologias.

Tabela 4 – Hemograma referente a uma mulher de 64 anos.

Tabela 5 – Boletim de análises referente a um homem de 48 anos.

Tabela 6 – Importância clínica: distúrbios no metabolismo dos lípidos.

ABREVIATURAS

ABCA1: *ATP binding cassette subfamily A member 1*

ALP: Fosfatase Alcalina (*alkaline phosphatase*)

ALT: Alanina Transaminase (*alanine transaminase*)

AMY: Amilase (*amylase*)

AST: Aspartato Transaminase (*aspartate aminotransferase*)

ATP: *Adenosine triphosphate*

BAP: *Bone alkaline phosphatase*

CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular média

CK: Creatina Cinase

CK-BB: Creatina Cinase, *brain type*

CK-MB: Creatinina Cinase, *muscle-brain type*

CK-MM: Creatina Cinase, *muscle type*

CREA: Creatinina

CSMC: Centro Saúde Militar de Coimbra

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

GGT: *Gamma-glutamyltransferase*

GLU: Glicose (*glucose*)

Hb: Hemoglobina

HbA1c: Hemoglobina A1 Glicada

HCM: Hemoglobina corpuscular média

HCT: Hematócrito (*hematocrit*)

HDL: Lipoproteína de Alta Densidade (*high-density lipoprotein*)

HLA: Human leukocyte antigen

INR: Índice Internacional normalizado (*International Normalized Ratio*)

ISI: Índice de Sensibilidade Internacional

LDH: Lactato desidrogenase (*lactate dehydrogenase*)

LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade (*low-density lipoprotein*)

LLC: Leucemia Linfocítica Crónica

LPS: Lipase (*human pancreatic lipase*)

MO: Medula Óssea

PLT: Plaquetas (*platelets*)

PNAEQ: Programa Nacional de Avaliação Externa de Qualidade

PT: Tempo de Protrombina (*prothrombin time*)

PTGO: Prova Tolerância Glicose Oral

PTH: Hormona Paratiróide (*parathyroid hormone*)

RBC: Eritrócitos (*Red blood cells*)

RDW: Distribuição de glóbulos vermelhos (*red cell distribution width*)

RET: Reticulócitos

RIQAS: *Randox International Quality Assessment*

SPOT: Albumina de baixa concentração

TG: Triacilgliceróis

TIBC: Capacidade total de ligação do ferro (*total Iron Binding Capacity*)

TP: Proteínas Totais (*total proteins*)

TTPA: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

UA: Ácido Úrico (*uric acid*)

VCM: Volume corpuscular médio

VLDL: Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (*very-low-density lipoprotein*)

VS: Velocidade de sedimentação

WBC: Leucócitos (*white blood cells*)

RESUMO

“A sciencia não é só porque cria riquezas, porque fomenta os progressos materiaes, e porque espalha a flux beneficios na sociedade, como porque é educadora do espirito e do character; como porque é emancipadora de preconceitos e escola do pensamento livre; como porque é conciliadora, tendendo a approximar os homens pelos laços affectivos e de concordia; - a sciencia, digo, é verdadeiramente bemfeitora da humanidade.” (BERTHELOT). Ferreira da Silva in A IMPORTÂNCIA E A DIGNIDADE DA SCIENCIA E AS EXIGENCIAS DA CULTURA SCIENTIFICA (DISCURSO NA SESSÃO DA ABERTURA SOLENE DA UNIVERSIDADE DO PORTO, EM 1 DE NOVEMBRO DE 1911)

Este relatório refere-se ao estágio realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

O seu objetivo era que o aluno contactasse com a realidade laboral a fim de poder aplicar e sedimentar os conhecimentos adquiridos ao longo do ciclo de estudos. Com a oportunidade de passar por todas as valências (Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia) pretendia-se que o aluno tivesse uma aprendizagem integrada.

Como forma de atingir este objetivo, pude estar em contato, não só com um laboratório físico, mas também equipamentos, sempre que possível de vanguarda, o que permite uma maior fiabilidade dos resultados clínicos. Uma grande variedade de fatores confrontam o analista na realização do seu trabalho e, de fato, à parte dos equipamentos que estão em permanente desenvolvimento, o profissional de análises clínicas tem que ter em conta critérios/conhecimentos científicos para uma análise rigorosa no que diz respeito à área de saúde, o que proponho expor.

Este trabalho representa ainda o esforço e trabalho de equipa que se fazem sentir no laboratório já que o seu principal foco são os utentes e, por isso, garantir um bom desempenho para que se possam fazer bons diagnósticos.

Foi pois, apoiado num trabalho de campo, que procurou ser o mais preciso possível. Serão enunciadas técnicas e características de duas áreas, a saber, hematologia e bioquímica.

ABSTRACT

“Science is not only because it creates wealth, because it fosters material progress, and because it spreads the benefits in society, because it is an educator of spirit and character; as because it is an emancipator of prejudice and a school of free thought; as it is conciliatory, tending to bring men closer to each other through affection and concord; - science, I say, is truly the well-being of humanity” (BERTHELOT). Ferreira da Silva in THE IMPORTANCE AND DIGNITY OF SCIENCE AND THE REQUIREMENTS OF SCIENTIFIC CULTURE (SPEECH AT THE SESSION OF THE SOLENE OPENING OF THE UNIVERSITY OF PORTO, ON NOVEMBER 1, 1911)

This report refers to the stage carried out in the Laboratory of Clinical Analysis of the Coimbra Military Health Center within the scope of the Master of Clinical Analysis, by the Faculty of Pharmacy from the University of Coimbra.

The main objective is that the student to contact the work reality in order to be able to experience the knowledge acquired during his / her study cycle. With the opportunity to pass through all the valences (Hematology, Biochemistry, Immunology and Microbiology) it was intended that the student had an integrated learning.

As a way to achieve this purpose, I was able to be in contact, not only with a physical laboratory, but also with equipment, whenever possible leading edge, which allows greater reliability of clinical results. A great variety of factors confront the analyst in the performance of this work. In fact, apart from the equipment that is in constant evolution, the professional of clinical analyses has to take into account criteria and scientific knowledge for a rigorous analysis in the area of health, which I propose to do.

This work also represents the effort and teamwork that are felt in the laboratory since its main focus is the users and, therefore, to guarantee a good performance so that they can make good diagnoses.

It was therefore supported by a field work, which sought to be as precise as possible, that I carry out this work. Techniques and characteristics of two areas, namely hematology and biochemistry, will be enunciated.

I - INTRODUÇÃO

O estágio decorreu no período compreendido entre 12 de dezembro de 2016 e 30 de junho de 2017, no âmbito do Mestrado de Análises Clínicas pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Durante os seis meses, e dada a importância de entender o funcionamento do laboratório como um todo, integrei-me numa equipa de farmacêuticos, técnicos e administrativos a fim de seguir o processo desde a fase pré analítica à pós analítica, e contactar com o mundo laboral aplicando os conhecimentos científicos adquiridos ao longo do mestrado.

A constante comunicação entre todos, a passagem de conhecimento e o espírito de interajuda foram cruciais para a minha aprendizagem assim como para o bom funcionamento do laboratório. É importante que todos os trabalhadores se sintam chamados a servir o laboratório dado ser fundamental manter um compromisso com as satisfações e necessidades dos utentes.

Pude participar ativamente em cada uma das quatro valências, Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia, permanecendo cerca de um mês e meio em cada uma delas. Neste relatório apenas irão ser descritas, com pormenor, as áreas de Hematologia e Bioquímica.

2 - CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

O Laboratório de Análises Clínicas insere-se no Centro de Saúde Militar de Coimbra (CSMC) e está sob orientação do Diretor Técnico Dr. Mário João Roque, Tenente-Coronel, Farmacêutico especialista em Análises Clínicas e Mestre em Saúde Pública.

Constituído por uma zona de receção/sala de espera, uma sala de colheitas, uma secretaria onde são registados todos os processos que entram no laboratório, três gabinetes divididos por valências, o gabinete do diretor técnico, uma zona de lavagem de material e uma zona de arrumos/arquivo.

Todas as amostras são devidamente identificadas por código de barras e garante-se que o transporte e conservação foram adequados. A este laboratório chegam tanto urinas para exame sumário/bacteriológico, determinação de albumina de baixa concentração (urina 24h), pesquisa de drogas de abuso, como fezes, exsudados de feridas, pele e zaragatoas contendo material biológico.

Todas as valências, gabinete técnico e secretaria estão ligadas, em rede, através do programa SISLAB.

Durante os seis meses o fluxo de amostras foi variando devido à rotina e apoios prestados a outras unidades, sendo, contudo, maioritariamente na área de Bioquímica e Hematologia.

Todas as valências estão equipadas com o essencial à rotina do laboratório, sendo que análises mais específicas, e não tanto frequentes, são reencaminhadas para um laboratório externo, com o qual o CSMC estabeleceu um protocolo.

Em Hematologia o produto processado é essencialmente sangue total EDTA, exceto quando se realizam testes de coagulação em que se utiliza plasma citratado. Há cinco aparelhos nesta valência: Cell Dyn Ruby, BD Sedi-15, ADAMS AIC HA8160, Option 4 plus e Pretty Interlab que realizam respetivamente, hemograma, velocidade de sedimentação, hemoglobina glicada A1c, testes de coagulação e electroforese.

Já na Bioquímica e Imunologia o fluido biológico é o soro e há um aparelho comum às duas valências: Arquitech ci8200. Existe também o miniVIDAS, exclusivo para doseamento de hormonas e marcadores tumorais no soro.

São também realizadas análises toxicológicas, pesquisa de drogas de abuso, no âmbito do programa de controlo do alcoolismo e toxicod dependência nas Forças Armadas. As

substâncias doseadas na urina são essencialmente anfetaminas, canabinóides, cocaína e opiáceos. Esta pesquisa apenas é realizada em caso de suspeita ou controlo do uso de drogas de abuso. A colheita é feita sob vigilância e em duplicado. Se positiva, o duplicado da amostra é enviada para o Laboratório de Toxicologia da Direção de Saúde do Exército em Lisboa, para que seja confirmado o resultado.

Na Microbiologia os exames realizados referem-se a estudos microbiológicos, parasitológicos e micológicos, sendo que os produtos mais processados são urina e fezes. Chegam também exsudados, mas com menor frequência. O estudo mais frequente é a análise bioquímica da urina tipo II, que consiste numa observação das características físicas e químicas (URIT, Uritest-300) seguidas de um exame microscópico ao sedimento urinário.

A particularidade deste laboratório prende-se com o fato de estar inserido num Hospital Militar e, por isso, os serviços prestados apoiarem militares, ex-militares, GNR, PSP e seus familiares. Para além da rotina habitual, existem também períodos de aprontamentos e retrações, análises próprias para quem parte ou regressa de missão, no estrangeiro.

3 – HEMATOLOGIA

A hematologia é a área que estuda o sangue e seus constituintes. Inclui o estudo do hemograma (que encaminha para o estudo da morfologia) e da hemostase.¹

A razão pelo qual o diagnóstico quantitativo e qualitativo é baseado nos componentes celulares sanguíneos prende-se com o fato de serem acessíveis e indicarem distúrbios nos órgãos de origem, que dificilmente são acessíveis.²

O sangue contém diferentes tipos de células, cada uma com funções biológicas muito específicas. Os eritrócitos são células anucleadas, bicôncavas e discoides, com hemoglobina, a principal proteína que transporta o oxigênio. Granulócitos e monócitos são células que desempenham papéis na inflamação e fagocitose. Já as plaquetas são fragmentos celulares anucleados e muito pequenos, que contêm moléculas necessárias à hemostase sanguínea. Têm propriedades de adesão e agregação que proporcionam as reações de coagulação. Os linfócitos medeiam a imunidade altamente específica contra microrganismos e outras moléculas estranhas.³

A resposta imunológica depende dos linfócitos B e T e é altamente específica na medida em que necessita da presença de um recetor próprio na superfície dos linfócitos. Há macrófagos especializados que processam antígenos antes de apresentá-los aos linfócitos B e T. Cada linfócito tem um recetor com uma estrutura muito própria e, por isso, cada um deles só se liga a um número restrito de antígenos. No entanto, os linfócitos T não se ligam a antígenos que não lhe sejam apresentados previamente, assim, tem de ser apresentados sob a forma de peptídeos pelas moléculas HLA.

Na medula óssea existem células precursoras de todos os tipos de células sanguíneas, células estaminais multipotentes, capazes de se dividir e originar células-filhas semelhantes às células-mães. As células desenvolvem-se na medula (ou no timo, no caso dos linfócitos T), e, após maturação, passam para a circulação medular; por fim para a circulação periférica. Num indivíduo saudável, apenas as células diferenciadas ou os elementos delas resultantes se encontram em circulação.⁴

Todas as células derivam duma célula comum, consoante influência do local e de fatores humorais, e diferenciam-se em distintas linhagens (Fig. 1).^{1,5}

A hematopoiese engloba cinco linhagens diferenciadas: mielopoiese, monopoiese, megacariopoiese, eritropoiese e linfopoiese, que correspondem, respetivamente, à diferenciação dos mielócitos, ou granulócitos, dos monócitos, das plaquetas, dos eritrócitos e dos linfócitos.^{1,5}

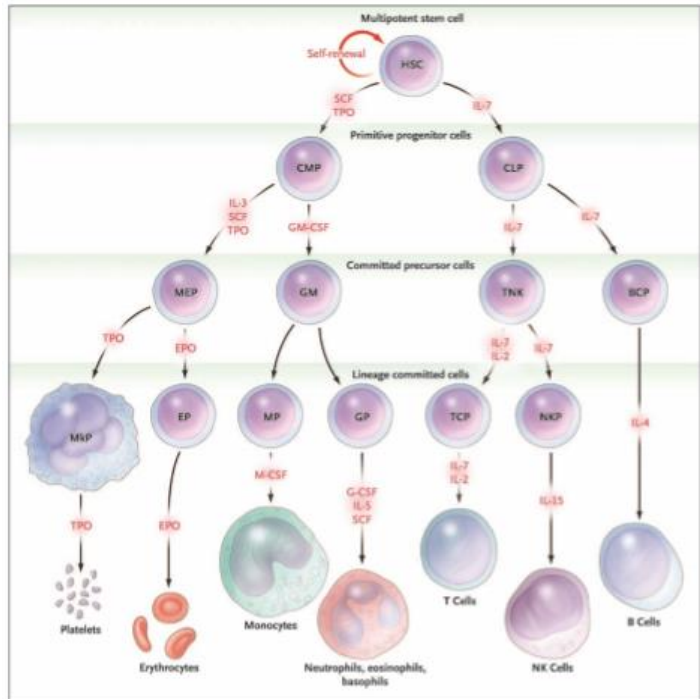


Figura 1 – Esquema Geral da Hematopoiese.

A colheita de sangue é feita por punção venosa – flebotomia, que apesar de ser uma técnica invasiva, continua a ser a mais segura na obtenção de resultados fidedignos, efetuado em sistema fechado, vácuo. Assim, o risco de contaminação é menor e a colheita é mais fácil quando são necessárias múltiplas amostras.

O sangue pode ser colhido em sistema aberto ou fechado, sendo que cada um deles pode usar agulhas e seringas de diferentes calibres consoante o paciente e/ou dificuldade da colheita; a principal diferença é que num sistema fechado, a colheita é feita diretamente para o tubo da amostra.

