



Cristiana Ferraz Fontes

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo
Dr. Frederico Valido e pela Professora Doutora Teresa Dinis e apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Cristiana Ferraz Fontes

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Relatório de Estágio Curricular, realizado no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Doutor Frederico Valido e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2018

Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil E. P. E.

Estágio realizado no período entre dezembro de 2017 e maio de 2018, nas áreas de Microbiologia, Bioquímica, Hematologia e Imunologia, sendo estas duas últimas valências as escolhidas para posterior aprofundamento.

Orientador interno: Professora Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva

Orientador externo: Doutor Frederico Fernando Monteiro Marques Valido

*“O que hoje é novo tornar-se-à velho
Assim como o que hoje é velho
Também já foi novo um dia...”*

*Não é o tempo que dá valor às coisas
O que lhes dá valor
É apenas a excelência que possuem.”*

Belloste, 1701

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer abordagem pretendo, por este meio, expressar o meu agradecimento ao Doutor Frederico Valido, Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, pela oportunidade proporcionada no âmbito hospitalar, pelo seu incentivo e reconhecimento durante o período de estágio.

Um agradecimento igualmente importante aos quatro orientadores de cada setor por onde passei, por toda a gentileza com que me acolheram e todo o conhecimento que me transmitiram.

Um enorme agradecimento à coordenação do Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. À Professora Doutora Leonor Martins de Almeida, que acompanhou o meu primeiro ano de mestrado e à Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa, que coordenou o meu segundo ano de mestrado incluindo, portanto, todo o processo de colocação do estágio curricular. Agradeço pela prontidão de ambas, pelo caráter afável e disponibilidade prestada.

Demonstro, também, a minha gratidão à Professora Doutora Teresa Carmo Pimenta Dinis Silva por todo o tempo dispendido na revisão do relatório, todo o apoio e sugestões pertinentes.

Um gigante e especial agradecimento aos meus pais, Dinis Fontes e Acélia Ferraz, pelo pilar firme e incansável que para mim representam, pela determinação que sempre me passaram, pela firmeza nos meus objetivos, pela ambição de mãos dadas com a humildade, pela disciplina que sempre priorizaram. Ao meu irmão, Pedro Fontes, por todos os ensinamentos e reconhecimento do meu percurso académico. À minha avó, Adelaide Ferraz, pelas horas a fio a estudar ao meu lado, por toda a paz e tranquilidade que me transmite e por toda a emoção que transparece pelo seu olhar doce e caloroso.

Por fim, mas não menos importante, dedico os meus últimos agradecimentos às amigadas de coração, que a todo o segundo dão sentido à minha vida. Obrigada Ana Catarina Neves, Ana Luísa Carvalho, Rita Santos, Joana Tabuaço, Liliana Esteves e às minhas afilhadas, Inês Pereira, Mara Almeida e Ana Cláudia Malafaia.

ÍNDICE GERAL

Página(s)

ABREVIATURAS	13
RESUMO	15
ABSTRACT	17
1. A PATOLOGIA E O LABORATÓRIO.....	19
2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO.....	21
2.1. CONTROLO DE QUALIDADE	23
2.2. SETOR DE MICROBIOLOGIA	24
2.3. SETOR DE BIOQUÍMICA.....	25
2.4. SETOR DE IMUNOLOGIA E HORMONOLOGIA	27
2.4.1. IMUNOENSAIOS.....	28
2.4.1.1. DETEÇÃO DE IMUNOCOMPLEXOS	28
2.4.1.1.1. AUTOMATIZAÇÃO.....	28
2.4.1.1.2. TÉCNICAS MANUAIS.....	31
2.4.1.2. PARÂMETROS ANALÍTICOS.....	32
2.4.1.2.1. MARCADORES TUMORAIS.....	32
2.4.1.2.1.1. CEA.....	33
2.4.1.2.1.2. CA 15.3	33
2.4.1.2.1.3. CA 125	33
2.4.1.2.1.4. CA 19.9	34
2.4.1.2.1.5. CA 72.4	34
2.4.1.2.1.6. CYFRA 21.1.....	34
2.4.1.2.1.7. PSA.....	34
2.4.1.2.2. HORMONAS	35
2.4.1.2.2.1. TESTOSTERONA.....	35
2.4.1.2.2.2. ALDOSTERONA	36
2.4.1.2.3. METABOLITOS DIVERSOS.....	37
2.4.1.2.3.1. METANEFRINA E NORMETANEFRINA.....	37

2.4.1.2.3.2. ÁCIDO 5-HIDROXINDOLACÉTICO.....	38
2.4.1.2.3.3. ÁCIDO VANILMANDÉLICO.....	38
2.4.1.2.4. ENZIMAS.....	38
2.4.1.2.4.1. RENINA.....	38
2.4.2. PROTEINOGRAMA e IMUNOFIXAÇÃO.....	39
2.4.2.1. SORO.....	40
2.4.2.2. URINA CONCENTRADA.....	42
2.5. SETOR DE HEMATOLOGIA.....	43
2.5.1. HEMOGRAMA.....	45
2.5.1.1. COLHEITA E PROCESSAMENTO.....	45
2.5.1.2. ANÁLISE.....	45
2.5.1.2.1. PRINCÍPIO DE COULTER.....	45
2.5.1.2.1.1. SÉRIE VERMELHA.....	46
2.5.1.2.1.1.1. ANEMIA NO DOENTE ONCOLÓGICO.....	46
2.5.1.2.1.2. SÉRIE BRANCA.....	47
2.5.1.2.1.3. PLAQUETAS.....	47
2.5.1.2.1.4. RETICULÓCITOS.....	48
2.5.1.3. ESFREGAÇO DE SANGUE PERIFÉRICO.....	48
2.5.1.3.1. COLORAÇÃO DE WRIGHT-GIEMSA.....	49
2.5.1.3.2. MEDULOGRAMA E COLORAÇÃO DE PERLS.....	49
2.5.2. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO.....	50
2.5.3. HEMOSTASE.....	51
2.5.3.1. COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	52
2.5.3.1.1. TESTES DE COAGULAÇÃO.....	52
2.5.3.1.1.1. TEMPO DE PROTROMBINA.....	53
2.5.3.1.1.2. TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA.....	54
2.5.3.1.1.3. TEMPO DE TROMBINA.....	56
2.5.4. PERFIL IMUNOFENOTÍPICO.....	56
2.5.5. ANÁLISE GENÉTICA DO GENE BCR-ABL.....	57
3. CONCLUSÕES.....	59

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
5. ANEXOS	65
<i>ANEXO 1: Equipamentos de quimioluminescência e respetivos parâmetros analíticos avaliados em cada um deles</i> .	65
<i>ANEXO 2: Equipamento de imunofluorescência e respetivos parâmetros analíticos avaliados</i>	66
<i>ANEXO 3: Equipamentos de nefelometria e respetivos parâmetros analíticos avaliados em cada um deles</i>	66
<i>ANEXO 4: Equipamento imunoenzimático e respetivos parâmetros analíticos avaliados</i>	66
<i>ANEXO 5: Equipamento imunoenzimático de fluorescência e respetivos parâmetros analíticos avaliados</i>	67
<i>ANEXO 6: Técnicas manuais realizadas no setor de Imunologia e Hormonologia: amostras, analitos e respetivas metodologias</i>	67
<i>ANEXO 7: Equipamento de radioimunoensaio e respetivos parâmetros analíticos avaliados</i>	67
<i>ANEXO 8: Equipamento de leitura ELISA</i>	68
<i>ANEXO 9: Equipamento de registo dos perfis eletroforéticos e respetivos parâmetros analíticos avaliados</i>	68
<i>ANEXO 10: Equipamento para realização do hemograma</i>	68
<i>ANEXO 11: Equipamentos para coloração e visualização do esfregaço sanguíneo</i>	68
<i>ANEXO 12: Equipamento para determinação da velocidade de sedimentação</i>	69
<i>ANEXO 13: Equipamento para testes de coagulação</i>	69
<i>ANEXO 14: Equipamento de citometria de fluxo</i>	69

ABREVIATURAS

*ACTH: Hormona adrenocorticotrófica
(Adrenocorticotropic Hormone)*

Ac: anticorpo

Ag: antígeno

*APA: adenoma produtor de aldosterona
CA 72.4: Antígeno Carbohidrato 72.4*

CA 125: Antígeno Carbohidrato 125

CA 15.3: Antígeno Carbohidrato 15.3

CA 19.9: Antígeno Carbohidrato 19.9

*CEA: antígeno carcinoembrionário
(Carcinoembryonic antigen)*

*ELP: eletroforese de proteínas
(electrophoresis protein)*

*EMIT: Enzyme Multiplied Immunoassay
Technique*

FT: fator tecidual

GAM: cadeias IgG, IgA e IgM

G6PDH: glucose 6 fosfato desidrogenase

*INR: razão internacional normalizada
(International Normalised Ratio)*

*K3EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
tripotássico*

LCR: líquido cefalorraquidiano

LLA: leucemia linfocítica aguda

LLC: leucemia linfocítica crónica

LMA: leucemia mielóide aguda

LMC: leucemia mielóide crónica

NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide

*NADH: nicotinamida adenina dinucleótido
hidreto*

*NRBC: glóbulos vermelhos nucleados
(nucleated red blood cells)*

PCR: proteína C reativa

PDF: produtos de degradação da fibrina

*PDW: índice de anisocitose plaquetar
(platelet distribution width)*

PP: polipeptídeo pancreático

*PSA: Antígeno Específico da Próstata
(Prostate Specific Antigen)*

*PT: tempo de protrombina (prothrombin
time)*

*PTT: tempo de tromboplastina parcial
ativada (partial thromboplastin time)*

*PTH: Hormona paratiróideia (Parathyroid
Hormone)*

RIA: Radioimunoensaio (Radioimmunoassay)

*RIQAS: Randox International Quality
Assessment Scheme*

RNA: ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)

SPC: Serviço de Patologia Clínica

SRA: sistema renina-angiotensina

*TRACE: Time Resolved Amplified Cryptate
Emission*

TSA: teste de suscetibilidade antimicrobiana

TT: tempo de trombina (thrombin time)

UFC: unidades formadoras de colónias

VS: velocidade de sedimentação

RESUMO

Este relatório pretende refletir parte do conhecimento adquirido no estágio curricular, integrado no Mestrado de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, realizado no Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil E. P. E., no serviço de Patologia Clínica.

É um Instituto centrado na doença oncológica, em que o Serviço de Patologia Clínica permite a obtenção de resultados fiáveis, diagnósticos concretos e o direcionamento de terapêuticas, alicerçadas no conhecimento científico, em paralelo com uma sofisticada tecnologia.

O conhecimento da flora patogénica, a deteção da alteração de inúmeros parâmetros relativos aos fluidos biológicos e órgãos do nosso organismo e em particular, no contexto oncológico, a determinação de marcadores tumorais, são tudo suportes que nos permitem a monitorização de patologias.

A tecnologia permite-nos obter cada vez mais resultados confiáveis, através de técnicas e ensaios mais sensíveis e específicos, em paralelo com um controlo de qualidade implementado na rotina do laboratório.

Palavras-chave: patologia clínica; oncologia; tecnologia; diagnóstico; controlo de qualidade; terapêutica.

ABSTRACT

This report intends to reflect part of the knowledge acquired at the curricular stage, integrated in the Master of Clinical Analysis of the School of Pharmacy of the University of Coimbra, held at the Portuguese Oncology Institute Francisco Gentil E. P., in the Clinical Pathology service.

It's an Institute focal in the oncologic disease. The Patological service allows to obtain reliable results and exact diagnosis. This is possible by using scientific knowledge and sophisticated technology.

The knowledge of the pathogenic flora, the detection of the alteration of numerous parameters related to the biological fluids and organs of our organism and in particular, in the oncological context, the determination of tumor markers, are all supports that allow us to monitor pathologies.

Using advanced methods of technology we are able to obtain more and more reliable results, through more sensitive and specific techniques and tests, in parallel with a quality control implemented in the routine of the laboratory.

Keywords: clinical pathology; oncology; technology; diagnosis; quality control; therapy.

1. A PATOLOGIA E O LABORATÓRIO

“Todo o interesse na doença e na morte é, na verdade, apenas uma outra expressão do nosso interesse na vida.”

Thomas Mann

O cancro é uma realidade dura de aceitar e que, cada vez mais, não escolhe género, idade ou estrato social. Milhões de pessoas travam esta batalha diariamente e a sua prevalência tende a aumentar, pelo que é inevitável a procura de respostas cada vez mais concretas para se atingir uma terapêutica o mais próxima possível do sucesso.

Caracteriza-se por uma proliferação celular descontrolada, decorrente de uma expressão genética alterada em resultado de uma mutação. Existem duas categorias, os cancros não sanguíneos, conhecidos como tumores sólidos, e os cancros das células sanguíneas. Os tumores sólidos são classificados de acordo com o tipo de célula a partir da qual eles surgem, sendo o cancro de células epiteliais o mais comum, como o cancro do pulmão, mama, cólon e cervical. Os cancros de células de sangue mais frequentes são as leucemias e os linfomas. Surgem quando descendentes de células imaturas deixam de se diferenciar e continuam a proliferar. Na leucemia, as células imaturas ocupam a medula e impedem que outras células do sangue proliferem, de onde advém a anemia. No linfoma, aglomerados de células imaturas encontram-se nos gânglios linfáticos e outros órgãos linfóides, semelhantes a tumores sólidos. (Sompayrac L, 2016)

O laboratório de análises clínicas veio estabelecer a ponte entre patologia oncológica e o diagnóstico clínico e, posteriormente, com o surgimento do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil afirmou-se a relevância em dispôr de meios para a monitorização dos doentes oncológicos.

O laboratório clínico veio permitir o estudo das alterações estruturais, funcionais e bioquímicas das células, tecidos e órgãos, e rege-se pela identificação, quantificação, interpretação e direcionamento para o clínico. Parâmetros clínicos alterados devido a tumores têm vindo a refletir evidências mais precisas em relação ao cancro, com vista à monitorização e ao direcionamento terapêutico mais eficaz, atingir o sucesso e permitir uma nova esperança de vida para o doente oncológico.

