



Rúben Freitas Alves

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa e pela Doutora Helena Manuela Gouveia da Cunha Leal e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Março de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Rúben Freitas Alves

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa e pela Doutora Helena Manuela Gouveia da Cunha Leal e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Fevereiro de 2017



Eu, Ruben Freitas Alves, estudante do Mestrado em Análises Clínicas, com o nº 2009027592, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do presente relatório de estágio apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão de outrem, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia deste relatório, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, de Março de 2017

(Rúben Freitas Alves)

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

ORIENTADORES:

Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa

Doutora Helena Manuela Gouveia da Cunha Leal

Agradecimentos

Começo por agradecer aos meus pais pela perseverança e apoio incondicional que me permitiu terminar esta página da minha vida.

Aos meus amigos, que me apoiaram no dia a dia, ajudando a manter os meus olhos sempre no futuro.

À Raquel Catrau, minha namorada, um especial obrigado por acreditar em mim e me motivar quando já eu tinha perdido um pouco o meu caminho.

Ao Alexandre Nery, um muito obrigado, por uma amizade que parece ser de infância, que sempre me motivou, ajudou e me apoiou até à conclusão desta fase.

Por fim um obrigado a todos aqueles que se cruzaram no meu percurso académico, colegas, amigos, professores e orientadores, que me proporcionaram o crescimento necessário para atingir esta meta.

Índice Geral

Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	ix
Capítulo 1 – Introdução.....	1
Capítulo 2 – Caracterização do laboratório de estágio.....	3
Capítulo 3 – Controlo de Qualidade	9
3.1 Controlo de Qualidade Interno	9
3.2 Avaliação Externa de Qualidade.....	10
Capítulo 4 – Atividades desenvolvidas.....	13
4.1 Imunologia.....	13
4.2 Microbiologia.....	13
4.3 Hematologia.....	14
4.3.1 Hematopoiese.....	14
4.3.2 Determinações analíticas da hematopoiese	19
4.3.3 Hemóstase.....	24
4.3.4 Outras determinações hematológicas.....	26
4.4 Bioquímica	27
4.4.1 Provas bioquímicas da função hepática.....	27
4.4.2 Provas bioquímicas da função renal	31
4.4.3 Provas bioquímicas da função pancreática	34
4.4.4 Diagnóstico e monitorização da Diabetes mellitus	34
4.4.5 Provas bioquímicas para a avaliação de risco cardiovascular	35

4.4.6	Provas bioquímicas para o estudo da hematopoiese	37
4.4.7	Provas bioquímicas reumáticas	39
4.4.8	Íons	39
4.4.9	Proteinograma eletroforético.....	42
Capítulo 5	— Conclusão	45
Bibliografia	47

RESUMO

O presente relatório de estágio pretende descrever as atividades que acompanhei e realizei durante os seis meses de estágio curricular, realizado no Coimbralab – Laboratório de Análises Clínicas Cruz de Celas LDA., no âmbito do curso de Mestrado em Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

O estágio teve como objetivo a integração na atividade profissional das análises clínicas, proporcionando oportunidades para adquirir experiência na execução de técnicas laboratoriais, que compõem as valências lecionadas no decorrer do curso: Bioquímica, Imunologia, Microbiologia e Hematologia. Para além disso, aprofundi o meu conhecimento teórico nestas áreas ao acompanhar a interpretação dos resultados e validação biopatológica.

As valências desenvolvidas neste relatório são a Hematologia e a Bioquímica.

Na Hematologia, foi desenvolvido fundamento teórico das análises realizadas nesta área do Coimbralab, obtido através da bibliografia consultada e no conhecimento obtido durante o estágio. Com esse objetivo foco nesse capítulo as populações quantificadas e observadas no sangue periférico e nos processos da hemóstase.

Na Bioquímica, é desenvolvido o método de deteção dos testes bioquímicos em questão e o interesse clínico que estes têm ao serem estudados, isto baseado na bibliografia disponível.

No final do relatório, como conclusão, é realizado um balanço geral do estágio e do próprio mestrado, indicando na minha perspetiva os aspetos fortes e fracos desta experiência, identificando possíveis pontos a melhorar no meu relatório para melhor exercer funções como profissional de Análises Clínicas.

ABSTRACT

This report shows the activities which I observed and performed in 6 months of curricular internship, held at the Coimbralab — Laboratório de Análises Clínicas Cruz de Celas LDA., in the context of the Master in Clinical Analysis of the Pharmacy Faculty of Coimbra University.

The internship was aimed at integration in the professional activity of clinical analysis, providing opportunities to earn experience in the execution of laboratory techniques, which make up the core topics taught throughout the course: Biochemistry, Immunology, Microbiology and Haematology. In addition, I further developed my knowledge in these fields by following up the interpretation of results and their validation.

The fields developed in this report are Haematology and Biochemistry.

In the field of Haematology, it's described the tests performed in Coimbralab, with basis on the referenced bibliography and in the knowledge acquired during the internship. It's focused in this chapter the theoretical concepts about the cell populations studied and quantified in the peripheral blood and about the biochemical process involved in the study of haemostasis.

In Biochemistry, it's described the method of quantification of the biochemical tests practiced in the lab and their clinical interest.

At the end of this report, for its conclusion, I'll make a summary and balance of this internship and master's degree, stating my perspective on the strong and weak points of this experience and identifying new ways to improve my abilities to work in the future as a Clinical Analysis professional.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferenciação da Hematopoiese.....	14
Figura 2 - Células eritróides.....	15
Figura 3 - Produção de plaquetas.....	16
Figura 4 - Fases de maturação das células da linhagem granulocítica.....	17
Figura 5 - Fases de maturação do monócito.....	18
Figura 6 - Formas observáveis de linfócitos no sangue periférico.....	19
Figura 7 – Esfregaço de sangue periférico.....	20
Figura 8 - a) exemplo de uma plaqueta gigante; b) agregação plaquetar.....	22
Figura 9 – Exemplos de alterações morfológicas nos leucócitos.....	23
Figura 10 - Exemplo de reticulócitos.....	23
Figura 11- Cascata de coagulação.....	24
Figura 12- Exemplos de resultados em cartão.....	27
Figura 13 – Perfil electroforético em placa de acetato de celulose e gráfico representativo dos picos de cada fração de proteínas.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Equipamentos utilizados no Coimbralab.....	5
Tabela 2 - Contagens sanguíneas normais de leucócitos.....	17
Tabela 3 - Valores de referência para um hemograma do aparelho ABX Pentra 80.....	20
Tabela 4 – Alterações morfológicas do eritrócito observáveis no sangue periférico.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

IAPMEI — Instituto de Apoio de Pequenas e Médias empresas

PME — Pequenas e Médias Empresas

SI — Sistema Informático

CQI — Controlo de Qualidade Interna

PT — Tempo de Protrombina

PTT — Tempo de Tromboplastina parcialmente activado

PCR — Proteína C Reactiva

HDL — Lipoproteína de alta densidade

LDL — Lipoproteína de baixa densidade

ALT — Alanina aminotransferase

AST — Aspartato aminotransferase

CK — Creatina quinase

FA — Fosfatase Alcalina

GGT — γ -glutamiltransferase

LDH — Lactato desidrogenase

DTA — Directora Técnica Adjunta

TSC — Técnico superior de laboratório

AEQ — Avaliação externa da qualidade

PAEQ — Programa da avaliação externa de qualidade

Ac — Anticorpo

Ag — Antigénio

FSH — Hormona foliculo-estimulante

LH — Hormona luteinizante

PTH — Hormona paratiroideia

TSH — Hormona estimulante da tiróide

T4/FT4 — Tiroxina/Tiroxina livre

T3/FT3 — Triiodotironina/ Triiodotironina livre

AFP — α -fetoproteína

RNA — Ácido ribonucleico

DNA — Ácido desoxirribonucleico

INR – Razão normalizada internacional
ISI – Index de sensibilidade internacional
MDH – Malato-desidrogenase
NAD – Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADH – NAD na forma reduzida
ALP – Fosfatase alcalina
TFG – Taxa de filtração glomerular
GLDH – Glutamato desidrogenase
HbA1c – Hemoglobina glicosilada
HK – Hexoquinase
G-6-PD – Glicose – 6 – fosfato desidrogenase
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
TG – Triglicéridos
LDH – Lactato desidrogenase
CTTF – Capacidade total de fixação do ferro
TGB – Globulina ligadora de tiroxina
IgA – Imunoglobulina A
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M

CAPÍTULO I — INTRODUÇÃO

O estágio curricular, como a última fase da formação do mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, tem por objetivo preparar o estudante para o mundo profissional das análises clínicas. A principal nota caracterizadora deste estágio curricular prende-se com o seu carácter profissional, focando em introduzir o estudante (estagiário) em todas as vertentes da prática laboratorial, especialmente a execução das mesmas e a interpretação dos resultados obtidos, finalizando com a consolidação de conceitos teóricos aprendidos no decorrer do mestrado.

O Coimbralab executa análises nas valências de Bioquímica, Hematologia, Microbiologia e Imunologia/Endocrinologia. De acordo com o plano do estágio, foi-me permitido acompanhar todas estas áreas que se focam e compõem a fase analítica do fluxo de trabalho no laboratório. Com o intuito de complementar a minha aprendizagem com todas as etapas desenvolvidas no laboratório, também acompanhei a fase pré-analítica, composta pelo atendimento e receção do utente, colheita e transporte da amostra, e a fase pós-analítica, composta pela interpretação de resultados, validação biopatológica e seguimento do boletim de análises obtido.

Neste relatório serão abordados mais extensivamente as valências de Hematologia e Bioquímica, onde será apresentado os métodos laboratoriais mais preponderantes no fluxo de trabalho, para além do interesse clínico de cada análise para avaliação do estado de saúde do doente.

Será ainda abordada a implementação do Sistema de Gestão de Qualidade, nota caracterizadora do Coimbralab. De forma a manter e a melhorar esta sua nota caracterizadora, o Coimbralab promove auditorias internas e externas, as quais pude presenciar, e premiaram o laboratório com a certificação pela NP EN ISO 9001:2015 e pela Norma para o Laboratório Clínico 2015 da Ordem dos Farmacêuticos, sendo o primeiro laboratório de Portugal a obter estes certificados pela Apcer.

CAPÍTULO 2 — CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O Coimbralab - Laboratório Cruz de Celas iniciou a sua atividade a 16 de Maio de 1984, sob a direção técnica da Dra. Helena Cunha Leal, no local que é atualmente o posto de colheitas de Celas. Em 2000, com vista a expansão e a modernização da imagem da empresa, o Laboratório Cruz de Celas regista a marca Coimbralab e muda a sua sede para o Vale das Flores, apostando simultaneamente na abertura de novos postos de colheita.

Nos 10 anos que se seguem, o Coimbralab continua a expandir-se e obtém a Dupla Certificação (Normas NP EN ISO 9001 e Norma para Laboratório Clínico) em 2002, atestando a sua qualidade e rigor nos serviços prestados. O Coimbralab apostou também na sua plataforma digital, publicando online a sua página do Facebook, website, newsletter e promovendo o envio de boletins por SMS ou Correio eletrónico, facilitando a proximidade com os seus utentes.

Atualmente, o Coimbralab encontra-se duplamente certificado pelas Normas para Laboratório Clínico 2015 da Ordem dos Farmacêuticos e pela Norma NP EN ISO 9001:2015. Para além disso, foi-lhe atribuído pelo Instituto de Apoio às Pequenas e Médias Empresas e à Inovação (IAPMEI) a certificação Pequena e Média Empresa (PME) Líder 2016, dada a sua gestão e indicadores económico-financeiros e pretende também obter a certificação de PME Excelência 2016. A sede atual do Coimbralab situa-se na seguinte morada: Rua Augusto Marques Bom, Lote 7, Lojas 4 e 7, 3030-218 Coimbra.

A Diretora Técnica do Coimbralab é a Dr.^a Helena Cunha Leal, sendo Especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos.

O Coimbralab, para além do seu laboratório central, possui também outros postos de colheita de amostras localizadas em Coimbra e seus arredores: Brasfemes, Cruz de Celas, Figueira do Lorvão, Lousã, Penacova, Santa Clara, S. Martinho do Bispo, Taveiro e Vila Nova de Poiares. Além destes postos de colheita, o Coimbralab tem acordos com várias empresas no âmbito da medicina no trabalho e com lares, para a realização de análises dos seus utentes. Simultaneamente, possui também serviço de colheitas ao domicílio, para utentes que tenham dificuldade em deslocar-se até ao laboratório ou postos.

O laboratório central do Coimbralab está dividido fisicamente e funcionalmente em 3 grandes áreas:

- Receção e atendimento (fase pré-analítica)
- Área Laboratorial (fase analítica e pós-analítica)
- Área administrativa (gestão, administração e finanças)

Elaborando o fluxo de trabalho, o utente chega ao laboratório, ou a um dos seus postos de colheitas, e é atendido por um/a dos/as rececionistas. É efetuada a inscrição no sistema informático (SI), com a confirmação dos dados do utente e da requisição e algumas questões relacionadas com as análises pedidas (jejum, modo de colheita, medicação, etc.). É atribuído um número de seriação que será impresso em todas as etiquetas da amostra, cada etiqueta com um sufixo específico do sector onde a análise será realizada (U0 — urina, H0 — hematologia, I0 — imunologia, etc.) e um código de barras correspondente. O utente é chamado por um técnico de colheitas que o dirige à sala de colheitas. É confirmado novamente a

identificação do utente e das análises pedidas para efetuar a colheita das amostras adequadas. O técnico escolhe e identifica com a respetiva etiqueta, cada tubo/contentor que será necessário e inicia a colheita.

Após a colheita, os tubos/contentores são transportados para a zona de triagem já no interior da área laboratorial. As amostras colhidas dos postos de colheita são transportadas em malas térmicas, sempre com a temperatura controlada. Quando a mala térmica (que tem um termómetro incorporado), chega a zona de triagem, o técnico de colheita responsável comunica qualquer informação que seja relevante sobre as amostras que está a entregar e regista a temperatura da mala num documento que será mais tarde transcrito para o sistema informático.

Na zona de triagem, é dada a entrada da amostra no sistema informático com um leitor ótico de código de barras que a identifica. O técnico verifica as condições em que chegam as amostras em termos de quantidade, qualidade, contaminação e se será o tipo de amostra/tubo correto para a análise requisitada. Realiza-se a centrifugação dos tubos de soro/plasma. Por fim, as amostras são colocadas em suportes comuns das várias valências para onde serão encaminhadas, com o objetivo da realização das várias análises.






Devido à otimização do trabalho pelo sistema informático, as amostras são colocadas nos respetivos equipamentos, que por sua vez identificam os tubos pelos seus códigos, automatizando o trabalho. As análises manuais são realizadas na banca da área do laboratório. Os equipamentos enviam automaticamente os resultados para o sistema informático, onde o técnico superior realiza a validação técnica dos resultados com base nos valores de referência e no histórico dos utentes. Qualquer valor suspeito ou discordante é confirmado com uma repetição na própria amostra.





Após a validação técnica, os resultados são enviados e agrupados num boletim de análises que fica disponível para aprovação da diretora técnica. É realizada a validação biopatológica, onde são validados novamente os resultados, tendo em conta todo o quadro clínico e histórico disponível do utente.