É importante que na colheita se sigam todos os requisitos estabelecidos, que vão desde a identificação do utente, à desinfeção das mãos do técnico, do local da punção até à qualidade do material utilizado.

Quando são necessárias múltiplas amostras, é importante também certificar a ordem da colheita para evitar a contaminação cruzada, uma vez que, os diferentes tubos contêm composições distintas.⁶ Assim, deve-se colher primeiro o tubo para a coagulação, seguido do de bioquímica, hemograma e velocidade de sedimentação.






Para o hemograma, a colheita é então feita sob vácuo, num tubo com EDTA K3. Cada tubo está marcado com um limite máximo até onde se pode colher para que se possa ter a certeza de que a amostra é colhida da forma correta e na quantidade necessária. O EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético, é um anticoagulante que remove o cálcio, o que impossibilita o normal funcionamento da cascata da coagulação. É considerado o

anticoagulante de eleição para realização do hemograma.⁷ Após a colheita, deve-se homogeneizar bem a amostra.⁶

Para o estudo da coagulação, e para impedir que esta aconteça após a colheita, o sangue é diretamente colhido num tubo com citrato de sódio como anticoagulante. É necessário proceder à centrifugação antes de processar a amostra para assim se promover a separação do sangue e utilizar apenas o plasma.⁷ Após centrifugação, o sangue ficará dividido em três fases: uma primeira de eritrócitos; uma segunda de leucócitos e plaquetas e uma terceira de plasma.

Importa referir que a quantidade de EDTA utilizada nos tubos é de extrema importância. O seu excesso (2 mg/mL) provoca falsos resultados na série vermelha, branca e plaquetas; ao diluir a amostra de sangue os parâmetros são afetados. O resultado é a desintegração das células, o que causa um falso aumento nas contagens. Por outro lado, o EDTA provoca, por exemplo, uma alteração na conformação de GPIIb/IIIa, que ao expor os epítomos das plaquetas resulta na aglutinação das mesmas.⁷

Assim, existem diferentes tubos para colheita da amostra consoante as determinações a realizar:

-  Sem anticoagulante e com gel ativador de coágulos - Bioquímica
-  Citrato de sódio - Coagulação
-  EDTA K3 - Hemograma
-  Heparina Lítio - Hemograma ou Bioquímica
-  Citrato de sódio - Velocidade de Sedimentação

3.1 – HEMOGRAMA

O hemograma consiste numa análise detalhada ao sangue, em que o resultado quantitativo/qualitativo se baseia na avaliação dos componentes celulares sanguíneos, série vermelha, série branca e plaquetas.²

Existem tanto técnicas manuais como automáticas para a realização do mesmo. Hoje em dia recorre-se sobretudo a métodos automáticos, sendo que no caso deste laboratório utiliza-se o equipamento Cell Dyn Ruby da Abbott Diagnostics (Fig. 2).

Como já foi referido, a amostra tem de ser colhida em tubo com EDTA. Deverá ser processada até 6h após a colheita e até 24h, se armazenada a 4°C.⁷



Figura 2 – CELL-DYN Ruby™

3.1.1 Analisador hematológico automático

A impedância elétrica é o método de referência apoiada na contagem das suas células, pelo Princípio de Coulter.

Os eritrócitos são maus condutores de eletricidade, ao contrário de certos diluentes, por isso, faz-se passar um volume conhecido de sangue diluído numa solução de eletrólitos por um orifício situado entre dois elétrodos. Consequentemente, ao passarem no orifício geram uma alteração no potencial mantido entre os dois elétrodos, que corresponde ao tempo que a célula demora a passar no orifício. Os impulsos produzidos correspondem à contagem das células e a altura do impulso indica o volume da célula que passou. Com isto, consegue-se determinar número de Eritrócitos, Hematócrito e Volume Corpuscular Médio.

A determinação da concentração de hemoglobina é feita por espectrofotometria, a 540 nm.

Para a contagem dos glóbulos brancos o aparelho utiliza a técnica de citometria de fluxo. Há um fluxo contínuo de amostra de sangue onde os eritrócitos são lisados e os leucócitos fixados. As células ficam assim numa suspensão com diluente e passam num fluxo ótico com corrente contínua. Permite-se assim que as células sejam analisadas individualmente consoante tamanho e complexidade.

A contagem de reticulócitos é feita através de fluorescência. Há um fluoróforo que se liga ao RNA permitindo assim contabilizar a quantidade de reticulócitos presentes na amostra.⁷

Os parâmetros avaliados podem, então, dividir-se em três grandes grupos: eritograma, leucograma e plaquetograma. Os seus valores de referência encontram-se em Anexo.

Eritograma:

- ✓ Contagem de eritrócitos (RBC) – mede o número de eritrócitos por mL de sangue, através da impedância ou dispersão da luz que atravessa o tubo de sangue EDTA. Quando se verifica um aumento destas células diz-se que há eritrocitose e a sua diminuição designa-se por eritrocitopenia.² O aumento ou diminuição estão relacionados com o maior ou menor nível de produção/destruição (hemólise).
- ✓ Hematócrito (Hct) – volume total de eritrócitos em relação ao volume total da sangue.²
- ✓ Hemoglobina (Hb) – principal constituinte dos eritrócitos que confere tom avermelhado aos mesmos. Este parâmetro indica se há ou não anemia e é medido através de espectrofotometria. Na realidade o que é medido é a quantidade de cianometahemoglobina.²
- ✓ Volume Corpuscular Médio (VCM) – calculado através da relação do hematócrito sobre o número de eritrócitos.²
- ✓ Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) – quantidade média de hemoglobina por eritrócito. Obtém-se o valor através da divisão entre a concentração de hemoglobina e o número de eritrócitos.²
- ✓ Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) – expressa a concentração média de hemoglobina por unidade de volume de eritrócito. Mais um parâmetro calculado, desta vez a partir da concentração de hemoglobina sobre o hematócrito.²

- ✓ Coeficiente de variação (RDW) – distribuição dos volumes de eritrócitos (diâmetro celular).²
- ✓ Reticulócitos (RET) – contagem de eritrócitos imaturos, o que permite tirar ilações sobre o estado da atividade eritropoiética.²

Leucograma

- ✓ Contagem de leucócitos

O leucograma tem como objetivo a quantificação de glóbulos brancos no volume total da amostra. Assim, podemos inferir sobre diferentes alterações, consoante haja aumento (leucocitose) ou diminuição (leucopenia) dos mesmos. Alterações estas que se devem a uma, ou várias, populações de leucócitos.

- ✓ Contagem de leucócitos diferencial

Baseado em caraterísticas físicas, apresenta a distribuição de leucócitos na amostra (Fig. 3).

Quantifica a população de leucócitos e disponibiliza um gráfico consoante o seu predomínio, isto é, primeiro neutrófilos, seguindo-se linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Em caso de anormalidade o aparelho reflete um sinal (asterisco), ao qual habitualmente se chama *flag*.⁷

As *flag* existem para alertar que uma variável saiu fora do desvio padrão aceitável.

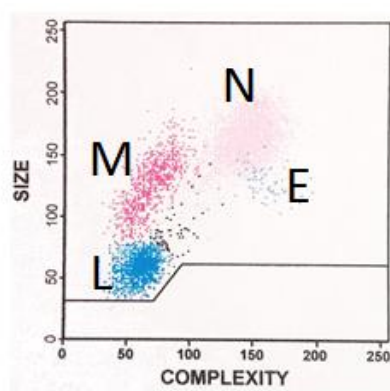


Figura 3 – Diferencial Leucocitário/Histograma

L: Linfócitos; M: Monócitos; N: Neutrófilos; E: Eosinófilos

Trombocitograma:

A contagem de plaquetas (PLT) é feita por impedância no mesmo local da contagem dos eritrócitos, sendo estas diferenciadas pelo volume. Os valores variam ao longo do dia; de dia para dia, assim como consoante a raça. Também se confirma a diferença entre sexos, sendo que no sexo feminino os valores são 20% mais elevados.

As plaquetas estão comumente aumentadas – trombocitose. Este aumento pode ser classificado em três grandes grupos: hereditário, associada a neoplasias mieloproliferativas e secundário/reactivo. Esta última é a mais frequente podendo ser provada por perda crónica de sangue, doenças inflamatórias, infeções crónicas, toma de fármacos. Sempre que a medula óssea (MO) se ajusta aos novos requisitos impostos pelo funcionamento do corpo, o número de plaquetas retoma, progressivamente, ao normal. A diminuição das plaquetas designa-se por trombocitopenia que desencadeia diversos distúrbios, nomeadamente, coagulação intravascular profunda, embolia pulmonar, trombose cerebral, enfarte e lesão isquémica, que causam grande mortalidade.⁸

A falsa contagem de plaquetas pode também resultar da contagem de eritrócitos como plaquetas gigantes ou ainda satelitismo, episódios induzidos pelo EDTA.⁷

3.1.2 Eritrócitos

Todos os dias são produzidos cerca de 10^{12} novos eritrócitos por meio dum processo designado por eritropoiese. A eritropoiese passa pelas células progenitoras até ao primeiro precursor eritroide identificável na medula óssea (MO), o proeritoblasto (Fig. 1). É uma célula grande, com núcleo central, nucléolo e cromatina levemente concentrada. O proeritoblasto por várias divisões vai originando eritroblastos, progressivamente menores, mas com um conteúdo em hemoglobina maior. O citoplasma vai perdendo a sua tonalidade basófila à medida que perde o seu RNA. A cromatina nuclear, ao contrário, torna-se cada vez mais condensada. O núcleo acaba por ser expulso do eritroblasto maduro na MO, resultado assim um estado de reticulócitos. Estes ficam a amadurecer no baço e só depois surgem os eritrócitos maduros (Fig. 1). Células bicôncavas e sem núcleo. Para este processo é essencial a regulação por parte da eritropoietina.

Os eritrócitos têm como função principal o transporte de oxigénio para os tecidos. Por outro lado retiram o dióxido de carbono dos tecidos e devolvem aos pulmões. Para que

estas trocas ocorram é necessário que exista uma proteína, a hemoglobina. A hemoglobina consiste em quatro cadeias polipeptídicas, cada uma com o seu grupo heme.⁹

3.1.3 Células polimorfonucleares e mononucleares

Os leucócitos podem ser divididos em granulócitos (polimorfonucleares: neutrófilos, eosinófilos e basófilos), em linfócitos e em monócitos (mononucleares).¹⁰

A sua função é proteger o organismo contra infeções e está relacionada com sistemas de proteínas: imunoglobulinas e do complemento.¹¹

Neutrófilos: Envolvidos na resposta inflamatória, representam mais de metade dos leucócitos em circulação. São a principal defesa do corpo contra infeções bacterianas e geralmente têm um tamanho uniforme com núcleo segmentado. Podem ter de 3 a 5 lóbulos ligados entre si por uma banda de cromatina condensada. Na coloração MayGrunwald Giemsa mostram uma tonalidade rosa no citoplasma e uma granulação fina (Fig. 4).¹²

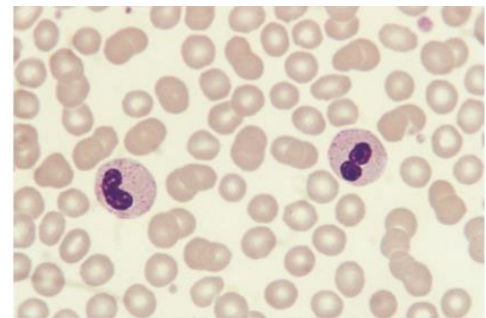


Figura 4 – Neutrófilo

Eosinófilos: ligeiramente maiores que os neutrófilos no que diz respeito ao diâmetro, com 2 lóbulos e citoplasma com grânulos tipicamente alaranjados (Fig. 5). O restante citoplasma cora de azul pálido com a coloração May-Grunwald Giemsa. São fagócitos e modulam a resposta inflamatória. O aumento do número de eosinófilos (eosinofilia) pode estar associado a alergias e a infeções com parasitas. A sua diminuição (eosinopenia) pode dever-se à administração prolongada de esteróides.¹²

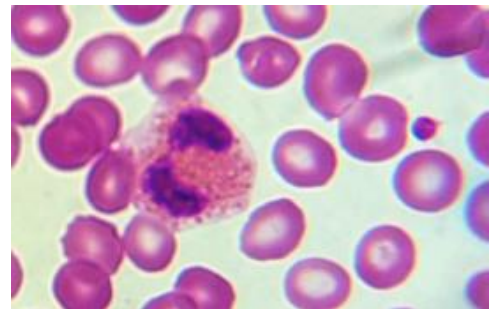


Figura 5 – Eosinófilo

Basófilos: são as células em menor quantidade a circular na corrente sanguínea. Os segmentos nucleares tendem a agregar-se resultando num núcleo denso e irregular. O citoplasma apresenta grânulos púrpura ou azuis-escuros que vão escurecer, ou mesmo podendo, inclusive, estarem sobrepostos ao núcleo (Fig. 6). Grânulos ricos em histamina, serotonina e

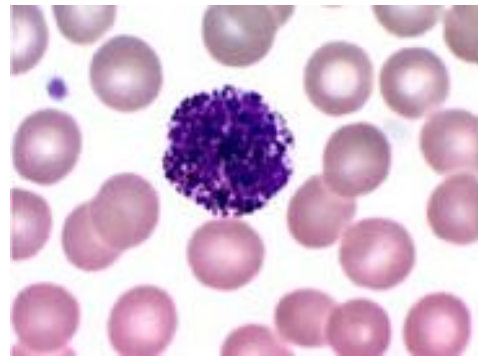


Figura 6 – Basófilo

heparina, que expressam a grande afinidade aos recetores de IgE. Estas substâncias levam a um aumento da permeabilidade vascular no local de atividade de agentes patogénicos levando a um recrutamento de células inflamatórias. Os basófilos podem desintegrar-se deixando vacúolos citoplasmáticos.^{10,12}

Monócitos: Leucócitos circulantes de maior tamanho na corrente sanguínea, com citoplasma azulado com número variável de grânulos avermelhados. Núcleo largo e curvo que não sofre segmentação. A cromatina é fina e distribuída uniformemente (Fig. 7).¹²

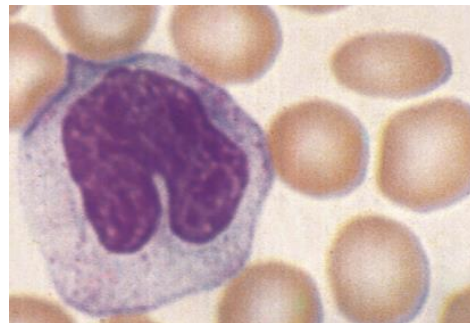


Figura 7 – Monócito

Os monócitos são fagócitos que removem antígenos específicos, apresentando-os aos linfócitos para que sejam eliminados. Atuam na defesa contra bactérias, fungos, vírus e corpos estranhos através de hidrolases e peroxidases que possuem nos seus lisossomas. São também células importantes na defesa uma vez que libertam mediadores/fatores que ajudam a propagar a resposta inflamatória.¹³

Linfócitos: Células mononucleares com grânulos citoplasmáticos evidentes e azurófilos (Fig. 8). A maioria dos linfócitos circulantes são pequenos, com um núcleo uniforme e cromatina homogénea. Estas células são classificadas de acordo com a sua função em linfócitos T, linfócitos B e NK, sendo que 85% são T ou NK.¹²

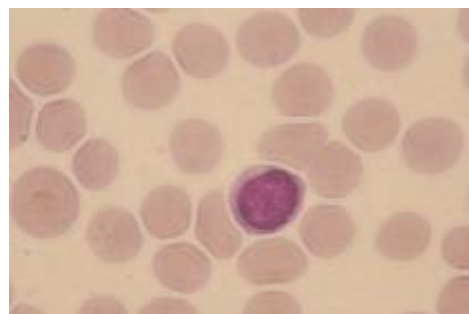


Figura 8 – Linfócito

Os linfócitos T desenvolvem-se a partir de células migradas para o timo, no qual se diferenciam em linfócitos T maduros durante a passagem do córtex para a medula. Durante este processo, só células T com alguma especificidade para moléculas de antígenos humanos

(HLA) são selecionados. Os linfócitos citotóxicos (NK) não têm recetores de células T e, por isso, são orientados para matar células-alvo que tenham baixo nível de expressão de moléculas HLA classe I, que pode ocorrer durante infeções virais ou aparecimento de células malignas.¹⁴

Algumas alterações que cada tipo de leucócito pode apresentar encontram-se descritas na tabela (Tabela 1).