A amostra do paciente deve permanecer íntegra e, por isso, passível de ser analisada. Pretende-se que seja representativa do organismo de origem de forma a garantir que a análise *in vitro* reflita fielmente o que se passa *in vivo*, no interior do organismo.

Este estágio foi realizado durante um período de seis meses, de dezembro de 2017 a maio de 2018, contemplando a passagem pelos setores de Microbiologia, Bioquímica, Hematologia e Imunologia, sendo estas duas últimas valências as que escolhi para um maior aprofundamento.

Foi um estágio deveras desafiante em que o contacto com a rotina hospitalar me trouxe uma realidade que eu não conhecia até então. Conheci a retaguarda do altruísmo e verifiquei o esforço que é exigido e toda a complementaridade entre áreas para que se possa promover a saúde e o bem estar dos pacientes. Além disso, a cada manhã em que estava de volta ao IPO, nunca ficava indiferente à passagem pelas salas de espera, o silêncio devorador, as lágrimas contidas, as perguntas sem resposta, a luta contra o vazio da cura e da doença. E isso veio trazer-me uma noção mais real da carga emocional que todo este percurso acarreta e que vem aumentar a responsabilidade de qualquer profissional de saúde.

Uma análise laboratorial é muito mais do que uma cultura numa estufa ou um tubo numa centrífuga, muito mais do que a exploração de um esfregaço ou a deteção de um imunocomplexo. É uma vida humana à qual estamos a conferir um sentido e um rumo. É como uma forma científica de acrescentar ou roubar sonhos.

“Não procure fora, mas dentro de você, é no interior do Homem que habita a verdade.”

Santo Agostinho

2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O Serviço de Patologia Clínica é dirigido pelo Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido, especialista em Patologia Clínica. A equipa é constituída por médicos, farmacêuticos, biólogos, bioquímicos, técnicos de análises, pessoal administrativo e auxiliares.

O Serviço conta com um fluxo de, aproximadamente, 300 utentes por dia. A administração trata do atendimento de cada utente, receção das várias requisições de análises e posterior registo informático com a atribuição de um número de processo, único para cada utente. Durante muitos anos houve a intenção de implementar um sistema informático que permitisse o registo em função do número de processo, ou seja, em função de cada utente, e não em função do tipo de análise requisitada. Tal avanço aconteceu no período em que decorreu o meu estágio, o que veio possibilitar um registo mais metódico, organizado e de fácil acesso, onde o número de processo veio permitir o acesso a todos os tipos de análises de um utente, individualmente. Além disso, como parte integrante do registo de um utente, é atribuído um número de dia a cada amostra recebida em laboratório, que se representa por um número seguido de uma letra maiúscula, de A a G, que representa os dias da semana, de segunda a domingo. Enquanto o número de processo é constante no tempo, o número de dia varia para cada amostra recebida.

Após o registo informático é a área das colheitas o passo seguinte. São os técnicos de análises clínicas que efetuam as colheitas nas salas do ambulatório, aos doentes que até lá se deslocam, bem como as colheitas nas salas de internamento.

As amostras são reencaminhadas para os diversos setores, de acordo com as análises requisitadas. A componente laboratorial compreende quatro setores: Microbiologia, Bioquímica, Hematologia e Imunologia.

Todo o processamento analítico é garantido pelos variados testes laboratoriais, executados com tecnologia avançada (tabela I) e com uma qualidade dos resultados assegurada pelo Controlo de Qualidade Interno e Externo.

Tabela I. Equipamentos existentes no Serviço de Patologia Clínica do IPO de Coimbra

AUTO-ANALISADOR	FUNÇÃO/DESCRIÇÃO
MICROBIOLOGIA	
BD Bactec™ 9050 Blood Culture System	Hemoculturas
Vitek® 2 Compact 15, da BioMérieux™	Antibiograma: sensibilidade e resistências de bactérias e leveduras
Cobas u411, da Roche Diagnostic™	Análise sumária de urina
Câmara de fluxo laminar Forma Scientific	Câmara de trabalho
GeneXpert®, da Cepheid	Análise genética
BIOQUÍMICA	
RapidChem™ 744, da Bayer®	Confirmação de ionogramas (Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻)
Reflotron® Plus, da Roche®	Confirmação de alguns parâmetros do COBAS® 6000
COBAS® 6000 Analyser Series Hitachi, da Roche®	Autoanalisador, com dois módulos em cadeia, para a maioria dos parâmetros bioquímicos
- COBAS® 501, da Roche (2)	
COBAS® 311, da Roche	Autoanalisador de apoio
Rapidlab® 1265, da Siemens	Gasometria
ABL 800 Flex	Deteção do cálcio ionizado
IMUNOLOGIA E HORMONOLOGIA	
Immulite 2000 Xpi®, da Siemens	Maioria dos parâmetros analíticos
VersaCell X3, da Siemens	Braço mecânico que assegura a distribuição dos tubos para o Immulite e o Centaur
ADVIA Centaur® XP, da Siemens	Deteção de parâmetros de fertilidade
Kryptor® Brahms	Deteção de parâmetros de mama e pulmão
COBAS 6000® Analyser Series Hitachi, da Roche®	Deteção de parâmetros digestivos e da tiróide
- COBAS 601®, da Roche	
Liaison®, da DiaSorin	Deteção de marcadores cardíacos e vírus
BN - ProSpec®, da Siemens	Deteção de imunoglobulinas
Optilite Optimised Protein System Binding Site	Deteção de cadeias leves livres
I 470 Wizard Wallac maditecno	Contador de radiação gama
Hydrasis®, da Sebia - Thermo Fisher Scientific	Eletroforese
Viva-E®, da Siemens	Monitorização de fármacos
UniCAP Thermo Fisher Scientific	Testes de auto-imunidade
Molecular devices	Leitura de microplacas
HEMATOLOGIA	
ALI FAX® Test I BCL	Velocidade de sedimentação
Beckman Coulter® LH 750	Hemograma
FC 500 Cytomics Beckman Coulter®	Citómetro de fluxo
Wescor® Aerospray® 7150 cytocentrifuge	Coloração de lâminas
ACL TOP 500 Instrumentation laboratory	Testes de coagulação
GeneXpert®, da Cepheid	Análise genética
Leitz Laborlux S	Microscopia

2.1. CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade visa garantir a qualidade dos resultados que é um dos objetivos primordiais no laboratório, permitindo melhores diagnósticos e terapêuticas mais bem direcionadas, para além da redução de tempo e custos.

O controlo da qualidade diz respeito às fases pré-analítica, analítica e pós-analítica. A fase pré-analítica representa a maior fonte de erro e reflete uma série de eventos anteriores ao processamento da amostra, desde o preenchimento de requisições, a escolha de anticoagulantes, o tempo de transporte da amostra, a posição do utente no momento da colheita, a sua medicação usual, restrições alimentares e esforço físico. A fase analítica compreende a execução laboratorial propriamente dita e, aqui, têm primordial importância os analisadores automáticos, respetivas calibrações e controlos, e a preparação dos reagentes. A fase pós-analítica implica a interpretação, validação e emissão dos resultados.

O controlo de qualidade interno prende-se com a precisão dos resultados e é realizado todos os dias, a partir de um nível baixo (*low*), normal e alto (*high*) de cada parâmetro, em todos os analisadores ou em algum que não tenha sido recentemente utilizado. Em Bioquímica este procedimento é realizado de manhã, antes do serviço se iniciar, enquanto que em Imunologia os controlos intercalam-se com as amostras porque existem deteções com uma hora de duração e seria inviável que todas as amostras esperassem esse tempo e se retardasse a resposta ao paciente. Além disso, analisam-se os gráficos de controlo (gráfico de Levey-Jennings) que, de acordo com as regras de *Westgard*, nos reportam a relevância de cada desvio padrão e um controlo de qualidade mais rigoroso.

O controlo externo prende-se com a exatidão dos resultados e é realizado uma ou duas vezes por ano, consoante o setor. A entidade avaliadora envia amostras desconhecidas para o laboratório e a análise segue o percurso normal. Internacionalmente existe o RIQAS (*Randox International Quality Assessment Scheme*) e a nível nacional o INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge). Este controlo permite a comparação entre laboratórios, mediante as mesmas tecnologias, condições e protocolos.

2.2. SETOR DE MICROBIOLOGIA

O setor de Microbiologia está sob a orientação da Doutora Maria Alexandre, técnica superior de saúde, Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Neste setor realizam-se estudos bacteriológicos, micobacteriológicos, micológicos e parasitológicos. A amostra maioritária é a urina, mas recebe uma grande diversidade de amostras tais como: sangue, secreções respiratórias (expetoração e lavados), exsudatos/pús superficial em zaragatoa, pús profundo em seringa, fezes, líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido pleural, biópsias e pontas de catéteres (para monitorização de dispositivos médicos), para além do controlo bacteriano de superfícies de suporte laboratorial e farmacêutico.

Estruturalmente, o setor de Microbiologia encontra-se subdividido em duas partes: a análise sumária de urina e a pesquisa de microorganismos em sementeira, englobando toda a extensão da sua identificação quer manual quer apoiada por tecnologia. As observações microscópicas, após técnicas de coloração, efetuam-se numa sala à parte.

A urina, em particular, reúne a análise sumária, a observação microscópica e a urocultura (Fonseca A. *et al.*, 2004).

É o setor menos automatizado, existindo grande risco de contaminação, pelo que o trabalho técnico é fulcral para que se obtenham resultados de confiança.

Para se identificar o agente responsável por um estado infeccioso é fundamental a correta escolha da amostra biológica e o reconhecimento da flora e dos contaminantes, de forma a garantir a racionalização do uso de antimicrobianos.

A consideração do valor patogénico das estirpes depende de diversos fatores. A qualidade da amostra prende-se com a colheita por parte dos técnicos ou próprios utentes, como é o caso da recolha de urina para urocultura, uma vez que se pretende evitar a contaminação com a flora comensal. A representatividade relaciona-se com a qualidade, mas também com a quantidade, dado que amostras irrisórias pressupõem, geralmente, uma negatividade. Em termos de patogenicidade, devemos ter em conta que estirpes oportunistas são comuns nos doentes de Oncologia, uma vez que a maioria são imunodeprimidos. A proporção das colónias é importante na medida em que, se existir uma estirpe comensal muito prevalente em relação às outras, poderemos ter de a considerar clinicamente relevante.

A técnica pioneira de qualquer identificação é a coloração de Gram, que nos permite diferenciar cocos de bacilos. Realiza-se um esfregaço, diretamente da amostra, de seguida a

sementeira em meio de cultura, incubação e, finalmente, a identificação e o teste de suscetibilidade antimicrobiana, feitos paralelamente num analisador adequado (*Vitek*).

Existem ainda provas manuais bioquímicas realizadas à parte como forma de confirmação, como a pesquisa da catalase, oxidase, urease e coagulase. A observação das colónias, em meio de cultura, apoia-se na análise qualitativa e quantitativa (não se valoriza quando há menos do que 10^5 UFC/mL por estirpe) (Fonseca A. *et al.*, 2004).

Fluidos estéreis, como o sangue e o LCR, implicam sempre positividade mediante o surgimento de alguma estirpe. O sangue é uma amostra muito particular cuja cultura se faz em meio líquido de tripticase de soja e, quando positiva, indica-nos a presença de infeção. O LCR exige um processamento imediato e urgente, dada a relação com a Meningite Bacteriana (Fonseca A. *et al.*, 2004).

Tal como o exame micológico está para os fungos, o exame micobacteriológico está para as micobactérias, mais concretamente os bacilos ácido – álcool resistentes (BAAR), confirmado por técnicas de biologia molecular. O meio de cultura Lowenstein-Jensen e a coloração de Ziehl são exclusivos das micobactérias, bacilos altamente aeróbios (Fonseca A. *et al.*, 2004).

Neste setor acompanhei toda a rotina laboratorial, desde a chegada da amostra ao seu processamento e, posteriormente, a interpretação acerca do crescimento das colónias, as suas morfologias microscópicas e em meio de cultura, a sua valorização em termos quantitativos e registo das resistências e suscetibilidades antimicrobianas.

Acompanhei, inclusive, o percurso clínico de muitos utentes, cujo historial patológico tinha relação com a Bioquímica e a Hematologia, o que permitiu um olhar mais próximo e mais atento da evolução da doença e levou a não me restringir meramente à Microbiologia.

2.3. SETOR DE BIOQUÍMICA

O setor de Bioquímica está sob a orientação do Doutor Luís Nina, médico especialista em Patologia Clínica.

Nesta área do laboratório faz-se a deteção de iões, como o sódio, potássio, cloro, cálcio (total e ionizado), enzimas como a amilase e fosfatases, proteínas como a albumina, hemoglobina glicada, marcadores cardíacos como a mioglobina e a troponina, metabolitos como as bilirrubinas, ácido úrico e creatinina, e lípidos como o colesterol, triglicerídeos e fosfolípidos. Há também a deteção da pressão parcial de gases (gasometria), CO_2 e O_2 ,

sendo a colheita do sangue arterial um ato exclusivamente médico. As gasometrias são particularmente úteis para avaliar as condições de pré-operatório, durante a cirurgia e o pós-operatório, de forma a direcionar comportamentos cirúrgicos adequados e a fomentar o sucesso da terapia.

Parâmetros bioquímicos como estes permitem-nos inferir sobre a funcionalidade dos órgãos e suas vias metabólicas, avaliando as dinâmicas dos sistemas hepático, renal, biliar, cardiovascular, pancreático, gastrointestinal e muscular.

Muitos parâmetros comportam-se como marcadores tumorais, pelo que este setor apresenta especial relevância para a monitorização de doentes oncológicos.