De imediato os boletins são impressos e introduzidos em envelopes, para serem encaminhados à receção ou para o posto de colheita onde serão levantados ou, caso seja pedido pelo utente, estes poderão ser enviados por correio eletrónico.

Do ponto de vista da automatização, o Coimbralab possui vários equipamentos para a realização rápida das suas análises, que estão descritos na seguinte tabela I.

Tabela 1 - Equipamentos utilizados no Coimbralab

Nome Equipamento e Fornecedor	Tipo de Prova	Imagem
ABX Pentra 80 da Horiba	Hemograma	
Adams HA-8160 da A. Menarini	Hemoglobina glicada	
AU680 Chemistry System da Beckman Coulter	Bioquímica	
Aution Max AX-4280 da A. Menarini Diagnostics	Urina tipo II	
Architect i2000sr da Abbot Diagnostics	Imunologia/Endocrinologia	
ID - Centrifuge 12s II da Diamed	Grupo sanguíneo/Coombs Indirecto	

Microtech 648 ISO da Interlab	Eletroforese	
Thrombolyzer XR da Behnk Electronics	Coagulação	
Vesmatic 30 da A.Menarini Diagnostics	Velocidade de sedimentação globular	
Vitek 2 compact da bioMérieux	Identificação/susceptibilid ade bacteriana	

Para além dos descritos na tabela, no laboratório central, o Coimbralab também dispõe de outros equipamentos essenciais: 2 centrifugadoras, 2 microscópios, 3 estufas, 5 frigoríficos e micropipetas. As micropipetas são calibradas anualmente pela empresa acreditada Normalab, e os equipamentos de armazenamento ou incubação são controlados por um Data-Logger (registador) que mede as suas temperaturas diariamente e são descarregadas semanalmente no sistema informático (SI). Para garantir que os registadores estão a medir corretamente, um segundo Data-Logger (“Joker”), que é calibrado anualmente pela empresa acreditada Catim, alterna semanalmente entre os vários equipamentos.

A maior parte das análises do Coimbralab são realizadas no laboratório central. Aquelas que não podem ser realizadas neste, são enviadas no próprio dia para um laboratório subcontratado (CERBA) por uma transportadora profissional. Este procedimento ocorre da seguinte forma:

- Na inscrição, qualquer análise que seja de serviço externo, inicia automaticamente uma requisição para enviar e realizar aquela análise no laboratório subcontratado;
- Na colheita, as amostras são identificadas com o sufixo correspondente ao serviço externo na etiqueta (exemplos: -HE, -BE, IE);

- Na triagem, as amostras são separadas (e congeladas se necessário) para outro tubo, no caso do soro/plasma, de acordo com o Manual de Colheitas do laboratório subcontratado, permanecendo os tubos primários no laboratório até 3 dias após a saída dos resultados;
- O envio do serviço externo realiza-se ao imprimir duas cópias da Lista do Exterior, uma para enviar junto as amostras, e uma para guardar em Arquivo;
- As amostras refrigeradas são acondicionadas num saco hermeticamente selado com a Lista do exterior, que por sua vez é inserido noutra saco de transporte, onde se coloca gelo, para manter as condições de temperatura (sempre que se envia amostras congeladas, o laboratório terá de solicitar o contentor de gelo seco, ficando as amostras a aguardar a chegada do referido contentor);
- A recolha é feita diariamente de Segunda-Feira a Sexta-Feira, e são enviadas de avião para o laboratório subcontratado em Barcelona;
- Os resultados são obtidos via web, são impressos, sendo de seguida introduzidos no SI e arquivados em pasta própria.

A unir todos estes passos temos o já referido sistema informático. Este está presente em todos os passos do fluxo de trabalho do laboratório, desde a inscrição, questões relacionadas com análise que se deve colocar aos utentes, passando pela impressão das etiquetas, entrada das amostras na fase de triagem, elaboração automática das listas de trabalho e produtos em falta, cartas de controlo dos equipamentos, receção e introdução automática e manual de resultados, a sua validação e impressão, e por fim faturação. Isto permite uma fácil e rápida transição entre os processos uma vez que estão todos integrados no mesmo programa, para além de permitir a rastreabilidade de todas as fases (pré-analítica, analítica, pós-analítica). Todas as informações ficam também arquivadas no sistema informático. Para além deste programa, o Coimbralab criou uma interface própria onde pode facilmente através de um menu comum aceder a todos os documentos e procedimentos que fazem parte do seu Sistema de Gestão e Comissão da Qualidade. A partir desta interface, o usuário poderá aceder facilmente às normas em vigor, documentos de controlo de stock, procedimentos técnicos, arquivos, inquéritos, entre outros.

O Coimbralab dá uma grande importância ao reconhecimento do rigor e qualidade do seu serviço. Com esse objetivo desde cedo procurou implementar o seu Sistema de Gestão e Qualidade, obtendo assim a sua 1ª certificação para a NP EN ISO 9001:2002 pela APCER, e em 2003 a Certificação para a Norma para Laboratório Clínico, pela Ordem dos Farmacêuticos, ficando desde então Duplamente Certificada. Em 2009 faz a sua 1ª transição para as normas ISO 9001:2008 e NLC:2008, e por fim, em 2016, realizou a sua 2ª transição para as normas ISO 9001:2015 e NLC:2015, tornando-se no 1º laboratório no país a implementar e obter a certificação pelas mais recentes normas.

CAPÍTULO 3 — CONTROLO DE QUALIDADE

3.1 Controlo de Qualidade Interno

O controlo de qualidade interno (CQI) é um passo essencial ao trabalho de qualquer laboratório, especialmente daquele que pretende atingir níveis mais elevados de rigor das análises realizadas. O CQI garante a reprodutibilidade dos resultados e a deteção de não conformidades, que são corrigidas ainda antes da análise da primeira amostra. São realizados regularmente controlos que permitem avaliar a precisão e a exatidão dos resultados produzidos pelo equipamento.

No Coimbralab, a área laboratorial está dividida em 4 sectores funcionais, onde estão localizados os respetivos equipamentos:

- Na Hematologia tem-se disponível o ABX Pentra 80, a ID-Centrífuge 12 S II, o Vesmatic 30 e o Thrombolyzer XR;
- Na Imunologia tem-se disponível o Architect i2000 SR;
- Na Microbiologia o utilizasse o Vitek 2 Compact;
- Na Bioquímica tem-se disponível o Olympus AU680, o Microtech 648, o Adams HA-8160 e o Aution Max AX-4280.

Para a realização das análises, é necessário confirmar que os equipamentos estão a produzir resultados de confiança, pelo que a Comissão da Qualidade do Coimbralab elaborou um Plano de Ensaios de Controlo de Qualidade Interno e Externo, identificado pelo SGQ como Q14. O Controlo Interno é realizado da seguinte forma:

- Para o ABX Pentra 80 é feito o controlo de todos os seus parâmetros, que incluem os parâmetros do Hemograma, do Leucograma e das Plaquetas. É realizado o controlo diário com 2 ensaios, um ensaio de nível normal (dentro dos valores de referencia) e um segundo de nível anormal (fora dos valores de referencia, alto ou baixo, alternando quinzenalmente). É utilizado um kit controlo de sangue com três níveis diferentes (normal, alto e baixo). Todos os controlos ficam registados no SI;
- Para a ID-Centrífuge 12 S II é feito o controlo no início de cada lote para a determinação de Grupo Sanguíneo e do Teste de Coombs Indirecto. É utilizado um Kit Controlo do fornecedor e o registo é feito no folheto do Kit Controlo e no SI;
- Para o Vesmatic 30 é feito o controlo da Velocidade de Sedimentação Globular (VS) diariamente com 2 ensaios, um de nível normal e outro de nível alto. É feito com um Kit Controlo de sangue e os resultados ficam registados no SI;
- Para o Thrombolyzer é feito o controlo dos parâmetros PT e PTT. Tal como no ABX Pentra 80, são realizados 2 ensaios diariamente, um de nível normal e outro anormal. É feito com um Kit Controlo de Sangue que

inclui três níveis, um deles normal e dois altos com valores diferentes. Os resultados dos controlos ficam registados no SI;

- Para o Architect i2000 SR é feito o controlo de todos os parâmetros semanalmente;
- O Vitek 2 Compact é controlado uma vez por semana, assim como o Microtech e o Aution Max AX 4280;
- O HA 8160 é controlado diariamente por dois níveis alternados à semelhança do Pentra 80;
- O Olympus AU680 tem de ser controlado para dois tipos de amostras diferentes: soro e urina. No soro, excepto a PCR, Ferritina, Transferrina, Factor Reumatóide, Microalbuminúria, e Proteinúria que são controladas semanalmente, todos os restantes parâmetros (Albumina, Bilirrubina total, Bilirrubina direta, Cálcio, Cloro, Colesterol, HDL, LDL, Creatinina, Fosfato, Glicose, Ferro, Magnésio, Potássio, Proteínas, Sódio, Triglicéridos, Ácido úrico, Ureia, Amilase, ALT, AST, CK, FA, GGT e LDH) são controlados diariamente. Na urina os parâmetros são controlados sempre que necessários, uma vez que não são tão requisitados.

Todos os equipamentos de análise encontram-se sempre calibrados. Com este efeito, equipamentos como o Pentra 80, por exemplo, são calibrados pelo fornecedor em períodos regulares, enquanto outros, como o AU680, a calibração é da responsabilidade da Diretora Técnica Adjunta (DTA) e do Técnico Superior de Laboratório (TSL). Uma vez que os métodos podem variar, grande parte dos parâmetros são calibrados na mudança de lote ou sempre que necessário (valores anormais no controlo), enquanto o parâmetro da Creatinina necessita de calibração diária.

3.2 Avaliação Externa de Qualidade

A avaliação externa da qualidade (AEQ) tem como objetivo avaliar a reprodutibilidade dos ensaios em comparação com um laboratório de referência que realiza o programa e com os restantes laboratórios participantes.

O Coimbralab participa em programas de três organismos externos que são: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC), o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), e o Irlandox (RANDOX).

Na valência de Hematologia, as técnicas de Hematimetria (Hemograma, Leucograma e Plaquetas) e Coagulação Básica (PT e PTT) são avaliadas mensalmente. As técnicas de Morfologia Celular (Esfregaço de Sangue Periférico) e Reticulócitos Manuais, são avaliadas trimestralmente pelo o Programa da Avaliação Externa da Qualidade (PAEQ) em Hematologia Geral da SEQC.

Na valência de Imunologia e Imunoquímica, os parâmetros do Ac HIV, do Ac HBc e do Ag HBs são avaliadas num plano trimestral, e os parâmetros de Cortisol, Estradiol, Ferritina, FSH, β hCG, LH, Progesterona, Prolactina, PTH, Testosterona, TSH, T4, FT4, T3, FT3, AFP, CEA, PSA total, PSA livre, ácido fólico e vitamina B12, são avaliadas num plano mensal, ambos também do PAEQ da SEQC.

Na valência de Microbiologia, as técnicas de Identificação Bacteriana e Sensibilidade Bacteriana são avaliadas trimestralmente pelo PAEQ de Microbiologia e Serologia da SEQC. Por outro lado, a técnica de Morfologia Parasitária é

avaliada quadrimestralmente pelo Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ) em Morfologia Parasitária do INSA.

Na valência de Bioquímica, a técnica de HbA1c é avaliada mensalmente pelo programa RIQAS (Randox International Quality Assessment Scheme) da RANDOX. Por outro lado, os parâmetros de Albumina, Bilirrubina total, Bilirrubina direta, Cálcio, Cloro, Colesterol, HDL, LDL, Creatinina, Fosfato, Glicose, Ferro, Magnésio, Potássio, Proteínas, Sódio, Triglicéridos, Ácido úrico, Ureia, Amilase, ALT, AST, CK, FA, GGT e LDH, são avaliadas mensalmente pelo PAEQ da SEQC.

Em todos os casos, depois da preparação da amostra (hidratação, restituição, etc.), é realizado o ensaio como se fosse uma amostra normal, seguido da elaboração do relatório do ensaio (poderá ser automático ou manual, este último preenchendo um formulário enviado pelo respetivo programa), que é enviado para instituição responsável, sendo os resultados recebidos online.

CAPÍTULO 4 — ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Enquanto que o estágio me permitiu adquirir prática em todas as fases do processo analítico, o seu maior foco foi na fase analítica e pós-analítica. Este capítulo do relatório tem como fim desenvolver conceitos teóricos e práticos que foram utilizados no decorrer do estágio, em todas as valências, mas mais pormenorizadamente na valência de Hematologia e Bioquímica, fazendo uma breve referência às restantes. De referir que, de acordo com o plano de estágio, observei durante a primeira semana o Modus Operandi do laboratório e acompanhei durante todo o estágio o processo pré-analítico e pós-analítico. Quanto ao processo analítico, entrei num sistema rotativo de acompanhamento às diferentes valências, ficando a minha formação sob tutela do Técnico Superior de Laboratório responsável. Não obstante, mesmo durante estes períodos, pratiquei as técnicas manuais que me eram atribuídas pelo Departamento Técnico, sempre acompanhado do respetivo Técnico Superior de Laboratório.

4.1 Imunologia

O estágio nesta valência decorreu no mês de Maio de 2016. Durante este período tive a possibilidade de realizar e observar os testes de Imunologia e Alergologia feitos no laboratório, que incluem o Teste Imunológico de Gravidez, teste de Paul Bunnell, teste RA (anti-gama-globulina), reação de Weil-Felix, reação de Widal, reação de Wright, reação de Rosa Bengala, o Teste RPR e o teste de Intolerância Alimentar, sendo estes testes manuais. Por outro lado, durante o mesmo período, acompanhei as análises realizadas em soro por técnicas automáticas, as quais eram realizadas pelo equipamento Architect i2000, aprendendo o seu funcionamento e o seu programa de calibração e controlo, ambos já referidos no capítulo anterior.

4.2 Microbiologia

O estágio nesta valência decorreu no mês de Julho de 2016. Em Microbiologia, grande parte das provas são de índole bacteriológica: uroculturas, coproculturas, espermocultura, hemocultura, culturas de vários tipos de exsudatos (anal, auriculares, faríngeos, nasais, oculares, vaginais), cultura de expectoração, pús e pesquisa do *Streptococcus* b Hemolítico. Com este fim, utiliza-se diversos meios de cultura específicos consoante o tipo de cultura que se pretende realizar, incluindo: gelose CPSE, gelose de chocolate, gelose de sangue, gelose de Hektoen, gelose MacConkey, gelose de Candida, gelose Campylosel, meio Granada e meio Selenite. Quando alguma destas culturas é considerada positiva, utiliza-se o equipamento Vitek 2 Compact que identifica a bactéria e realiza os testes de sensibilidade bacteriana. Em complemento podem ser realizados também testes do tipo “API” para identificação bacteriana em casos específicos/bactérias menos comuns.

Também nesta valência são realizados os espermogramas e a pesquisa do Bacilo de Koch, a pesquisa do antígeno de *Giardia* e a pesquisa de ovos e quistos de parasitas.

4.3 Hematologia

A Hematologia é a área da ciência que estuda o sangue. Com esse fim, os estudos em Hematologia abrangem o estado normal dos elementos sanguíneos e dos órgãos hematopoiéticos, para além das doenças a eles relacionados.

Os elementos sanguíneos estudados são principalmente os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas.

A Hematologia estuda também a Hemostase, que é o conjunto de mecanismos fisiológicos por meio dos quais se faz a paragem de uma hemorragia (vasoconstrição, aderência, agregação plaquetária e coagulação).