Tabela 1 – Alterações das populações leucocitárias

		Possíveis causas
<i>Neutrófilos</i>	Neutrofilia	Condições inflamatórias; Estímulos físicos como calor ou frio; cirurgias, stress, queimaduras; consumo de algumas drogas ou hormonas; alguns tipos de leucemias.
	Neutropenia	Dano na medula óssea; anorexia nervosa.
<i>Linfócitos</i>	Linfocitose	Infeções agudas (hepatite infecciosa, mononucleose infecciosa) ou crónicas (tuberculose, sífilis, etc...); leucemias linfoblásticas agudas; alguns linfomas
	Linfopenia	Insuficiência grave da medula óssea, com tratamento com corticoesteroides ou linfoma de Hodgkin se imunodeprimidos.
<i>Monócitos</i>	Monocitose	Infeções como tuberculose e endocardite bacteriana; doença intestinal de origem inflamatória; artrite reumatoide; doenças hematológicas
<i>Eosinófilos</i>	Eosinofilia	Doenças alérgicas; algumas leucemias e algumas infeções parasitárias (não protozoários) Helmintas por exemplo.
<i>Basófilos</i>	Basofilia	Colite ulcerosa; Hormonas (progesterona); Hiperlipidémia; Policitemia vera; alguns tipos de leucemias.

3.1.4 Plaquetas

As plaquetas (Fig. 9) são produzidas na medula óssea por fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, uma das maiores células existentes no corpo humano. O precursor dos megacariócitos surge através dum processo de diferenciação a partir das células estaminais hematopoiéticas. Os megacariócitos tornam-se maduros por processos mitóticos e aumentam o volume citoplasmático à medida que os lóbulos aumentam em múltiplos de dois. A certa altura do desenvolvimento, o citoplasma torna-se granular. Os megacariócitos maduros são então largos, com um núcleo isolado lobulado excêntrico e com uma baixa razão citoplasma/núcleo.

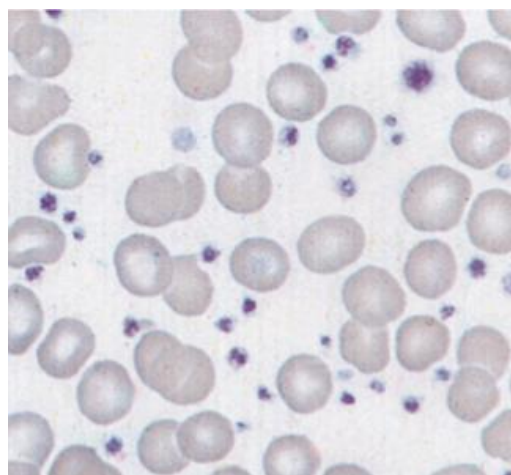


Figura 9 - Plaquetas

Da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos resultam sensivelmente 1000-5000 plaquetas. Estas são libertadas dos nichos vasculares da medula através do endotélio. O tempo que medeia a diferenciação e a produção é cerca de 10 dias.

No que diz respeito à estrutura das plaquetas estas são extremamente pequenas e discóides. Possuem glicoproteínas na sua superfície, fator importante para reações de adesão e agregação. As plaquetas ao aderirem ao local da lesão expressam recetores funcionais, glicoproteínas IIb/IIIa (integrina). É esta glicoproteína, que é específica das plaquetas, que medeia o recrutamento de plaquetas locais formando pontes de fibrinogénio entre elas.

O processo de agregação plaquetária é bastante complexo e representa múltiplos passos com distintos recetores e ligandos. No fim, o objetivo é sempre a formação dum trombo, que não é mais do que o agregado plaquetário reforçado com fibrina.

A sua função passa, assim, pela formação de mecanismos que funcionem como tampão a danos vasculares, ou seja, uma resposta mecânica. Sem plaquetas, ou com um número reduzido delas, pode haver o risco de perda de sangue através de derrames de pequenos vasos.¹⁵

Por vezes verifica-se pseudotrombocitopenia quando a amostra é colhida em tudo com EDTA, isto é, uma falsa diminuição no número de plaquetas. Pode dever-se a aglutinação de plaquetas, clump plaquetário, provocada por anticorpos IgM e IgG que reagem

contra epítomos das glicoproteínas presentes na superfície das plaquetas. O uso de outro anticoagulante como, por exemplo, o citrato de sódio reduz este efeito.

3.1.5 Reticulócitos

O sangue normalmente contém menos de 1% de reticulócitos e um aumento no seu número (reticulocitose) indica uma saída aumentada de eritrócitos jovens da medula óssea. Isto pode acontecer por correção de um estado anémico ou por uma atividade medular aumentada. É especialmente notável em anemias hemolíticas, onde há uma grande atividade eritopoiética que tenta compensar a diminuição da vida média dos eritrócitos periféricos. Geralmente têm um diâmetro maior que os eritrócitos.

A diminuição dos reticulócitos, designada por reticulocitopenia, reflete essencialmente uma falha na resposta da atividade da MO, podendo acontecer principalmente em anemias aplásticas.^{7,16}

3.2 – MORFOLOGIA

3.2.1 Critérios para realização de esfregaços

Algumas amostras sujeitas à realização de hemograma são suscetíveis à concretização de esfregaços sanguíneos para estudo da sua morfologia. Existem critérios, definidos pelo laboratório, que devem ser tidos em conta. Assim, as normas internas para execução de um esfregaço de sangue periférico são:

Tabela 2 – Critérios para a realização dum esfregaço de sangue periférico

Basófilos $\geq 3\%$
Hb >15 ou <11 se individuo sexo feminino; Hb >17 ou <12 se individuo sexo masculino
Qualquer inversão de fórmula com WBC $> 8 \times 10^9/L$
Inversão de fórmula [neutrófilos-linfócitos] $\geq 10\%$
Leucócitos $> 12000 \times 10^9/L$
Monócitos $\geq 15\%$
Plaquetas $< 150 \times 10^9$ ou diferente do histórico
RDW $\geq 15\%$ (ou entre 14-15% se anemia)

O esfregaço faz-se a partir duma gota de sangue recorrendo-se ao esgotamento da mesma. Assim, deve-se homogeneizar a amostra e colocar uma gota de sangue numa lâmina. Com uma 2ª lâmina, ou lamela, deixar que esta deslize até encontrar a gota de sangue

mantendo sempre um ângulo de aproximadamente 35°- 45°. Por capilaridade o sangue irá espalhar-se ao longo da linha definida pelo ângulo das duas lâminas (Fig. 10). Num movimento firme e rápido, estender a gota de sangue. Esta técnica designa-se por distensão sanguínea. Por fim deixar secar ao ar para depois proceder à sua coloração.

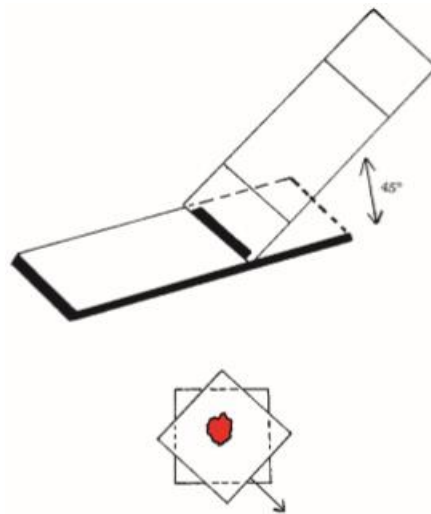


Figura 10- Modo de realizar um esfregaço de sangue periférico

O esfregaço deve ser progressivamente mais fino à medida que se avança do ponto de aplicação até a cauda. O local preferencial para a observação do esfregaço de sangue periférico é o assinalado com o número dois (Fig. 11). As margens laterais do esfregaço não devem tocar nas bordas da lâmina.

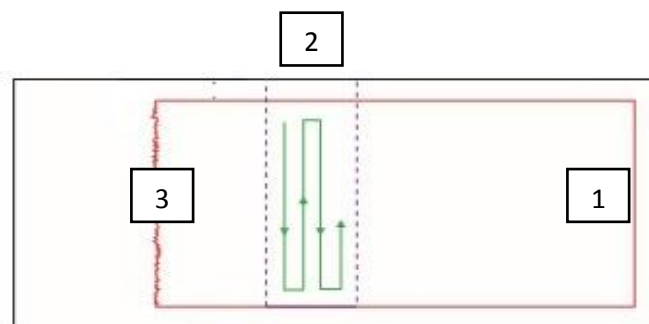


Figura 11 - Esfregaço sanguíneo ideal

1 - Ponto de aplicação; 2 - Área de observação; 3 - Cauda

3.2.2 Coloração

O método de coloração utilizado no Laboratório para corar o esfregaço sanguíneo é a de May-Grünwald-Giemsa.

Técnica manual:

Primeiro utiliza-se metanol para fixar o material biológico, deixando atuar durante 3 minutos. De seguida, o corante por 2 minutos. Serão corados os componentes nucleares e citoplasmáticos das células. O corante é composto por 1 parte de Giemsa + 2 de MayGrünwald + o volume total, 3 partes, de água destilada ou tampão fosfato. Para terminar é necessário lavar a lâmina com água destilada.

Os corantes Giemsa e MayGrünwald são também eles preparados no laboratório, sendo que correspondem a 1 parte de Giemsa + 9 de tampão Sörensen e 1 parte de MayGrünwald + 1 de tampão Sörensen, respetivamente.

Consoante as células a coloração será diferente. Assim, eritrócitos ficarão com uma coloração rósea enquanto as plaquetas ficam azuladas. Os neutrófilos ficam com o núcleo azul e o citoplasma corado de rosa pálido e com granulações que podem variar do rosa ao azul claro. Os linfócitos apresentarão núcleo azul violeta e citoplasma azul; já os basófilos apresentam um núcleo púrpura/azul-escuro e citoplasma com granulações azul-escuro. Os monócitos coram o núcleo de azul violeta e o citoplasma de azul claro que contrapõe com os eosinófilos que apresentam o núcleo e citoplasma rosa pálido com grânulos volumosos que variam entre vermelho e laranja.¹⁷

3.2.3 Alterações nos eritrócitos

Os estudos morfológicos permitem evidenciar alterações que advêm tanto do aumento da eritopoiese, em que o resultado é o aparecimento de células imaturas no sangue periférico, como da produção inadequada de hemoglobina, eritropoiese anormal ou dano direto no eritrócito.¹²

No que diz respeito aos eritrócitos, há diversas alterações que podem ocorrer, nomeadamente a nível de tamanho, cor, forma e existência de inclusões, como descrito na tabela 3.

Tabela 3 – Algumas alterações no tamanho, cor e forma dos eritrócitos e respectivas patologias

	Alteração	Casos em que se verifica
TAMANHO Anisocitose	Macrocitose (↑)	Anemias megaloblásticas, Anemias macrocíticas (perniciosa e deficiência de ácido fólico)
	Microcitose (↓)	Anemia por deficiência de ferro, Hemoglobinopatias.
COR Anisocromia	Hipocromia (-)	Anemia por deficiência de ferro. Condições de microcitose.
	Hipercromia (+)	Condições de formas anormais como macrocitose.
FORMA Poiquilocitose	Acantócitos	Abetalipoproteinémia, Cirrose associada a anemia hemolítica, Após administração de heparina, Hepatite neonatal.
	Equinócitos	Diferentes anemias, Úlceras gástricas e péptidas, Insuficiência renal, Deficiência na piruvase cinase, Urémia, Desequilíbrios osmóticos.
	Eliptócitos	Anemias hemolíticas (eventualmente eliptocitose hereditária).
	Esquizócitos	Anemias hemolíticas relacionadas com queimaduras ou implantes (próteses), Rejeição de transplante renal.
	Leptócitos	Distúrbios hepáticos, Anemia por deficiência de ferro, Talassémias.
	Drepanócitos	Anemia falciforme.
	Esferócitos	Doenças hemolíticas do RN, Anemias hemolíticas adquiridas, Transfusões sanguíneas, Congénito.
	Estomatócitos	Alcoolismo agudo, Cirrose alcoólica, Hereditário, Mononucleose, Intoxicação/Envenenamento por chumbo, Talassemia minor, Hemoglobinopatias,

	Anemia hemolítica, Doença hepática com ou sem icterícia.
Células em alvo	Doenças hepáticas crônicas, Hipobetalipoproteinemia hereditária, Anemia por deficiência de ferro, Talassemias, Anemia falciforme.
Dacriócitos	Beta talassémia homozigótica, Anemia perniciosa, Anemia severa.
Corpúsculos de Howell-Jolly	Esplenectomia, Anemia perniciosa, Doença celíaca, Situações que envolvem atrofia esplênica.
Rouleaux	Mieloma múltiplo, Estados de inflamação.

Os **acantócitos**, **equinócitos** ou **esquizócitos** inserem-se num grupo de células designadas por células espiculadas. Os acantócitos apresentam com 2-20 espículas de distribuição irregulares enquanto os equinócitos têm 10-30 espículas regulares. Os esquizócitos são fragmentos eritrocitários, muitos deles espiculados.

Células em alvo: estas ocorrem quando há distribuição anormal de hemoglobina resultando numa mancha central de hemoglobina rodeada por uma zona mais pálida. Formadas devido a excesso de membrana em relação ao volume de citoplasma ou por excesso de lípidos na membrana como na icterícia obstrutiva e nas hepatopatias graves. Verificam-se ainda quando existe uma redução do conteúdo citoplasmático sem redução da membrana como nas talassemias, deficiência de ferro e algumas hemoglobinopatias.¹⁹

Corpúsculos de Howell-Jolly e Rouleaux: fragmentos nucleares, pequenas inclusões citoplasmáticas geralmente presentes em casos de atrofia esplênica. Podem ainda ser vistos, embora que em pequena percentagem, em casos de anemia perniciosa. Já os rouleaux são RBC unidos que simulam aglutinação – pseudoaglutinação. Há duas formas de se distinguir as duas situações:

- Primeira, reparar se os RBC estão dispostos lado a lado (tipicamente rouleaux);

- Segunda, adicionar NaCl:

- Em caso de pseudoaglutinação/rouleaux os RBC irão dispersar-se.