A amostra maioritária é o soro, mas também sangue total, urina, LCR e expetorações. O sangue total centrifuga a 3000 rpm, durante 10 minutos, e as restantes amostras a 1500 rpm, durante 10 minutos, uma vez que a matriz proteica é menos densa.

O aspeto primordial para se obter soro é a colheita de sangue para tubo sem anticoagulante, mas com esferas ativadoras da coagulação e gel separador.

Estruturalmente, o setor de Bioquímica encontra-se subdividido em três partes. Uma primeira sala é de receção de amostras, etiquetagem, centrifugação e obtenção do soro. Numa segunda sala, a mais automatizada, faz-se a análise da maioria dos parâmetros bioquímicos e inclui computadores e tecnologia associada à programação dos equipamentos. Numa terceira sala realiza-se a confirmação do ionograma, a determinação rápida de parâmetros como a glucose e a creatinina através de química seca, a realização de gasometrias e a validação dos resultados.

É um setor muito automatizado, pelo que o trabalho técnico adota um ritmo mais rígido.

Para além das análises comumente automatizadas, também são realizados testes serológicos manuais, como o teste de Waaler Rose (deteção de fatores reumatóides), o RPR - Nosticon II (diagnóstico da Sífilis), o Avitex SLE (diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistémico), teste de Wright (diagnóstico de Brucelose), entre outros menos comuns.

Neste setor acompanhei a generalidade da rotina laboratorial, desde a centrifugação à recolha dos tubos dos equipamentos de análise, passando pela programação do autoanalisador, realização de repetições e entrega das requisições para posterior validação. Assisti, inclusive, ao procedimento pré-analítico da hidratação de reagentes.

2.4. SETOR DE IMUNOLOGIA E HORMONOLOGIA

O setor de Imunologia está sob a orientação do Doutor Nuno Cunha, Licenciado em Bioquímica.

Neste setor, em contexto automatizado, faz-se a deteção de marcadores tumorais e cardíacos, hormonas, proteínas, inclusive as de fase aguda, enzimas, auto-anticorpos para estudos de autoimunidade e fármacos com vista à monitorização ou ajuste terapêutico. São também realizadas técnicas manuais com alguma frequência, em relação a parâmetros pré-estabelecidos, como a deteção da testosterona livre, aldosterona, glucagon, entre outros, para além dos proteinogramas e imunofixações.

As amostras analisadas neste setor são o soro, a urina e o plasma. Regra geral, qualquer amostra é primeiramente centrifugada a 3000 rpm, durante 10 min, exceto a urina das 24h que exige uma homogeneização, registo do volume e centrifugação de uma alíquota. A obtenção do soro é conseguida pela colheita de sangue para tubo sem anticoagulante, com esferas ativadoras da coagulação e gel separador. O plasma obtém-se na presença de um anticoagulante (K3EDTA) e, quando refrigerado, permite a determinação da hormona paratiroideia (PTH), hormona adrenocorticotrófica (ACTH) e metanefrinas fraccionadas, uma vez que se trata de hormonas e metabolitos instáveis à temperatura ambiente. Por vezes também se doseia o cortisol livre a partir de amostras de saliva.

É de referir que este setor integra um “software” independente do restante Serviço, pelo que as prescrições analíticas de imunologia, serologia infecciosa, hormonologia e proteínas específicas, entre outras, são novamente registadas com atribuição de novo código por contentor, numa base de dados distinta.

Estruturalmente, o setor de Imunologia e Hormonologia encontra-se subdividido em várias áreas, sendo o setor com a maior área, mas também o mais diversificado em termos de parâmetros analíticos e termos tecnológicos. O circuito dos produtos recebidos no setor segue uma ordem pré-definida: registo informático, centrifugação, etiquetagem do contentor e colocação no equipamento *VersaCell*, que os reencaminha para o *Immulite XPi* e/ou *Centaur XP*, seguindo para o *Kryptor*, *COBAS e601* e, consoante os parâmetros pedidos são reencaminhados para o *Liaison*, *BN – ProSpec*, *Hydrasis* e/ou *Optilite*, entre outros mais específicos e menos utilizados na rotina, de forma a que o percurso prioritário seja feito na sala principal, onde se encontram a maioria dos analisadores e onde se inclui a validação dos resultados por parte dos especialistas do setor.

Neste setor acompanhei toda a rotina laboratorial, desde o registo na base de dados, etiquetagem e distribuição dos tubos pelos equipamentos conforme os testes requisitados. Também realizei técnicas manuais para quantificação da testosterona livre, aldosterona, glucagon, ácido 5-hidroxi-indolacético, metanefrinas fraccionadas urinárias e plasmáticas. Também efetuei eletroforese de proteínas do soro e de urina de 24h.

2.4.1. IMUNOENSAIOS

O princípio base do imunoensaio é a reação antigénio-anticorpo, dada a afinidade entre epítomos. Trata-se de uma interação altamente específica e sensível, pelo que se projeta como a base de funcionamento da generalidade dos equipamentos utilizados neste setor, permitindo a deteção de anticorpos ou de moléculas que se comportem como antigénios, como hormonas, marcadores de infeção ou marcadores tumorais. Quanto à ligação do antigénio ao anticorpo conseguimos distinguir diversos tipos de imunoensaios (Koivunen M. e Krogsrud R., 2006).

Face ao desenho experimental do imunoensaio, as metodologias de deteção diferem conforme o tipo de visualização do imunocomplexo ou o tipo de marcador utilizado, que pode ser um fluoróforo, um radioisótopo ou uma enzima, que permite a deteção por fluorescência, quimioluminescência ou eletroquimioluminescência.

2.4.1.1. DETEÇÃO DE IMUNOCOMPLEXOS

2.4.1.1.1. AUTOMATIZAÇÃO

Uma das deteções mais simples de imunocomplexos é pela medida da dispersão de luz – nefelometria – que é o princípio base do *BN-ProSpec*[®] e do *Optilite*. (ANEXO 3)

Este modo de deteção baseia-se na formação de imunocomplexos insolúveis que permitem a dispersão de luz (Reed R., 2017).

A maioria dos ensaios imunoenzimáticos recorrem ao uso de uma enzima como marcador, ou seja, conjugada com o anticorpo, sendo a ação catalítica dessa enzima que permite a quantificação, que pode ser colorimétrica, fluorimétrica ou quimioluminescente, dependendo dos substratos que são utilizados.

A quimioluminescência, princípio base do *Immulite 2000 Xpi*[®], *ADVIA Centaur*[®] *XP*, *COBAS 6000*[®] e *Liaison*[®] (ANEXO 1), independentemente do desenho experimental do imunoensaio (competitivo ou não competitivo) é a principal técnica de deteção de imunocomplexos

utilizada no setor de imunologia e hormonologia, do laboratório de patologia clínica do IPOFG.E.P.E. de Coimbra.

Nos imunoensaios competitivos existe uma matriz sólida com anticorpos específicos imobilizados que estabelecem complementaridade com os antígenos da amostra e com antígenos marcados, os quais competem entre si pela ligação aos anticorpos. Quanto maior a concentração do antígeno de interesse, menor o sinal gerado pelo antígeno marcado, sendo inversamente proporcionais. O mesmo raciocínio adequa-se à pesquisa de anticorpos, com recurso a anticorpos marcados, pelo mesmo ensaio competitivo (Darwish I., 2006).

Nos imunoensaios não competitivos (diretos) ou em sandwich existem anticorpos específicos imobilizados (anticorpos primários) que são complementares com os antígenos da amostra que, por sua vez, estabelecem complementaridade com anticorpos secundários, que reconhecem esses antígenos numa região distinta. (Koivunen M. e Krogsrud R., 2006) Quanto maior a concentração do antígeno de interesse maior o sinal obtido, sendo diretamente proporcionais (Darwish I., 2006).

O sistema *Immulite 2000 Xpi*[®] (ANEXO 1), responsável pela determinação da maioria dos parâmetros, contém esferas revestidas com anticorpos primários específicos para o antígeno de interesse (Ciarlini L. et al., 2002).

É uma técnica competitiva pelo que se adicionam antígenos marcados com a enzima fosfatase alcalina. A posterior incubação a 37°C dá-se com uma agitação permanente, permitindo a formação eficaz de complexos Ag-Ac e os Ag e Ac que não se ligaram são removidos por lavagem, por centrifugação, para um poço coletor. O ensaio prossegue com a adição de um substrato quimioluminescente o éter fosfato de adamantil dioxetano (Ciarlini L. et al., 2002).

Dá-se o início da reação quimioluminescente, que reúne a hidrólise do substrato pela enzima fosfatase alcalina, cuja reação promove a excitação de eletrões de um intermediário e a sua instabilidade leva ao retorno ao estado fundamental. Tal processo leva à emissão de luz como consequência de uma reação química (Koivunen M. e Krogsrud R., 2006).

Os passos sequenciais de lavagem são fundamentais para minimizar erros e conferir especificidade ao ensaio, eliminando Ag livres que se ligam aos Ac secundários e não aos primários. De uma forma geral, as vantagens da quimioluminescência são: a ausência de material radioativo, metodologias com maiores prazos de validade, automatização e execução de vários testes numa só amostra (Ciarlini L. et al., 2002).

Variantes da quimioluminescência são também aplicadas laboratorialmente, como é o caso da eletro-quimioluminescência no *COBAS 6000*[®] (ANEXO 1), que recorre ao uso de dois Ac monoclonais, um biotilado e outro com ruténio, sendo os imunocomplexos formados à superfície de um elétrodo. A reação é eletricamente estimulada pela aplicação de uma corrente elétrica que leva à indução e emissão de luz. Outra variante é a da quimioluminescência luminométrica no *Liaison*[®] (ANEXO 1) que segue o princípio comum da quimioluminescência, no entanto, utiliza como marcador um derivado do isoluminol (Ciarlini L. et al., 2002).

Outro ensaio imunoenzimático competitivo ocorre no *Viva-E*[®] (ANEXO 4) para a análise rápida de drogas de abuso, anti-convulsionantes, antibióticos e imunossuppressores, com vista à monitorização ou ajuste de terapêuticas. É uma técnica baseada na tecnologia EMIT (*Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*) onde se dá a competição entre o xenobiótico de interesse (antigénio) e um antigénio marcado com a enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), pelo anticorpo da matriz. Quanto maior a quantidade de xenobiótico, menor a atividade enzimática, uma vez que o antigénio marcado só reage quando se encontra livre (não ligado ao anticorpo). A reação enzimática origina a conversão do NAD a NADH, que é lido espectrofotometricamente (Fukushima A. et al., 2009).

A imunofluorescência do tipo não competitivo, associada à tecnologia TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission), é o princípio base do *Kryptor*[®] (ANEXO 2). Caracteriza-se pela transferência de energia não radioativa entre dois marcadores fluorescentes, um dador (criptato) e um recetor (XL 665), acoplados a dois anticorpos específicos para o antigénio de interesse. Após a formação do imunocomplexo Ag-Ac, ocorre uma transferência de energia do criptato para o fluorocromo XL 665, o que requer uma proximidade física entre dador e aceitador, de forma que o aceitador só seja excitado quando se forma um complexo entre o antigénio e o anticorpo dador. O antigénio assume-se como a “ponte” entre os anticorpos (Darwish I., 2006).

A intensidade do sinal do XL 665 é proporcional à concentração do antigénio da amostra, mas ambos os sinais de fluorescência são medidos simultaneamente, permitindo calcular uma razão de intensidades e corrigir as diferenças de transmissão ótica do meio (Darwish, 2006). As vantagens deste princípio prendem-se com o alongamento temporal e a intensificação do sinal de fluorescência. Além disso, permite uma análise cinética, dispensando os processos de separação e lavagem, levando a uma medição sem interrupção logo no início da incubação,

permitindo o reconhecimento de amostras de concentrações elevadas, para que sejam automaticamente diluídas e analisadas (Darwish I., 2006).

Os imunoenaios indiretos implicam a detecção de imunocomplexos por um anticorpo secundário, como acontece no *UniCAP* (ANEXO 5) para estudos de auto-imunidade. É um ensaio imunoenzimático de fluorescência, uma vez que o anticorpo secundário marcado com uma enzima, ao catalisar a reação, leva à formação de um produto fluorescente. A intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à concentração do anticorpo presente na amostra (Johansson S., 2004).

Técnicas indiretas permitem-nos reduzir ligações inespecíficas e aumentar a especificidade (Koivunen M. e Krogsrud R., 2006).

Associado a todos estes imunoenaios pode existir o efeito de “hook”, que é a subestimação do analito em estudo. Este efeito pode dever-se a anticorpos de baixa afinidade, ao excesso de antígenos na amostra ou à lavagem inadequada. O excesso de Ag leva à saturação de ambos os Ac, que se reflete num sinal quase nulo nos métodos competitivos e numa ausência do modelo em sandwich, nos não competitivos (Koivunen M. e Krogsrud R., 2006).

Na prática laboratorial, este efeito contorna-se com uma diluição da amostra.

2.4.1.1.2. TÉCNICAS MANUAIS

Um dos imunoenaios mais amplamente utilizados em Imunologia e Hormonologia é o radioimunoensaio (RIA) (ANEXO 6) que utiliza um radioisótopo como marcador, cuja detecção se faz pela emissão de radiação. Permite a análise quantitativa de complexos antígeno-anticorpo, geralmente por método competitivo. Permite detetar hormonas esteróides, proteínas, vitaminas e, em particular, moléculas que se assumem como marcadores tumorais.

O procedimento de ensaio segue o princípio básico do radioimunoensaio, envolvendo a concorrência entre um antígeno marcado radioativamente e outro não radioativo, pelo mesmo local de ligação ao anticorpo da fase sólida. O marcador mais utilizado é o ^{125}I , radioisótopo que emite radiação gama e de semi-vida alargada (Nöthling J. e Cramer K., 2018).

A quantidade de antígeno marcado com ^{125}I ligado ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração de analito a quantificar na amostra. A radiação emitida é medida por um contador de radiação gama (equipamento *Wallac Wizard*). (ANEXO 7)

São usados calibradores de concentrações crescentes, cuja curva estabelece relação entre a concentração (ng/mL) e a unidade de radiação (cpm – cintilações por minuto), de forma a estabelecer uma curva padrão, interpolar com o valor da radiação da amostra e chegar à sua concentração.