4.3.1 Hematopoiese

Hematopoiese é o processo de formação, diferenciação e desenvolvimento das células sanguíneas e ocorre em locais diferentes consoante a idade. Na infância e no adulto, a medula óssea é o único local onde se realiza a formação, sendo que entre a nascença e dois anos, pode ocorrer na medula de praticamente todos os ossos e depois dos dois anos de idade, ocorre nas vértebras, costelas, esterno, crânio, pélvis e sacro, mas principalmente nas extremidades proximais do fêmur e úmero. ⁽¹⁾

A hematopoiese inicia-se com uma célula estaminal pluripotente, que se autorrenova e dá origem às distintas linhagens celulares (Eritrócitos, Plaquetas, Granulócitos e Linfócitos). Para a formação das diferentes linhagens que podem ser observadas na Figura 1, ocorre a diferenciação celular que é regulada por fatores de crescimento específicos, que determinam qual é a quantidade células que é formada entre as diferentes linhagens.

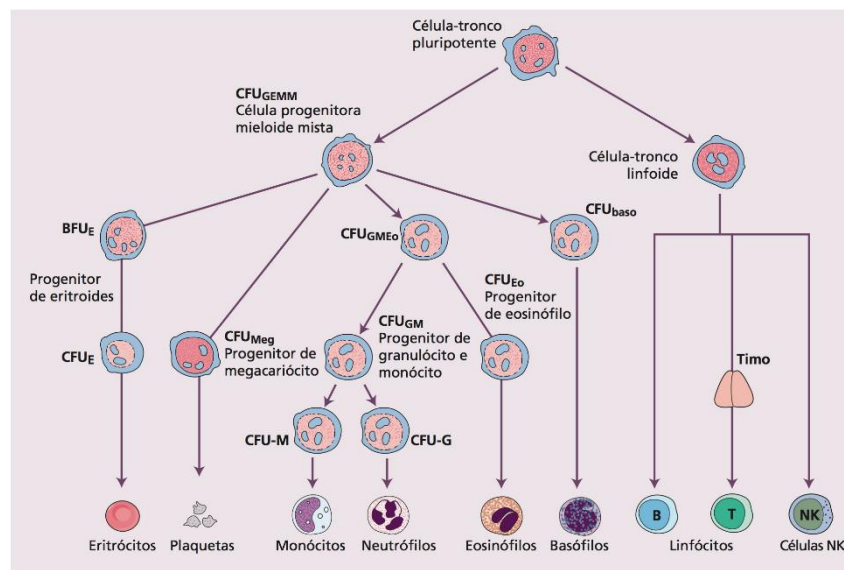


Figura 1 - Diferenciação da Hematopoiese (adaptado de Hoffbrand, A.V. and Moss, P.A.H., 2016) ⁽¹⁾

GEMM, granulócítica, eritroide, monocítica e megacariocítica; E, Eritrócito; Meg, Megacariócito; GM, Granulócito e Monócito; Eo, Eosinófilo; NK, Natural Killer Baso, Basófilo; CFU, Unidade Formadora de Colônias; BFU, Unidade formadora explosiva.

4.3.1.1 ERITRÓCITOS

Todos os dias são produzidos em torno de 10^{12} novos eritrócitos. A partir da célula estaminal, a eritropoiese passa por vários estados de células progenitoras CFU_{GEMM} , BFU_E , e CFU_E , até o primeiro precursor eritróide com estrutura identificável, o pronormoblasto.⁽²⁾

Progressivamente, por meio de várias divisões celulares, o proeritroblasto origina uma série de eritroblastos menores, mas com maior quantidade de hemoglobina no citoplasma, perdendo a sua tonalidade azul clara à medida que perde o seu RNA e os organelos e enquanto a cromatina torna-se mais condensada.

Finalmente, o núcleo é expelido do eritroblasto maduro na medula óssea, resultando no reticulócito, forma que ainda contém algum RNA ribossômico e sintetiza hemoglobina. O reticulócito fica um a dois dias na medula óssea e circula também no sangue periférico, durante um tempo semelhante, antes de amadurecer, sobretudo no baço, onde ocorre o catabolismo do restante RNA.

Surge por fim o eritrócito maduro, um disco bicôncavo, sem núcleo e coloração rósea. Células eritroides nucleadas não estão presentes no sangue periférico normal. No entanto, a sua presença ocorre se houver eritropoese fora da medula óssea e em algumas doenças da medula óssea.⁽²⁾ As diferentes fases de maturação da linhagem eritroide podem ser observadas na Figura 2.



Figura 2 - Células eritroides (fases de maturação); (adaptado de Turgeon, M.L., 2005)⁽³⁾

4.3.1.2 PLAQUETAS

As plaquetas são produzidas na medula óssea por fragmentação do citoplasma dos megacariócitos. O precursor do megacariócito (o megacarioblasto), surge por diferenciação da célula estaminal hematopoiética. O megacariócito amadurece por replicação endomitótica sincronizada, aumentando o volume do citoplasma à medida que o número dos lóbulos nucleares aumenta em múltiplos de dois, estando este processo esquematizado na Figura 3. Em torno do estágio de oito lóbulos nucleares do desenvolvimento, o citoplasma torna-se granuloso. Os megacariócitos maduros são enormes, com um único núcleo lobulado excêntrico e baixa relação núcleo-citoplasma. As plaquetas formam-se a partir da fragmentação das extremidades das

extensões do citoplasma do megacariócito, dando origem desde 1000 até 5000 plaquetas cada. O intervalo entre o início da diferenciação até a produção das plaquetas é de 10 dias em média.

O principal regulador da produção de plaquetas é a trombopoietina, constitutivamente produzida pelo fígado e pelos rins. Ela aumenta o número e o ritmo de maturação de megacariócitos ao interagir com o receptor de trombopoietina, também denominada por myeloproliferative leukemia protein (c-MPL). Por outro lado, as plaquetas também têm este receptor, que neste caso serve para remover trombopoietina da circulação. Por esta razão a trombopoietina mostra-se elevada em trombocitopenia por falta de produção de plaquetas, mas encontra-se diminuída em caso de trombocitose.

Os valores de referência para a contagem de plaquetas estão entre 150 000/ μL e 400 000/ μL e a expectativa de vida plaquetária média é sete a dez dias. Até um terço das plaquetas produzidas pela medula podem ser retidas pelo baço normal, podendo até chegar aos 90% em caso de esplenomegalia.⁽³⁾

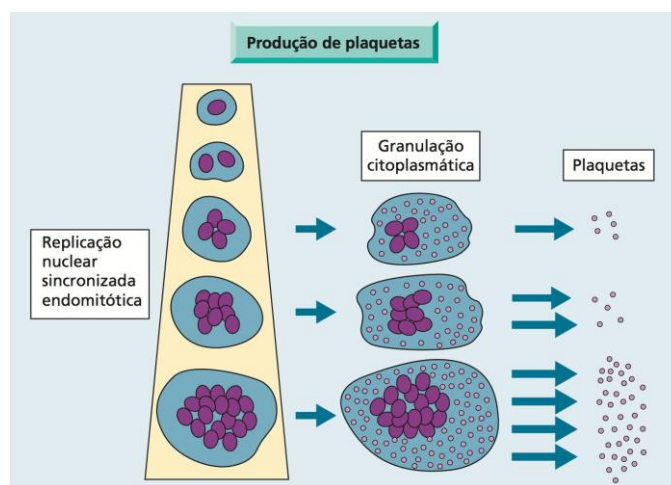


Figura 3 - Produção de plaquetas (adaptado de Hoffbrand, A.V. and Moss, P.A.H., 2016)⁽²⁾

4.3.1.3 GRANULÓCITOS E MONÓCITOS

Os leucócitos podem ser divididos em dois grandes grupos, os fagócitos e os linfócitos. Os fagócitos são as células do sistema imunitário inato, que reagem rapidamente após a infecção e os linfócitos medeiam a resposta imune adquirida, que tem por finalidade a resposta específica e a memória imunológica. Por sua vez, os fagócitos podem ser também subdivididos em granulócitos e monócitos. Os granulócitos incluem três tipos de células: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Somente células fagocíticas maduras e linfócitos estão presentes no sangue periférico normal.⁽⁴⁾

Tabela 2 - Contagens sanguíneas normais de leucócitos (adaptado de Hoffbrand, A.V. e Moss, P.A.H., 2016)⁽⁴⁾

Adultos	Contagem sanguínea	Crianças	Contagem sanguínea
Leucócitos totais	4,0-11,0 × 10 ⁹ /L*	Leucócitos totais	
Neutrófilos	2,5-7,5 × 10 ⁹ /L*	Recém-nascidos	10-25 × 10 ⁹ /L
Eosinófilos	0,04-0,4 × 10 ⁹ /L	1 ano	6-18 × 10 ⁹ /L
Monócitos	0,2-0,8 × 10 ⁹ /L	4-7 anos	6-15 × 10 ⁹ /L
Basófilos	0,01-0,1 × 10 ⁹ /L	8-12 anos	4,5-13,5 × 10 ⁹ /L
Linfócitos	1,5-3,5 × 10 ⁹ /L		

Antes de caracterizar as células, refere-se brevemente as suas formas prematuras, uma vez que a sua identificação e presença no sangue periférico pode ser indicativo de anomalias graves na medula óssea.

O mieloblasto é na sequência de maturação o precursor granulocítico mais jovem morfológicamente identificável. Esta célula é grande em comparação com o leucócito comum e tem a sua cromatina nuclear reticulada, com um a cinco nucléolos levemente visíveis. O citoplasma tem uma coloração basófila, sem presença de grânulos.

O promielócito é o seguinte na sequência de maturação dos granulócitos. A característica predominante desta célula é a presença de granulação elevada, de tal forma que pode mesmo dificultar a observação de outras características morfológicas. Os grânulos são principalmente azurófilos. O promielócito é maior que o mieloblasto, sendo a relação Núcleo:Citoplasma (N:C) inferior. A cromatina nuclear é mais densa, estando, no entanto, também visíveis nucléolos.

O mielócito é o terceiro na sequência de maturação dos granulócitos. Nesta fase já começa a ser possível diferenciar o tipo de célula granulocítica pela cor, tamanho e forma da sua granulação citoplasmática. A relação N:C continua a diminuir. Os nucléolos deixam de ser visíveis, a cromatina mais densa e o núcleo mais pequeno e oval.

O metamielócito é o quarto na sequência de maturação. O núcleo começa a alongar, adquirindo uma forma em “feijão” ou “banda” nesta fase. A cromatina continua a ficar mais densa e a cor da granulação é específica da linhagem celular em que a célula diferenciou.⁽⁵⁾

Pode-se observar exemplos destas células na Figura 4.

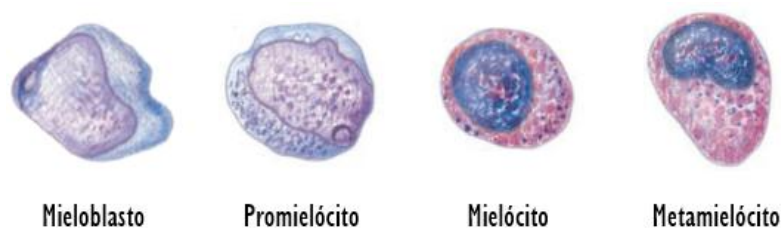


Figura 4 - Fases de maturação das células da linhagem granulocítica; adaptado de (adaptado de Turgeon, M.L., 2005)⁽³⁾

Por outro lado, as formas precoces da série monócito-macrófago são mais difíceis de identificar morfológicamente, uma vez que as formas precoces e maduras, podem variar muito na sua aparência em cada uma das suas fases. No entanto, a série monocítica é identificável pelo seu padrão de cromatina nuclear característico. A cromatina é aglomerada, mas mais fina e alongada que nos neutrófilos. A forma do núcleo pode ser oval ou redonda, podendo adquirir formas mais retorcidas ou emaranhadas. Os monócitos maduros são as maiores células maduras observáveis no sangue periférico normal. Pode-se

observar no seu citoplasma bordos irregulares, que podem incluir pseudópodes. Vacúolos são também muito comuns. O citoplasma é de cor azul-acizentada, com grânulos finos.⁽⁵⁾ O monoblasto, o promonócito e o monócito podem-se observar na Figura 5.



Figura 5 - Fases de maturação do monócito; (adaptado de Turgeon, M.L., 2005)⁽³⁾

Os neutrófilos, também denominados polimorfonucleares, têm núcleo denso característico, com dois a cinco lóbulos, citoplasma pálido com contorno irregular e contêm muitos grânulos rosa-azulados ou cinza-azulados. A sobrevivência dos neutrófilos é de apenas 6 a 10 horas. Eles são os principais leucócitos, em conjunto com os monócitos, que participam na fagocitose, sendo os neutrófilos os mais envolvidos na resposta inflamatória localizada. Prova disso é a composição do exsudato inflamatório (pus), que se desenvolve rapidamente na resposta inflamatória e é composto maioritariamente por neutrófilos e monócitos. O seu potencial fagocítico é muito superior ao dos eosinófilos e basófilos por ter mais enzimas líticas.

Os eosinófilos por sua vez são maiores no seu tamanho e nos seus grânulos citoplasmáticos, coram-se em vermelho-alaranjado intenso e têm até três lóbulos nucleares. Mielócitos eosinófilos podem ser identificados na medula, mas os estágios mais primitivos são indistinguíveis dos precursores dos neutrófilos. A sua vida média no sangue periférico é superior à dos neutrófilos, podendo sobreviver durante dias nos tecidos. Os eosinófilos penetram em exsudatos inflamatórios e têm papel principal nas respostas alérgicas, na defesa contra parasitas e na remoção de fibrina formada durante a inflamação.

Basófilos existem no sangue periférico em uma percentagem muito inferior em relação aos restantes leucócitos. Eles são facilmente identificáveis por terem numerosos grânulos citoplasmáticos escuros que dificulta a observação do núcleo e contêm heparina, serotonina e histamina, que tendem a desgranular, deixando vacúolos no citoplasma. Nos tecidos, transformam-se em mastócitos e estão envolvidos nas reações de hipersensibilidade imediata, podendo também estar relacionados com processos alérgicos.⁽⁶⁾

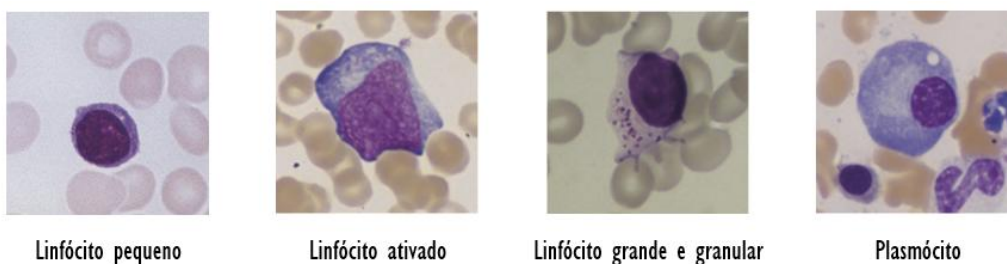
Os Monócitos são, por norma, maiores que os restantes leucócitos do sangue periférico, possuem núcleo grande e central ou indentado com cromatina aglomerada. O citoplasma abundante cora-se de azul e contêm vacúolos finos. Também possui alguns grânulos citoplasmáticos. Os monócitos permanecem pouco tempo na medula óssea, circulam vinte a quarenta horas no sangue e entram nos tecidos onde amadurecem e desempenham suas funções (macrófagos), podendo permanecer por vários meses ou anos. Os monócitos podem ter várias funções no sistema imunológico, tais como: repor macrófagos nos tecidos em condições normais; migração em resposta a sinais inflamatórios libertados por locais onde houve uma infeção em tecidos; diferenciação em macrófagos ou células dendríticas.⁽⁵⁾

4.3.1.4 LINFÓCITOS

Linfócitos são células imunologicamente competentes que auxiliam os fagócitos na defesa do organismo contra infecções e outras invasões, acrescentando ao sistema imunológico duas das suas características fulcrais: a especificidade antigénica e a memória imunológica.