- Em caso de verdadeira aglutinação os RBC continuam agregados.¹²

Dacriócitos: eritrócitos em forma de lágrima que aparecem quando há fibrose da MO o diseritopose grave. Aparecem também em anemias hemolíticas e anemias megaloblásticas.

Drepanócitos: ou eritrócitos falciformes, em que a membrana adquire a forma de foice ou crescente. Características das doenças falciformes como talassémias e outras combinações de hemoglobinas anormais com a hemoglobina S.

Eliptócitos: eritrócitos cujo eixo maior é pelo menos duas vezes o menor. Quando muito numerosos suspeita-se de eliptocitose hereditária, doença causada por uma alteração hereditária da membrana do eritrócito.

Esferócitos: eritrócitos que adquirem a forma esférica por perderem porções da membrana. Perdem ainda a característica palidez central e, por isso, ficam intensamente corados e diminuem o seu diâmetro. Encontram-se na esferocitose hereditária, onde existe um defeito no citoesqueleto da membrana eritrocitária. Observam-se em condições de anemias imuno-hemolíticas, em que porções de membrana com anticorpos são removidas por macrófagos, podendo aparecer microesferócitos, que não só têm uma redução de diâmetro como também de volume eritrocitário. Outro possível caso é na transfusão de sangue armazenada, em que os eritrócitos podem estar crenados, designando-se por esferoequinócitos.

Estomatócitos: eritrócitos que apresentam uma fenda na região central. Podem ocorrer de forma esporádica ou em numerosas situações clínicas, geralmente criadas por abuso de álcool. Estão também presentes em doenças hereditárias, estomatocitose hereditária, resultado de distúrbios de regulação de volume (alteração da permeabilidade) podendo ser de dois tipos – hiperhidratada ou desidratada.¹⁹

Leptócitos: eritrócitos que se assemelham a células em alvo exceto que a zona central não está tão afastada ou marcada da zona periférica. Clinicamente associa-se a distúrbios hepáticos, anemia por deficiência de ferro e talassémias.²⁰

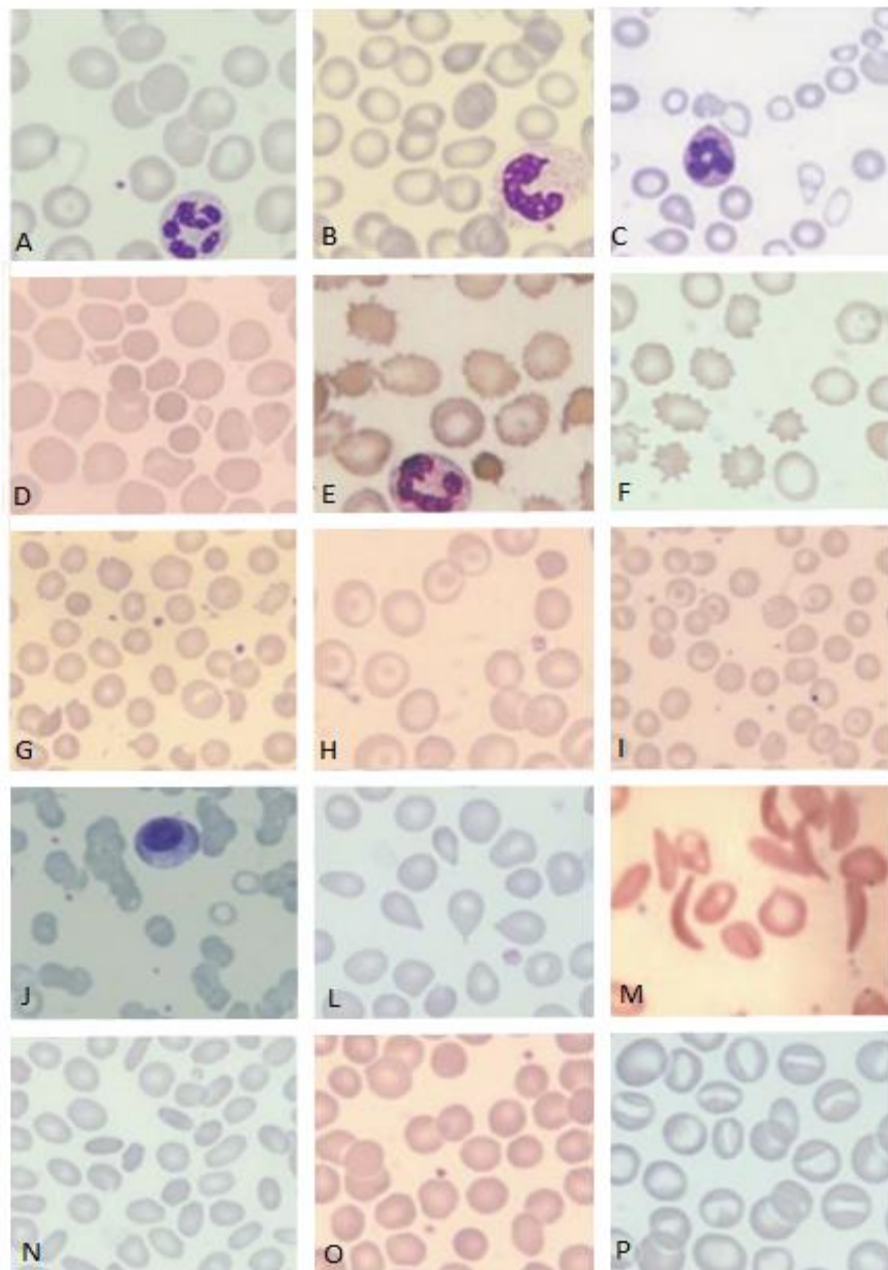


Figura 12 - Alterações na série vermelha

A: Macrocitose; B: Microcitose; C: Hiperchromia; D: Hipocromia; E: Acantócitos; F: Equinócitos; G: Esquizócitos; H: Células em alvo; I: Corpúsculos de Howell-Jolly; J: Roulaux; L: Dacriócitos; M: Drepanócitos; N: Eliptócitos; O: Esferócitos; P: Estomatócitos

3.3 – HEMOGLOBINA GLICADA

A hemoglobina é a proteína específica dos eritrócitos. Cada molécula de hemoglobina A (Hb A) normal do adulto é constituída por quatro cadeias polipeptídicas $\alpha_2\beta_2$, cada uma com o seu próprio grupo heme.

A hemoglobina glicada (HbA1c) forma-se a partir de reações não enzimáticas e irreversíveis entre a hemoglobina e a glicose e permite inferir sobre o controlo da glicémia nos últimos 120 dias. Podemos afirmar que quanto maior for a exposição da hemoglobina a concentrações elevadas de glicose, maior será a percentagem de hemoglobina glicada formada. Normalmente, indivíduos diabéticos apresentam valores de HbA1c mais elevados, dado estarem sujeitos a valores elevados de glicémia.⁹

Neste laboratório o doseamento da hemoglobina glicada é realizado no aparelho ADAMS A1C – HA8160 (Fig. 13). A técnica usada é a Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC), que usa uma coluna composta por resina de troca iónica de carácter catiónico de fase reversa.



Figura 13 - Aparelho ADAMS A1C - HA8160

3.4 – TESTES DE COAGULAÇÃO

A hemorragia de pequenos vasos sanguíneos pode ser travada por vasoconstrição e pela formação de um tampão plaquetário, ou trombo. A formação do coágulo propriamente dito ocorre através do processo normal de hemostasia.

O início da coagulação dá-se com a via extrínseca ou intrínseca (Fig. 14). A ativação do fator X é o ponto de convergência. O fator X pode ser ativado por uma das duas vias e consequentemente catalisa a conversão da protrombina em trombina.

A via extrínseca inicia-se com a entrada da tromboplastina do tecido no sangue circulante. Deriva de fosfolipoproteínas e membranas de organelos das células. Estas lipoproteínas da membrana, denominadas fatores teciduais, são normalmente extrínsecas à circulação.

O fator VII liga-se a estes fosfolípidos nas membranas das células e é ativado para o fator VIIa, uma enzima potente capaz de ativar fator X a Xa na

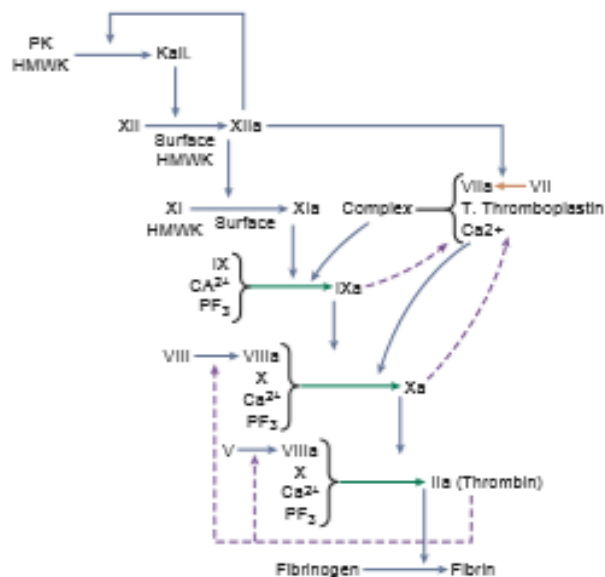


Figura 14 - Modelo da coagulação

presença de cálcio ionizado. A atividade do fator VII parece ser, em parte, dependente da concentração de tromboplastina no tecido. A clivagem proteolítica do fator VIIa pelo fator Xa resulta na inativação do fator VIIa. O fator VII participa apenas na via extrínseca. O passo final é a conversão do fibrinogénio em fibrina, pela trombina.

A via intrínseca de coagulação envolve o contato com fatores de ativação pré-caliceína, fator XII e fator XI (Fig. 14). Estes fatores interagem numa superfície para ativar o fator IX a IXa. O fator IXa reage com o fator VIII, PF 3 e cálcio para ativar o fator X a Xa. Na presença de fator V, o fator Xa ativa a protrombina (fator II) a trombina, que por sua vez converte o fibrinogénio em fibrina.

O cálcio ionizado desempenha um papel importante na ativação de certos fatores de coagulação na via intrínseca. Não é necessário para a ativação do fator XII, pré-caliceína ou fator XI, mas é necessário para a ativação do fator IX pelo fator IXa.

Quando o fator X é ativado para Xa, as vias intrínseca e extrínseca entram numa via comum (Fig. 14). O fator II, a protrombina, passa a trombina (fator IIa), que normalmente circula no sangue como um fator inativo.

Após a ativação do fator Xa, permanece ligada às plaquetas e ativa o fator V. Por sua vez, o complexo Xa / Va ligado a plaquetas cliva o fator II em trombina (fator IIa), processo que é acelerado pelo fator V e cálcio ionizado.²¹

Assim, os testes de coagulação servem essencialmente para avaliar as vias extrínsecas e intrínsecas da coagulação.¹⁵



Figura 15 – Aparelho Option 4 Plus

Para avaliar a hemóstase o laboratório dispõe do Option 4 Plus (Fig. 15), um aparelho que se baseia na detecção ótica do coágulo com agitação magnética. As amostras de sangue devem ser colhidas em tubo citrato de sódio, na proporção de 1:9 (1 anticoagulante, 9 sangue). Se o volume de sangue for inadequado, a amostra não pode ser processada. Os resultados dos tempos de coagulação estarão falsamente aumentados, assim como, amostras com coágulos ou hemolisadas após centrifugação também não podem ser processadas, sob pena dos tempos de coagulação estarem diminuídos devido à libertação do cálcio.

3.4.1 Tempo de protrombina

O tempo de protrombina (TP) avalia a via extrínseca. Adiciona-se cálcio ao plasma estando também presente uma concentração de tromboplastina. Muito útil para monitorizar a terapêutica com anticoagulantes orais. O tempo de protrombina varia, geralmente, entre os 10 e os 13 segundos. É comumente expresso como INR (International Normalized Ratio).

O INR surge pela necessidade de se padronizar resultados. É importante ressaltar que este não é um teste laboratorial mas sim um cálculo matemático que corrige a variabilidade causada pela sensibilidade variável dos agentes de tromboplastina utilizados pelos laboratórios.

$$\text{INR} = [\text{TP Paciente} / \text{TP plasma referência}]^{\text{ISI}}$$

O ISI é um parâmetro de calibração que define a capacidade de resposta do reagente em relação a uma preparação de referência internacional. Cada fabricante atribui um ISI ao lote comercial de reagente, depois de comparada com um reagente de trabalho. Este reagente é calibrado com base em preparações de referência internacionais.

Quanto menor for o ISI, mais sensível é a tromboplastina e vice-versa. Assim, pequenos erros no valor de ISI podem afetar o INR calculado, uma vez que, é expoente na fórmula de cálculo.²¹

Algumas causas de TP aumentado:

- Anticoagulante oral
- Deficiência ou inibição dos fatores VII, X e V
- Problemas hepáticos (em especial insuficiência hepática)
- Coagulação intravascular disseminada²²

3.4.2 Tempo de tromboplastina parcial ativado

O tempo de tromboplastina parcial ativado mede o tempo necessário à formação de polímeros de trombina e fibrina através da via intrínseca. Adicionam-se, ao plasma, fatores de contato, fosfolípidos e CaCl_2 , mas sem adição de tromboplastina. Reflete a atividade dos fatores XII, XI, IX, VIII, X, V, II e I. O tempo normal ronda os 35 segundos.²¹

Algumas causas de TTPA aumentado:

- Anticoagulante oral (ex: varfarina)
- Deficiência ou inibição dos fatores XII, XI, IX, VIII, X, V, II e I
- Administração de amostras contaminadas com heparina ou outro anticoagulante
- Doença hepática
- Coagulação intravascular disseminada²²

3.4.3 Quantificação do fibrinogénio

O fibrinogénio é uma proteína estável. É o precursor da fibrina, que forma o coágulo final. Quando exposto à trombina, os dois peptídeos do fibrinogénio separam-se da molécula deixando apenas um monómero de fibrina. Estes monómeros agregam-se para formar o coágulo final de fibrina.

Para a determinação do fibrinogénio, dilui-se o plasma numa solução rica em trombina para que o tempo de coagulação seja independente da sua concentração. O tempo

é inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio presente na amostra e expressa-se em mg/dL (ou g/L).

Os testes de fibrinogénio são úteis para detetar deficiências no mesmo, no que diz respeito à conversão de fibrinogénio a fibrina. Diminui na doença hepática ou na patologia designada por coagulação intravascular disseminada. Pelo contrário, aumenta na gravidez, processos de inflamação e uso de contraceptivos orais.^{5,21,23}

3.5 – VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO

Este teste mede a velocidade de sedimentação (VS) dos eritrócitos durante uma hora e é influenciado por diversos fatores. Apesar de não ser específico, é clinicamente útil para o diagnóstico de distúrbios associados ao aumento da produção de proteínas de fase aguda.^{3,24}

A diferença de gravidade entre eritrócitos e plasma, mas principalmente a formação de células em rouleaux, originam uma sedimentação mais rápida quando comparada com eritrócitos normais.

Outros parâmetros, como a viscosidade, a posição vertical da amostra (quando é processada) e a diluição do sangue são também fatores que podem influenciar a velocidade a que os eritrócitos sedimentam.