Um outro imunoenensaio é o ELISA (ANEXO 6) que permite a quantificação de antigénios e anticorpos presentes numa amostra, por técnicas competitivas, em “sandwich” e indiretas, como já anteriormente abordado. Baseia-se, por isso, em reações antigénio-anticorpo detetáveis pela formação de um composto corado, após adição de um substrato que é degradado enzimaticamente, terminando com a leitura espectrofotométrica da microplaca (Nöthling J. e Cramer K., 2018).

Apesar de se tratar de uma metodologia em grande parte manual, é feita a leitura da absorvância no equipamento da *Molecular devices*. (ANEXO 8)

O facto do radioimunoensaio (RIA) ser um método que utiliza radioisótopos leva a que o teste *ELISA* se constitua como uma alternativa mais limpa.

Outra técnica manual, embora menos comum, é a cromatografia de troca iónica que permite a separação de moléculas com base nas diferenças da carga das moléculas e da matriz, resultando em diferentes graus de interação com as matrizes carregadas, dependendo principalmente do pH. Trata-se de uma cromatografia sólido-líquido na qual ocorre uma troca reversível de iões entre a fase móvel (líquida) e a fase estacionária (resina).

2.4.1.2. PARÂMETROS ANALÍTICOS

2.4.1.2.1. MARCADORES TUMORAIS

Define-se como marcador tumoral um amplo espectro de moléculas, presentes no tumor, no sangue ou outros fluidos biológicos, cujo aparecimento e/ou alterações das suas concentrações estão relacionados com a génese e o crescimento de células neoplásicas (Duffy J., 2007).

Apesar do seu carácter preditivo ou comparativo com a atividade tumoral ainda estamos longe de alcançar a máxima especificidade e sensibilidade destes marcadores, em relação aos diversos órgãos afetados no organismo. Falsos positivos são muito comuns na medida em que patologias benignas e alterações tecidulares sem origem tumoral podem também provocar um aumento sérico dos marcadores tumorais (Molina R. *et al.*, 2011).

De referir que o catabolismo e a eliminação do marcador pelo organismo são fatores a ter em conta, ambas condicionantes da vida média plasmática do marcador, bem como a sensibilidade da resposta a tratamentos antineoplásicos, envolvendo fatores como a idade, género, tecido afetado e evolução tumoral (Molina R. *et al.*, 2011).

A grande maioria dos marcadores tumorais são determinados automaticamente (ANEXOS 1-9, exceto 6).

2.4.1.2.1.1. CEA

A função biológica do antígeno carcinoembrionário (CEA) não é bem definida, mas pode ter um papel no reconhecimento intercelular, na regulação da resposta imunológica e nas metástases de cancro colorectal. Níveis elevados são também detetados em outras condições malignas, como carcinoma do pulmão, mama, pâncreas, ovários e útero, e não malignas, como cirrose, lesão inflamatória, infeções, trauma, enfarte, deterioração renal e consumo de tabaco. O interesse deste marcador reside no prognóstico do doente, avaliação de estado e monitorização da terapêutica. É considerado o indicador mais preciso de recorrência no carcinoma do cólon (Holdenrieder S. *et al.*, 2008). (ANEXO 1)

2.4.1.2.1.2. CA 15.3

A glicoproteína CA 15.3 é produzida pelas células epiteliais mamárias e é expressa em células normais e cancerígenas. É o marcador tumoral, por excelência, do cancro da mama, dado ser mais sensível e específico do que o CEA. A elevação do CA 15.3 varia de acordo com o estágio da doença, demonstrando valores crescentes para estádios mais avançados. É um marcador usado no diagnóstico precoce de recidivas, precedendo os sinais clínicos até aos 13 meses, no entanto, ainda se considera de baixa especificidade e sensibilidade, uma vez que níveis elevados podem surgir noutras neoplasias, como no ovário, pulmão e linfomas, e noutras doenças, como hepatite crónica, tuberculose e lúpus eritematoso. Assim, não se recomenda para rastreio, diagnóstico, estadiamento do cancro da mama, mas sim como um importante indicador de prognóstico, recorrência, doença residual e remissão do tumor (Malati T., 2007). (ANEXO 2)

2.4.1.2.1.3. CA 125

A glicoproteína CA 125 é derivada dos ductos de Muller (trompa de Falópio, endocérvix e fundo vaginal) e mesotélios (pleura, pericárdio, peritoneu). As suas principais aplicações são: o seguimento da resposta ao tratamento, predição de recaída ou progressão da doença após a terapêutica, o rastreio populacional em doente de risco hereditário de cancro epitelial do ovário, como marcador de prognóstico e recorrência de neoplasia endometrial. Aumenta

antes da evidência clínica de recorrência, apresentando um valor preditivo. É encontrado em menores concentrações em diversos epitélios e o seu falso aumento pode dever-se à fase folicular do ciclo menstrual e início de gravidez, dada a síntese deste marcador ao nível dos mesotélios (Malati T., 2007). (ANEXO I)

2.4.1.2.1.4. CA 19.9

A glicoproteína CA 19.9 é expressa pelas células pancreáticas, dos ductos biliares e pelo epitélio gástrico, cólon, endométrio e salivar. É indicado no estadiamento e monitorização de tratamento (quimioterapia) e assume-se como um dos marcadores mais sensíveis e específicos para o cancro do pâncreas e vesícula biliar, mas também em casos de pancreatite, sendo o seu uso para diagnóstico diferencial um motivo de discordância entre os autores. A principal fonte de falsos positivos são as hepatopatias (Malati T., 2007). (ANEXO I)

2.4.1.2.1.5. CA 72.4

A glicoproteína CA 72.4 tem sido usada principalmente no controlo de remissão e recidiva de carcinomas do trato gastrointestinal (gástrico, cólon, pâncreas e trato biliar), uma vez que 50% dos doentes com cancro gástrico apresentam níveis elevados, demonstrando-se como um marcador mais sensível do que o CEA e o CA 19.9 para esta patologia (Malati T., 2007). (ANEXO I)

2.4.1.2.1.6. CYFRA 21.1

As citoqueratinas são proteínas que intervêm na estabilidade das células epiteliais e nas múltiplas cascatas de sinalização intracelular. São usadas como marcadores tumorais principalmente no cancro broncopulmonar e outras neoplasias sem evidência de marcadores tumorais específicos. O Cyfra 21.1 surge aumentado em neoplasias epiteliais e mesenquimais, e predomina no tecido pulmonar, apesar de estar aumentado noutras patologias benignas, agudas infecciosas (tuberculose, sépsis), doenças crónicas (cirrose, colestase, insuficiência renal, doença de Crohn,...) e até no período de gestação, com elevações mais discretas. O aumento inespecífico face a neoplasias benignas é a causa de falsos positivos (Holdenrieder S. *et al.*, 2008). (ANEXO I)

2.4.1.2.1.7. PSA

O antígeno específico da próstata (PSA) é uma protease considerada como marcador específico da próstata, produzido no tecido prostático normal, benigno e maligno, nas células do epitélio do ducto prostático e encontrado em grandes concentrações no fluido seminal ou no soro de um homem assintomático. Trata-se de uma enzima proteolítica cuja função é dissolver o gel seminal formado após ejaculação. É o marcador tumoral de maior utilidade

clínica conhecido até ao momento, sendo usado no diagnóstico dada a sua exclusividade em relação ao tecido da próstata. Valores elevados podem ser encontrados em doentes com carcinoma da próstata, prostatites, hipertrofia benigna da próstata e, mais raramente, em condições inflamatórias de tecidos genitais adjacentes. No entanto, o PSA por si só não é suficiente para o rastreio do cancro da próstata, uma vez que não é suficientemente específico. Assim sendo, considera-se um marcador útil na deteção deste cancro quando usado em conjunto com o toque retal em homens com mais de cinquenta anos. O PSA permite a deteção da ocorrência de metástases ou recidivas após cirurgia ou tratamento do tumor. O seu aumento persistente após tratamento ou em pré-tratamento reflete a recorrência do tumor ou presença de doença residual (Molina R. *et al.*, 2011). (ANEXO I)

2.4.1.2.2. HORMONAS

2.4.1.2.2.1. TESTOSTERONA

A testosterona, hormona sexual masculina, é um esteróide com um papel fundamental no desenvolvimento de tecidos reprodutores masculinos, como testículos e próstata, bem como outras características secundárias. É usada como fármaco na terapêutica do hipogonadismo, que se caracteriza pela diminuição da função das gónadas (ovários ou testículos), que se traduz numa menor produção de hormonas e gâmetas (óvulos ou espermatozóides) (Alves M. *et al.*, 2010).

A testosterona é avaliada no soro em contexto oncológico, dado acreditar-se que é a hormona impulsionadora do tumor da próstata, estimulando o tecido prostático, pelo que os doentes efetuam uma terapêutica que não é mais do que uma “castração” hormonal, onde se pretende reduzir os níveis desta hormona. Contudo, existem poucos dados científicos a suportar a ideia de que a testosterona elevada pode estar associada ao aumento do risco de cancro da próstata, tal como a ideia de reposição hormonal masculina com testosterona, no contexto de tratamento do hipogonadismo, é ainda muito discutida (Rhoden E. e Averbek M., 2009).

A sua determinação é a mais comum no laboratório de Imunologia e faz-se por RIA (ANEXO 6 e 7).

2.4.1.2.2.2. ALDOSTERONA

A Aldosterona é uma hormona produzida e secretada no córtex das glândulas suprarenais e tem como alvo os rins, de forma a potenciar a retenção de sódio e a excreção de potássio, regulando assim o balanço eletrolítico. A sua produção é regulada pela hipófise e pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (Melby J., 1984).

O hiperaldosteronismo primário é uma entidade clínica na qual há uma secreção inapropriada de aldosterona e supressão da renina plasmática. A origem mais comum são os adenomas do córtex suprarenal produtores de aldosterona, mas também pode ser provocado por carcinoma adrenal e tumores extra-adrenais. De referir que também a retenção de água devido a hipernatrémia, provoca um aumento da pressão arterial (Melby J., 1984).

Assim sendo, como exame de triagem, quando existe suspeita de hiperaldosteronismo, deve-se determinar a aldosterona e a renina, normalmente no soro e por RIA (ANEXO 6 e 7).

O hiperaldosteronismo tumoral abrange grupos de tumores que não respondem ao sistema renina-angiotensina (SRA), devido à ausência de recetores para a angiotensina no tecido neoplásico. Assim, qualquer estímulo que eleve os níveis de angiotensina resulta numa produção significativa de aldosterona, decorrente por exemplo de adenomas produtores de aldosterona (APA). Por outro lado, o hiperaldosteronismo não tumoral, essencialmente o idiopático, caracteriza-se pela hipersensibilidade adrenal a estímulos que ativam o SRA (Passos V. *et al.*, 2001) .

Dentro dos diversos tipos de hiperaldosteronismo existe uma série de sub-grupos com comportamentos bioquímicos específicos, no entanto, regra geral, o hiperaldosteronismo primário é uma combinação clássica de aldosterona elevada com renina reduzida.

A aldosterona, sintetizada nas glândulas supra renais, é colhida em:

- decúbito (paciente deitado durante 30 minutos)
- ortostatismo (paciente que tenha estado em pé)

Este teste postural é usado para diferenciação entre adenoma produtor de aldosterona (hiperaldosteronismo tumoral) e hiperaldosteronismo idiopático. Assim, espera-se que valores em decúbito e ortostatismo no hiperaldosteronismo idiopático sejam diferentes e coexistentes com uma aldosterona elevada, enquanto que em adenomas produtores de aldosterona os valores serão semelhantes, uma vez que este tipo de hiperaldosteronismo tumoral não responde ao estímulo postural. O aumento da aldosterona não será tão

acentuado (Burtis C. e Bruns D., 2016).

Complementando este modelo de determinação da aldosterona, também a excreção urinária e os produtos metabólicos apresentam um bom índice da taxa de produção da aldosterona e ainda um melhor valor de diagnóstico (Burtis C. e Bruns D., 2016).

Os adenomas podem ainda aumentar a secreção de aldosterona em resposta à variação circadiana da ACTH, sendo necessária a medida do cortisol sérico para correta interpretação do teste (Chen W. *et al.*, 2015).

2.4.1.2.3. METABOLITOS DIVERSOS

2.4.1.2.3.1. METANEFRINA E NORMETANEFRINA

Para a determinação das metanefrinas plasmáticas e urinárias é utilizado o radioimunoensaio. A metanefrina e normetanefrina são metabolitos inativos das catecolaminas epinefrina (adrenalina) e norepinefrina (noradrenalina), respetivamente. São produzidas na medula das glândulas adrenais, refletindo a presença de tumores neuroendócrinos, conhecidos pela produção de catecolaminas, que são secretadas episodicamente na corrente sanguínea, em resposta a um stress físico ou emocional (Burtis C. e Bruns D., 2016).

Estudos recentes demonstram que a quantificação da metanefrina e normetanefrina plasmáticas são marcadores bioquímicos úteis no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com feocromocitoma. Contudo, outros tumores neuroendócrinos, que não o feocromocitoma, podem produzir grandes quantidades de catecolaminas, resultando num aumento considerável destas hormonas e seus metabolitos tanto na corrente sanguínea como na urina (Lenders J. *et al.*, 2014).

O diagnóstico laboratorial do feocromocitoma apoia-se principalmente no doseamento do ácido vanilmandélico, metanefrinas e normetanefrinas plasmáticas e urinárias, uma vez que as catecolaminas são secretadas intermitentemente pelo feocromocitoma, que explica que determinações isoladas não nos conduzem a um diagnóstico (Lenders J. *et al.*, 2014).

Na urina das 24h poderá detetar-se o excesso de produção que não é avaliado no soro, ou seja, podemos ter níveis basais no sangue e níveis elevados na urina, refletindo-se numa maior especificidade e sensibilidade.