A resposta imunológica depende de dois tipos de linfócitos, células B e T, que derivam da mesma célula estaminal hematopoiética. Os linfócitos B maturam na medula óssea e circulam no sangue periférico até adquirirem reconhecimento de antígeno. O recetor do linfócito B é uma imunoglobulina ligada à membrana que, após ativação, é secretada como imunoglobulina livre. Reconhecido um antígeno, estas maturam para linfócitos B de memória ou em plasmócitos.

Os linfócitos T desenvolvem-se de células migradas para o timo, no qual ocorre a maturação na passagem do córtex para a medula. As células auxiliares, linfócitos *helper* maduras expressam CD4, e as citotóxicas expressam CD8. As células naturalmente citotóxicas (NK cells) são células CD8+ que não têm receptor de célula T (TCR) e que atuam em células que tenham baixo nível de expressão de antígeno humano leucocitário (HLA) classe I, o que pode ocorrer em infecção viral ou células malignas. A seguinte Figura 6 demonstra as morfologias observáveis mais comuns do linfócito no sangue periférico.⁽⁷⁾



Linfócito pequeno

Linfócito ativado

Linfócito grande e granular

Plasmócito

Figura 6 - Formas observáveis de linfócitos no sangue periférico; (adaptado de Hoffbrand, A.V. and Moss, P.A.H., 2016)⁽⁷⁾

4.3.2 Determinações analíticas da hematopoiese

4.3.2.1 HEMOGRAMA

Uma das análises de rotina mais pedidas no laboratório é o hemograma. No Coimbralab, o hemograma, que é complementado com a contagem diferencial de leucócitos, é realizado pelo aparelho ABX Pentra 80 da Horiba Medical. Esta determinação tem grande importância no diagnóstico e monitorização de patologias, não só porque dá informações sobre o estado geral de saúde do indivíduo, como também revela as anomalias dos elementos figurados do sangue. Esta análise é composta pela quantificação e medição das diferentes células maduras sanguíneas e pelo cálculo de várias constantes relativas às mesmas. Dependendo dos resultados obtidos, e havendo suspeita de alguma alteração nos elementos figurados, é também realizado a observação ao microscópio ótico do esfregaço sanguíneo do sangue periférico. Os exemplos mais comuns que levam à realização do esfregaço são: uma contagem baixa ou alta em qualquer das populações sanguíneas, impossibilidade de se fazer a contagem de alguma das populações ou a falha no cálculo da forma leucocitária pelo equipamento.

A seguinte Tabela 3 indica os valores de referência utilizados pelo programa do Pentra 80. O Pentra 80 deteta e quantifica dois parâmetros adicionais: Linfócitos atípicos (ALY) e Células Grandes e Imaturas (LIC). Neste caso, não há valores de referência e são usados como alerta de presença de células anormais no sangue periférico.

Tabela 3 - Valores de referência para um hemograma do aparelho ABX Pentra 80 (em adultos saudáveis)

Teste	Género		Unidades
	Homem	Mulher	
Eritrócito	4,5 – 5,9	4,1 – 5,1	$\times 10^{12}/L$
Hemoglobina	140 – 175	120 – 153	g/L
Hematócrito	0,42 – 0,50	0,36 – 0,45	L/L
VCM	80 – 96		fl
HCM	27 – 33		pg
CHCM	300 – 350		g/L
RDW	11,6 – 14		%
PCT	0,15 – 0,5		%
Leucócitos totais	4,0 – 11,0		$\times 10^9/L$
Neutrófilos	2,0 – 7,5		$\times 10^9/L$ (40-80%)
Linfócitos	1,0 – 4,0		$\times 10^9/L$ (20-40%)
Monócitos	0,2 – 1,0		$\times 10^9/L$ (2-10%)
Eosinófilos	0,02 – 0,5		$\times 10^9/L$ (1-6%)
Basófilos	0,02 – 0,2		$\times 10^9/L$ (<1%)

4.3.2.2 ESTUDO MORFOLÓGICO DO SANGUE PERIFÉRICO

Como referido anteriormente, o esfregaço sanguíneo é muito útil em casos em que o equipamento indica valores anormais ou em falta, permitindo fazer a contagem diferencial dos leucócitos, observar a morfologia de todas as séries de células do sangue e fazer a identificação de células anormais e/ou com alterações na sua morfologia. O estudo da morfologia celular permite auxiliar na classificação de muitas patologias, como sejam por exemplo anemias ou mesmo mononucleose infecciosa. O esfregaço é realizado por aplicação de uma gota (+/- 6 μL) de sangue numa lâmina e com outra fazer o arrastamento ao longo da lamina com a gota.⁽⁸⁾ Após a secagem, fixa-se o esfregaço com metanol, e em seguida realiza-se a coloração por método de MayGrunwald-Giemsa, o que produz uma lâmina que ao observar ao microscópio ótico terá o aspeto da Figura 7.

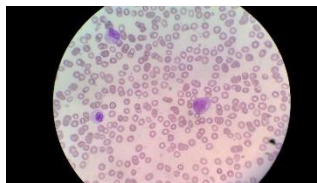
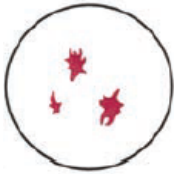








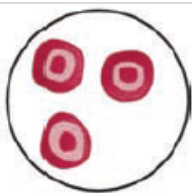
Figura 7 – Esfregaço de sangue periférico (foto do Coimbralab)

Na observação da lâmina, realiza-se a identificação das alterações observáveis nas diferentes populações do sangue periférico e de células anómalas presentes, podendo também fazer-se uma contagem diferencial se necessário, o que é mais

comum em casos de erro na obtenção da fórmula leucocitária pelo equipamento. As formas anormais do eritrócito estão brevemente descritas e ilustradas na Tabela 4.

Tabela 4 – Alterações morfológicas do eritrócito observáveis no sangue periférico (adaptado de Turgeon, M.L., 2005)⁽⁹⁾

Tipos de Células	Descrição	Exemplos (representação de ESP)
Acantócitos	Eritrócitos que tem uma membrana com projeções com aspeto de espículas, de tamanho largura e número variável. Não tem palidez central. Associado a problemas hepáticos/alcoolismo crónico, estas células são consequência de uma alteração do metabolismo do colesterol que, por sua vez, é importante para a estabilidade da membrana celular.	
Equinócitos	Semelhantes na origem aos acantócitos, os equinócitos tem projeções curtas, rombas e distribuídas por toda a membrana, mantendo a palidez central da célula. Também associado a perturbações nos valores de colesterol.	
Esferócitos	Resultante de alterações genéticas nas proteínas eritrócitárias, ou por sensibilização dos eritrócitos com anticorpos específicos para as mesmas, os esferócitos tomam a sua forma esférica devido à perda de maleabilidade e tamanho, ficando mais suscetíveis a possíveis alterações osmóticas.	
Eliptócitos	Forma menos intensa das mesmas alterações que ocorre com os esferócitos, perdendo também alguma da sua função normal.	
Drepanócitos	Células em foice, características da anemia falciforme, que resultam de uma alteração genética qualitativa da hemoglobina, originando a hemoglobina S. Esta alteração provoca a precipitação de hemoglobina no interior dos eritrócitos quando há baixa pressão de oxigénio, provocando rigidez e a sua forma única, que compromete a sua função normal.	
Dacriócitos	Células em forma de lágrima aparecem devido a deformações na membrana eritrocitária e que estão associadas a situações de anemia, de mielofibrose ou de insuficiência renal.	
Esquizócitos	Fragmentos resultantes da destruição mecânica de um eritrócito normal. Ocorre em casos de vasos danificados, ao formar o coágulo, capturando eritrócitos que sob a enorme pressão da corrente sanguínea rebentam. São por isso muito comuns em anemias hemolíticas.	

Estomatócitos	Células que formam uma depressão descorada central e resulta de alterações ao nível da permeabilidade membranas; identifica-se em casos de consumo crónico de álcool ou de problemas renais.	
Células em alvo	Observam-se com uma zona central corada descorado em redor do centro; resultam principalmente de problemas hepáticos.	

Relativamente à população das plaquetas no sangue periférico é muito comum observar-se anisocitose plaquetar, assim como plaquetas gigantes. As plaquetas gigantes resultam do deficiente processo de produção das mesmas, que poderá ser por sua vez consequência de um défice na trombopoietina, que está associado a insuficiência hepática e/ou a casos de alcoolismo. Observa-se, também recorrentemente, diferentes graus de agregação plaquetar, mesmo quando o sangue é solubilizado com anticoagulante. Isto ocorre devido a várias razões, o indivíduo poderá produzir anticorpos anti-EDTA que o consome, permitindo a agregação; pode ocorrer também devido a estados transitórios de ineficácia da produção do mesmo e por fim devido a uma patologia, refletindo numa agregação em “tapete” de muitas plaquetas. Devido a isto, qualquer trombocitopenia deve ser observada no esfregaço sanguíneo, por suspeita de agregação plaquetar.⁽⁶⁾

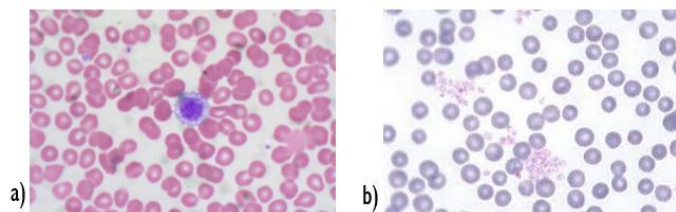


Figura 8 - a) exemplo de uma plaqueta gigante; b) agregação plaquetar (fotos do CoimbraLab)

Os leucócitos também são observados, tanto para poder verificar se a fórmula leucocitária se encontra correta, ou para observar quaisquer alterações nesta população, que sucintamente se verificam da seguinte forma:

- Alterações nos grânulos (quantidade, tamanho, cor);
- Número de lóbulos;
- Presença de mononucleares atípicos;
- Células imaturas (precursores medulares, blastos).⁽⁶⁾

Entre estas cinco possibilidades que poderão afetar os leucócitos isoladamente ou em simultâneo como se pode observar na Figura 9, sendo necessário interpretar e delinear estratégias até chegar a alguma conclusão sobre o que estamos a observar, se é relevante ou não para identificar ou monitorizar uma patologia.

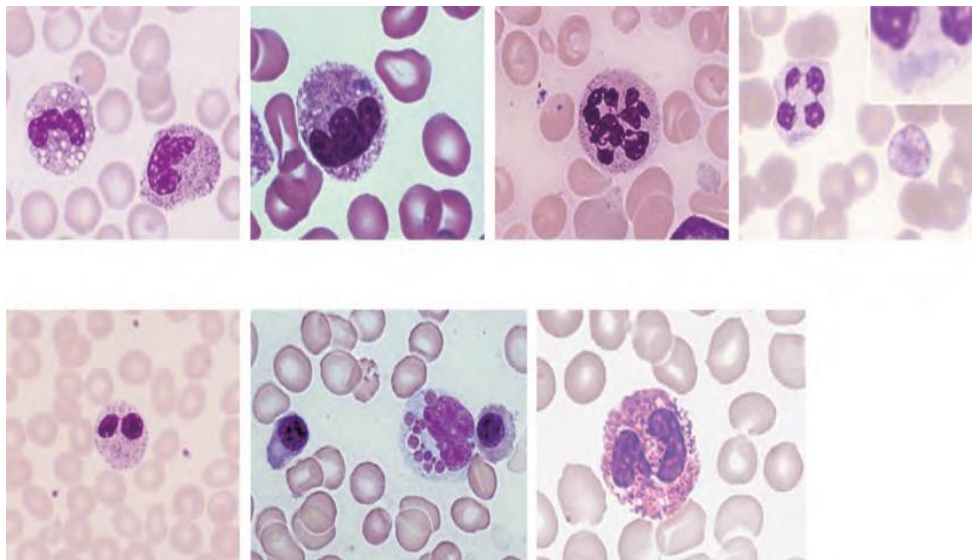


Figura 9 – Exemplos de alterações morfológicas nos leucócitos (adaptado de Hoffbrand, A.V. and Moss, P.A.H., 2016) ⁽⁹⁾

4.3.2.3 RETICULÓCITOS

Os reticulócitos podem ser observados em circulação no sangue periférico em situação fisiológica, representando em relação ao número total de eritrócitos entre 0,5 e 2,5 % da população.⁽⁹⁾

Estas células já não possuem núcleo, mas no seu citoplasma ainda é possível observar precipitados azuis, de aspeto reticulado, que são fragmentos de RNA ribossomal, quando sujeitos a coloração pelo azul de cresil brilhante (Figura 10).

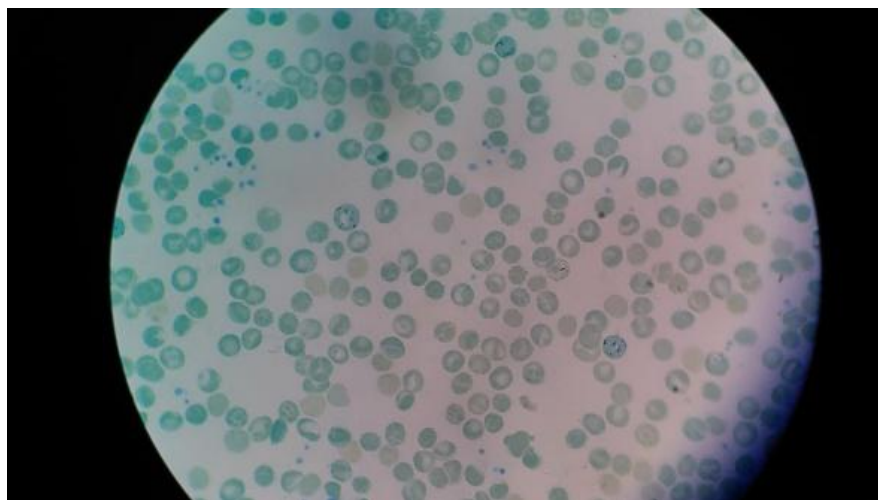


Figura 10 - Exemplo de reticulócitos (foto do CoimbraLab)

Em lâmina e por observação ao microscópio, deve ser feita a contagem de 1000 eritrócitos e o correspondente número de reticulócitos a ele associado, calculado depois a razão entre o número de reticulócitos sobre o número de eritrócitos contados, multiplicado por 100.