A formação de formas em rouleaux é controlada pela concentração de fibrinogénio assim como de proteínas de fase aguda como a haptoglobina, ceruloplasmina e proteína C reativa. Aumenta na presença de imunoglobinas, ao contrário do que se verifica com a albumina.

A anemia, por alterar a proporção de células vermelhas em relação ao plasma, contribui para a formação de células em rouleaux, logo aumenta a velocidade de sedimentação. A VS é ainda influenciada pela idade, ciclo menstrual e toma de medicamentos. Há também casos de diminuição da mesma, nomeadamente na policitemia vera e insuficiência cardíaca congestiva.²⁴

No laboratório a velocidade de sedimentação é medida através do aparelho BD Sedi-15 (Fig. 16), que, através da densidade ótica, mede a velocidade de agregação e sedimentação dos eritrócitos. As condições laboratoriais são controladas. O resultado é, posteriormente, convertido num algoritmo para se poder obter uma taxa de sedimentação eritrocitária, expressa em mm/h. Os valores de referência variam entre 1 e 20 mm/h.



Figura 16 – Aparelho BD Sedi-15

3.6 – EXEMPLO DE UM CASO CLÍNICO

- ❖ Hemograma referente a uma mulher de 64 anos,
- ❖ Alterações na série vermelha.

Tabela 4 – Hemograma referente a uma mulher de 64 anos

Parâmetro	Resultado	Unidades
RBC	5,31 ↑	10 ⁶ /uL
HGB	10,2 ↓	g/dL
HCT	31,5 ↓	%
MCV	59,3 ↓	fL
MCH	19,2 ↓	Pg
MCHC	32,9	g/dL
RDW	18,9 ↑	%

A partir deste hemograma (Tabela 4) verifica-se que há diminuição do teor de hemoglobina (anemia), hematócrito, volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média. Pelo contrário há aumento do número de eritrócitos e da distribuição dos eritrócitos (anisocitose). A este tipo de anemia designa-se anemia hipocrómica microcítica. Valores de referência no Anexo I.

A nível de esfregaço sanguíneo foi possível observar tanto dacriócitos (RBC em lágrima) como eliptócitos (RBC em forma de elipse) e observa-se que os glóbulos vermelhos estão hipocrómicos e microcíticos, que está de acordo com o menor teor de hemoglobina. Também foi possível observar algum ponteadado basófilo.

Para saber a origem da anemia e distinguir se se trata duma anemia por deficiência de ferro ou de uma talassémia existe o Índice de Mentzer, que é o quociente entre o volume

corpúscular médio e o número de eritrócitos. Este índice, se for superior a 13 indica deficiência de ferro mas se for inferior sugere tratar-se de uma talassémia.

No caso em análise o índice é inferior a 13 → Índice de Mentzer = MCV/RBC ⇔ Índice de Mentzer = $59,3/5,31 = 11,17$. Assim, suspeita-se duma β talassémia.²⁵

As talassémias caracterizam-se por uma anormalidade na síntese das cadeias de globinas. Contrastam com as verdadeiras hemoglobinopatias já que estas resultam dum defeito estrutural hereditário numa das cadeias produzindo assim hemoglobina com características físicas e funcionais anormais.

Os genes envolvidos na talassémia parecem alterar diretamente a estrutura do gene e consequentemente a sua função, através de mutações, favorecendo o início precoce da síntese da cadeia de globina, ou alterando o promotor e assim diminuir a taxa de expressão do gene, quer por alterarem o fim do gene conduzindo ao alongamento da cadeia. Há depleção total ou parcial dum gene.

Há vários tipos de talassémias sendo a mais comum a β talassémia. Reflete a insolubilidade da α globina, que está presente em excesso no RBC devido à diminuição da síntese de β globina. Por sua vez, esta diminuição leva ao excesso de γ globina instável que, aliada à eritropoiese ineficaz, provoca uma redução na sobrevivência dos RBC. Caracteriza-se ainda por excesso de cadeias livres, instáveis, que precipitam dentro das células causando danos na membrana. Os RBC circulantes são destruídos no baço contribuindo assim para a anemia que está associada a esta patologia.

O esfregaço de sangue periférico revela anisocitose, poiquilocitose e poucos RBC normais, uma vez que se apresentam microcíticos e hipocrómicos. O RDW aumenta devido à anisocitose. Há mais parâmetros laboratoriais que podem ser tidos em conta. Neste caso não foi possível avaliar outros parâmetros mas é de esperar que os reticulócitos, a bilirrubina e o ferro aumentem e que na electroforese de hemoglobina haja um aumento da Hb A₂ e diminuição da Hb A₁.²⁶

3.7 – CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO E EXTERNO

Entende-se por controlo de qualidade o processo estatístico que monitoriza e avalia métodos analíticos que produzem resultados. É de extrema importância que esta monitorização e avaliação sejam feitas desde a colheita até à obtenção do resultado.

O objetivo é garantir que os resultados são fidedignos e reais, tendo por base as cartas de Levey-Jennings. Os controlos de qualidade internos são procedimentos do laboratório que permitem a avaliação da precisão dos resultados das análises do laboratório e são sempre realizados quando um kit ou lote novos são utilizados.²⁷

Podem ser diários ou semanais, consoante o equipamento e teste em questão, e são constituídos por dois ou três níveis (normal, alto e baixo).

Relativamente aos controlos de qualidade externos, servem para avaliar a exatidão dos resultados assim como comparar resultados com outros laboratórios. No caso deste laboratório participa no programa de controlo externo da qualidade (PNAEQ), do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, e também no Randox International Quality Assessment (RIQAS). São quinzenais ou mensais e os resultados têm que ser enviados para a entidade competente numa plataforma própria existente na internet.²⁷

4 – BIOQUÍMICA

4.1 – ANALISADOR DE QUÍMICA CLÍNICA

O aparelho utilizado neste sector é um aparelho automático, Architect Ci8200, dividido em dois módulos: bioquímica e imunologia. Neste relatório apenas será abordado o módulo da bioquímica.

Apresenta várias metodologias como a espectrofotometria, turbidimetria, potenciometria e nefelometria (Anexo V) sendo o soro o fluido mais utilizado.

A colheita do soro é feita num tubo próprio, com um gel ativador do processo da coagulação e sem anticoagulante.⁵

Também processa urina – primeira da manhã - no caso da análise à albumina de baixa concentração ou urina 24h – no caso da determinação da concentração da microalbumina.

O controlo de qualidade externo é realizado semanalmente e, mais uma vez, segue as indicações do RIQAS. Todos os parâmetros são analisados e enviados através duma plataforma *online*.

Já o controlo de qualidade interno é feito diariamente. Tem por base a conformidade às exigências dos utentes, havendo sempre um grande compromisso com a gestão e capacidade de controlo do processo analítico. O seu objetivo é sempre a melhoria da qualidade dos resultados obtidos. Assenta em gráficos de Levey-Jennings, que definem limites altos e baixos no qual têm de cair os pontos dos diferentes parâmetros analisados. O controlo só é válido se os pontos estiverem dentro dos limites. Para interpretar e validar os pontos nas cartas existem, então, regras de Westgard. Não é válido o controlo que apresente uma das seguintes premissas:

- 1 2s – uma observação (controlo) excede os 2 desvios padrão, limite alto ou baixo;
- 1 3s – uma observação excede os 3 desvios padrão, limite alto ou baixo;
- 2 2s – duas observações consecutivas excedendo os 2 desvios padrão;
- R 4s – uma observação que excede os 2 desvios padrão, limite superior, e outra imediatamente a seguir a exceder os 2 desvios padrão, limite inferior;
- 4 1s – quatro observações consecutivas a exceder 1 desvio padrão;

→ 10x – dez observações consecutivas acima do limite superior ou dez observações consecutivas abaixo do limite inferior.

Geralmente os gráficos refletem uma ou duas observações diárias, consoante o número de níveis que cada laboratório avalia para cada parâmetro, e são relativos ao último mês.²⁸

4.2 – ESTUDO DA FUNÇÃO LIPÍDICA

O termo lípido aplica-se a uma série de compostos solúveis em solventes orgânicos mas insolúveis em água, quimicamente ligados por ligações não polares, originando ácidos gordos e/ou álcoois complexos após hidrólise. Contudo, podem conter grupos carregados/polares como grupos siálico, amino, hidroxilo, etc.

A presença destes grupos químicos confere às moléculas lipídicas uma afinidade com a água e com os solventes orgânicos, o que possibilita uma interface aquosa das membranas biológicas.²⁹

O colesterol é um álcool esteróide que faz parte da membrana de todas as células animais. Uma parte muito considerável de colesterol é absorvida no intestino a partir das secreções e do turnover biliar das células da mucosa. Praticamente todo o colesterol presente no intestino está na forma não esterificada (livre). A forma esterificada, que contém um ácido gordo ligado ao grupo hidroxilo no anel A, é hidrolisada em colesterol livre e ácidos gordos. Antes de ser absorvido, o colesterol é solubilizado, através da emulsificação, sendo o seu objetivo a formação de micelas mistas. A capacidade do colesterol formar micelas é influenciada pela quantidade de gordura na dieta. O colesterol entra nas células da mucosa, fica retido com triacilgliceróis, fosfolípidos e proteínas dando, assim, origem a grandes partículas designadas por quilomicrons, que serão secretados na linfa e que, conseqüentemente, entrarão na circulação, onde distribuem os lípidos absorvidos para o fígado e tecidos periféricos.

Os triacilgliceróis constituem 95% da gordura de armazenamento dos tecidos, são constituídos por três ácidos gordos ligados a um glicerol e são digeridos no duodeno e absorvidos no íleo proximal. Após absorção são novamente reunidos como triacilgliceróis nas células epiteliais e, então, acondicionados com o colesterol e lipoproteínas para formar os quilomicrons. Os lípidos sintetizados no fígado e intestino são transportados no plasma nos complexos macromoleculares chamados lipoproteínas. Esféricas, com lípidos neutros

não polares no centro e lípidos anfipáticos polares na superfície. As diferentes lipoproteínas têm propriedades físicas e químicas diferentes já que contêm proporções de lípidos e proteínas distintas.²⁹

São estas mesmas lipoproteínas que ajudam no diagnóstico laboratorial, uma vez que é através destes parâmetros que se avalia o perfil lipídico. A importância de o conhecer prende-se com a avaliação do risco cardiovascular em doentes com ou sem doença cardiovascular aterosclerótica clinicamente evidente, diabetes mellitus, história de dislipidemia familiar, doença inflamatória crónica e doença renal crónica.³⁰

Existem cinco categorias distintas de lipoproteínas classificadas conforme a sua densidade em: quilomicrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermedia (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL). Regra geral, as lipoproteínas maiores contêm mais lípidos, triglicerídeos e éster de colesterol no núcleo, são mais leves em densidade e contêm uma percentagem menor de proteína.

Em jejum, a maior parte dos triglicerídeos está presente nas VLDL; após refeição os quilomicrons aparecem temporariamente aumentados e contribuem de forma significativa para a concentração de triglicerídeos plasmáticos totais. Por esta razão se recomenda jejum de 12-14 horas para doseamento de triacilgliceróis.

As HDL têm como função o transporte reverso do colesterol, isto é, remover o excesso de colesterol das células periféricas e retorná-lo para o fígado para ser excretado, isto porque, grande parte das células não cataboliza o colesterol e este ao acumular-se torna-se tóxico para as células. Interage ainda com transportadores ABCA1, que funcionam como macrófagos e removem o colesterol extra.

O colesterol determina-se por métodos enzimáticos. São usadas enzimas como colesterol esterase e colesterol oxidase que formam peróxido de hidrogénio, que por sua vez, através duma peroxidase, origina um composto corado, medido por espectrofotometria. O colesterol das HDL, também medido por espectrofotometria, usa catalisadores nas suas reações.

Os triglicerídeos são determinados por reação colorimétrica direta. Pela ação da lipase, glicerocinase e glicerofosfato oxidase produz-se peróxido de hidrogénio que forma um composto corado, medido por espectrofotometria.

Existe um método que doseia diretamente o colesterol das LDL, no entanto, a forma mais prática é pela fórmula/equação de Friedwald:

$$\text{Colesterol LDL} = [\text{Colesterol Total}] - [\text{Colesterol HDL}] - \{[\text{Triacilgliceróis}]/5\}$$

Todos os parâmetros são expressos em mg/dL e note-se que a fração $[\text{Triacilgliceróis}]/5$ representa uma estimativa do colesterol VLDL. Esta equação não deve ser usada em amostras com concentrações de triglicerídeos acima de 400 mg/dL, com quilomicrons muito elevados ou em doentes que, à partida, já se conhece histórico de disbetalipoproteinémias, pois nestes casos a fração não representa uma estimativa correta sobre o colesterol das VLDL.²⁹ No laboratório do CSMC quando os triglicerídeos estão na ordem dos valores acima referidos, o LDL é determinado diretamente.

Exemplo de um perfil analítico:

- ❖ Homem, 48 anos;
- ❖ Soro totalmente lipémico, com coloração amarelo pálido/branco;
- ❖ Análises realizadas no âmbito duma junta de promoção, motivo pelo qual apenas são avaliados alguns parâmetros laboratoriais.

Tabela 5 – Boletim de análises referente a um homem de 48 anos

	Resultado	Intervalo referência	Unidades
AlkP	83	40-150	U/L
ALT	42	0-55	U/L
AST	57	5-34	U/L
Chol	462	0-199	mg/dL
GGT	155	9-64	U/L
GluC	88	70-109	mg/dL
Trig	240	0-149	mg/dL
UHDL	48	40-60	mg/dL
Urea	27	15-56	mg/dL
Total PSA	0,891	-	ng/mL

No boletim de análises apresentado (Tabela 5) podemos constatar o aumento tanto do colesterol total como dos triglicerídeos. Valores de referência Anexo IV.

Na tabela que se segue (Tabela 6) estão referidos alguns dos distúrbios originados por alterações no perfil lipídico.²⁹

Tabela 6 - Importância clínica: distúrbios no metabolismo dos lípidos

Hiperapobetalipoproteinémia	Aumento das [apo B100], LDL normal ou ligeiramente aumentado. [colesterol total] e [triglicéridos] geralmente aumentados. [HDL] e [apo A1] diminuídas.
Hipertrigliceridémia familiar	Aumento moderado de TG; podendo haver superprodução de partículas VLDL. LDL dentro dos valores normais. HDL reduzido possivelmente pelo aumento dos TG. Designa-se familiar pois parece estar associada a um padrão autossómico dominante.
Hiperlipoproteinémia (tipo v)	Aumento dos quilomicrons e VLDL. Calcula-se que esteja associado a um aumento de produção ou a uma redução da remoção de VLDL.
Disbetalipoproteinémia (tipo iii)	Defeito na remoção de lipoproteínas remanescentes tanto dos quilomicrons como de VLDL. Estas partículas que se acumulam são muito ricas em colesterol. Tanto o LDL e HDL estão mais baixos do que o normal. Distúrbio que se manifesta numa fase tardia e pode evoluir para aterosclerose (formação de placas de gordura dentro dos vasos sanguíneos).
Hipercolesterolémia familiar	Defeito na expressão e/ou função do recetor do LDL, que se liga e remove os LDL da circulação. O LDL ao acumular-se aumenta a probabilidade de ocorrer aterosclerose. A apo B100 está também aumentada. Os TG são normais ou ligeiramente aumentados e o HDL reduzido. Aqui o padrão genético mais afetado é o homocigótico.
Apolipoproteína B-100 defetiva familiar	Resultado de mutações na apo B100, que reduz a sua afinidade para pelo recetor LDL. O LDL aumenta assim mas os TG e HDL são geralmente normais.
Hipoalfalipoproteinémia	Níveis baixos de HDL. Muito associado a mutações genéticas ou ainda à deficiência da LCAT.

