



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Marília Fernanda Meireles Xavier

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Professor Doutor José Barata Antunes Custódio e pela Dra. Cristiana Helena Barranha Rêgo Canha e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019

Marília Fernanda Meireles Xavier

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientado pelo Professor Doutor José Barata Antunes Custódio e pela Dra. Cristiana Helena Barranha Rêgo Canha e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

Ao Professor Doutor José Custódio, estou imensamente grata pela disponibilidade e auxílio na orientação deste relatório.

À Dra. Cristiana Canha e à Dra. Alice Mendes pela transmissão de conhecimento técnico e científico, disponibilização de recursos e orientação durante todo o tempo de estágio.

À restante equipa técnica do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, por todos os ensinamentos.

À minha mãe, por todo o esforço efetuado ao longo destes anos e por nunca ter deixado de acreditar em mim.

Ao meu pai e ao meu irmão, pela confiança e orgulho que sempre demonstraram.

Ao Kenny, por todo o apoio e compreensão.

À Carolina, por estar sempre presente e nunca me deixar cair.

A todos os meus amigos de Coimbra, por todos os momentos passados e por terem tornado o meu percurso académico ainda mais especial. Sem vocês nada seria igual.

À Joana e ao Marco, por tudo o que vivemos e pelo apoio incondicional.

A ti, Coimbra!

Índice

Índice de Figuras.....	7
Índice de Tabelas.....	8
Índice de Anexos	8
1. Abreviaturas	9
2. Resumo.....	13
3. Abstract.....	13
4. Introdução.....	15
5. Caracterização do Laboratório de Estágio.....	15
5.1 Recursos Humanos.....	16
5.2 Fluxo de Amostras.....	16
5.3 Sistema Informático	16
5.4 Espaço Físico e Organização.....	16
5.4.1 Sala de Colheitas	17
5.4.2 Setor de Bioquímica	17
5.4.3 Setor de Hematologia.....	20
5.4.4 Setor de Microbiologia	22
5.4.5 Setor de Imunologia	23
6. Controlo de Qualidade.....	24
7. Fase pré analítica	25
7.1 Colheita da Amostra	26
7.2 Receção e Triagem das Amostras	27
7.3 Caso Clínico	27
8. Fase Analítica.....	28
8.1 Bioquímica.....	28
8.1.1 Bioquímica da Avaliação Hepática.....	29
8.1.2 Perfil Lipídico e Avaliação do Risco Cardiovascular	34

8.1.3	Biomarcadores Cardíacos.....	37
8.1.4	Avaliação da Função Renal	39
8.1.5	Equilíbrio Hidro-eletrolítico.....	43
8.1.6	Metabolismo Glucídico.....	45
8.1.7	Avaliação da Função Pancreática.....	47
8.1.8	Avaliação do Ferro	48
8.1.9	Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo	50
8.2	Hematologia	53
8.2.1	Hematopoiese	53
8.2.2	Hemograma	54
8.2.3	Esfregaço Sanguíneo.....	60
8.2.4	Velocidade de Sedimentação	68
8.2.5	Hemostase	69
8.3	Microbiologia	76
8.4	Imunologia	77
9.	Fase pós analítica.....	77
10.	Conclusão	79
11.	Bibliografia	81
12.	Anexos.....	85

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática do metabolismo da bilirrubina	31
Figura 2 - Concentrações séricas da amilase e lipase em função do tempo, após um episódio de pancreatite aguda	48
Figura 3 - Hematopoiese.....	54
Figura 4 - Esfregaço de sangue periférico com um pequeno linfócito no centro.	61
Figura 5 - Alterações no tamanho do eritrócito.	62
Figura 6 - Alterações na forma do eritrócito	63
Figura 7 - Hipocromia.....	64
Figura 8 - Policromasia.....	64
Figura 9 - Inclusões eritrocitárias.....	65
Figura 10 - Formação de <i>rouleaux</i>	65
Figura 11 - Aglutinação dos eritrócitos	65
Figura 12 - Leucócitos.....	66
Figura 13 - Neutrófilos anormais	67
Figura 14 - Esfregaço de sangue periférico de uma infecção por citomegalovírus evidenciando linfócitos atípicos.	68
Figura 15 - Causas de pseudotrombocitopenias.....	68
Figura 16 - Representação esquemática da cascata da coagulação.....	70