As metanefrina e normetanefrina são metabolitos determinados por cromatografia de troca iónica (ANEXO 6), seguida da leitura da absorvância num espectrofotómetro (Acikara O., 2013).

2.4.1.2.3.2. ÁCIDO 5-HIDROXINDOLACÉTICO

O ácido 5-hidroxitindolacético (5-HIAA) é um metabolito da serotonina e, juntos, são biomarcadores importantes para o diagnóstico do tumor carcinóide e neoplasias neuroendócrinas produtoras de serotonina. Em geral, a serotonina circulante é maioritariamente de origem plaquetar, pelo que se pesquisa em sangue total ou plasma rico em plaquetas (Burtis C. e Bruns D., 2016).

Este metabolito é detetado por imunoensaio enzimático, ELISA (ANEXO 6 e 8), do tipo competitivo (Zuetenhorst J. *et al.*, 2004).

2.4.1.2.3.3. ÁCIDO VANILMANDÉLICO

O ácido vanilmandélico (VMA) é o principal catabolito urinário da adrenalina e noradrenalina e a sua determinação auxilia na deteção de tumores secretores de catecolaminas, neuroblastomas e feocromocitomas, bem como auxilia na avaliação da função da medula adrenal. A maioria dos pacientes com neuroblastoma excretam níveis elevados do VMA (Burtis C. e Bruns D., 2016).

O ácido vanilmandélico é quantificado, após extração, por cromatografia de troca iónica, por intermédio de uma resina trocadora aniónica, ou por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) (Acikara O., 2013).

A extração é realizada em microcolunas de troca iónica (ANEXO 6) e a leitura faz-se num espectrofotómetro.

2.4.1.2.4. ENZIMAS

2.4.1.2.4.1. RENINA

A renina determina-se no plasma à temperatura ambiente e é sintetizada no rim, como parte integrante do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Controla a ativação da angiotensina, que estimula as glândulas adrenais a produzir aldosterona. A sua determinação é relevante nos doentes com hipertensão arterial, hiperaldosteronismo primário, para além do estudo da função hepática (Sahay M. e Sahay R., 2012).

A determinação da renina veio permitir a diferenciação dos tipos de hiperaldosteronismo uma vez que no primário, se encontra suprimida. São feitas determinações em ortostatismo e decúbito (Sahay M. e Sahay R., 2012).

É doseada por quimioluminescência, no aparelho *Liaison* (ANEXO 1), por RIA.

2.4.2. PROTEINOGRAMA e IMUNOFIXAÇÃO

A eletroforese de proteínas séricas e de outros fluidos é uma análise muito útil, usada em rotina nos laboratórios de análises clínicas, com vista à detecção de anomalias no perfil proteico. Baseia-se nos princípios da eletroforese num suporte adequado para separação de proteínas. A agarose tem sido utilizada por ser um meio de suporte versátil e eficaz (Silva R. *et al.*, 2008).

O perfil eletroforético e imunofixação de proteínas, apesar de reunir muitas etapas manuais, são procedimentos que se servem da automatização.

O sistema HYDRASYS é um aparelho semi-automático multi-paramétrico. Os passos automáticos incluem o tratamento do gel de agarose HYDRAGEL (ANEXO 9) segundo as etapas seguintes: aplicação da amostra, migração eletroforética, secagem, coloração, descoloração e secagem final.

Um proteinograma corresponde à separação das proteínas por eletroforese, para obtenção de um possível perfil monoclonal que será posteriormente caracterizado por imunofixação. Podem ser pedidos paralelamente quando há suspeitas de mieloma múltiplo, plasmocitoma ou sempre que o histórico clínico assim o exigir (Silva R. *et al.*, 2008).

A eletroforese em gel de agarose separa as proteínas séricas em seis frações principais, de acordo com a sua carga a pH alcalino: albumina; alfa-1 globulinas; alfa-2 globulinas; beta-1 globulinas; beta-2 globulinas e gama globulinas. Cada zona contém uma ou mais proteínas do soro (Silva R. *et al.*, 2008).

A presença de imunoglobulinas monoclonais, marcadores das gamopatias, são detetadas por eletroforese das proteínas. Elas apresentam-se sob a forma de bandas anormais situadas essencialmente nas zonas das beta ou gama globulinas. A imunofixação efetuada com recurso a antisoros monoespecíficos permite a identificação das bandas monoclonais separadas por eletroforese (Hill P. *et al.*, 2006).

Os kits HYDRAGEL destinam-se à detecção de proteínas monoclonais no soro ou urina humanos, por imunofixação no sistema semi-automático HYDRASYS.

A técnica é realizada em quatro etapas:

- 1) Separação das proteínas por eletroforese em gel de agarose e meio alcalino.
- 2) Fixação e imunoprecipitação das proteínas separadas por eletroforese: fixador para precipitar as proteínas e antisoros para precipitar os antigénios.
- 3) Lavagem e absorção para remoção das proteínas solúveis não precipitadas.
- 4) Coloração com negro de amido ou violeta ácido e comparação das bandas imunoprecipitadas com as bandas anómalas.

Para identificar de forma precisa a natureza das bandas monoclonais, as amostras são testadas simultaneamente em seis pistas. Para além da pista do perfil eletroforético das proteínas, as restantes cinco pistas permitem a caracterização das bandas monoclonais graças aos anticorpos específicos anti-cadeias pesadas gama (IgG), alfa (IgA) e mu (IgM), e anti-cadeias leves kapa e lambda (livres e ligadas) (Burtis C. e Bruns D., 2016).

No que diz respeito às cadeias leves livres, elas existem livres no soro e, relativamente à urina, a sua detecção depende da sua produção e da clearance renal. São cadeias que não estão acopladas às respetivas cadeias pesadas e que, por isso, exibem um epítopo que por norma não está exposto. A imunofixação combina eletroforese com imunoprecipitação, apresentando maior sensibilidade e rapidez (Burtis C. e Bruns D., 2016).

2.4.2.1. SORO

No que diz respeito à interpretação dos resultados existem três situações possíveis.

Ausência de banda monoclonal:

- uma amostra de soro normal apresenta uma zona corada difusa de imunoglobulinas policlonais em todas as pistas;

- uma hipergamaglobulinémia é caracterizada por uma zona difusa fortemente corada, sem apresentar bandas estreitas.

Presença de uma banda monoclonal:

- a presença de uma imunoglobulina monoclonal (gamapatia) é caracterizada por uma banda estreita detetada com um dos antisoros anti-cadeias pesadas (gama, alfa ou mu) e com

um dos antisoros anti-cadeias leves, kapa ou lambda. A banda monoclonal detetada, geralmente estreita e bem visível, deve estar localizada ao mesmo nível de migração que a banda presente na pista de referência (ELP);

- a ausência de reação com qualquer um dos antisoros anti-cadeias pesadas e reação com um dos antisoros anti-cadeias leves pode indicar:

a) a presença de uma cadeia leve livre, que deve ser confirmada com o antisoro anti-cadeias leves livres (kapa livre e lambda livre).

Quando as bandas das cadeias livres não coincidem com as cadeias pesadas (GAM) significa que são efetivamente cadeias leves livres, dado não estarem acopladas ao “resto” do anticorpo (retângulo azul da Fig. 2). Quando existem cadeias kapa ou lambda com correspondência no perfil das cadeias pesadas (GAM) significa que são anticorpos “completos”, ou seja, não se trata de cadeias leves livres (retângulo amarelo da Fig. 2).

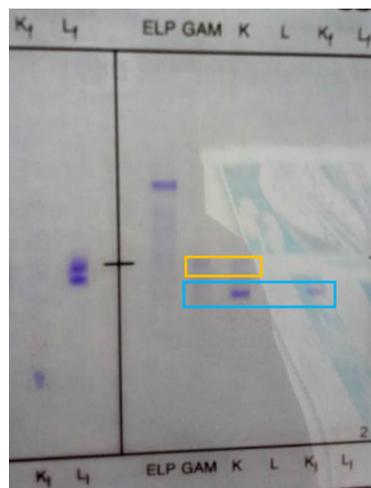


Figura 2. ELP (perfil eletroforético-proteinograma), GAM (cadeias pesadas IgG, IgA e IgM), K (kappa total), Kf (kappa livre), L (lambda total), Lf (lambda livre)

Fonte: cedido pelo SPC do IPO

b) a presença de uma gamapatia IgD IgE muito rara, que deve ser confirmada com o antisoro anti-cadeias pesadas delta e épsilon.

- quando não se observa reação com qualquer um dos antisoros anti-cadeias leves, mas existe uma cadeia pesada, pode indicar uma gamapatia de cadeias pesadas (gama, alfa ou mu), muito rara.

Presença de duas ou mais bandas monoclonais:

- em casos raros, proliferam vários clones de células B, conforme é verificado pela presença de várias bandas monoclonais reveladas na imunofixação: uma gamapatia biclonal

caracteriza-se pela presença de duas cadeias pesadas (idênticas ou diferentes) e duas cadeias leves (idênticas ou diferentes);

- as imunoglobulinas polimerizadas caracterizam-se pela presença de várias bandas sobre uma mesma cadeia pesada e uma mesma cadeia leve. Para confirmar a presença de uma anomalia monoclonal, é necessário despolimerizar a amostra com β -mercaptoetanol e repetir a imunofixação. Isto permitirá quebrar ligações dissulfureto (S-S) proteicas, de modo que tanto a estrutura terciária como a quaternária de algumas proteínas fica comprometida, pelo que se usa para garantir que estas se encontram apenas em formas monoméricas. Tal procedimento é importante porque se pretende evitar o surgimento de uma “banda monoclonal” em todas as pistas (bandas policlonais) e, com o β -mercaptoetanol, distendemos as proteínas e conduzimos a uma maior nitidez das bandas;

- uma gamaptia oligoclonal caracteriza-se pela presença de múltiplas bandas de um ou mais tipos de cadeias pesadas e por um ou dois tipos de cadeias leves (Keren D., 2003).

2.4.2.2. URINA CONCENTRADA

A eletroforese de urina é comumente utilizada para detetar a presença de imunoglobulina monoclonal de cadeias leves livres (proteínas de Bence Jones) ou outras proteínas de baixa massa molecular, típico de proteinúria tubular (Burtis C. e Bruns D., 2016).

O procedimento na urina é idêntico à eletroforese das proteínas do soro, com exceção de que, geralmente, amostras de urina estão concentradas cerca de 100 vezes (Burtis C. e Bruns D., 2016).

Primeiramente, as amostras de urina devem ser concentradas (com um tubo apropriado) até uma concentração de proteínas totais ≥ 5 g/L ou um total de Imunoglobulinas de aproximadamente 1 g/L. É recomendado eliminar partículas, como sais, por centrifugação de forma a evitar a deformação do gel durante a migração (Keren D., 2003).

No que diz respeito à interpretação dos resultados existem quatro situações possíveis.

Proteína monoclonal intacta na urina é caracterizada por:

- uma banda monoclonal detetada com um dos antisoros anti-cadeias pesadas (gama, alfa ou mu) e/ou antisoros anti-cadeias leves kapa ou lambda (livres ou ligadas) (Keren D., 2003);

- a banda monoclonal detetada, de aparência afiada e demarcada, deve estar localizada na mesma distância de migração que a banda suspeita de ser monoclonal da pista de referência (ELP) (Keren D., 2003).

A cadeia leve livre BENCE JONES é caracterizada por:

- um banda monoclonal detetada por qualquer um dos antisoros anti-cadeia leve livre kapa ou lambda (Keren D., 2003);

- não se deve detetar reações positivas nas pistas dos antisoros anti-cadeias pesadas (gama, alfa ou um). Para se confirmar que a cadeia leve é uma cadeia leve livre, a amostra deve ser testada com o kit HYDRAGEL 1,2,4 BENCE JONES. (Keren D., 2003).

Uma paraproteína sérica que passa para a urina, com ausência da proteína BENCE JONES, é caracterizada por:

- uma banda monoclonal revelada pelas cadeias pesadas gama, alfa e mu (pistas G, A e M);

- a mesma banda revelada pelo soro anti-cadeias leves (livres ou ligadas) kapa ou lambda (pistas K ou L) (Keren D., 2003).

Uma paraproteína sérica que passa para a urina, associada a uma proteína BENCE JONES, é caracterizada por:

- uma banda monoclonal revelada pelas cadeias pesadas gama, alfa e mu (pistas G, A e M) (Keren D., 2003);

- duas bandas reveladas com um ou dois antisoros anti-cadeias leves kapa e/ou lambda (livres ou ligadas) (Keren D., 2003).

2.5. SETOR DE HEMATOLOGIA

O setor de Hematologia está sob a orientação da Dr Joana Diamantino, médica assistente graduada e especialista em Patologia Clínica.

Neste serviço realizam-se hemogramas, que reúnem todos os parâmetros inerentes às células da série branca, vermelha, plaquetas e, quando requerido, reticulócitos. Também se pesquisa a velocidade de sedimentação, efetuam-se testes de coagulação, determinação de fatores específicos da coagulação, imunofenotipagem e estudo do DNA. Quase todos os

procedimentos são automatizados, bem como a coloração das lâminas por coloração de Wright-Giemsa. Manualmente, efetuam-se esfregaços em lâmina, observação microscópica e coloração de Perls em amostras de aspirados de medula óssea.

Este setor trabalha geralmente com sangue total e, contrariamente a todo o resto do Serviço de Patologia Clínica, pretende-se evitar a coagulação e garantir que todas as células estão em suspensão na amostra, uma vez que queremos manter intactos os fatores da coagulação. Para tal, a amostra de sangue é recolhida para tubo com EDTA, que complexa o cálcio e assim inibe a coagulação e permite a conservação de leucócitos e eritrócitos, não provocando hemólise nem alterações morfológicas. Quanto às amostras para os estudos da coagulação, colhe-se o sangue para tubo com citrato de sódio, na proporção 9:1, centrifuga-se para obtenção de plasma, rico em fatores de coagulação e pobre em plaquetas.