4.3 – ESTUDO DA FUNÇÃO HEPÁTICA

O fígado tem um papel importante na homeostasia das proteínas, hidratos de carbono e lípidos. Todas as células aeróbias dos nossos órgãos processam estas vias metabólicas havendo vias que são quase exclusivas do fígado, como a neoglucogénese. Assim, as células do fígado são capazes de metabolizar, desintoxicar e excretar tanto compostos endógenos como exógenos. É, portanto, de muita utilidade avaliar a função hepática já que a partir do soro se podem tirar ilações sobre a bilirrubina, aminotransferases, fosfatase alcalina, albumina, etc. É possível direcionar o diagnóstico no que diz respeito a obstrução do trato biliar, dano hepatocelular agudo e ainda doença do fígado crónica (cirrose).

Por exemplo, a concentração de bilirrubina e fosfatase alcalina no soro podem indicar colestase (gerada por bloqueio de fluxo da bÍlis). As aminotransferases indicam o nível de integridade das células hepáticas.

Bilirrubina total e direta: a bilirrubina deriva do heme, é insolúvel em água e transportada no plasma através da ligação com a albumina. É então levada para as células hepáticas e conjugada para formar compostos mais solúveis (quando comparada com a não conjugada). Posteriormente, a bilirrubina conjugada é excretada na bÍlis. Quando, por exemplo, o trato biliar fica comprometido a bilirrubina não é excretada e as concentrações séricas aumentam.

Fosfatase alcalina (ALP): o aumento da sua atividade é resultado do aumento da síntese das enzimas pelas células dos canalículos biliares, que respondem a uma colestase, intra ou extra hepática. O seu aumento também se pode dever a doenças infiltrativas do fígado como tumores ou ainda em casos de cirrose. Num sangue normal, a ALP deriva principalmente dos ossos e fígado e apenas uma parte do intestino. É avaliada em conjunto com a *gamma-glutamyltransferase* (GGT), pois um aumento desta enzima sugere que o fígado é o responsável pelo aumento da ALP.³¹

A **Bone Alkaline phosphatase (BAP)** está ligada ao doseamento ósseo na medida em que se expressa cedo na diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e os seus níveis parecem estar diretamente relacionados com o número e estado de diferenciação dos osteoblastos. Vários estudos confirmam um aumento da BAP, 4 semanas após fratura, assim como às 24 semanas (ainda que não de forma tão pronunciada). Reflete assim o que se pode esperar no fim da cicatrização óssea, quando prevalece a fase de remodelação.³²

Alanina Transaminase (ALT) e Aspartato Transaminase (AST), transaminases que estão envolvidas na conversão de aminoácidos e são usadas no metabolismo hepático.

Estão amplamente distribuídas pelo corpo podendo encontrar a AST no coração, fígado, músculo-esquelético e rins e a ALT no fígado e rins. A ALT é exclusivamente citoplasmática enquanto a AST apresenta duas formas (citoplasmática e mitocondrial) e encontra-se em todas as células. Quando comparadas, a atividade da ALT, no soro, é melhor marcador da doença hepática já que a AST pode aparecer em diversos órgãos, como referido acima. Em doenças do foro hepático quase sempre os níveis da ALT são superiores aos da AST. Apenas algumas exceções se verifica o contrário: hepatite alcoólica, cirrose hepática e neoplasias.

Não esquecer que os parâmetros bioquímicos devem ser analisados como um todo e não individualmente, ainda assim, estas duas transaminases ajudam muito no diagnóstico, por exemplo, da icterícia. Esta caracteriza-se por uma alteração do equilíbrio entre a produção e excreção da bilirrubina resultando numa acumulação da mesma – hiperbilirrubinemia.

A nível hepático há também outras patologias muito comuns como o caso do dano hepatocelular, estado de inflamação normalmente causado por vírus ou produtos químicos (álcool e fármacos). Consoante a duração denomina-se agudo ou crónico.

A colestase, isto é, a obstrução biliar também pode ter o seu início no fígado ou nos ductos biliares. Laboratorialmente verifica-se um aumento das enzimas ALP e GGT com posterior aumento da AST e ALT. Estas duas últimas começam a diminuir mesmo quando ainda se verifica a obstrução.

Uma outra patologia onde se verifica o aumento das duas enzimas (AST e ALT) é a cirrose, definida como fibrose difusa que representa o estado final da formação de cicatrizes no fígado.

Como resposta a situações de inflamação ou infeção, o fígado liberta diversas proteínas – proteínas de fase aguda – que são produzidas pela estimulação de citocinas pelos macrófagos.^{33,34}

A **GGT** é uma enzima amplamente distribuída pelo fígado e túbulos renais. A sua atividade no plasma aumenta aquando da colestase, sendo um marcador sensível a patologias hepáticas. Também é muito afetada com a ingestão de álcool mesmo quando o fígado parece

ainda não estar afetado. Em falha hepáticas agudas, as mudanças na GGT e aminotransferases são afetadas em paralelo.³¹

A **lactato desidrogenase** é uma enzima, tetramérica, em que cada monômero é constituído por uma cadeia de 334 aminoácidos e com o próprio centro ativo. Assim, a LDH cataliza a redução, dependente do NADH, de piruvato a lactato ou a oxidação, dependente de NAD⁺, de lactato a piruvato. Há cinco isoenzimas da LDH. Os locais do corpo onde estas isoenzimas são encontradas vão variando sendo que no fígado a que mais predomina é a LDH5. A atividade total desta enzima reflete a gravidade do dano ocorrido enquanto a isoenzima, doseada no sangue, reflete o local do dano.

As proteínas provêm da dieta e são metabolizadas em aminoácidos a fim de poder sintetizar de novo proteínas (turnover proteico). São filtradas pelo glomérulo e, não havendo qualquer tipo de comprometimento, são absorvidas no túbulo proximal e devolvidas à circulação. As proteínas plasmáticas, exceto as de maior peso molecular, podem ser encontradas na urina.

A nível clínico, uma diminuição tem maior interesse e reflete estado avançado da doença hepática crónica, glomerulonefrite, síndrome nefrótica. Já o aumento verifica-se em casos de desidratação.³⁵

Por ser a proteína em maior quantidade no plasma, a albumina é o ponto de referência para interpretar este parâmetro.

4.4 - ESTUDO DO EQUILÍBIO HIDRO-ELECTROLÍTICO

A manutenção da homeostasia é essencial para a vida de todos os organismos e prende-se com o equilíbrio da pressão osmótica e distribuição da água nos vários compartimentos de fluidos corporais. Está diretamente dependente de três principais eletrólitos: sódio, potássio e cloro. Não só para a homeostasia, estes eletrólitos são também importantes para a manutenção do pH, reações de oxidação-redução ou ainda como cofatores de enzimas. Dadas as concentrações anormais dos eletrólitos causarem vários distúrbios, a sua determinação é de extrema importância. À avaliação destes três parâmetros dá-se o nome de ionograma. A determinação laboratorial das concentrações séricas dos iões sódio (Na⁺), potássio (K⁺) e cloro (Cl⁻) deve ser sempre realizada em função da patologia apresentada pelo doente e das suas especificidades individuais. O

ionograma é um bom auxiliar de diagnóstico por ser um exame laboratorial utilizado, de forma transversal, por quase todas as especialidades médicas e cirúrgicas.^{36,37}

Sódio: o sódio é o principal cátion do espaço extracelular e, por isso, responsável por metade da força osmótica do plasma. A função primordial é a manutenção da distribuição normal da água e pressão osmótica. É livremente filtrado pelos glomérulos e reabsorvido ativamente nos túbulos proximais. O intervalo de referência é entre 135 e 145 mmol/L.

O seu aumento designa-se por hipernatrémia e está associado à hiperosmolaridade. A causa principal do aumento é a desidratação, causada pela pouca ingestão de água, por aumento da excreção renal ou por perda do trato gastrointestinal. O contrário, a diminuição dos níveis de sódio, hiponatrémia, estão associados à hipoosmolaridade como hiperosmolaridade ou isoosmolaridade. Aqui é extremamente importante avaliar a osmolaridade a fim de se conhecer o tipo de hiponatrémia. Está, então, associada a episódios de vômitos, diarreia prolongada, diminuição da reabsorção renal e retenção excessiva de líquidos.^{36,37}

Potássio: principal cátion no meio intracelular. As altas concentrações são mantidas pela bomba Na⁺/K⁺ ATPase, que é sustentada pelo adenosine triphosphate (ATP) e que transporta continuamente K⁺ para dentro das células, contra um gradiente de concentração. É um fator importante na manutenção e ajuste dos gradientes iônicos. A necessidade de K⁺ é satisfeita pela ingestão na dieta. O potássio absorvido do trato gastrointestinal é rapidamente distribuído, com uma pequena quantidade a ser absorvida pelas células para mais tarde ser excretada pelos rins.

A diminuição do potássio, hipocaliémia, leva a fraqueza muscular, irritabilidade, paralisia, problemas neuromusculares graves e taquicardia. Deve-se à redistribuição do mesmo no espaço extracelular ou ao déficit devido ao aumento da perda/diminuição da ingestão. Já o aumento, hipercaliémia, associa-se a confusão mental, dormência e fraqueza dos músculos. Em última análise está também associada a queimaduras, cetoacidose diabética e retenção renal.^{36,37}

Cloreto: o ânion em maior quantidade no meio extracelular, com concentrações médias no plasma de 103 mmol/L. Juntamente com o sódio representam a maior parte dos constituintes osmoticamente ativos no plasma. Está envolvido de forma significativa na manutenção da distribuição da água, pressão osmótica, balanço cátion-ânion no espaço

extracelular. O cloreto que vem da alimentação é quase absorvido na sua totalidade no trato intestinal. O Cl⁻ excedente é excretado na urina assim como no suor.

A diminuição (hipoclorémia) deste ião reflete a acidose metabólica, secreção gástrica contínua e vômito prolongado; o aumento (hiperclorémia) relaciona-se com a desidratação, falha renal aguda e acidose metabólica se diarreia prolongada ou perda de bicarbonato de sódio.³⁸

Cálcio, Magnésio e Fósforo: a concentração de cálcio no meio extracelular é reduzida quando comparado ao existente a nível ósseo. O equilíbrio e homeostase do cálcio é controlado pela hormona tiroideia parathyroid hormone (PTH), pela calcitonina e vitamina D. No plasma, grande parte do cálcio esta ligado a proteínas (albumina). A parte ativa do cálcio é a fração não ligada e a manutenção da concentração é essencial para a função nervosa, permeabilidade membranas, contração muscular e secreção glandular. Na determinação do cálcio em laboratório é preciso ter atenção que ambas as frações são determinadas – cálcio total – o que poderá levar a uma difícil interpretação.

Se a albumina baixa, o cálcio total também baixa (relembrar que os mecanismos homeostáticos respondem à fração não ligada e não à total) e por isso a fração não ligada do Ca²⁺ está normal, não constituindo um verdadeiro caso de hipocalcémia (< cálcio). O que é aconselhável é fazer a medição quer do cálcio quer da albumina para melhor interpretar os resultados.

A hipocalcémia verifica-se em casos de deficiência vitamina D (problemas ósseos), hipoparatiroidismo (visto que PTH é a hormona responsável pela homeostase do cálcio), deficiência do magnésio e doença renal; já a hipercaliémia ocorre quando há excesso de vitamina D ou terapia com cálcio.³⁹

A osmolaridade é um teste não específico que avalia o estado de hidratação dum indivíduo, sendo calculada, no CSMC, através da seguinte fórmula:⁴⁰

$$\text{Osmolaridade (mOsm/kg)} = \{1,86 [\text{sódio}] (\text{mmol/L})\} + \{0,36 [\text{azoto ureico}] (\text{mmol/L})\} + \{0,056 [\text{glicose}] (\text{mmol/L})\} + 9$$

4.5 – ESTUDO DA FUNÇÃO RENAL

Creatinina: a creatinina é o produto final do metabolismo da creatina, que é encontrada a nível muscular. Pequenas quantidades de creatina são irreversivelmente convertidas em creatinina, que é removida através da excreção renal. A quantidade de creatinina gerada é produzida de forma proporcional à massa muscular dum indivíduo e os níveis diários mantêm-se constantes, exceto se houver lesão por esmagamento ou doenças que produzem dano muscular.

A excreção da creatinina é muito menos afetada do que a da ureia, já que as alterações no fluxo sanguíneo e na atividade glomerular são compensadas pelo aumento da secreção tubular da creatinina na urina. Por esta mesma razão, e porque as flutuações dos valores são pequenas, a determinação da creatinina também é útil em amostras de urina de 24h.

Valores de creatinina aumentada verificam-se na insuficiência renal mas se a esta se aliar a perda de massa muscular, os valores estarão normais no soro, contudo, em amostras de urina de 24h verificar-se-á uma diminuição dos mesmos. Valores elevados de ureia num indivíduo com creatinina normal indicam causa não renal da uremia, que geralmente é pré renal.

Ureia: os grupos amina dos ácidos aminados das proteínas são metabolizados em amónia, que no fígado é convertida em ureia. Esta libertação dos grupos amina surge por troca entre aminoácidos e pela metabolização dos mesmos. Chegam ao sangue, por exemplo, pela degradação das proteínas provenientes da dieta. A ureia difunde-se depois tanto para o meio intra como extracelular. Os valores de ureia aumentam no caso de dietas ricas em proteínas, verificando-se o contrário quando a alimentação é pobre nestas moléculas. Os valores ligeiramente abaixo do nível normal não são consideráveis anormais, exceto quando a diminuição é excessiva, sendo considerada importante para o diagnóstico de hepatopatias graves. Estas circunstâncias significam que o fígado é incapaz de sintetizar ureia a partir da amónia em circulação.

A hiperurémia é o termo que se usa para referir níveis elevados de ureia no sangue. O caso mais comum onde isto se verifica é na insuficiência renal, comprometendo assim a sua excreção (insuficiência aguda, glomerulonefrite, drogas ou metais nefrotóxicos, nefropatia crónica). Existe também a urémia pré renal, ou seja, referente a algum mecanismo anterior à filtração do sangue pelos glomérulos, como a diminuição do fluxo de sangue, o choque, a desidratação, o aumento do catabolismo das proteínas, queimaduras e hemólise. A

urémia pós renal ocorre quando há obstrução, por cálculos ou tumores, do trato urinário inferior, ureteres, bexiga ou uretra, que impede a excreção da urina.

A razão entre a ureia e a creatinina pode ser usada para avaliar diferentes alterações fisiológicas. Verifica-se baixa quando a dieta é pobre em proteínas e nos casos de necrose tubular aguda e insuficiência hepática.