A contagem de reticulócitos ajuda a perceber se a medula está funcionar corretamente, indicando se há eritropoiese eficaz em resposta a perdas de sangue ou um aumento em resposta a uma anemia hemolítica, entre outros.⁽⁹⁾

4.3.2.4 PESQUISA DE EOSINÓFILOS

O clínico pode recomendar um teste de eosinófilos no exsudato nasal ou expectoração, se o indivíduo tem frequentemente sintomas como tosse, falta de ar, pieira, para investigar suspeita de alergia, asma e infecções. O teste é realizado por colheita do exsudato com zaragatoa sem meio, esfregando na mucosa nasal. O produto de seguinte é inoculado numa lâmina, fixado e corado pela coloração de Wright. Ao microscópio pesquisa-se células sanguíneas.⁽¹⁰⁾

4.3.3 Hemóstase

A manutenção da hemóstase é conseguida através do processo que mantém o equilíbrio entre a hemorragia e a coagulação. Vários fatores influenciam o processo, principalmente os vasos sanguíneos, as plaquetas, os fatores de coagulação e seus inibidores, e o sistema fibrinolítico. Todos os fatores envolvidos estão sempre em circulação, porém são apenas ativados nas circunstâncias especiais em que são necessários ou por estimulação com moléculas.⁽¹¹⁾

O processo inicia-se com a contração do vaso lesado e com a agregação e adesão das plaquetas ao endotélio, de forma a formarem uma rede que vai permitir, não só a paragem a hemorragia, mas também a base do futuro coágulo.

De seguida ocorre a cascata de coagulação, um dos grandes processos da hemóstase que envolve a ativação consecutiva de várias proteínas como pode ser observado na Figura 11. Este processo, in vitro, é separado em duas vias distintas (intrínseca e extrínseca) uma vez que são ativadas por fatores diferentes, culminando numa via comum que transforma o fibrinogénio em fibrina e forma o coágulo. Importante salientar que no organismo estas vias ocorrem simultaneamente.

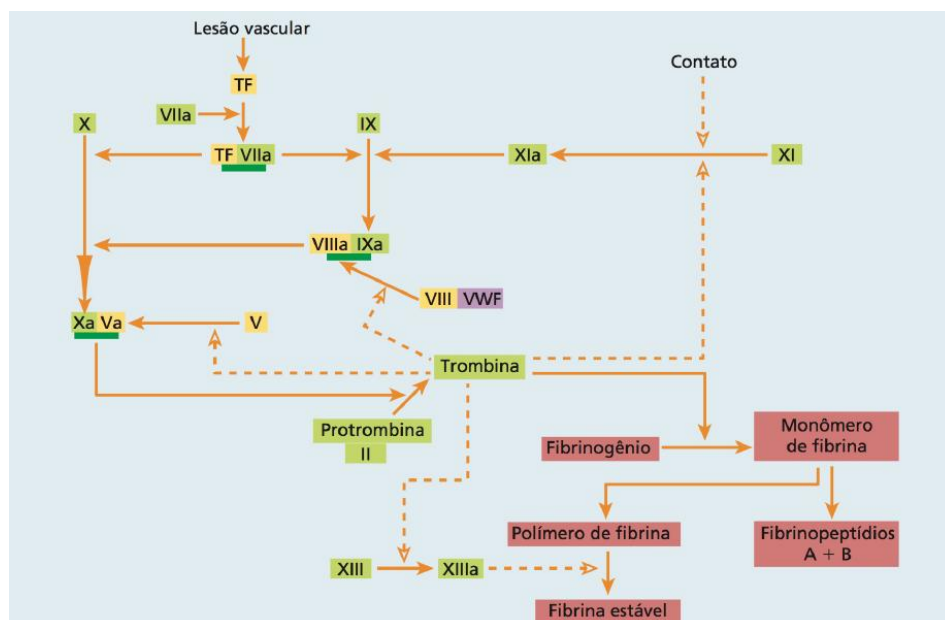


Figura 11- Cascata de coagulação (adaptado de Hoffbrand, A.V. and Moss, P.A.H., 2016)⁽²⁾

O terceiro passo deste sistema, para que este seja funcional, é a fibrinólise ou a destruição do coágulo. Este processo ocorre em paralelo ao da cascata de coagulação, sendo potenciado pela proteína S e proteína C que captam a trombina ligada à trombosmodulina e inibem a ação dos fatores Va e VIIIa, e pelo o plasminogénio, que por ação do ativador de plasminogénio tecidual (t-PA), transforma em plasmina e degrada a fibrina. Após a hemorragia ter terminado, há destruição do coágulo e inibição de sua formação, garantido que não será libertado na corrente sanguínea e provoque acidentes vasculares como embolias e trombozes.⁽¹¹⁾

No Coimbralab as provas de coagulação são realizadas pelo Thrombolyzer XR Behnk Electronics, sendo que a técnica de medição consiste numa esfera que gira durante a totalidade do tempo de medição, no caso da formação do coágulo a fibrina para o movimento rotativo da esfera que é detetado por um sensor (impedância). A amostra usada neste teste é plasma citratado.

4.3.3.1 TEMPO DE PROTROMBINA

Muito requisitado, principalmente com o objetivo de monitorização terapêutica de anticoagulantes orais e também como teste de função hepática, o tempo de protrombina mede o tempo de coagulação do plasma, na presença de uma concentração ótima de extrato tecidual de tromboplastina e de iões de cálcio, registando o tempo até à formação do coágulo, dando uma indicação geral da via extrínseca. Este resultado é indicador da quantidade de protrombina, dos factores V, VII e X e ainda da concentração de fibrinogénio no plasma.

O reagente é constituído de tromboplastina tecidual liofilizada, iões cálcio e conservantes.

O resultado da medição é expresso em segundos, em percentagem do valor normal utilizando uma curva de referência, e/ou razão normalizada internacional (INR).⁽¹²⁾ INR é obtido pela a razão entre o tempo da reação da amostra sobre o tempo da reação do plasma normal, elevado a índice de sensibilidade internacional (ISI) – fornecido pelo fabricante, consiste no valor numérico que indica relação de qualidade entre a tromboplastina de referência e a comercializada.⁽¹³⁾

$$INR = \left(\frac{\text{Tempo de reação da amostra}}{\text{Tempo de reação normal}} \right)^{ISI}$$

As tromboplastinas variam na sua resposta ao efeito anticoagulante dos anticoagulantes orais. Ao padronizar os resultados do TP com um lote de tromboplastina próprio, a Organização Mundial de Saúde (OMS) permite fazer a calibração de tromboplastinas usadas como reagente, caracterizando cada lote do fabricante com um ISI específico em relação ao padrão da OMS. O sistema INR tem a grande vantagem de permitir a comparação fiável de resultados de diferentes laboratórios, diminuir o risco de hemorragia e cenários de trombose e de facilitar uniformização internacional de intervalos terapêuticos.⁽¹³⁾

Em doentes submetidos a uma terapêutica com anticoagulantes orais para profilaxia de trombose venosa, recomenda-se que o intervalo terapêutico se situe entre um INR de 2 e 3 e para prevenir a embolia sistémica recorrente e para válvulas cardíacas protésicas, entre 3 e 4,5.⁽¹⁴⁾

4.3.3.2 TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADO

O Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado tem por objetivo estudar a via intrínseca da coagulação, indicando a eficácia da coagulação estando dependente dos fatores VIII, IX, XI, XII, de fibrinogénio e protrombina. Ocorre por meio de um ativador dos fatores de contacto, que na presença de íões de cálcio e fosfolípidos provocam a cascata de reações que forma a fibrina.

O reagente activador é constituído por fosfolípidos em conjunto com sílica micronizada (contacto com a superfície) e tampão N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-ácidoetanosulfónico.

O resultado, tal como o TP, é expresso em segundos.

As causas mais comuns para TTPa aumentado são a coagulação intravascular disseminada, patologias hepáticas, transfusão massiva, administração/contaminação com heparina, anticoagulante circulante, entre outros. É normalmente utilizado na vigilância terapêutica com heparina.⁽¹³⁾

4.3.4 Outras determinações hematológicas

4.3.4.1 VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO DO SANGUE

É predominantemente usado como uma medida não específica de inflamação.

A determinação da velocidade de sedimentação globular consiste em medir a velocidade de separação entre os glóbulos vermelhos e o plasma, em sangue com anticoagulante. Consiste na medição da descida espontânea dos glóbulos vermelhos em suspensão no plasma.⁽¹⁵⁾

No Coimbralab este teste é realizado pelo Vesmatic 30 da Menarini, um analisador automático para a determinação da VSG até 30 amostras em simultâneo. A determinação normal é executada em 26 minutos na 1ª hora e 46 minutos para a 2ª, incluindo a homogeneização das amostras. As amostras são colhidas para tubos Vacu-code de metacrilo com vácuo e para um volume de 1 mL sangue total com citrato.

4.3.4.2 GRUPO SANGUÍNEO E TESTE DE COOMBS INDIRETO

A tipagem do grupo sanguíneo consiste em determinar a presença ou ausência dos antígenos A, B e Rhesus (D) na superfície dos glóbulos vermelhos. O teste de Coombs indirecto é um teste serológico que pesquisa pelos anti-corpos anti-A e anti-B.

No Coimbralab utiliza-se o analisador Centrifuge 12 s II da Diamed para a realização deste teste, em conjunto com o kit ID-System card DiaClon ABO/D. O teste é realizado com soro heparinizado, que é pipetado no topo dos microtubos com gel, presentes no cartão. O cartão é então incubado e será centrifugado no analisador. No final retira-se e interpreta-se os resultados como pode ser observado na Figura 12.



Figura 12- Exemplos de resultados em cartão (foto do Coimbralab)

4.3.4.3 OUTROS

Para além dos referidos, o Coimbralab executa também os testes: do Índice de Katz; Células Lúpus eritematoso (LE); pesquisa de células falciformes; tempo de Hemorragia e tempo de Coagulação.

4.4 Bioquímica

4.4.1 Provas bioquímicas da função hepática

4.4.1.1 ASPARTATO AMINOTRANSFERASE

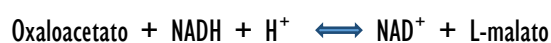
A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima que catalisa a transferência de um grupo amino do L-aspartato para o α -cetoglutarato, com formação de glutamato e oxaloacetato, tendo um papel muito importante no metabolismo dos aminoácidos. A AST está presente no fígado, coração, músculo esquelético e rins, sendo por isso pouco específica, apesar de a sua libertação ser mais pronunciada na lesão hepática. A concentração de AST e de ALT no soro e o cálculo do seu rácio são testes utilizados como biomarcadores de qualquer tipo de lesão hepática. Também está elevado no enfarte do miocárdio.

A enzima AST presente na amostra catalisa a reação de equilíbrio abaixo descrita por determinação cinética. O oxaloacetato formado é determinado por meio de uma reação indicadora catalisada pela malato-desidrogenase (MDH). O Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (NADH) é oxidado a dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado (NAD⁺). A velocidade de diminuição do NADH medido fotometricamente a 340 nm por vários minutos, é diretamente proporcional à velocidade de formação do oxaloacetato, e por consequência, à atividade da AST.⁽¹⁶⁾

AST



MDH

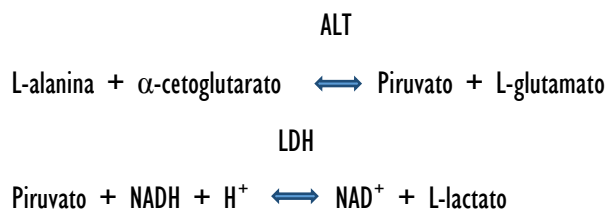


4.4.1.2 ALANINA AMINOTRANSFERASE

A alanina aminotransferase (ALT) catalisa a transferência do grupo amino da L-alanina para o α -cetogluturato, com formação de glutamato e piruvato.

Esta enzima é mais específica e persiste mais tempo para a lesão hepática, uma vez que a sua concentração nos hepatócitos é elevada, sendo inferior no tecido cardíaco e outros. Níveis elevados de ALT estão geralmente associados com algum grau de necrose hepática como cirrose, carcinoma, hepatite viral ou tóxica e icterícia obstrutiva. Na hepatite, este valor será normalmente mais elevado que a AST e o inverso aplica-se em casos de doença hepática crónica.

A ALT presente na amostra catalisa a reação abaixo descrita, produzindo piruvato. O aumento do piruvato é determinado pela reação indicadora catalisada pela lactato desidrogenase (LDH). À semelhança da AST, a LDH vai oxidar o NADH em NAD^+ . A velocidade da diminuição do NADH é diretamente proporcional à velocidade de formação do piruvato e à atividade de ALT.⁽¹⁶⁾



4.4.1.3 GAMA-GLUTAMILTRANSFERASE

A gama-glutamyltransferase (GGT) catalisa a transferência de aminoácidos de um péptido para o outro, no caso específico em que o péptido contém o resíduo de glutamato terminal ligado através do carboxilo terminal. Existe em todas as células do organismo, exceto nas musculares, no entanto a que circula livre no soro tem origem hepatocelular. O aumento deste parâmetro associado ao das enzimas hepáticas indica dano hepático.

Em caso de obstrução intra-hepática ou pós-hepática ocorre um aumento acentuado desta enzima. É mais sensível que a ALP na deteção de icterícia obstrutiva, colangite e colestite e o seu aumento ocorre mais rapidamente e prolonga-se por mais tempo. Um aumento mais suave pode ocorrer também por outras patologias hepáticas e na terapêutica com certos fármacos.⁽¹⁶⁾

Tem papel também importante na deteção e monitorização de alcoolismo.

Para a sua determinação, a GGT da amostra transfere o grupo gama-glutamil da L-gama-glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida para a glicilglicina. Esta reação é quantificável fotometricamente a 410 nm, comprimento de onda do 5-amino-2-nitrobenzoato, um dos produtos da reação.

GGT



4.4.1.4 BILIRRUBINAS

O conhecimento do metabolismo da bilirrubina é determinante para um entendimento adequado das doenças hepáticas. A bilirrubina é um produto da degradação do grupo heme da hemoglobina. O processo de degradação ocorre nas células do reticulo-endotelial. Inicialmente, a clivagem das pontes α -metilénicas do grupo heme origina a biliverdina. Seguidamente, por ação da biliverdina redutase, a ponte metilénica central da biliverdina é reduzida, dando origem à bilirrubina. Do total da bilirrubina, 80-85% é originada a partir da degradação da hemoglobina e os restantes 15-20% são produzidos a partir do catabolismo de outras proteínas que contêm heme, como os citocromos, a mioglobina e as peroxidases.

Na circulação, liga-se à albumina sérica e é transportada para o fígado, onde se tornará mais solúvel ao ligar dois glucoronatos às suas cadeias laterais, dando origem à bilirrubina conjugada (diglucoronada) que é secretado pelo fígado para o duodeno. No duodeno, por meio de enzimas bacterianas, a bilirrubina conjugada é transformada em vários componentes que constituem os urobilinogénios. O maior volume destes componentes, depois de oxidados, são excretados nas fezes, 10 % é reabsorvido para o sangue e pequenas quantidades passam para o rim para serem excretadas.

A bilirrubina do soro (bilirrubina não conjugada) reage com o diazorreactivo de Erlich (ácido sulfanílico diazotado) apenas na presença de um álcool, enquanto que a bilirrubina excretada pelo fígado (bilirrubina conjugada) reage com o ácido sulfanílico diazotado na ausência de um álcool. Assim, à forma da bilirrubina que reage com o diazorreactivo de Erlich sem a adição de álcool dá-se o nome de bilirrubina direta e à bilirrubina que reage apenas na presença de álcool, é dado o nome de bilirrubina indireta.