Em relação às centrifugações, nos testes habituais submete-se a amostra a 3000 rpm, durante 10 min e, para estudos mais particulares, como a pesquisa do anticoagulante lúpico, realizam-se duas centrifugações nas mesmas condições, permitindo a obtenção de um plasma sem plaquetas.

Menos frequentemente, também chegam ao laboratório aspirados de medula óssea e líquidos biológicos como o líquido cefalorraquidiano (LCR).

Estruturalmente, o setor de Hematologia está repartido por duas salas. A sala principal, que inclui a etiquetagem dos tubos, hemogramas, velocidade de sedimentação, colorações automáticas, técnicas manuais, como esfregaços de sangue e de medula óssea, e validação dos resultados. A sala secundária é onde se realiza os testes de coagulação, os processos da centrifugação das amostras e fenotipagem linfocitária por citometria de fluxo.

Neste setor acompanhei toda a rotina laboratorial, desde a etiquetagem dos tubos à realização de hemogramas e toda a extensão da automatização do setor, testes de coagulação e respetiva programação, misturas de plasma, análise dos controlos através do gráfico de Levey-Jennings e assisti ao procedimento de pesquisa do gene bcr-abl por RT-PCR. Manualmente efetuei esfregaços, visualizei ao microscópio as mais diversas linhas celulares, maduras e imaturas, características patológicas de leucemias e linfomas e contagem celular como forma de confirmação do hemograma, em toda a sua extensão de parâmetros.

2.5.1. HEMOGRAMA

O hemograma é dos exames mais solicitados na prática médica, nomeadamente no setor de hematologia, assumindo-se como um exame complementar de diagnóstico e o de primeira linha no estudo da função hematológica. Permite a quantificação das células sanguíneas e o estudo da sua morfologia (Burtis C. e Bruns D., 2016).

Os parâmetros hematológicos são particularmente importantes no diagnóstico e monitorização das doenças oncológicas, tratamentos de quimioterapia e radioterapia e tratamentos de suporte (Burtis C. e Bruns D., 2016).

2.5.1.1. COLHEITA E PROCESSAMENTO

A colheita e processamento da amostra são etapas fulcrais para que tenhamos um resultado correto. O sangue é colhido por punção venosa para tubos com EDTA, homogeneizado e analisado o mais rapidamente possível.

2.5.1.2. ANÁLISE

2.5.1.2.1. PRINCÍPIO DE COULTER

O hemograma é feito em equipamento automático, com recurso ao princípio de Coulter ou de impedância elétrica para contagem das células, tecnologia VCS (volume, condutividade e scattering) para contagem e diferenciação dos leucócitos (fórmula leucocitária) e espectrofotometria para quantificação da hemoglobina (Abbott laboratories, 2010).

O princípio de Coulter baseia-se na deteção e medição de mudanças na condutividade elétrica produzidas pela passagem de células num líquido condutor, entre dois eléctrodos com uma corrente contínua entre eles. Este fenómeno de resistência elétrica origina impulsos, cujo número está relacionado com a quantificação celular e as amplitudes desses impulsos relacionam-se com a dimensão/volume das células (Abbott laboratories, 2010).

O analisador *Beckman Coulter*[®] *LH 750* (ANEXO 10) inicia a contagem dos eritrócitos e plaquetas num primeiro canal e, após hemólise, faz a contagem de leucócitos e subpopulações, num segundo canal, com recurso à tecnologia VCS, que permite a diferenciação celular conjugando volume, condutividade e luz dispersa de cada tipo de leucócito.

2.5.1.2.1.1. SÉRIE VERMELHA

O impulso elétrico gerado entre os eletrodos, segundo o princípio da impedância, é o que permite a caracterização dos eritrócitos em termos quantitativos e qualitativos, obtendo-se também histogramas em paralelo com um índice de anisocitose (RDW), por norma, sobreponível e concordante.

A espectrofotometria é o método usado para a medição da concentração da hemoglobina, após a ação do “*coulter lyse S diff lytic reagent*”, que lisa os eritrócitos. A absorvância é proporcional à concentração de hemoglobina na amostra (Magno J. *et al.*, 2017).

A função hemostática é especialmente importante na avaliação pré-operatória, dado fornecer-nos informações sobre a tendência hemorrágica ou trombótica do doente, avaliando riscos cirúrgicos e permitindo uma conduta operatória segura e que comporte o mínimo de riscos para o doente, para além de avaliar perfis pós-transfusão e o grau de resposta da medula (Colombini M., 2007).

2.5.1.2.1.1.1. ANEMIA NO DOENTE ONCOLÓGICO

A anemia surge muitas vezes como uma consequência da neoplasia, apresentando-se como uma patologia secundária e contribuindo para a morbidade dos doentes com cancro (Longo D., 2010).

A anemia ocorre frequentemente no decurso das doenças malignas, sendo defendido por vários autores que um nível baixo de hemoglobina é um fator de prognóstico associado a doentes com neoplasia, bem como a doença oncológica estimula a coagulação e inibe a fibrinólise, estabelecendo uma relação com o tromboembolismo, principalmente em doentes internados. No entanto, é de referir que a incidência de anemia é variável e depende da localização, estágio, duração do regime, intensidade da terapêutica, ocorrências infecciosas ou cirurgia (Feliciano A. *et al.*, 2003).

Mais de 50% dos doentes com cancro desenvolverão anemia, independentemente do tratamento, e cerca de 20% dos doentes que realizam quimioterapia necessitarão de transfusão sanguínea, o que explica a relação entre o perfil hematológico e a neoplasia (Feliciano A. *et al.*, 2003).

O mieloma múltiplo é o mais frequentemente associado a anemia embora nas neoplasias hematológicas a anemia é uma constante (Feliciano A. *et al.*, 2003).

2.5.1.2.1.2. SÉRIE BRANCA

A contagem de glóbulos brancos é efetuada após hemólise da amostra de sangue total pela ação do “*coulter LH series Pak reagent Kit*”, que recorre a um agente lisante de eritrócitos mas também a um estabilizador de leucócitos, ou reagente leucoprotetor, que estabiliza estas células e permite a distinção das diversas populações da série branca.

A fórmula leucocitária é determinada a partir da tecnologia VCS: volume (amplitude do impulso), condutividade, relacionada com a composição química celular, e a dispersão da luz de acordo com a complexidade celular (grânulos celulares, lóbulos nucleares e características membranares). Tais parâmetros permitem distinguir a presença de células imaturas das diferentes linhagens e subpopulações leucocitárias: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, das células mais abundantes para as menos (Kalraa V. et al., 2016).

A quantificação das células da série branca permite identificar leucocitoses, granulocitoses e neutrofilia resultantes de infeções bacterianas e inflamações; leucopenia, neutropenia e granulocitopenia resultantes de doenças auto-imunes, anemia aplástica, cancro, agentes terapêuticos, infeções, drogas e hemodiálise; linfocitose devido a infeções virais (mononucleose infecciosa); monocitose devido a infeções bacterianas e micobacterianas; basofilia e eosinofilia decorrentes de reações alérgicas e parasitas; leucemias de diversas origens, leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielóide aguda (LMA) e leucemia mielóide crónica (LMC); linfomas resultantes de envolvimento crónica no sistema linfático e alterações nos glóbulos brancos (linfoma de Hodgkin), linfomas malignos e linfomas não-Hodgkin (Abbott laboratories, 2010).

No que diz respeito à morfologia dos leucócitos, também podemos ter evidências de granulações, vacúolos e núcleos hiperlobulados, que indica geralmente toxicidade.

2.5.1.2.1.3. PLAQUETAS

Como anteriormente referido, a contagem das plaquetas realiza-se num primeiro canal, pelo princípio da impedância elétrica, de onde é obtido um histograma que reflete índices de anisocitose plaquetar (PDW) variáveis.

É um fator hemostático fundamental e a sua quantificação permite-nos identificar situações de trombocitopenia como vasculite, leucemia, linfoma ou terapêutica com heparina, que

causem uma anormal destruição, ou trombocitose decorrente de cancro e inflamação (Abbott laboratories, 2010).

De referir que contagens reduzidas podem também dever-se a agregados plaquetares ou plaquetas gigantes, bem como contagens falsamente elevadas podem traduzir a presença de fragmentos de hemólise de eritrócitos.

2.5.1.2.1.4. RETICULÓCITOS

Por vezes, é pedida a contagem de reticulócitos, cuja deteção automatizada recorre à coloração supra-vital com azul de metileno. Este corante permite a precipitação do RNA dos reticulócitos da amostra de sangue total e só depois se sucede a análise através da tecnologia VCS, cujo resultado se apresenta em percentagem (%), por cada 100 eritrócitos (Abbott laboratories, 2010).

Este é um parâmetro que avalia a resposta da medula face a anemias e quimioterapia, por exemplo. É importante entender até que ponto a medula corresponde e está capaz de acelerar a eritropoiese (Abbott laboratories, 2010).

Assim, reticulócitos aumentados no sangue periférico sugerem anemia hemolítica ou perdas, uma vez que o baixo valor de eritrócitos não se deve à diminuição da produção, mas ao aumento da eliminação. Já a diminuição de reticulócitos explica a supressão da medula óssea, uma vez que há efetivamente uma redução na produção reticular (Abbott laboratories, 2010).

2.5.1.3. ESFREGAÇÃO DE SANGUE PERIFÉRICO

Após obtenção do hemograma é feito manualmente um esfregaço de sangue periférico perante determinadas situações: leucocitose acima dos $20 \times 10^3 \mu\text{L}$, amostra icterica, indicação de “NRBC” (eritrócitos nucleados - nucleated red blood cells), plaquetas anormalmente baixas, resultados sem leucograma, agregados plaquetares, presença de blastos, basofilia, monocitose, eosinofilia acima dos 10%, entre outras.

O esfregaço avalia a veracidade do hemograma e, logo, torna-se muito importante na avaliação da doença hematológica, permitindo a observação microscópica manual das linhagens celulares em termos quantitativos e qualitativos (morfologia celular). Apenas desta forma se confirmam situações de anisocitose, poiquilocitose, anisocromia, células atípicas, células imaturas no sangue periférico, agregados plaquetares e permite-nos caracterizar o

núcleo e citoplasma das células, completando assim a caracterização morfológica (Longo D., 2010).

A observação microscópica deve começar com uma ampliação de 10x para escolha do campo ideal e noção alargada das proporções celulares, seguida da ampliação de 50x ou 100x para contagem diferencial e deteção de anomalias das diversas linhagens celulares.

É igualmente importante referir características patológicas numa lâmina de sangue periférico e que exigem particular atenção: sombras nucleares, células clivadas, hipersegmentação, entre outras (Burtis C. e Bruns D., 2016).

2.5.1.3.1. COLORAÇÃO DE WRIGHT-GIEMSA

A coloração de Wright-Giemsa (ANEXO II) é uma técnica de coloração para esfregaços de sangue periférico, urina, medula e biópsias. Permite-nos identificar as mais diversas linhagens, caracterizar morfologias celulares patológicas e orientar o estudo de uma amostra. A fixação é o primeiro passo e é feita com metanol, depois a coloração propriamente dita e observação ao microscópio (Longo D., 2010).

Esta técnica é uma modificação da coloração de Romanowsky e serve-se da combinação dos corantes de azul de metileno e eosina, que coram simultaneamente o núcleo e citoplasma das células. O azul de metileno é um corante básico com a capacidade para corar de azul os constituintes ácidos da célula, tais como os núcleos (ácidos nucleicos e nucleoproteínas) dos leucócitos, grânulos de neutrófilos e basófilos e granulação citotóxica. A eosina é um corante ácido que cora de rosa as estruturas alcalinas da célula, como o citoplasma dos leucócitos, a hemoglobina dos eritrócitos e grânulos de eosinófilos. Tais corantes permitem-nos distinguir os diversos tipos de células (Longo D., 2010).

A fixação e coloração (ANEXO II) são realizadas automaticamente no Serviço de Patologia Clínica.

2.5.1.3.2. MEDULOGRAMA E COLORAÇÃO DE PERLS

O medulograma consiste na observação de um esfregaço de aspirado medular e permite um estudo mais específico em determinadas situações, nomeadamente alterações no hemograma. As síndromes mielodisplásicas (SMD) são um grupo heterogénio de doenças malignas das células-tronco hematopoiéticas, daí a relevância deste exame no contexto do laboratório clínico (Dharwadkar A. *et al.*, 2016).

Numa primeira abordagem, o aspirado medular, tal como o sangue periférico, é misturado com EDTA e corado automaticamente pela coloração Wright-Giemsa, no equipamento referido para este efeito. É observado inicialmente numa ampliação de 10x e depois na de 100x, para procura e caracterização de fragmentos ósseos e megacariócitos.

Numa segunda abordagem realiza-se a coloração de Perls, que utiliza o ferrocianeto ácido para avaliação de depósitos de ferro que, em determinadas situações, depositam-se nos precursores dos eritrócitos (eritroblastos), detetando-se sideroblastos em anel, sugerindo anemia sideroblástica, uma vez que existe défice de produção de hemoglobina e o ferro acumula-se em anel (sideroblastos em anel) (Longo D., 2010).

Em lâminas de medula consegui detetar megacariócitos, as linhagens mielóide e eritróide, células reticulares, blastos, mielócitos, plasmócitos, entre outros.

É igualmente importante referir características patológicas numa lâmina de aspirado medular e que exigem particular atenção: plasmócitos com mais do que um núcleo, pontes internucleares entre eritroblastos, alteração da relação mielóide/eritróide, entre outros.

2.5.2. VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO

A velocidade de sedimentação (VS) é a medição do grau de sedimentação dos eritrócitos pela ação da gravidade, a partir de sangue total com EDTA. Por outras palavras, é a velocidade a que os glóbulos vermelhos se separam do plasma e se depositam no fundo do tubo quando em repouso durante algum tempo. Tal como o hemograma, é dos testes mais requisitados no laboratório de hematologia (Guarner J. *et al.*, 2015).