Se se verificar alta, há duas hipóteses a ter em atenção: a primeira se os valores de creatinina estiverem normais, caso de urémia pré renal, dieta rica em proteínas, estados catabólicos e hemorragia gastrointestinal; a segunda, se os valores de creatinina estiverem elevados, que se verifica em casos de azotémia pré renal, insuficiência renal, azotémia pós renal.

Importa ter em consideração que a ureia per si varia com demasiados fatores, sendo essa a razão para não ser um biomarcador específico.

Ácido úrico: o ácido úrico é outro parâmetro relacionado com a função renal, produzido como produto final do metabolismo das purinas que são constituintes dos ácidos nucleicos. É sintetizado no fígado e excretado pelos rins através da urina. O seu aumento designa-se por hiperuricémia. O aumento é proporcional á taxa de renovação celular como resultado da degradação dos ácidos nucleicos, como se observa nas leucemias e em outros casos malignos com grandes massas celulares. A insuficiência renal também provoca acumulação de ácido úrico bem como de creatinina e ureia, verificando-se também aumento com alguns medicamentos por diminuírem a sua excreção, caso dos diuréticos tiazida.

Há três hipóteses a ter em consideração relativamente aos níveis de ácido úrico:

- 1- **Produção aumentada e níveis séricos aumentados:** gota primária, excesso purinas na dieta, anemia falciforme.
- 2- **Excreção reduzida e níveis séricos aumentados:** ingestão de álcool, diuréticos, acidose láctica, insuficiência renal.
- 3- **Excreção aumentada e níveis séricos diminuídos:** medicamentos.⁴¹

Outro parâmetro muito utilizado é a **albumina de baixa concentração**, doseada numa amostra de urina. Geralmente caracterizada como uma taxa de excreção da albumina.

É um marcador de disfunção endotelial e dano microvascular, de doença renal precoce assim como de doença cardíaca coronária. Serve ainda para despistar a nefropatia diabética.⁴²

4.6 – ESTUDO DA FUNÇÃO PANCREÁTICA

O pâncreas tem 12 a 15 cm de comprimento e localiza-se na parede posterior da cavidade abdominal. A sua cabeça fica na curva duodenal e a sua cauda é direcionada para a esquerda.

Como nos outros órgãos, há diversos biomarcadores que ajudam no diagnóstico. Estes, por alterarem os seus níveis de forma significativa consoante a patologia, são importantes moléculas a ter em consideração, a saber:

Amilase: a amilase é uma enzima que catalisa a hidrólise das ligações 1,4- α -glicosídicas em polissacarídeos. Está presente em numerosos órgãos e tecidos mas de forma mais significativa é encontrada nas glândulas salivares (Amy-S). Há, então, várias formas de amilase sendo que no pâncreas a forma encontrada é a forma P (Amy-P), sintetizada pelas células acinares e secretada para o intestino através do ducto pancreático.

Assim, esta enzima não é específica do pâncreas mas os seus níveis parecem estar sempre aumentados em situações de pancreatite aguda e inflamação das glândulas salivares.

Aumenta, na pancreatite aguda, 5 a 8h após o surgimento dos sintomas, desaparecendo até aos 4 dias seguintes. Todavia, o aumento dos níveis séricos desta enzima não reflete a severidade da patologia, ainda assim, quanto maior for o valor da Amy, maior será a probabilidade de estarmos perante um quadro clínico de pancreatite. Os aumentos de Amy podem também significar distúrbios intra-abdominais e extra-hepáticos. Deste modo, para aumentar a especificidade deste parâmetro deve dosear-se a atividade Amy-P em vez de Amy-total.

Outra patologia em que se verifica o aumento da atividade da Amy é na colecistite, como resultado primário ou secundário do envolvimento pancreático. Também na insuficiência renal há aumento da atividade desta enzima, aumento este proporcional à extensão do dano, podendo apresentar um aumento 5 vezes superior ao normal.

Verificam-se casos de macroamilasémia, complexos de amilase com imunoglobulinas, que originam, posteriormente, hiperamilasémia. Estes complexos são demasiado grandes para serem excretados e, por isso, ficam retidos, não sendo conhecidos sintomas associados a esta situação.

O doseamento da amilase na urina reflete as concentrações de amilase no sangue. Os testes de amilase são utilizados para controlar o tratamento de alguns cancros relacionados

com o pâncreas e depois da eliminação ou remoção de cálculos biliares. Podem ainda avaliar a eficácia dum tratamento e determinar se os níveis de amilase têm subido ou diminuído ao longo do tempo.^{43,44,45}

Lipase: a lipase (LPS) é uma glicoproteína de cadeia simples que, para ter a sua atividade catalítica completa e específica, precisa de sais biliares e um cofator, secretado pelo pâncreas, a colipase.

Só atua quando o substrato está presente numa forma emulsionada na interface entre água e substrato e a sua ação depende da área de superfície. A maior parte da atividade deriva do pâncreas, ainda assim, uma parte provem da mucosa intestinal e gástrica. Por ser muito pequena para ser filtrada pelo glomérulo, é totalmente reabsorvida pelo túbulo renal.

É usada no diagnóstico diferencial da pancreatite. É sensível ao ponto de se estimar que 4-8h após uma crise de pancreatite os seus níveis irão aumentar, diminuindo só passados 7-14 dias.

A pancreatite é difícil de diagnosticar pois é necessário distingui-la de outras patologias como a úlcera duodenal, a úlcera gástrica e a obstrução intestinal. O aumento em cerca de 3 vezes da atividade de LPS, e na ausência de falha renal, é mais específico que um aumento da Amy. Além disso um aumento de LPS mantem-se por mais tempo quando comparado com a Amy.^{43,44}

4.7 - ESTUDO DO METABOLISMO DO FERRO

O ferro existe na grande maioria das células, plasma e outros fluidos extracelulares, ainda que em quantidades pequenas, e é armazenado sob a forma de ferritina e hemossiderina.

A ferritina é uma estrutura proteica circundada por um núcleo de ferro, enquanto que a hemossiderina é formada pela quebra da ferritina nos lisossomas. A ferritina é encontrada em quase todas as células mas nos hepatócitos e macrófagos constitui uma reserva de ferro para a formação de hemoglobina e outras hemoproteínas. O ferro não pode existir livre a nível celular sendo armazenado de forma a não provocar dano oxidativo nas células. Pequenas quantidades de ferritina também estão presentes no soro, em concentrações proporcionais às do ferro, observando-se o seu aumento em casos de lesão hepática ou outros processos inflamatórios.

O transporte do ferro é feito através duma proteína plasmática, a apotransferrina. Ao complexo apotransferrina-Fe³⁺ dá-se o nome de transferrina. Quando esta se liga aos recetores próprios existentes nas células, o complexo é envolvido num endossoma, e por estar num meio ácido, liberta o ferro, que se reduz ao seu estado ferroso (Fe²⁺). Posteriormente, é transportado nas células através de transportadores próprios.⁴⁶

A deficiência em ferro ou a sua sobrecarga são os dois grandes distúrbios do metabolismo do ferro, sendo a deficiência o mais comum. Pode dever-se a défice na dieta, perda de sangue, absorção inadequada e cirrose.^{46,47} Inicialmente, a falta de ferro era associada à anemia hipocrómica, mas hoje sabe-se que é necessário avaliar o ferro sérico, capacidade de ligação do ferro e ferritina para se poder fazer um bom diagnóstico da causa da perda de ferro. Nenhum destes parâmetros individualmente permite um diagnóstico seguro. A sobrecarga de ferro define-se por hemossiderose e é de salientar que não implica lesão tecidual e pode dever-se a transfusões sanguíneas ou mesmo fatores hereditários.

A capacidade total de ligação do ferro (TIBC) é determinada pela adição de Fe³⁺ suficiente para saturar os locais de ligação. É uma medida da concentração máxima de ferro que a transferrina liga e varia consoante o distúrbio do metabolismo do ferro, estando aumentada na deficiência de ferro e diminuída nas doenças inflamatórias e na hemocromatose.

A saturação da transferrina é um parâmetro calculado através da seguinte fórmula⁴⁶:

$$\text{Saturação transferrina (\%)} = 100 \times \frac{\text{ferro sérico}}{\text{TIBC}}$$

4.8 - MARCADORES DE LISE MUSCULAR E LESÃO CARDÍACA

Muscular

A creatina cinase (CK) é uma enzima que apresenta três isoenzimas principais: CK-BB (cérebro); CK-MM (músculo esquelético) e CK-MB (músculo cardíaco) e apresenta-se elevada em diferentes condições relacionadas com lesão muscular ou esforço físico. Por serem específicas são um bom marcador.⁴⁸

Cardíaco

Para avaliar a função cardíaca, nomeadamente o dano do miocárdio, existem vários biomarcadores que são proteínas do próprio miocárdio. A qualidade dum marcador prende-se com a sua localização no miócito, a cinética de libertação após ocorrer dano e a clearance da circulação.

A CK-MB é conhecida como a isoenzima cardíaca pois 10-20% da atividade total da CK é proveniente da atividade no miocárdio. Esta isoenzima apresenta valores normais em indivíduos saudáveis, isto é, que não sofrem lesões no músculo cardíaco, e aumentados em indivíduos com distrofia muscular ou que praticam excesso de exercício físico.

A troponina: Três subunidades de troponinas formam um complexo que regula a interação de actina e miosina e, por isso, a contração cardíaca e que são sequências de diferentes aminoácidos codificados por diferentes genes e são distintas das troponinas encontradas no músculo-esquelético. Há três troponinas: I, T e C, no entanto, esta última, por não ser específica do músculo cardíaco, não é útil para o diagnóstico.

As concentrações de troponina são praticamente indetetáveis no soro dum individuo saudável e, por isso, após lesão do miocárdio, enfarte agudo, observa-se um ligeiro aumento a partir das 4-6h após a lesão. São encontradas tanto nos tecidos como no soro e podem permanecer aumentadas de 4 a 14 dias. Assim, este marcador apresenta ser o mais sensível e específico.⁴⁸

4.9 - GLICOSE E DIAGNÓSTICO DE DIABETES

Os glúcidos da dieta são digeridos no trato gastrointestinal e transformados em monossacarídeos, que são absorvidos. A glicose é o glúcido mais comum no organismo e a sua concentração resulta do equilíbrio entre a glicose da dieta e a sintetizada.⁴⁹

A diabetes *mellitus* é uma das complicações do distúrbio do metabolismo da glicose sendo, por isso, motivo de grande foco no que diz respeito ao seu diagnóstico.⁵⁰

A etiologia ainda não é totalmente conhecida mas envolve a destruição das células β dos ilhéus de Langerhans. Há autoanticorpos que afetam estas células e, por isso, a produção de insulina.⁵¹ A diabetes é resultado quer da produção de quantidade insuficiente de insulina pelo pâncreas, quer pelas células do corpo que não respondem devidamente à insulina que é

produzida; um conjunto de doenças metabólicas em que se verificam níveis altos de glicose no sangue durante um grande intervalo de tempo.

Os sintomas mais frequentes incluem a constante necessidade de urinar e o aumento da sede e da fome. Quando não é tratada, causa várias complicações agudas, nomeadamente a cetoacidose e o coma hiperosmolar hiperglicémico. A longo prazo podem surgir doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais, doença renal crónica, úlceras no pé e retinopatia diabética.

Pode-se classificar a diabetes em três tipos:

→ Diabetes *mellitus* tipo 1 que resulta da produção de quantidade insuficiente de insulina pelo pâncreas ficando os doentes sujeitos a insulino-terapia, isto é, injeções de insulina.

→ Diabetes *mellitus* tipo 2 que tem a sua origem na resistência à insulina. As células do corpo não respondem à insulina de forma correta por deficiência nos recetores e transportadores da glucose.⁵⁰ Maior propensão para pessoas obesas, e visto que o peso excessivo e a falta de exercício físico contribuem muito para esta patologia, a redução do estômago pode ser uma medida eficaz. Pode também ser tratada com medicamentos com ou sem insulina já que causam baixos níveis de glicose no sangue.

→ Diabetes gestacional, condição em que a mulher sem diabetes apresenta níveis elevados de glicose no sangue, pela primeira vez, durante a gravidez. Resolve-se por si própria após o nascimento de bebé.^{50,51}

O diagnóstico de diabetes é feito com base em diferentes parâmetros e valores (para plasma):

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

Se o indivíduo não apresentar sintomatologia o diagnóstico não deve ser realizado com base num único valor anormal de glicémia de jejum ou de HbA1c, devendo ser confirmado numa segunda análise, após uma a duas semanas.

Há ainda a possibilidade de se fazer o diagnóstico da hiperglicemia intermédia ou identificação de categorias de risco aumentado para diabetes, que se faz com base nos seguintes parâmetros:

- ❖ Anomalia da Glicemia de Jejum: glicemia em jejum ≥ 110 e < 126 mg/dl (ou $\geq 6,1$ e $< 7,0$ mmol/l);
- ❖ Tolerância Diminuída à Glicose: glicemia às 2 horas na PTGO ≥ 140 e < 200 mg/dl (ou $\geq 7,8$ e $< 11,1$ mmol/l).

O diagnóstico da diabetes gestacional usa critérios mais rigorosos:

- ❖ Glicemia em jejum, a realizar na 1^a consulta de gravidez, ≥ 92 mg/dl e < 126 mg/dl (ou $\geq 5,1$ e $< 7,0$ mmol/l);
- ❖ Glicemia em jejum < 92 mg/dl \rightarrow realiza-se PTGO com 75 g de glicose, às 24-28 semanas de gestação. É critério para diagnóstico a confirmação de um ou mais valores:
 - a. às 0 horas, glicemia ≥ 92 mg/dl (ou $\geq 5,1$ mmol/l);
 - b. à 1 hora, glicemia ≥ 180 mg/dl (ou $\geq 10,0$ mmol/l);
 - c. às 2 horas, glicemia ≥ 153 mg/dl (ou $\geq 8,5$ mmol/l).⁵⁰

5 – CONCLUSÃO

Considero que a realização deste estágio foi muito positiva e de grande utilidade num futuro profissional. Julgo que seis meses é um tempo bastante limitado para quem tem de passar por todas as valências, ainda assim, todos os objetivos que me eram propostos foram cumpridos.

Foi uma experiência positiva não só a nível profissional mas também pessoal já que, mais uma vez, tive de trabalhar em equipa e adaptar-me a ritmos de trabalho diferentes. O fato de vivenciar uma grande proximidade tanto com os colaboradores do laboratório como com utentes proporcionou uma experiência de trabalho única.

A formação teórica que tive ao longo do Mestrado pode agora ser aplicada no mundo laboral e, principalmente, contatar com novos conceitos, métodos, procedimentos e técnicas.

Serviu também para constatar que é extremamente importante ter uma visão global das áreas das análises clínicas, e que todas interagem como um todo, consciencializando-me de que os conhecimentos devem estar em permanente renovação/atualização.