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Equipamentos utilizados no setor de Microbiologia.	23
Tabela 2 - Equipamentos utilizados no setor de Imunologia.	24
Tabela 3 - Tubos utilizados na colheita de sangue.	27
Tabela 4 - Causas associadas a aumentos nas atividades da fosfatase alcalina (ALP) e da gamaglutamil-transferase (γ -GT).	32
Tabela 5 - Causas associadas a alterações na proteinémia.	33
Tabela 6 - Correlação dos parâmetros analisados no exame físico-químico da urina com a aplicação clínica.	42
Tabela 7 - Causas associadas a alterações na natrémia.	44
Tabela 8 - Causas associadas a alterações na caliémia.	45
Tabela 9 - Causas associadas a alterações na calcémia, fosfatémia e magnesémia.	51
Tabela 10 - Interpretação de anormalidades nos testes de screening da coagulação.	73
Tabela 11 - Interpretação da pesquisa de inibidores através do APTT.	74

Índice de Anexos

Anexo 1 - Canais do Syxmex XN e respectivas funcionalidades.	85
Anexo 2 - Parâmetros e respectivos métodos de determinação do Syxmex XN.	85
Anexo 3 - Boletim de análises clínicas referente ao caso clínico decorrente de um erro pré-analítico.	87
Anexo 4 - Algoritmo da Troponina de Alta Sensibilidade (hs-cTnI) implementado no CHUC	89
Anexo 5 - Valores de referência do Hemograma.	91

I. Abreviaturas

ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
APTT	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
AST	Aspartato aminotransferase
BNP	Peptídeo Natriurético do tipo B
CBC	Contagem de eritrócitos
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
CK	Creatina Cinase
CLIA	Imunoensaio Quimioluminescente
CMIA	Imunoensaio Quimioluminescente com Micropartículas Magnéticas
CT	Colesterol Total
cTnI	Troponina Cardíaca I
cTnT	Troponina Cardíaca T
CV	Coefficiente de Variação
dRVVT	Teste de Veneno de Víbora de Russell Diluído
EAM	Enfarte Agudo do Miocárdio
EC	Extracelular
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ESP	Esfregaço de Sangue Periférico
FIB	Fibrinogénio
Hb	Hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês <i>high density lipoprotein</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta precisão

HTC	Hematócrito
IC	Intracelular
IFI	Imunofluorescência Indireta
INR	Razão Internacional Normalizada
IPF	Fração de Plaquetas Imaturas
LA	Anticorpo Lúpico
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês <i>low density lipoprotein</i>)
LMWH	Heparina de baixo peso molecular
MALDI-TOF	Dessorção/Ionização Assistida por Matriz - Tempo de Voo
PCR	Proteína C reativa
PCT	Plaquetócrito
PDW	Distribuição do tamanho das plaquetas
PL	Fosfolípidos
P-LCR	Racio de Plaquetas Gigantes
PTGO	Prova de Tolerância à Glucose
PTH	Hormona Paratiróide
PTI	Púrpura Trombocitopénica Idiopática
PTT	Púrpura Trombocitopénica Trombótica
RDW	Distribuição do tamanho dos eritrócitos (do inglês <i>Red-cells Distribution Width</i>)
RET	Reticulócitos
SCT	<i>Silica Clot Time</i>
SIADH	Síndrome de Secreção Inapropriada da Hormona Antidiurética
SNC	Sistema Nervoso Central
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TG	Triacilgliceróis

TIBC	Capacidade total de fixação do ferro
TP	Tempo de Protrombina
TT	Tempo de Trombina
UDP-GT	Uridinadifosfato-glucuroniltransferase
VCM	Volume Corpuscular Médio
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade (do inglês <i>very-low density lipoprotein</i>)
VPM	Volume Plaquetar Médio
VS	Velocidade de Sedimentação
γ -GT	Gama glutamiltransferase

2. Resumo

O presente relatório expõe um registo da aprendizagem teórica e prática dos seis meses de estágio, no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Além de abordar a dinâmica laboratorial, referindo as amostras, equipamentos, metodologias e parâmetros mais frequentemente determinados, este relatório apresenta a caracterização do local de estágio e destaca a importância da fase pré-analítica e do controlo de qualidade. Paralelamente à descrição dos parâmetros clínicos, são apresentadas situações em que ocorrem alterações nos valores a determinar, enfatizando a importância das análises clínicas como diagnóstico complementar e toda a multidisciplinariedade envolvida. Ao longo do relatório são abordadas, de uma forma genérica, todas as áreas em que trabalhei, com uma descrição mais detalhada das áreas de Bioquímica e Hematologia.