Os eritrócitos possuem carga global negativa e quando se aglomeram tendem a repelir-se, de forma a que essa força magnética se oponha à gravidade e reduza a velocidade de sedimentação. Contrariamente, quando existem constituintes de carga positiva, estes vão anular as cargas negativas dos eritrócitos e suas repulsões, pelo que favorece a velocidade de sedimentação, como acontece em processos inflamatórios, decorrentes por exemplo de intervenção cirúrgica (Hashemi R. *et al.*, 2015).

É um parâmetro que nos permite, por isso, inferir acerca de diversas patologias como anemias (hemodiluição), mieloma múltiplo (aumento de proteínas plasmáticas), processos infecciosos ou inflamatórios (aumento de imunoglobulinas), patologias cardíacas, condições ginecológicas, neoplasias, bem como patologias da tiroide, cirrose hepática e insuficiência renal (Plebani M. e Piva E., 2002).

A velocidade de sedimentação permite inferir acerca da atividade inflamatória, mas surgindo como um marcador inespecífico de inflamação, infecção e neoplasia, devendo ser interpretado em consideração com o contexto clínico e nunca para diagnóstico, principalmente no contexto oncológico em que se espera que esteja quase sempre aumentada devido ao aumento da proteínas de fase aguda, decorrente de quimioterapia, transfusões e cirurgia (Guarner J. *et al.*, 2015).

A proteína c-reativa é, por vezes, pesquisada em paralelo com a velocidade de sedimentação, uma vez que se trata de uma proteína de fase aguda e que, tal como a VS, se assume como um indicador sensível de inflamação, pelo que juntas evidenciam ainda mais a presença de processo inflamatório. No entanto, são parâmetros com diferentes cinéticas, pelo que não se determinam em paralelo em todos os laboratórios (Hashemi R. *et al.*, 2015).

A automatização, pelo analisador *ALI FAX[®] Test I BCL* (ANEXO 12) surge como uma forma de melhorar a sensibilidade e especificidade e permite o uso de um reduzido volume de sangue colhido. O processo da determinação deste parâmetro contempla a agregação, precipitação e empacotamento.

A velocidade de sedimentação é determinada automaticamente por fotometria cinética capilar (infravermelho). Uma amostra de sangue total é aspirada, distribuída num capilar e centrifugada. No sistema capilar dá-se a sedimentação com a formação de agregados de eritrócitos, detetados por sensores infravermelhos devido à alteração da densidade ótica, e geração de impulsos elétricos diretamente proporcionais à concentração dos eritrócitos (Plebani M. e Piva E., 2002).

De referir que qualquer fator que afete a agregação ou sedimentação dos eritrócitos, incluindo o número e a morfologia dos eritrócitos, se irá traduzir conseqüentemente na alteração do parâmetro da velocidade de sedimentação.

2.5.3. HEMOSTASE

A hemostase é o conjunto de mecanismos de defesa fisiológicos que mantêm a integridade vascular e da circulação sanguínea. Para além da lesão de um vaso, uma hemorragia pode ter origem numa doença hereditária ou adquirida do sistema hemostático (Burtis C. e Bruns D., 2016).

Fazem parte deste sistema: vasos sanguíneos, plaquetas, fatores de coagulação, inibidores de coagulação e o sistema fibrinolítico (Longo D., 2010).

A hemostase inclui uma resposta vascular (constricção do vaso lesado), a hemostase primária (formação do trombo plaquetário) e hemostase secundária (formação do coágulo de fibrina). A exposição do endotélio lesado e o fator de Von Willebrand promovem a adesão plaquetária e os constituintes plaquetares, vão, por sua vez, levar à agregação plaquetar, em paralelo com a vasoconstricção, de onde resulta o tampão hemostático primário. É a ativação da cascata da coagulação que leva à formação da fibrina e aos tampões hemostáticos secundários, agora estáveis (Longo D., 2010).

É fulcral ocorrer um equilíbrio entre mecanismos de coagulação e de dissolução do coágulo para que riscos trombóticos (coagulação excessiva) e hemorrágicos (défice de coagulação) sejam evitados. Este facto é particularmente importante no pré-operatório, para avaliação da predisposição hemorrágica ou trombótica do doente.

2.5.3.1. COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

A cascata da coagulação é um modelo que explica a fisiologia da coagulação do sangue, a qual se traduz por uma ativação sequencial de enzimas e que resulta na formação de trombina, que converte o fibrinogénio em fibrina (Longo D., 2010).

O processo de coagulação é experimentalmente dividido numa via intrínseca ou de contacto, iniciada por componentes intrínsecos do espaço intravascular, e numa via extrínseca, dependente do fator tecidual e ativada aquando de lesão vascular (Longo D., 2010).

No entanto, esta divisão é apenas prática, de forma a identificar os fatores responsáveis, porque “*in vivo*” não existe esta separação, mas uma sequenciação de acontecimentos.

É importante referir que valores baixos de fatores de coagulação se podem dever a uma menor produção por parte do fígado, pelo que podem servir como uma avaliação da função hepática (Burtis C. e Bruns D., 2016).

2.5.3.1.1. TESTES DE COAGULAÇÃO

A contagem de plaquetas, por impedância elétrica assume-se como um rastreio inicial importante que nos permite inferir acerca da capacidade de coagulação do sangue devido à correlação com o risco de hemorragia.

Os testes de coagulação propostos em laboratório são o tempo de protrombina (PT), tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT) e o tempo de trombina (TT), para além da pesquisa do fibrinogénio e D-dímeros que, numa abordagem sequencial, levam à determinação do anticoagulante lúpico, fatores VII, VIII e IX, proteína C, proteína S e antitrombina, como explicarei adiante.

Estes testes são efetuados automaticamente, após centrifugação, pelo princípio da turbidimetria. Pela amostra atravessa um feixe de luz e, à medida que o coágulo se forma, a turvação leva a que haja um decréscimo da luz transmitida e é o começo do coágulo que indica a paragem da reação no autoanalisador.

Os parâmetros da coagulação são determinados pelo analisador *ACL TOP 500* (ANEXO 13).

2.5.3.1.1.1. TEMPO DE PROTROMBINA

O tempo de protrombina avalia a via extrínseca da cascata da coagulação bem como a via comum. Reflete alterações em três dos fatores (fator II, VII e X) dependentes da vitamina K, do fibrinogénio e do fator V. É um parâmetro utilizado para a monitorização dos anticoagulantes orais, como o varfarina (Burtis C. e Bruns D., 2016).

Este teste consiste em juntar ao plasma com citrato o reagente de tromboplastina, constituído por fator tecidual e cálcio, avaliando de seguida o tempo de coagulação, ou seja, o tempo que decorre até se formar o coágulo.

O fator tecidual ativa o fator VII, que ativa a via extrínseca, formando o complexo protrombinase ancorado pela tromboplastina, que culmina na formação de trombina. Esta atua no fibrinogénio e permite a formação de fibrina (Longo D., 2010).

Como forma de minimizar a discrepância dos resultados do PT, derivados de diferentes tromboplastinas usadas em laboratórios, criou-se uma referência internacional denominada por razão internacional normalizada (INR), que se traduz pela razão entre o PT do paciente e o PT de um plasma de referência, em segundos. O objetivo é padronizar os resultados (Longo D., 2010).

Um INR prolongado pode refletir a deficiência dos fatores I, II, V, VII e X, deficiência de vitamina K, terapêutica com alguns anticoagulantes orais, doença hepática, síndrome nefrótica ou coagulação intravascular disseminada. O INR pode estar diminuído em estados pró-trombóticos, por exemplo num pós-operatório (Longo D., 2010).

Perante um PT alargado e um aPTT normal realiza-se a determinação do fator VII. A deficiência hereditária de fator VII é uma doença rara e que resulta numa doença hemorrágica, com quadro clínico variável (Longo D., 2010).

2.5.3.1.1.2. TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA

O aPTT avalia a via intrínseca da cascata da coagulação, bem como a via comum. Reflete alterações dos fatores XII, XI, IX e VIII e os da via comum, X, V, II e fibrinogénio (Longo D., 2010).

Para além da deficiência de fatores, este teste é usado para deteção de anticoagulante lúpico e para monitorização da terapêutica com heparina.

Este parâmetro pode estar prolongado na deficiência dos fatores I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII, doença hepática, coagulação intravascular disseminada ou terapêutica com heparina, e estar diminuído num estado de hipercoagulabilidade (Longo D., 2010).

Neste teste utilizam-se substitutos de fosfolípidos plaquetários, como a cefalina que, sendo uma tromboplastina parcial, é incapaz de ativar a via extrínseca, que requer tromboplastina completa, isto é, o fator tecidual. Por consequência, este teste não é afetado pela deficiência de fator VII (Longo D., 2010).

O tempo que o plasma, adicionado de cefalina, demora a coagular dará o resultado deste parâmetro.

O aPTT apresenta relação com outros parâmetros doseados clinicamente como o fibrinogénio e D-Dímeros.

O fibrinogénio é uma proteína de fase aguda pelo que aumenta nos processos inflamatórios. Um valor elevado de fibrinogénio implica a formação de muita fibrina, pelo que o risco trombótico é maior. Contrariamente, um valor baixo de fibrinogénio pode refletir doença hepática ou coagulação intravascular disseminada. A sua determinação é feita pela adição de trombina em solução, com posterior medição do tempo de coagulação (Burtis C. e Bruns D., 2016).

Os D-Dímeros são produtos de degradação da fibrina (PDF) e a sua determinação tem interesse no diagnóstico de quadros trombóticos, apresentando um aumento na presença de trombos. Este parâmetro é reconhecido atualmente como o mais específico marcador para trombose e fibrinólise fisiológica, sendo clinicamente usado para exclusão diagnóstica de eventos tromboembólicos (Burtis C. e Bruns D., 2016).

Tem um forte valor preditivo mas a sua normalidade não elimina a possibilidade de uma patologia de risco trombótico. Para além de trombose e tumores, aumenta em situações de inflamação, trauma e cirurgia.

Em situações de PT ou aPTT (mais comum) alargados podemos estar perante a deficiência de um ou mais fatores da coagulação ou na presença de um inibidor. Para esta distinção faz-se uma diluição do plasma em estudo com uma mistura de plasma vulgarmente designada por “pool de plasma” em partes iguais e repete-se o tempo de coagulação (Longo D., 2010).

Se o valor de aPTT normalizar significa que foram consumidos os fatores da coagulação da mistura de plasmas saudáveis, logo o aPTT inicial alargado deve-se à diminuição de fatores da coagulação. Neste caso, doseiam-se fatores específicos da coagulação, dependendo da suspeita clínica. Por norma pesquisam-se os fatores VIII e IX que correspondem às patologias mais frequentes, e o fator de Von Willebrand em termos quantitativos e qualitativos (atividade), uma vez que é o transportador do fator VIII (Longo D., 2010).

O défice dos fatores VIII e IX caracteriza a hemofilia A e B, respetivamente. São condições hemorrágicas de origem genética diagnosticadas pela determinação destes fatores, que permite a classificação da sua gravidade e orienta para acompanhamento e tratamento (Longo D., 2010).

O fator de Von Willebrand é uma proteína plasmática de adesão essencial na hemostasia primária pois liga-se às estruturas expostas do subendotélio e promove a agregação plaquetar e, no âmbito da hemostasia secundária, liga-se ao fator VIII e protege-o da inativação causada pela proteína C e fator IX, mantendo os seus níveis plasmáticos. Defeitos quantitativos e/ou qualitativos no fator de Von Willebrand causam a doença hemorrágica hereditária de Von Willebrand, de origem genética e a mais frequente entre as doenças hemorrágicas congénitas (Longo D., 2010).

Se o valor de aPTT permanecer alargado significa que existem inibidores da coagulação, sendo a principal suspeita o anticoagulante lúpico que, ao ser positivo, reflete um risco trombótico. Ele é um inibidor inespecífico antifosfolipídico relacionado com a hipoprotrombinémia, no entanto esta condição pode dever-se a outras causas como a deficiência de vitamina k, doença hepática, entre outras (Campos M. e Santos I., 2011).

Em pacientes com terapêutica anticoagulante antagonista da vitamina k, existe a produção de fatores II, VII, IX e X funcionalmente deficientes, comportando-se como plasmas com deficiência de fatores, havendo normalização dos tempos de TP e aPTT com a mistura. Já a

heparina provoca inibição de fatores e, sendo assim, não há a correção no teste da mistura (Longo D., 2010).

2.5.3.1.1.3. TEMPO DE TROMBINA

O tempo de trombina (TT) é o tempo de conversão do fibrinogénio em fibrina, após adição de trombina, terminando com a formação do coágulo. É um parâmetro que reflete a quantidade de fibrinogénio, aplicado em contexto de monitorização de anticoagulantes (Longo D., 2010).

Poderá estar aumentado face a inibidores da trombina, como por exemplo a terapêutica com heparina, um fibrinogénio disfuncional ou perante um aumento dos produtos de degradação da fibrina (Longo D., 2010).

No seguimento dos testes de coagulação abordados anteriormente, e respetivas determinações sequenciais, são também determinadas a proteína c, proteína s e antitrombina.

2.5.4. PERFIL IMUNOFENOTÍPICO

O diagnóstico hematopatológico serve-se das técnicas de imunofenotipagem, por citometria de fluxo, que nos revelam o estado de maturação das populações celulares e a presença de células com fenótipo anormal, que se destacam como sendo alvos terapêuticos ou marcadores de prognóstico (Pinto A. *et al.*, 2002).

Esta análise imunofenotípica de neoplasias hematológicas tem, por isso, um papel importante na análise do comportamento biológico tumoral e na avaliação do curso clínico da doença (Pinto A. *et al.*, 2002).

A imunofenotipagem é automatizada, sendo o seu princípio básico o da medição de intensidade de fluorescência de um imunocomplexo. Qualquer molécula associada a um marcador fluorescente pode potencialmente ser analisada num citómetro de fluxo, admitindo sempre o passo inicial da obtenção de uma suspensão celular, que será dirigida para uma câmara de fluxo, cujas células são interceptadas por um laser (Pinto A. *et al.*, 2002).