O laboratório está constantemente em busca da qualidade no serviço prestado aos seus utentes, e por isso, vai implementado medidas, ano após ano, segundo as necessidades que são apresentadas, e nas diferentes valências.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- TURGEON, M. *Clinical Hematology – Theory and procedures*. Fifth Edition. Boston, Massachusetts & St. Petersburg, Florida: Wolters Kluwer, 2012. ISBN 978-1-60831-076-0 (p. 73-79)
- 2- HAFERLACH, T.; DIEM, H.; THEML, H. *Color Atlas of Hematology – Practical Microscopic and Clinical Diagnosis*. Stuttgart: Thieme, 2004. ISBN 3-13-673102-6 (p.2-11)
- 3- GREER, J et al. *Wintrobe’s Clinical Hematology*. Thirteenth Edition. Wolters Kluwer.
- 4- HOFFBRAND, A and MOSS, P. *Hoffbrand’s Essential Haematology*. Seventh Edition. West Sussex: Wiley Blackwell, 2016. ISBN 978-1-118-40867-4. (p. 1-10)
- 5- BAIN, Barbara [et al.]. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11ª Ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2011. ISBN-13: 9780702034084 (p.1-8)
- 6- Diretrizes da OMS para tiragem de sangue: boas práticas em flebotomia (p. 9-24). http://www.who.int/injection_safety/Phlebotomy-portuges_web.pdf Acedido a 03/04/2017.
- 7- BAIN, Barbara [et al.]. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11ª Ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2011. ISBN-13: 9780702034084 (p.24-51)
- 8- TURGEON, M. *Clinical Hematology – Theory and procedures*. Fifth Edition. Boston, Massachusetts & St. Petersburg, Florida: Wolters Kluwer, 2012. ISBN 978-1-60831-076-0 (p. 431-437)
- 9- HOFFBRAND, A and MOSS, P. *Hoffbrand’s Essential Haematology*. Seventh Edition. West Sussex: Wiley Blackwell. 2016. ISBN 978-1-118-40867-4. (p. 12-25)
- 10- TURGEON, M. *Clinical Hematology – Theory and procedures*. Fifth Edition. Boston, Massachusetts & St. Petersburg, Florida: Wolters Kluwer, 2012. ISBN 978-1-60831-076-0 (p. 235-247)
- 11- HOFFBRAND, A and MOSS, P. *Hoffbrand’s Essential Haematology*. Seventh Edition. West Sussex: Wiley Blackwell. 2016. ISBN 978-1-118-40867-4. (p. 88-100)
- 12- BAIN, Barbara [et al.]. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11ª Ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. 2011. ISBN-13: 9780702034084 (p.70-98)
- 13- HOFFBRAND, A.; PETTIT, J and VYAS, P. *Color Atlas of Clinical Hematology*. Fourth Edition. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2010. ISBN: 978-0-323-04453-0 (p. 50-57)
- 14- HOFFBRAND, A and MOSS, P. *Hoffbrand’s Essential Haematology*. Seventh Edition. West Sussex: Wiley Blackwell, 2016. ISBN 978-1-118-40867-4. (p. 103-114)
- 15- HOFFBRAND, A and MOSS, P. *Hoffbrand’s Essential Haematology*. Seventh Edition. West Sussex: Wiley Blackwell, 2016. ISBN 978-1-118-40867-4. (p. 265-277)
- 16- HAYHOE, F. and FLEMANS, R. - *A color atlas of haematological cytology*. Weert: Wolfe Medical Publications, 1982. ISBN: 0-7234-0985-4
- 17- Instruções May Grunwald - http://www.bioclin.com.br/sitebioclin/wordpress/wp-content/uploads/arquivos/instrucoes/INSTRUCOES_MAY_GRUNWALD.pdf. Acedido a 03/05/2017
- 18- HOFFBRAND, A and MOSS, P. *Hoffbrand’s Essential Haematology*. Seventh Edition. West Sussex: Wiley Blackwell, 2016. ISBN 978-1-118-40867-4. (p. 279-289)
- 19- Gualandro, S.; *Tratado de Hematologia – Análise do Exame Hematológico: alteração dos eritrócitos*. Cap 84. Acedido a 03/07/2017 <https://edisciplinas.usp.br/mod/resource/view.php?id=1778359>

- 20- TURGEON, M. Clinical Hematology – Theory and procedures. Fifth Edition. Boston, Massachusetts & St. Petersburg, Florida: Wolters Kluwer, 2012. ISBN 978-1-60831-076-0 (p. 126-137)
- 21- TURGEON, M. Clinical Hematology – Theory and procedures. Fifth Edition. Boston, Massachusetts & St. Petersburg, Florida: Wolters Kluwer, 2012. ISBN 978-1-60831-076-0 (p. 399-424)
- 22- BAIN, Barbara [et al.]. Dacie and Lewis Practical Haematology. 11^a Ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2011. ISBN-13: 9780702034084 (p.395-401)
- 23- TURGEON, M. Clinical Hematology – Theory and procedures. Fifth Edition. Boston, Massachusetts & St. Petersburg, Florida: Wolters Kluwer, 2012. ISBN 978-1-60831-076-0 (p. 498-518)
- 24- BAIN, Barbara [et al.]. Dacie and Lewis Practical Haematology. 11^a Ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2011. ISBN-13: 9780702034084 (p. 101-105)
- 25- Ullah, Z. et al - Evaluation of five discriminating indexes to distinguish Beta-Thalassemia Trait from Iron Deficiency Anaemia. JPMA (2016) 66:1627
- 26- JONES, A. In BAYNES, J. and DOMINICZAK, M.; Medical Biochemistry. Second Edition. Elsevier Mosby: Philadelphia. 2005. ISBN: 0 7234 3341 0 (p.399-412)
- 27- Livro de apresentação do PNAEQ <http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ApoioTecnico/PNAEQ/Documents/Livro%20de%20apresenta%C3%A7%C3%A3o%20-%20LivAp.pdf>. Acedido dia 27/04/2017
- 28- KLEE, G. and WESTGARD, J. – Quality Management. In BURTIS, C. and BRUNS, D. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 7th edition. Saunders Elsevier: St Louis, Missouri, 2015. ISBN: 978-1-4557-4165-6 (p. 90-104)
- 29- REMALEY, A; RIFAI, N and WARNICK, R. – Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins and other cardiac risk factos. In BURTIS, C and BRUNS, D. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 7th edition, Saunders Elsevier: St Louis, Missouri, 2015. ISBN: 978-1-4557-4165-6 (388-410)
- 30- Norma da Direção-Geral de Saúde, Abordagem Terapêutica das Dislipidémias no Adulto, 019/2011 (atualizada a 15/15/2017)
- 31- KAPLAN, L and PESCE, A. Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation, Fifth Edition. Mosby Elsevier: Missouri, 2010. ISBN: 978-0-323-03658-0
- 32- DONATELLA, G. [et al] - Changes of Bone Turnover Markers in Long Bone Nonunions Treated with a Regenerative Approach. Stem Cells International Volume (2017). 11 pages.
- 33- JONES, A. In BAYNES, J. and DOMINICZAK, M. – Medical Biochemistry. Second Edition. Elsevier Mosby: Philadelphia, 2005. ISBN: 0 7234 3341 0 (p. 399-412)
- 34- DUFOUR, D. – Liver Disease In BURTIS, C and BRUNS, D. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular diagnostics. 7th edition, Saunders Elsevier: St Louis, Missouri, 2015. ISBN: 978-1-4557-4165-6 (412-428)
- 35- KOOLMAN, J and ROEHM, K. Color Atlas of Biochemistry, Second Edition. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2005. ISBN 3-13-100372-3
- 36- Norma da Direção-Geral de Saúde, Indicações para Prescrição do Ionograma, 070/2011
- 37- SCOTT, M. et al. – Electrolytes and Blood Gases. In BURTIS, C and BRUNS, D. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular diagnostics. 7th edition, Saunders Elsevier: St Louis, Missouri, 2015. ISBN: 978-1-4557-4165-6 (412-428)

- 38- GAW, A. et al. Clinical Biochemistry – An illustrated colour text. Fifth edition. Churchill Livingstone Elsevier, 2013. ISBN: 978-0-7020-5179-1 (p. 14-25)
- 39- GAW, A. et al. Clinical Biochemistry – An illustrated colour text. Fifth edition. Churchill Livingstone Elsevier, 2013. ISBN: 978-0-7020-5179-1 (p. 70-75)
- 40- PINHEIRO, J. - Pedido de Consulta ao Colégio de Biologia Humana e Saúde da Ordem dos Biólogos (CBHS/OBIO) sobre a fórmula de Cálculo da Osmolalidade Urinária. http://ordembilogos.pt/wp-content/uploads/2015/11/C%C3%A1lculo-da-Osmolalidade-Urinaria_v1_Out2015.pdf (Acedido a 11/08/17)
- 41- SACHER, R and MCPHERSON, R. - Widmann: Interpretação clínica dos exames laboratoriais. Manole, São Paulo, 11ª, 2002. ISBN: 85-204-1231-9
- 42- XIA, F. [et al.] - Impact of microalbuminuria on incident coronary heart disease, cardiovascular and all-cause mortality: a meta-analysis of prospective studies, Int J Clin Exp Med (2015) 8(1):19.
- 43- HILL, P. – Gastrointestinal and Pancreatic Diseases. In BRUTIS, C and BRUNS, D. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular diagnostics. Seventh Edition. Elsevier Saunders: St Louis, Missouri, 2015. ISBN: 978-1-4557-4165-6 (p. 724-740)
- 44- PANTEGHINI, M. and BAIS, R.– Serum Enzymes. In BRUTIS, C and BRUNS, D. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular diagnostics. Seventh Edition. Elsevier Saunders: St Louuis, Missouri, 2015. ISBN: 978-1-4557-4165-6 (p. 318-335)
- 45- Amilase: LabTest - <http://www.labtestsonline-pt.org/tests/Amylase.html?tab=3> (Acedido a 11/08/17)
- 46- HIGGINS, T. et al. – Hemoglobin, Iron and Bilirubin. In BURTIS, C. and BRUNS, D. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular diagnostics. 7th edition. Elsevier Saunders: St Louis, Missouri, 2015. ISBN: 978-1-4557-4165-6 (p.499-519)
- 47- GKAMPRELA, E.; DEUTSCH, M. and PECTASIDES, D. - Iron deficiency anemia in chronic liver disease: etiopathogenesis, diagnosis and treatment. Ann Gastroenterol (2017) 30(4):405-413
- 48- APPLE, F.; GOETZE, J. and JAFFE, A. – Cardiovascular Disease. In BURTIS, C and BRUNS, D. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular diagnostics. 7th edition. Elsevier Saunders, St Louis, Missouri, 2015. ISBN: 978-1-4557-4165-6 (p. 632-648)
- 49- GAW, A. et al. Clinical Biochemistry – An illustrated colour text. Fifth edition. Churchill Livingstone Elsevier: Glasgow, 2013 ISBN: 978-0-7020-5179-1 (p. 56-57; 60-61)
- 50- Norma da Direção-Geral de Saúde, Diagnostico e classificação da diabetes mellitus, N°002/2011
- 51- KATSAROU, A. [et al] - Type I diabetes mellitus, Nat Rev Dis Primers (2017) 3:17016

7 - ANEXOS

Anexo I - Valores de referência do hemograma

Parâmetro	Valores de referência
RBC	Mulheres: $3.8-4.8 \times 10^{12}/L$
	Homens: $4.5-5.5 \times 10^{12}/L$
Hb	Mulheres: 12-15 g/dL
	Homens: 13-17 g/dL
Hct	Mulheres: 36-46 %
	Homens: 40-50 %
VCM	83-101 fL
RDW	<15 %
HCM	27-32 pg
CHCM	31.5-34.5 g/L
RET	$50-100 \times 10^9/L$
WBC	$4.0-11.0 \times 10^9/L$
Neutrófilos	$2.0-7.0 \times 10^9/L$ (40-80%)
Linfócitos	$0.60-3.50 \times 10^9/L$ (20-40%)
Monócitos	$0.0-1.0 \times 10^9/L$ (2-10%)
Eosinófilos	$0.0-0.7 \times 10^9/L$ (1-6%)
Basófilos	$0.0-0.2 \times 10^9/L$ (<2%)
PLT	$150-400 \times 10^9/L$

Anexo II – Valores de referência da hemoglobina A1 glicada

Valor HbA1c (%)	Diagnóstico
<5.7	Normal
5.7 - 6.4	Pré diabetes
≥6.5	Diabetes

Anexo III – Valores de referência do estudo da coagulação

Parâmetro	Valores de referência
TP	Depende do valor do controle
TTPA	<35 seg
Fibrinogênio	150-400 mg/dL
INR	1-2

Anexo IV – Valores de referência dos marcadores analisados no setor da Bioquímica

Parâmetro	Valor de referência
Ácido Úrico	Mulheres: 1.5-6.0 mg/dL
	Homens: 3.5-7.2 mg/dL
Albumina	3.5-5.0 g/dL
Albumina de baixa concentração	<30 mg/24h (urina)
Amílase	25-125 U/L
Alanina Aminotransferase	0-55 U/L
Aspartato Aminotransferase	5-34 U/L
Bilirrubina Direta	0-0.5 mg/dL
Bilirrubina Total	0,2-1.2 mg/dL
Cálcio	2.10-2.55 mmol/L
Cloreto	98-107 mmol/L
Colesterol Total	0-199 mg/dL
Colesterol HDL	40-60 mg/dL
Colesterol LDL	<100 mg/dL

Creatinina	Mulheres: 0.6-1.1 mg/dL
	Homens: 0.7-1.3 mg/dL
Creatina Cinase	Mulheres: 29-168 U/L
	Homens: 30-200 U/L
Creatina Cinase MB	<25 U/L
Ferro	Mulheres: 25-156 ug/dL
	Homens: 31-144 ug/dL
Fosfatase Alcalina	40-150 U/L
Fósforo	2.5-5 mg/100mL
Gama GT	Mulheres: 9-36 U/L
	Homens: 12-64 U/L
Glicose	70-109 mg/dL
Lactato Desidrogenase	125-220 U/L
Magnésio	1.6-2.6 mg/dL
Osmolalidade	275-300 mOsm/kg
Proteínas Totais	6.4-8.3 g/dL
Potássio	3.4-5.1 mmol/L
Sódio	136-145 mmol/L
Triglicerídeos	<149 mg/dL
Troponina	<30 ug/L
Ureia	2-34 mg/dL (até 1 ano de idade) 8-36 mg/dL (1-13 anos) 15-40 mg/dL (adultos)

Anexo V – Metodologia de detecção usada nos marcadores bioquímicos analisados

Parâmetro	Método
Ácido Úrico	Espectrofotometria
Albumina	Espectrofotometria
Albumina de baixa concentração	Imunoturbidimetria
Amilase	Espectrofotometria
Alanina Aminotransferase	Espectrofotometria
Aspartato Aminotransferase	Espectrofotometria
Bilirrubina Direta	Espectrofotometria
Bilirrubina Total	Espectrofotometria
Cálcio	Espectrofotometria
Cloreto	Potenciometria
Colesterol Total	Espectrofotometria
Colesterol HDL	Espectrofotometria
Creatinina	Espectrofotometria
Creatina Cinase	Espectrofotometria
Creatina Cinase MB	Espectrofotometria
Ferro	Espectrofotometria
Fosfatase Alcalina	Espectrofotometria
Fósforo	Espectrofotometria
Gama GT	Espectrofotometria
Glicose	Espectrofotometria
Lactato Desidrogenase	Espectrofotometria
Magnésio	Espectrofotometria
Proteínas Totais	Espectrofotometria
Potássio	Potenciometria
Sódio	Potenciometria

Triglicerídeos	Espectrofotometria
Troponina	Imunoturbidimetria
Ureia	Espectrofotometria