A bilirrubina não conjugada é um composto não polar, pelo que não é detectada na urina. Como esta fracção encontra-se ligada a albumina, esta não consegue ser filtrada no glomérulo renal. Já a bilirrubina conjugada é polar e não está ligada a proteínas plasmáticas, logo é detetada na urina, quando o nível sanguíneo se encontra elevado.

De forma a avaliar a intensidade e a progressão da icterícia, determina-se o nível total de bilirrubina sérica. A determinação das frações direta e indireta é essencial no diagnóstico diferencial da icterícia. No soro de pacientes com icterícia devido a hemólise excessiva, o aumento da bilirrubina total é devido ao aumento da fracção de bilirrubina não conjugada (determinação indirecta). No soro de pacientes com icterícia devido a problemas hepáticos, o aumento da bilirrubina total é devido ao aumento da fracção de bilirrubina conjugada (determinação direta). A icterícia é atualmente classificada hiperbilirrubinémia conjugada e não conjugada. A primeira pode ser hepática, envolvendo vários tipos de defeitos genéticos e/ou adquiridos no fígado, ou pode ser pós-hepática (icterícia obstrutiva), que se refere à obstrução anatómica do fígado. A segunda pode ser classificada como pré-hepática (icterícia hemolítica), devido a hemólise excessiva ou hepática quando há um defeito na eliminação da bilirrubina no sangue ou um defeito na sua conjugação no fígado.⁽¹⁷⁾

4.4.1.5 FOSFATASE ALCALINA

A fosfatase alcalina (ALP) está predominantemente presente nos ossos e fígado. Nos ossos, mais especificamente nos osteoblastos, há grandes quantidades desta enzima, uma vez que tem papel importante na formação do tecido ósseo. Por isso, a sua atividade no soro de crianças durante o crescimento é superior, assim como em qualquer doença que envolva alteração ou formação aumentada do tecido ósseo. A excreção é efetuada pela biliar. A icterícia obstrutiva normalmente é acompanhada por um aumento desta enzima. Pelo contrário, valores inferiores são associados normalmente à hipofosfatase (doença óssea hereditária).

O método segue a hidrólise do 4-nitrofenil fosfato (composto sem cor), na presença de ALP, íons de magnésio e zinco e água. A velocidade de formação de 4-nitrofenóxido é proporcional à atividade da ALP da amostra, tem cor amarela em pH alcalino, podendo ser quantificado espectrofotometricamente a 405 nm.⁽¹⁶⁾



4.4.1.6 ALBUMINA

A albumina é a proteína mais abundante no plasma humano. Tem várias funções biológicas, sendo as principais o transporte e armazenamento de uma grande variedade de ligandos, essências para transporte de outras moléculas, como por exemplo fármacos ou solubilização de compostos apolares (bilirrubina, ácidos gordos, etc.).

Hiperalbuminémia é normalmente consequência de grave desidratação ou de estase venosa excessiva. Já a hipoalbuminémia pode ser causada por variados fatores: síntese inadequada; catabolismo acrescido por lesões ou inflamação; má nutrição ou síndrome de absorção deficiente; perda de proteínas; e distribuição alterada. Situações graves de hipoalbuminémia perturbam o equilíbrio entre as pressões dos compartimentos, podendo desenvolver edemas.

De salientar que íons como o cálcio e magnésio se encontram ligados à albumina, o seu doseamento é fundamental para interpretar estes valores. A diminuição de albumina reflete numa diminuição destes valores.

Os métodos mais comuns para a determinação da albumina são através da medição colorimétrica após a ligação a corantes como o verde de bromocresol ou a púrpura de bromocresol.⁽¹⁸⁾

4.4.1.7 PROTEÍNAS TOTAIS

As proteínas totais séricas são o somatório de todas as proteínas em circulação no plasma humano. O seu doseamento é fundamental no diagnóstico e tratamento de diversas patologias hepáticas, renais ou medulares, bem como de outras perturbações metabólicas e nutricionais.

Uma alteração das proteínas totais séricas em relação aos valores de referência, é indicativo de disproteinemia ou de uma perturbação do equilíbrio da água. De forma a distinguir as duas situações pode-se utilizar a electroforese de proteínas séricas e a determinação do hematócrito como análises adicionais.

O método utilizado é o biureto, que depende da presença de ligações peptídicas em todas as proteínas. Essas ligações reagem com iões de Cu^{2+} em soluções alcalinas, formando um produto colorido, cuja a absorvância é medida a 540 nm.⁽¹⁸⁾

4.4.2 Provas bioquímicas da função renal

Neste grupo apresenta-se os parâmetros que são mais comuns de ser utilizados no estudo da integridade e/ou da função renal: creatinina, depuração de creatinina, ureia, ácido úrico, proteínas totais urinárias, microalbuminúria.

4.4.2.1 CREATININA

A creatinina é um catabolito do metabolismo muscular da creatina-fosfato. É eliminada quase exclusivamente por filtração glomerular e a sua retenção é, portanto, um índice de insuficiência glomerular. Uma pequena parte é eliminada por secreção tubular. A creatinina é um ótimo parâmetro de avaliação da função renal, já que a sua produção apenas depende do metabolismo celular muscular e não tem grandes variações diárias. As causas mais comuns de aumento da creatininemia são: a desidratação, a hipovolémia, a insuficiência renal e a destruição muscular.

O doseamento da creatinina sérica é um teste simples de avaliação da taxa de filtração glomerular, tornando-se muito útil no tratamento e diagnóstico de doenças renais e avaliação da função glomerular. No caso de lesões renais prematuras, o nível de creatinina sérico é menos sensível. A creatinina sérica e a ureia sérica são usadas com o objetivo de diferenciar uma uremia obstrutiva pré-renal ou pós-renal. Não obstante pode haver um aumento inesperado após uma refeição rica em carne ou depois de exercício muscular intenso.

A maioria dos métodos clínicos para a dosagem da creatinina baseia-se na sua reação com o picrato alcalino (reação de Jaffe), que reagem com a creatinina e produz um complexo laranja avermelhado que é detetado por colorimetria a 490-500 nm.

Outro valor muito utilizado é o da clearance de creatinina, que depois de medido os parâmetros de creatinina urinária de 24 h, o volume de urina de 24h e a creatinina sérica, pode ser calculado da seguinte forma:

$$\text{Clearance (mL/min)} = [\text{creatinina urinária (mg/mL)}] \times \text{volume urinário (mL/min)} / [\text{creatinina plasmática (mg/mL)}]$$

Sendo a eliminação de creatinina endógena um parâmetro constante, o cálculo da sua depuração serve como medida da taxa de filtração glomerular.

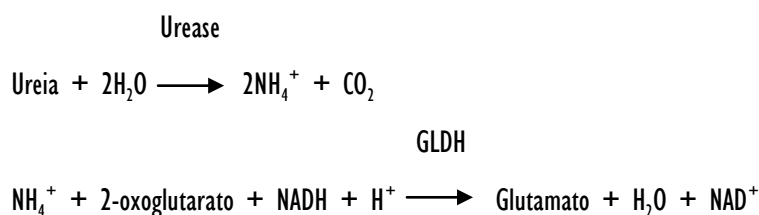
Tem valor de diagnóstico e prognóstico no caso de nefropatias, insuficiência cardíaca (pode existir uma ligeira retenção de creatinina) e obstruções urinárias.⁽¹⁹⁾

4.4.2.2 UREIA

A ureia é o produto final da degradação dos aminoácidos. A ureia, ao contrário da creatinina pode variar de dia para dia, pois a sua síntese é dependente da dieta. Grande parte da ureia é excretada por filtração glomerular, no entanto 40-70 % volta a difundir-se no plasma pelo túbulo proximal.

A elevação do nível de ureia pré-renal ocorre no caso de descompensação cardíaca, catabolismo proteico aumentado e depleção hídrica. Os níveis de ureia podem ser elevados devido a causas renais, nomeadamente nefrite crónica, nefrosclerose, necrose tubular, rim policístico e glomerulonefrite aguda. A elevação do nível de ureia pós-renal pode ser provocada pela obstrução do tracto urinário. A concentração de ureia no plasma é determinada pela perfusão renal, taxa de síntese da ureia e taxa de filtração glomerular (TFG), podendo aumentar em caso de insuficiência renal aguda, insuficiência renal crónica e urémia pré-renal. Nos doentes de diálise, a concentração de ureia é representativa da degradação proteica sendo igualmente indicadora do estado metabólico. As determinações de ureia e de creatinina no soro são frequentemente realizadas em conjunto no diagnóstico diferencial da função renal.

A ureia é determinada por reação enzimática, que ao ser hidrolisada pela urease, vai produzir amónia. A amónia de seguida reage com 2-oxoglutarato e NADH, sendo esta reação indicadora catalisada pela glutamato desidrogenase (GLDH). A redução da absorvância do NADH é medida fotometricamente e é proporcional à ureia na amostra.⁽¹⁹⁾



4.4.2.3 ÁCIDO ÚRICO

O ácido úrico do plasma é filtrado pelos glomérulos e reabsorvido pelos túbulos do nefrónio e é no homem o produto final no metabolismo das purinas (adenina e guanina). O teor de ácido úrico no plasma é muito influenciado por fatores extra-renais. A quantificação do ácido úrico é muito útil no diagnóstico da gota, nas quais os níveis no soro são frequentemente elevados.

A hiperuricémia decorre ou de um excesso na produção de ácido úrico, ou do défice da sua eliminação, podendo classificar-se como primária ou secundária. A hiperuricemia primária pode também ser dividida entre idiopática ou hereditária. A hiperuricémia primária está associada à gota, síndrome de Lesch-Nyhan, síndrome de Kelley Seegmiller e a uma maior actividade da sintase de fosforibosil-pirofosfato.

A hipouricémia pode ser consequência da subprodução de ácido úrico (xantinúria hereditária, deficiência de nucleósido fosforilase de purina hereditária e terapia de alopurinol). O aumento de eliminação urinária de ácido úrico que

pode ocorrer em diversas patologias (SIDA, Diabetes mellitus, síndrome de Fanconi, queimaduras graves e síndrome hipereosinofílica) poderá também ser a causa de hipouricemia.

O método de quantificação do ácido úrico envolve a oxidação do ácido úrico pela uricase. A medição pode ser feita diretamente no valor decrescente do ácido úrico a 293 nm, ou pode ser seguida pela reação do peróxido na presença de peroxidase com formação de um corante imino-quinona, cuja intensidade da cor vermelha é proporcional à concentração de ácido úrico da amostra (soro, plasma ou urina), sendo determinada fotometricamente e mais fácil de detetar por equipamentos automáticos.⁽¹⁹⁾

4.4.2.4 PROTEÍNAS TOTAIS URINÁRIAS

O doseamento das proteínas totais presentes na urina é particularmente importante no diagnóstico e tratamento de doenças que se encontram associadas ao funcionamento dos rins, do coração e da tireóide. Estas doenças caracterizam-se por proteinúria frequente. Os valores das proteínas totais urinárias encontram-se por vezes aumentados em consequência de exercício físico intenso ou em situações de gamopatias monoclonais, nefrite, nefropatia diabética ou infecções do tracto urinário.

O método é o do biureto, que já se encontra descrito anteriormente.⁽¹⁸⁾

4.4.2.5 MICROALBUMINA

A albumina, em condições normais, é uma molécula que não filtra pela membrana glomerular devido ao seu tamanho. Porém, mesmo em situações normais, é possível encontrar quantidades discretas de albumina na urina. Quando a membrana se encontra danificada, há uma alteração na sua permeabilidade, facilitando a passagem da albumina, o que fará aumentar a sua concentração na urina. Faz-se então o doseamento de albumina na urina para avaliar a existência de alterações à permeabilidade glomerular. A esta albumina que se mede na urina em concentrações muito mais pequenas se chama microalbuminúria.

A microalbumina é detetada por imunoturbidimetria, que utiliza anticorpos anti-albumina, reagindo com o antígeno na amostra (soro, plasma ou urina) e formam complexos antígeno-anticorpo. Estes, após a aglutinação, são determinados por turbidimetria.⁽¹⁸⁾

4.4.3 Provas bioquímicas da função pancreática

4.4.3.1 AMILASE

Esta enzima catalisa a reação de quebra das ligações glicosídicas 1,4 do amido e glicogénio. A α -amilase é secretada pelo pâncreas e pelas glândulas salivares. É comum em peritonites, pancreatites agudas, obstrução intestinal e disfunções hepáticas e renais, aparecem com níveis elevados desta enzima.

Na insuficiência pancreática, este parâmetro aparece reduzido. Para esta determinação, o soro deve ser recente pois esta enzima degrada-se rapidamente.⁽¹⁶⁾

4.4.4 Diagnóstico e monitorização da Diabetes mellitus

Neste grupo estão presentes parâmetros que são mais comuns de ser utilizados no estudo e monitorização da Diabetes mellitus: glicose e HbA_{1c}.

4.4.4.1 GLICOSE

É o monossacarídeo que é a fonte principal de energia para grande parte das células do nosso organismo, especialmente as do sistema nervoso.

A determinação da glicose permite o despiste de patologias associadas a hiperglicémia e hipoglicémia. A patologia mais pesquisada é a Diabetes Mellitus constitui um grupo de desordens metabólicas dos carboidratos, no qual há intolerância à glicose, originando hiperglicémia.

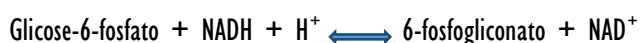
Segundo os últimos critérios da Direção-Geral da Saúde, o diagnóstico da Diabetes Mellitus baseia-se na glicémia em jejum $\geq 126\text{mg/dl}$ ou sintomas clássicos com glicémia ocasional $\geq 200\text{mg/dl}$, ou glicémia $\geq 200\text{mg/dl}$, na PTOG com 75g de glicose, às 2 horas. DGS

Para a determinação da glicose recorre-se ao método de hexoquinase (HK). Este método envolve duas reações acopladas, a primeira da HK e a segunda catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD). O produto detetado será NADPH a 340 nm, e a sua diminuição é proporcional à glicose presente na amostra.^(20,21)

Hexoquinase



G-6-PD



4.4.4.2 HbA_{1c}

A hemoglobina humana é constituída por quatro cadeias polipeptídicas, cada uma com o seu grupo heme. Num indivíduo adulto existem três classes de hemoglobinas, sendo a hemoglobina A a mais abundante nos eritrócitos. Por

cromatografia, verifica-se que esta hemoglobina ainda pode ser classificada por frações mais pequenas que se designam de hemoglobinas glicosiladas ou HbA_{1c} e representam 7% da hemoglobina total.

O termo HbA_{1c} aplica-se apenas à HbA em que existe uma molécula de glicose ligada ao terminal valina de uma ou das duas cadeias α da hemoglobina. No interior dos eritrócitos, acontece esta ligação, a uma velocidade que dependerá da concentração de glicose no plasma, que é livremente permeável à membrana dos eritrócitos.

Como a formação de hemoglobina glicosilada depende do nível de glicémia com que o eritrócito está em contacto durante o seu tempo de vida (120 dias), o doseamento da hemoglobina glicosilada constitui um índice preciso glicémia média dos 3 a 4 meses que antecederam a colheita. A longo prazo, este parâmetro é uma ferramenta muito útil para a terapêutica anti-diabética.