A intensidade da luz dispersa relaciona-se com o tamanho e complexidade celular, sendo o resultado obtido na forma de histogramas (Pinto A. *et al.*, 2002).

O imunofenótipo de células de leucemia humana pode ser estudado com a utilização de anticorpos monoclonais dirigidos contra proteínas membranares da superfície de leucócitos.

Isso é importante para distinguir tipos de leucemias e, em alguns casos, essenciais ao diagnóstico (Longo D., 2010).

Este estudo é realizado automaticamente no analisador *FC 500 Cytomics Beckman Coulter*[®] (ANEXO 14).

2.5.5. ANÁLISE GENÉTICA DO GENE BCR-ABL

A análise genética do gene bcr-abl faz-se por PCR em tempo real, a partir de sangue periférico, com o objetivo de auxiliar no diagnóstico e monitorização de pacientes com leucemia mielóide crónica (LMC) (Burtis C. e Bruns D., 2016).

A leucemia mielóide crónica faz parte das doenças mieloproliferativas e estes pacientes possuem o cromossoma Filadélfia (Ph1), que resulta de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22. Esta translocação envolve a transferência do gene ABL do cromossoma 9 para o gene BCR do cromossoma 22, resultando no gene de fusão bcr-abl. Este gene produz uma proteína, a p210, e uma tirosina cinase com atividade desregulada e que desempenha um papel chave no desenvolvimento da LMC (Burtis C. e Bruns D., 2016).

3. CONCLUSÕES

Mais uma etapa académica que se encerra com o culminar deste estágio curricular tão enriquecedor a nível profissional e humano. Passar pelos quatro setores do Serviço de Patologia Clínica do IPO conferiu-me uma noção alargada daquilo que é uma rotina laboratorial sustentada pelas diferentes áreas, cujos diagnósticos se suportam e complementam.

Assisti ao importante papel da tecnologia no circuito das amostras, todo o processo minucioso de análise e o impacto tão relevante do controlo da qualidade laboratorial.

Foi um complemento gratificante e um aporte de conhecimento teórico e prático, para além de entusiasmante na medida em que apliquei alguns dos meus conhecimentos adquiridos ao longo do curso a evidências práticas recorrentes em laboratório.

Termino a dizer que, melhor do que a aprendizagem, é poder entrar na realidade clínica com que sonhámos durante este percurso académico.

Um enorme obrigado a todos os que fizeram parte deste percurso.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, Learning Guide Hematology. *Abbott Diagnostics*. (2010) 41-42 (Acedido a 12 de julho de 2018). Disponível em: <https://www.slideshare.net/fidaajaafrah/hematology-learning-guide>
- Acikara O., *Ion Exchange chromatography and its applications*. In Martin D., *Column Chromatography*. Open Science Open Minds. (2013), pp 31-58.
- Alves M., Neves C. e Medina J., Diagnóstico e Tratamento do Hipogonadismo Masculino Tardio. *Arquivos de Medicina*. (2010) **24**: 13-20.
- Burtis C., Bruns D., *Tietz Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular*. Elsevier, 7th Ed. (2016), ISBN 9788535281668
- Campos M., Santos I., Síndrome de hipoprotrombinemia - Anticoagulante lúpico. *Acta Médica Portuguesa*. (2011) **24**: 611-616.
- Chen W., Zhou T., Zhou P., Li X., Wu Z., Zhang K. e Xing J., Aldosterone-to-renin ratio acts as the predictor distinguishing the primary aldosteronism from chronic kidney disease. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. (2015) **8**: 6901-6909.
- Ciarlini L., Ciarlini P. e Feitosa F., Quimiluminescência: Princípio e Aplicações. *Continuous Education Journal*. (2002) **5**: 181-185.
- Colombini M., Avaliação pré-operatória relacionada ao risco hemorrágico em procedimento eletivo. *Educação Continuada em Saúde Einstein*. (2007) **5**: 136-137.
- Darwish I., Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *International Journal of Biomedical Science*. (2006) **2**: 217-235.
- Dharwadkar A., Vimal S., Panicker N., Chandanwale S., Viswanathan V. e Kumar H., Study of sideroblasts and iron stores in bone marrow aspirates using Perls' stain. *Medical Journal of Dr. D.Y. Patil University*. (2016) **9**: 181-185.
- Duffy J., Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review. *European Journal of Internal Medicine*. (2007) **18**: 175-184.

Feliciano A., Costa A. e Melo M., Anemia no doente oncológico. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. (2003) **9**: 117-128.

Fonseca A., Sebastião C., Martins F., Ribeiro M., Calheiros I., Lito L., Abecassis M., Pinto M., Spencer M., Pinheiro M., Costa M., Barros R., Bento R., *Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*. (2004) pp 80-182.

Fukushima A., Barreto E., Ferrari M., França W., Marcal H., Pererira A., Ribeiro J., Silva E. e Chasin A., Aplicação de imunoensaios para análise de fármacos e drogas de abuso em sangue total, com finalidade forense. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*. (2009) **2**: 49-61.

Guarner J., Dolan H. e Cole L., Erythrocyte sedimentation rate: Journey verifying a new method for an imperfect test. *American Journal of Clinical Pathology*. (2015) **144**: 536-538.

Hashemi R., Mjidi A., Motamed H., Amini A., Najari F. e Tabatabaey A., Erythrocyte Sedimentation Rate Measurement Using as a Rapid Alternative to the Westergren Method. *Emergency*. (2015) **3**: 50-53.

Hill P., Forsyth J., Rai B., Mayne S., Serum Free Light Chains: An Alternative to the Urine Bence Jones Proteins Screening Test for Monoclonal Gammopathies. *Clinical Chemistry* (2006) **52**: 1743-1748.

Holdenrieder S., Pawel J., Dankelmann E., Duell T., Faderl B., Markus A., Siakavara M., Wagner H., Feldmann K., Hoffmann H., Raith H., Nagel D., Stieber P., Nucleosomes, ProGRP, NSE, CYFRA 21-I, and CEA in Monitoring First-Line Chemotherapy of Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. (2008) **14**: 3660-3665.

Johansson S., ImmunoCAP specific immunoglobulin E test: tool for research and allergy diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. (2004) **4**: 89-94.

Kalra V., Ahmad S., Shrivastava V., Mittal G., Quantitative and volume, conductivity and scatter changes in leucocytes of patients with acute undifferentiated febrile illness: A pilot study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. (2016) **110**: 281-285.

Keren D., *Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis*. Hodder Arnold (2003) pp 33-192

Passos V., Martins L., Pereira M., Kater C., Hiperaldosteronismo Primário Revisitado. *Arq Bras Endocrinol Metab* (2001) **45**: 285-301.

Koivunen M., Krogsrud R., Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Laboratory Medicine*. (2006) **37**: 490-497.

Lenders J., Duh Q., Eisenhofer G., Roqueplo A., Grebe S., Murad M., Naruse M., Pacak K. e Young W., Pheochromocytoma and Paraganglioma: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. (2014) **99**: 1915-1942.

Longo D., *Harrison's Hematology and Oncology*. 17th Ed. (2010) pp 70-264.

Malati T., Tumour Markers: an Overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. (2007) **22**: 17-31.

Magno J., Miguita K., Oshiro M., Métodos alternativos para avaliar a concentração de Hemoglobina livre no plasma. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. (2017) **27**: 3-5.

Reed R., Principles of Measurement. In Reed R., *Clinical Chemistry: Learning Guide series*. Abbott Laboratories (2017) pp 22.

Melby J., Primary aldosteronism. *Kidney International*. (1984) **26**: 769-778.

Molina R., Filella X., Augé J., Escudero J., *Utilidad clínica de los marcadores tumorales [Estado actual y perspectivas de futuro III]*. Roche Diagnostics S.I. (2011).

Nöthling J., Cramer K., Comparing the values of progesterone in the blood of bitches as measured with a chemiluminescence immunoassay and a radioimmunoassay. *Reproduction in Domestic Animals* (2018) 1-6.

Pinto A., Fonseca I., Soares J., Citometria de fluxo do ADN em tumores sólidos. *Acta Médica Portuguesa*. (2002) **15**: 133-142.

Plebani M., Piva E., Erythrocyte sedimentation rate: use of fresh blood for quality control. *American Society for Clinical Pathology*. (2002) **117**: 621-626.

Rhoden E., Averbeck M., Cancro da próstata e testosterona: riscos e controvérsias. *Arq Bras Endocrinol Metab*. (2009) **53**: 956-961.

Sahay M., Sahay R., Low renin hypertension. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. (2012) **16**: 728-739.

Silva R., Lopes A., Faria R., Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Revista Médica de Minas Gerais*. (2008) **18**: 116-122.

Sompayrac L, *Cancer and the Immune System*. In Sompayrac L., *How the Immune System Works*. Wiley Blackwell, 5th Ed. (2016) pp 131-133.

Zuetenhorst J., Korse C., Bonfrer J., Peter E., Lamers C., Taal B., Daily cyclic changes in the urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid in patients with carcinoid tumors. *Clinical Chemistry*. (2004) **50**: 1634-1639.

5. ANEXOS

ANEXO I: Equipamentos de quimioluminescência e respectivos parâmetros analíticos avaliados em cada um deles.



Immolute 2000 Xpi[®], da Siemens

ACTH, AF, ATA, ATG, CAL, CEA, GAS, GH, HCG, IGF-I, PSA, TSI, HCG total, Δ4-Androstenediona, EPN, FPSA, PSA (livre e total), TSH, β2-microglobulina



ADVIA Centaur[®] XP, da Siemens

PRL, FER, LH, FSH, Estradiol, IgE total, 25 OH, vit. D total, Progesterona, DHEA-SO₄, iPTH



COBAS 6000[®] Analyser Series Hitachi, da Roche[®]

T3 (livre e total), T4 (livre e total), Vit. B12, Ácido fólico, CA 125, CA 19.9, CA 72.4, NTPro-BNP, TRab's, cyfra 21.1, cortisol, cortisol salivar, cortisol urinário, HE-4, insulina, peptídeo C, osteocalcina, IL6, testosterona total, TG (2^a geração), Ac anti-Treponema pallidum (IgG e IgM)



COBAS 601[®], da Roche[®]

Ac anti-*Toxoplasma gondii* (IgG e IgM), Ac anti-Rubéola (IgG e IgM), S100, CK-MB, Mioglobina, Troponina I, TPS, Renina plasmática, Ac anti-EBV (EBNA, VCA, EA, IgG e VCA-IgM), Vírus do Sarampo, HSV I e II (IgG), BAP



Liaison[®], da DiaSorin

ANEXO 2: Equipamento de imunofluorescência e respetivos parâmetros analíticos avaliados.



Kryptor® Brahms

CA 15.3, CgA, NSE,
PCT, PROL
(monomérica), SCC

ANEXO 3: Equipamentos de nefelometria e respetivos parâmetros analíticos avaliados em cada um deles.



BN - ProSpec®, da Siemens

Imunoglobulinas (IgG,
IgA, IgM), C3, C4,
usPCR, Transferrina,
Haptoglobina, α 1-
antitripsina,
Ceruloplasmina, Fator
Reumatóide, TASO



Optilite Optimised Protein
System Binding Site

Cadeias leves livres
(kappa e lambda)

ANEXO 4: Equipamento de monitorização de fármacos e respetivos parâmetros analíticos avaliados.



Viva-E®, da Siemens

Ác. Valpróico,
Carbamazepina,
Fenitoína, Digoxina,
Vancomicina,
Gentamicina,
Fenobarbital,
Metotrexato

ANEXO 5: Equipamento imunoenzimático de fluorescência e respetivos parâmetros analíticos avaliados.



UniCAP Thermo Fisher Scientific

Ac anti-dsDNA, anti-MPO, anti-PR3, anti-CCP, Ac anti β-glicoproteína I (IgG e IgM), Ac anti-cardiolipina (IgG e IgM)

ANEXO 6: Técnicas manuais realizadas no setor de Imunologia e Hormonologia: amostras, analitos e respetivas metodologias.

SORO	Testosterona livre Aldosterona Estrona 17-OH-Progesterona DHEA Cromogranina B Polipeptídeo pancreático Seretonina	RIA
PLASMA	Glucagon	ELISA
	Metanefrina plasmática Normetanefrina plasmática VIP	RIA
URINA	Iodo	ELISA
URINA 24h	Metanefrina urinária Normetanefrina urinária	RIA
	5-OH indolacético	ELISA
	Acido Vanilmandélico	Cromatografia de troca iónica

ANEXO 7: Equipamento de radioimunoensaio e respetivos parâmetros analíticos avaliados.



1470 Wizard Wallac Meditecno

DHEA, metanefrinas fraccionadas plasmáticas e urinárias, 17-OH-progesterona, testosterona livre, aldosterona

ANEXO 8: Equipamento de leitura ELISA.



Molecular devices

Leitura da Abs de microplacas por técnicas ELISA

ANEXO 9: Equipamento de registo dos perfis eletroforéticos e respetivos parâmetros analíticos avaliados.



Hydrasis[®], da Sebia - Thermo Fisher Scientific

Electroforese de Hemoglobina e sérica, Imunofixação do soro, Pesquisa de proteína de Bence-Jones

ANEXO 10: Equipamento para realização do hemograma.



Beckman Coulter[®] LH 750

ANEXO 11: Equipamentos para coloração e visualização do esfregaço sanguíneo.



Wescor[®] Aerospray[®] 7150 cytocentrifuge



Leitz Laborlux S

ANEXO 12: Equipamento para determinação da velocidade de sedimentação.



ALI FAX® Test I BCL

ANEXO 13: Equipamento para testes de coagulação.



*ACL TOP 500
Instrumentation laboratory*

ANEXO 14: Equipamento de citometria de fluxo.



*FC 500 Cytomics Beckman
Coulter®*