A quantificação da HbA_{1c} por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que realiza a separação das várias frações da hemoglobina com colunas de troca catiónica.⁽²⁰⁾

4.4.5 Provas bioquímicas para a avaliação de risco cardiovascular

Os parâmetros que são utilizados com maior frequência na avaliação de risco cardiovascular são o colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, Triglicerídeos, LDH, CK.

4.4.5.1 COLESTEROL TOTAL

O colesterol é o principal esteroide do organismo, estando presente em todas as células como um componente estrutural das membranas e das lipoproteínas (HDL, VLDL e principalmente LDL). É também o precursor na formação das hormonas esteroídes pelas gónadas e o córtex adrenal. Cerca de 70 a 75% do colesterol plasmático encontra-se na forma de éster e 25 a 30% existe como colesterol livre. Além do colesterol absorvido diariamente pelo tubo gastrointestinal, denominado colesterol exógeno, grande quantidade de colesterol é formado no fígado e outros tecidos (colesterol endógeno).

A aterosclerose caracteriza-se pelo acumular de lípidos dentro e ao redor das células na íntima das artérias e está associada com a proliferação celular e fibrosa provocando o estreitamento do lúmen do vaso. O desenvolvimento da aterosclerose pode estar ativo em qualquer indivíduo e permanece sem qualquer manifestação por décadas. Subitamente pode manifestar-se por dor torácica, enfarte agudo do miocárdio ou morte súbita.

Diversos estudos epidemiológicos e experimentais comprovam uma correlação positiva entre os níveis do colesterol, mais precisamente do colesterol LDL, e o risco cardiovascular.

Valores aumentados de colesterol são encontrados na nefrose, no hipotireoidismo, nas doenças colestáticas do fígado e nas hiperlipoproteinemias. Níveis diminuídos são encontrados no hipertireoidismo e desnutrição crônica. Os níveis de colesterol sérico, juntamente com a hipertensão e o tabaco, constituem fatores de risco de aterosclerose e doença arterial coronária.⁽²²⁾

4.4.5.2 COLESTEROL HDL

Muitos estudos epidemiológicos indicam uma forte proporção inversa entre colesterol HDL e risco cardiovascular. Conclui-se que as partículas de HDL, ao capturar e transportar o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado (transporte inverso do colesterol), protegem contra o desenvolvimento de placas ateroscleróticas. É recomendado na avaliação de risco cardiovascular fazer um perfil lipídico que inclui colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicerídeos. O valor desejável para o colesterol HDL será acima dos 60 mg/dL, enquanto que abaixo dos 40 mg/dL é indicador de risco cardiovascular.⁽²²⁾

4.4.5.3 COLESTEROL LDL

Ao contrário do colesterol HDL, o valor de colesterol LDL é directamente proporcional ao risco de desenvolvimento de doença coronária devido às suas propriedades aterogénicas. Níveis elevados de colesterol LDL associados a níveis também elevados de triglicerídeos constituem um quadro especial de alto risco. Tal como no caso do doseamento de colesterol HDL, o doseamento do colesterol LDL também se torna bastante útil no reconhecimento precoce de risco aterosclerótico e na monitorização de indivíduos durante o tratamento com medicamentos redutores de lípidos.⁽²²⁾

4.4.5.4 TRIGLICERÍDEOS

Os triglicerídeos são formados por três ácidos gordos ligados ao glicerol através de ligações éster.

A maior parte da gordura ingerida na alimentação encontra-se no organismo sob a forma de triglicerídeos. Estes são hidrolisados nos intestinos, absorvidos e reconvertidos em triglicerídeos na mucosa intestinal. Depois de incorporados em quilomicrons e VLDL, são introduzidos nos vasos linfáticos e daí na circulação sanguínea, que é responsável pela sua distribuição por todos órgãos e tecidos onde são gastos e onde ficam armazenados nos adipócitos.

A principal fonte de triglicerídeos plasmáticos são os triglicerídeos endógenos provenientes do fígado. A sua síntese é realizada a partir de ácidos gordos livres captados pelo fígado ou a partir de acetil CoA derivada do metabolismo dos hidratos de carbono.

Para uma correcta avaliação dos TG, é muito importante um jejum prolongado. A ingestão de alimentos leva a um aumento dos TG em circulação, principalmente ao nível da fração dos quilomicrons, fazendo com que o valor seja determinado por excesso.⁽²²⁾

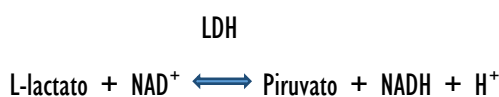
4.4.5.5 LACTATO DESIDROGENASE

A lactato desidrogenase (LDH) catalisa a redução do piruvato a lactato, com oxidação do NADH a NAD⁺. Ocorre predominantemente quando há atividade intensa com uma quantidade de oxigénio limitada.

No nosso organismo, várias isoformas do LDH estão presentes no citoplasma de todas as células, no entanto no soro normal, a sua concentração provem maioritariamente das plaquetas e dos eritrócitos.

Níveis elevados de LDH são observados em várias situações clínicas desde hemólise, a patologias hepáticas, do rim, do pulmão e do músculo. É também característico do enfarte do miocárdio dentro das primeiras 24 horas após o seu início.⁽¹⁶⁾

A LDH da amostra (soro preferencialmente) catalisa a conversão de piruvato em lactato e o NADH é oxidado. A velocidade da redução do sinal de NADH é directamente proporcional à atividade de LDH.

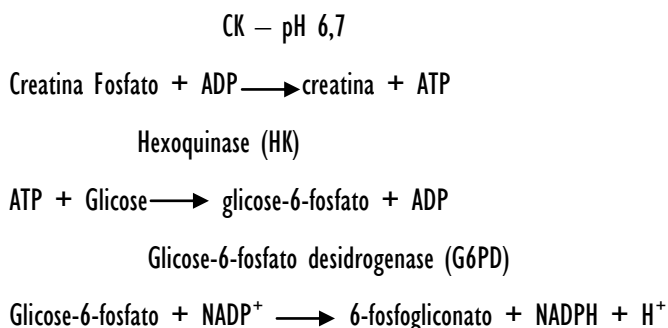


4.4.5.6 CREATINA QUINASE

A determinação da creatina quinase (CK) no soro é importante no estudo de distúrbios do musculo esquelético e no diagnóstico de suspeita de enfarte de miocárdio, dependendo da isoforma pesquisada. Existem 3 isoformas desta enzima: CK-BB (CK-1), CK-MB (CK-2) e CK-BB (CK-3).

Quando há lesão do músculo esquelético ou do músculo cardíaco, observa-se um aumento muito elevado da CK no soro, no caso do músculo esquelético a CK-3 e no caso do músculo cardíaco a CK-2. Pode também ser reflexo de outras respostas fisiológicas menos graves, como por exemplo edemas, embolias e exercício físico intenso.

O ensaio realiza-se ao utilizar a reação seguinte descrita. O produto final quantificado espectrofotometricamente da reação é fostato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), que se forma à mesma velocidade que o ATP, que por sua vez é proporcional à atividade da CK presente na amostra (soro ou plasma).⁽¹⁶⁾



4.4.6 Provas bioquímicas para o estudo da hematopoiese

Os parâmetros mais comuns de ser utilizados no estudo bioquímico da hematopoese são o ferro, ferritina e transferrina.

4.4.6.1 FERRO

O ferro, entre os metais de transição essenciais à vida, é o mais abundante e dos mais importantes, sendo utilizado num grande número de reações bioquímicas. O ferro é um componente essencial de moléculas transportadoras de oxigénio, como a hemoglobina e a mioglobina e de muitas outras enzimas, como as que participam no transporte de electrões.

A absorção do ferro ingerido na alimentação ocorre no duodeno e na porção superior do jejuno, sob a forma de ferro ferroso (Fe^{2+}). A transferrina é a glicoproteína do sangue responsável pelo seu transporte na forma férrica (Fe^{3+}). A transferrina tem a capacidade de captar dois átomos de ferro sérico. Depois da absorção, o ião ferro é transportado maioritariamente à medula óssea e ao fígado. Na medula óssea, o complexo ferro-transferrina liga-se aos eritrócitos maduros e liberta o ferro para o interior deles. Ao entrar no eritrócito maduro, o ferro ligar-se-á à hemoglobina, enquanto que a transferrina se desliga do eritrócito e regressa ao plasma a fim de captar mais ferro livre. Quando se atinge o fim do ciclo de vida dos eritrócitos, ocorre a sua lise e o ferro desliga-se da hemoglobina, ficando livre para se ligar de novo à transferrina e ser transportado para a medula óssea

Deficiência de ferro, infância, estados anémicos e gravidez, são situações responsáveis pelo aumento da capacidade de fixação de ferro pela transferrina. Patologias que provoquem a diminuição das proteínas devido a uma síntese proteica reduzida, como doenças malignas, doenças inflamatórias crónicas, e nos casos de pacientes que recebem frequentemente transfusões sanguíneas, ocorre uma sobrecarga de ferro e simultaneamente uma diminuição de transferrina.^(17,23)

4.4.6.2 FERRITINA

A ferritina é uma macropoteína constituída por uma estrutura glicoproteica, a apoferritina, que contém no seu centro activo átomos de ferro, sob a forma de microcristais de hidróxido férrico. A ferritina é encontrada fundamentalmente nas células da medula óssea, baço e fígado, onde tem como função o armazenamento de ferro em excesso no organismo. O doseamento de ferritina é utilizado na detecção de deficiências ou sobrecargas de ferro e no diagnóstico de anemias por insuficiência de ferro. Inflamações, síntese directa da substância no tecido tumoral, bloqueio da eritropoiese e necrose celular podem provocar níveis elevados de ferritina.⁽¹⁷⁾

4.4.6.3 TRANSFERRINA

A transferrina transporta o ferro no plasma, tendo dois locais de ligação. A sua síntese ocorre principalmente a nível hepático. A sua determinação é útil no diagnóstico diferencial de anemias.

Os níveis de transferrina aumenta em casos de deficiência de ferro e diminui em casos de sobredosagem de ferro. Também se pode encontrar aumentada em mulheres que tomem contraceptivos orais ou em fases tardias da gravidez. Encontra-se também diminuída em doenças que estejam associadas a perda proteica, como síndrome nefrótica, insuficiência

renal crônica, queimaduras graves e em insuficiência hepática grave. A transferrina observa-se diminuída em qualquer situação inflamatória ou de doença grave, considerando-se uma proteína de fase aguda negativa.⁽¹⁶⁾

4.4.7 Provas bioquímicas reumatismais

4.4.7.1 PROTEÍNA C REATIVA

A proteína c reativa (PCR) é uma glicoproteína que normalmente não se encontra no soro, sendo um indicador inespecífico de fase aguda. Esta proteína aparece em infecções e na inflamação em geral. O doseamento da PCR é utilizado para detetar processos inflamatórios sistémicos, avaliar o tratamento das infecções bacterianas com antibióticos, fazer a distinção entre a forma ativa e inativa de doenças com infeção concomitante. Em doentes que sofrem de Lúpus Eritematoso Sistémico ou colite ulcerosa, para controlar terapêuticamente as doenças reumáticas, avaliar a terapêutica anti-inflamatória e para distinguir entre infeção e rejeição de transplante da medula óssea. Mais recentemente verificou-se a sua utilidade no prognóstico de risco cardiovascular em indivíduos saudáveis, com angina instável ou enfarte do miocárdio, devido ao papel da inflamação na fisiopatologia da aterosclerose.⁽¹⁸⁾

4.4.7.2 FATOR REUMATÓIDE

Os fatores reumatoídes são anticorpos específicos que se ligam no fragmento Fc da IgG e normalmente são anticorpos do tipo IgM.

O doseamento de fator reumatoide é mais específico para o diagnóstico de artrite reumatoide e é comum o valor ser mais elevado em doentes com destruição rápida e progressiva das articulações. No entanto, este teste não é específico, pelo que pode ser positivo em situações fisiológicas, e ocorrer em idosos com outras doenças crônicas, em doenças reumáticas auto-imunes, entre outros.

4.4.8 Iões

Os parâmetros realizados no Coimbralab que englobei no grupo dos iões são os seguintes: cálcio, cloro, fósforo, magnésio, potássio e sódio.

4.4.8.1 CÁLCIO

O doseamento de cálcio no sangue é utilizado no diagnóstico e tratamento de doenças na paratiroide, um grande número de doenças ósseas, na insuficiência renal crônica e na tetania.

Os ossos funcionam como reservatório, mantendo um certo nível de cálcio sérico, libertando cálcio quando necessário para evitar hipocalcemia e capturando cálcio, quando perante um quadro hipercalcémico. A absorção e libertação de cálcio pelos ossos é regulado pela hormona paratiroide.

O cálcio existe no soro em 3 formas: Ca^{2+} , o mais comum; cálcio ligado a proteínas; cálcio complexado.

Apesar do cálcio ionizado ser o fisiologicamente mais relevante, a sua determinação direta não é simples, pelo que pode ser estimada a partir do cálcio total desde que se tenha conhecimento também do pH do sangue e da carga proteica. O nível de cálcio é normalmente inversamente proporcional aos de fosforo.

O cálcio ionizado é importante para transmissão de impulsos nervosos, como cofactor de reações enzimáticas, manutenção da contractilidade muscular e no processo da coagulação.

Variações no cálcio sérico podem ocorrer devido a alterações na glândula paratiroideia, doença óssea, absorção ineficaz a nível do intestino, doença renal, mieloma múltiplo, entre outros.⁽²³⁾

4.4.8.2 CLORO

O ião cloreto é o principal anião extracelular. No ionograma, as perdas de cloreto são acompanhadas por perdas de sódio mas em proporções diferentes, uma vez que esta é compensada por um aumento de bicarbonatos no soro. A perda de cloreto tem, a nível celular, efeitos semelhantes à perda de potássio, já que ambos participam da manutenção do potencial eléctrico das membranas celulares. Também tem grande importância pela sua função de tampão, quando o CO_2 e o O_2 são trocados nos eritrócitos.

A maior parte do cloreto que é ingerido é absorvido, sendo o excesso excretado pela urina. Concentrações baixas estão geralmente associadas a hipertensão e insuficiência renal. Elevadas concentrações estão associados a casos de obstrução intestinal, hipertiroidismo e fistulas pancreáticas.⁽²³⁾

4.4.8.3 FÓSFORO

O fósforo faz parte de nucleótidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos e outras moléculas. O fósforo encontrado no sangue está sob a forma de fosfato inorgânico: HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- e em PO_4^{3-} numa pequena percentagem. As suas proporções vão variar com o pH. Para além disso, tem um papel central no metabolismo, dado que serve de intermediário e dador de fosfatos de alta energia (como o ATP).

O fósforo está relacionado com o metabolismo do cálcio e com a hormona de crescimento, podendo estar elevado em períodos de crescimento. Também se encontra aumentado em quadros de hipoparatiroidismo.⁽²³⁾

4.4.8.4 MAGNÉSIO

Este ião encontra-se presente em quase todos os alimentos, pelo que a sua carência é muito rara. Cerca de 60% do magnésio ingerido na alimentação é excretado pelas fezes, sendo que os restantes 40% são excretados pela urina. O magnésio tem a função de regular a irritabilidade neuromuscular, sendo importante para coenzimas do metabolismo dos hidratos de carbono e das proteínas.

Quando este elemento se encontra em excesso no organismo atua como calmante e pode causar paragem cardíaca em casos extremos. Os casos de deficiência encontram-se associados a casos graves de má absorção e a longos tratamentos intravenosos com soluções isentas de magnésio.⁽²³⁾

4.4.8.1 POTÁSSIO

O potássio é o catião de maior concentração dentro das células, dado que é constantemente transportado para o seu interior pela bomba Na^+/K^+ .

A excreção do potássio consiste na sua filtração glomerular, reabsorção nos tubos proximais, e por fim novamente excreção, ao trocar com iões Na^+ nos túbulos distais.

O controlo rigoroso da concentração de potássio é essencial, dado que uma concentração alta de potássio pode inibir a contração muscular e levar a paragem cardíaca. Por outro lado, níveis baixos de potássio podem provocar ritmos cardíacos anormais. O laboratório deve sempre notificar imediatamente o médico em caso de ocorrência de valores alterados de potássio.⁽²³⁾

4.4.8.2 SÓDIO

O sódio é o catião mais abundante no fluido extracelular. Este catião tem uma função muito importante na manutenção da distribuição normal da água e da pressão osmótica do compartimento extracelular. A dieta diária normal contém 130 a 260 mmol de cloreto de sódio (NaCl) que são completamente absorvidas a nível intestinal. No entanto, o corpo humano apenas necessita de 1 a 2 mmol por dia, pelo que o excesso é eliminado a nível renal.

Distúrbios da homeostase do cálcio estão intimamente relacionados com a perda, absorção ou retenção excessivos de sódio ou com a perda, ganho ou retenção excessiva de água. Não é fácil distinguir os distúrbios do sódio do equilíbrio da água, pois estes encontram-se bastante relacionados no estabelecimento da osmolalidade normal de todos os compartimentos aquosos do corpo humano.⁽²³⁾

4.4.9 Proteinograma eletroforético

O proteinograma é uma electroforese em gel de agarose, que permite separar e quantificar as principais proteínas do soro, com base no seu tamanho e peso molecular. Depois de realizado o processo que engloba a separação electroforética, fixação e coloração em gel, o proteinograma apresenta 5 bandas correspondentes a cada uma das cinco frações de proteínas.

A intensidade de coloração da cada fração é proporcional à sua concentração em proteínas. Cada fração é quantificada separadamente de forma automática por densitometria no aparelho automático Microtech. O aparelho consegue detetar as diferentes absorções de luz, que correspondem às diferenças de coloração entre as várias frações, recorrendo a uma célula fotoelétrica. O estímulo é convertido em cinco ou seis picos, registados em papel, cuja área traduz as concentrações das diferentes bandas obtidas por electroforese. A concentração de cada fração é dada em função do valor das proteínas totais existentes no soro. A largura dos picos indica a heterogeneidade das proteínas constituintes da fração. As bandas diferenciadas num proteinograma correspondem às frações de seguida descritas. Pode-se verificar também na Figura 13, do lado esquerdo a foto da placa de acetato de celulose onde é feito a eletroforese, à direita uma adaptação do aspecto de um proteinograma normal.⁽¹⁸⁾

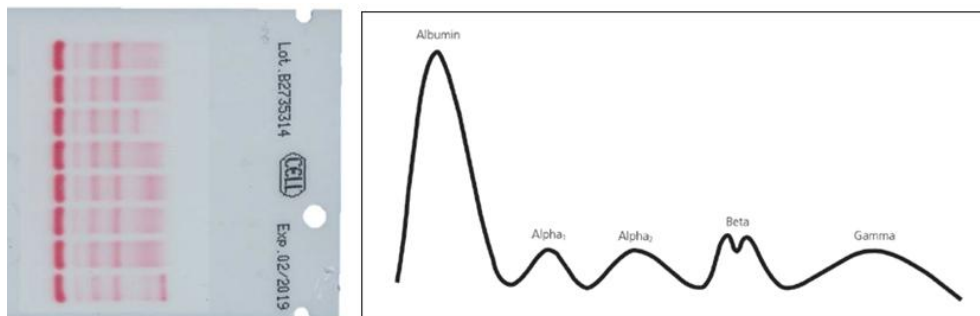


Figura 13 – Perfil electroforético em placa de acetato de celulose e gráfico representativo dos picos de cada fração de proteínas (foto do Coimbralab à esquerda, à direita gráfico representativo de proteinograma normal)

4.4.9.1 ALBUMINA

A albumina é a proteína mais abundante das proteínas do soro, sendo que corresponde a mais de metade das proteínas totais. A sua síntese é efetuada no fígado e é responsável pelo transporte de ácidos gordos, bilirrubina e outras substâncias, pela pressão oncótica sanguínea e é ainda uma fonte de aminoácidos para a síntese de novas proteínas. A albumina, ao participar no transporte de hormonas e cálcio, contribui para a estabilização dos seus níveis sanguíneos. A banda que corresponde à albumina, é aquela que migra mais, sendo por isso a que se encontra mais distanciada do pólo negativo.⁽¹⁸⁾

4.4.9.2 A₁-GLOBULINAS

A fração das α_1 -globulinas é heterogênea, pois apesar de ser constituída por proteínas plasmáticas diferentes, a sua mobilidade electroforética é semelhante: α_1 -antiquimiotripsina, transcortina (fixa o cortisol), lipoproteínas, globulina ligadora de tiroxina (TGB), α_1 -antitripsina e glicoproteínas orosomucoides. A proteína mais abundante desta fração é a α_1 -antitripsina.⁽¹⁸⁾

4.4.9.3 A₂-GLOBULINAS

A haptoglobina (proteína que fixa a hemoglobina oxigenada livre), a α_2 -macroglobulina, a eritropoietina e a ceruloplasmina (proteína importante no transporte do cobre) são as proteínas que estão englobadas na fração. As mais abundantes são a α_2 -macroglobulina e a haptoglobina, como tal são as que mais contribuem para o perfil electroforético.⁽¹⁸⁾

4.4.9.4 B-GLOBULINAS

As β -globulinas podem aparecer separadas em duas fracções β_1 e β_2 -globulinas. A principal componente da fracção β_1 é a transferrina, no entanto a hemoepsina também se encontra presente. A fracção β_2 é constituída por lipoproteínas β e por alguns componentes do sistema complemento.⁽¹⁸⁾

4.4.9.5 Γ -GLOBULINAS

As principais imunoglobulinas do soro estão incluídas nas γ -globulinas, particularmente as IgG, IgA e IgM. A IgG é a que se encontra em maior quantidade e a que menos migra, ficando mais próxima do polo negativo, seguido da IgA e da IgM. É importante realçar que as proteínas desta banda, para além de ter em comum a mobilidade electroforética, têm também em comum o facto de serem anticorpos. Por isto, quando se observa um soro imunizado, há um aumento no pico γ -globulinas em relação ao soro normal.⁽¹⁸⁾

CAPÍTULO 5 — CONCLUSÃO

Como estudante do Mestrado em Análises Clínicas, esta experiência foi imensamente enriquecedora como primeiro contacto que tive com o trabalho real de um laboratório de análises clínicas. Esta experiência veio confirmar que as análises clínicas são ferramentas fulcrais na monitorização da doença e no diagnóstico. O técnico superior de saúde tem também papel importante em garantir e avaliar a fiabilidade dos resultados obtidos, e na necessidade de pedir novas colheitas e/ou análises, mesmo antes destas chegarem ao clínico.

Para além do esperado na área laboratorial deste estágio, tive a oportunidade de seguir e presenciar as auditorias internas realizadas, que envolveram um grande trabalho da equipa, desde a apresentação de conteúdos com as regras da recente norma ISO 9001:2015, para que toda a equipa estivesse a par destas informações, fiscalização dos equipamentos e procedimentos em todos os postos de colheita e do laboratório, até a alteração de processos do funcionamento do próprio laboratório. Este trabalho foi o que permitiu ao Coimbralab adquirir a sua dupla certificação.

Em retrospectiva, fazendo um balanço do estágio:

- Acompanhei todos os processos que são o fluxo de trabalho do laboratório, desde a inscrição, colheita, triagem, análise e interpretação. Adquiri conhecimentos teóricos e práticos, ao realizar várias das técnicas manuais e discutindo resultados com a restante equipa, assim como ao acompanhar a validação biopatológica juntamente com a diretora técnica. Adquiri conhecimentos acerca da forma de implementação e de como trabalhar dentro de um Sistema de Gestão de Qualidade.
- Por motivos de segurança e também de imagem do laboratório, não me foi possível realizar colheitas, apenas observar e acompanhar, pelo que não adquiri componente prática nesta área. Tanto no laboratório, como no próprio curso, julgo ser uma falha, dado que pela informação que fui adquirindo junto dos meus colegas, é crucial no reportório do técnico superior de saúde, especialmente para novos técnicos que procuram o seu primeiro emprego.
- O estágio permitiu não só obter uma nova visão sobre como funciona um laboratório, mas também como funciona uma empresa. Independentemente do futuro que me aguarda, os padrões de qualidade que Coimbralab me ensinou serão úteis no meu futuro. Esta experiência revelou também em mim um renovado gosto por esta área, fomentando o desejo de continuar nas análises clínicas.
- Como dificuldade, já me informei que novas vagas nesta área podem não ser fáceis de encontrar, e para além disso, como já indiquei anteriormente, a falta de formação na colheita, pode dificultar o processo de encontrar o primeiro emprego.

Em nota final, a equipa do Coimbralab merece um muito obrigado da minha parte, pela sua cortesia e tempo disponibilizado, permitiram-me participar e fazer parte da sua equipa, formando-me como se de um novo elemento efetivo se tratasse, transformando este estágio numa etapa final enriquecedora a nível pessoal, académico e profissional.

BIBLIOGRAFIA

- (1) HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A.H. - **Haemopoiesis**. In: HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A.H. Hoffbrand's essential haematology. West Sussex: John Wiley & sons, Ltd, 2016. ISBN: 978-1-118-40867-4. p. 2-4.
- (2) HARRIS, J. Robin - **Erythroblasts and reticulocytes**. In: HARRIS, J. Robin. Blood Cell Biochemistry Vol.1: Erythroid cells. New York: Plenum Publishing Co., 1990. ISBN: 978-1-4757-9528-8.
- (3) HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A.H. - **Platelets, blood coagulation haemostasis**. In: HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A.H. Hoffbrand's essential haematology. West Sussex: John Wiley & sons, Ltd, 2016. ISBN: 978-1-118-40867-4. p. 265-267.
- (4) HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A.H. - **White cells — Granulocytes and monocytes**. In: HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A.H. Hoffbrand's essential haematology. West Sussex: John Wiley & sons, Ltd, 2016. ISBN: 978-1-118-40867-4. p. 88-93.
- (5) TURGEON, Mary L. - **Leukocytes — The granulocytic and monocytic series**. In: TURGEON, Mary L. Clinical haematology theory and procedures. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. ISBN: 978-1-60831-076-0. p. 236-243.
- (6) BAIN, Barbara J. - **Blood cell morphology in health and disease**. In: LEWIS, S. Mitchell, et al. Dacie and Lewis: Practical haematology. London: Churchill Livingstone, 2011. ISBN: 978-0-70203-408-4. p. 88-98.
- (7) HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A.H. - **The white cells 2 — Lymphocytes and their benign disorders**. In: HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A.H. Hoffbrand's essential haematology. West Sussex: John Wiley & sons, Ltd, 2016. ISBN: 978-1-118-40867-4. p. 103-106.
- (8) BRIGGS, C.; BAIN, Barbara J. - **Basic haematological techniques**. In: LEWIS, S. Mitchell, et al. Dacie and Lewis: Practical haematology. London: Churchill Livingstone, 2011. ISBN: 978-0-70203-408-4. p. 28-51.
- (9) HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A.H. - **Erythropoiesis and general aspects of anaemia**. In: HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, Paul A.H. Hoffbrand's essential haematology. West Sussex: John Wiley & sons, Ltd, 2016. ISBN: 978-1-118-40867-4. p. 22-23.
- (10) PORTUGAL. Direcção-Geral da Saúde — **Programa nacional para as doenças respiratórias**. Lisboa: DGS, 2013. p. 22.
- (11) LAFFAN, M.; MANNING, R. - **Investigation of haemostasis**. In: LEWIS, S. Mitchell, et al. Dacie and Lewis: Practical haematology. London: Churchill Livingstone, 2011. ISBN: 978-0-70203-408-4. p. 394-399.
- (12) LAFFAN, M.; MANNING, R. - **Investigation of haemostasis**. In: LEWIS, S. Mitchell, et al. Dacie and Lewis: Practical haematology. London: Churchill Livingstone, 2011. ISBN: 978-0-70203-408-4. p. 409-413.

- (13) LAFFAN, M.; MANNING, R. - **Laboratory control of anticoagulant, thrombolytic and antiplatelet therapy.** In: LEWIS, S. Mitchell, et al. *Dacie and Lewis: Practical haematology.* London: Churchill Livingstone, 2011. ISBN: 978-0-70203-408-4. p. 469-471.
- (14) BAGLIN, Caroline, et al — **Guidelines on oral anticoagulation with warfarin.** *British Journal of Haematology.* 154, 3 (2011), 311-324.
- (15) ASSASI, Nazila, et al — **Comparative value of ESR and CRP testing in combination Vs individually for the diagnosis of undifferentiated patients with suspected inflammatory disease or serious infection: a systematic review and economic analysis.** *Cadth Health Technology Assessment.* 140 (2015).
- (16) PANTEGHINI, M.; BAIS, R. - **Enzimas.** In: BURTIS, Carl A., et al. *Tietz: Fundamentos de Química Clínica.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. ISBN: 978-85-352-2845-8. p. 327-344.
- (17) HIGGINS, T., et al - **Hemoglobina, ferro e bilirrubina.** In: BURTIS, Carl A., et al. *Tietz: Fundamentos de Química Clínica.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. ISBN: 978-85-352-2845-8. p. 524-539.
- (18) JOHNSON, A.M. - **Aminoácidos e proteínas.** In: BURTIS, Carl A., et al. *Tietz: Fundamentos de Química Clínica.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. ISBN: 978-85-352-2845-8. p. 304-329.
- (19) LAMB, E.J.; PRICE, C.P. - **Creatinina, ureia e ácido úrico.** In: BURTIS, Carl A., et al. *Tietz: Fundamentos de Química Clínica.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. ISBN: 978-85-352-2845-8. p. 373-379.
- (20) SACKS, D.B. - **Carboidratos.** In: BURTIS, Carl A., et al. *Tietz: Fundamentos de Química Clínica.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. ISBN: 978-85-352-2845-8. p. 386-406.
- (21) PORTUGAL. Direcção-Geral da Saúde — **Diagnóstico e classificação da Diabetes Mellitus.** Lisboa: DGS, 2011.
- (22) RIFAI, N.; WARNICK, G.R.; REMALEY, A.T. - **Lípidos, lipoproteínas e outros factores de risco cardiovascular.** In: BURTIS, Carl A., et al. *Tietz: Fundamentos de Química Clínica.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. ISBN: 978-85-352-2845-8. p. 422-427.
- (23) SCOTT, M.G.; LEGRYS, V.A.; KLUTTS, J.S. - **Electrólitos e gases sanguíneos.** In: BURTIS, Carl A., et al. *Tietz: Fundamentos de Química Clínica.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. ISBN: 978-85-352-2845-8. p. 444-457.