Palavras-chave: Serviço de Patologia Clínica, Análises Clínicas, diagnóstico, bioquímica, hematologia.

3. Abstract

The present report displays a record of theoretical and practical learning on the six months internship, in Coimbra Hospital and University Center, executed in the ambit of Clinical Analysis Master's Degree of Coimbra University Pharmacy College.

Besides abording the dynamic laboratory, referring samples, equipments, methodologies and parameters more frequently determined, this document features a brief internship place characterization and highlights the importance of the pre-analytical phase and quality control. Parallel to the clinical parameters description are presented situations in which occur alterations in the values to be determined, emphasizing the importance of clinical analysis as complementary diagnosis and all the multidisciplinary involved. In a generic way, over the report are aborded all the áreas in wich I worked, with a more detailed discription of the Biochemistry and Hematological areas.

Keywords: Clinical Pathology Service, clinical analysis, diagnosis, hematology, biochemistry.

4. Introdução

As análises clínicas são imprescindíveis na prevenção, diagnóstico e definição e controlo da terapêutica da doença. Trata-se de uma área multidisciplinar, que funciona como serviço complementar de diagnóstico, o que lhe confere um elevado grau de responsabilidade. Assim, é imprescindível a garantia da qualidade em todo o processo analítico, desde a fase pré-analítica à pós-analítica.

O presente relatório tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas no decorrer do estágio, efetuado no período de janeiro a junho de 2019, no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). Abordar-se-á todo o processamento da amostra, desde o utente até ao resultado; os equipamentos, metodologias e procedimentos realizados na rotina deste laboratório, incluindo interpretações clínicas, de modo a inserir alguma contextualização teórica, que é fundamental no momento da validação dos resultados.

Para atingir o objetivo apresentado, o plano de estágio consistiu no desenvolvimento de atividades laboratoriais associadas aos setores de Bioquímica, Imunologia, Hematologia e Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica, nos quais integrei a rotina laboratorial a nível operacional, bem como na validação biopatológica dos resultados. Desta forma, possibilitou-me a elaboração do presente relatório de estágio que, cumprindo a sua função descritiva, encontra-se estruturalmente dividido em sete partes, sendo estas introdução, caracterização do laboratório de estágio, controlo de qualidade interno e externo, fase pré-analítica, fase analítica, fase pós analítica e, por fim, uma breve reflexão crítica sobre os seis meses de estágio. As fases pré-analítica e pós-analítica estão descritas de uma forma geral a todas as valências, enquanto que a fase analítica é abordada individualmente. É de notar que este relatório é centrado nas áreas da Bioquímica e da Hematologia, às quais será dado um maior destaque, enquanto as restantes serão abordadas de uma forma sucinta. Este destaque traduz-se numa descrição mais detalhada das metodologias utilizadas e dos parâmetros determinados.

5. Caracterização do Laboratório de Estágio

O Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra é o resultado da fusão dos serviços de patologia clínica do Hospital da Universidade de Coimbra, do Hospital Pediátrico e do Hospital dos Covões. Esta secção destina-se à caracterização deste serviço, na qual se abordará os recursos humanos, o fluxo de amostras, o sistema informático adotado, o espaço físico e os equipamentos e metodologias que o mesmo dispõe.

5.1 Recursos Humanos

Este serviço, dirigido pelo diretor Dr. Fernando Manuel Ribeiro Rodrigues, tem uma equipa técnica composta por médicos, técnicos superiores de saúde, técnicos de diagnóstico e terapêutica, administradores e auxiliares.

5.2 Fluxo de Amostras

O fluxo de amostras diário no Serviço de Patologia Clínica é colossal, com uma média diária de 1500 doentes “avaliados”. As amostras apresentam uma elevada diversidade, sendo especificado o seu uso aquando da descrição individualizada de cada setor. Para além das amostras internas provenientes da sala de colheitas e das enfermarias, são rececionadas amostras do Hospital Pediátrico, Hospital Geral, Maternidades Bissaya Barreto e Daniel de Matos, Hospital Sobral Cid e de outros postos de saúde da Região do Centro. O mesmo acontece com os CHUC, em que são enviadas amostras para o exterior por não ser justificável a sua análise, nomeadamente para o Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge e para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

5.3 Sistema Informático

Todo o circuito analítico, desde a requisição da análise até ao resultado, encontra-se informatizado com um sistema inteligente de gestão global de laboratórios de análises clínicas, o *Clinidata XXI (MaxData)*. Para além deste sistema, é também utilizado o *Hemagest*, específico do setor de Hematologia, o qual se encontra integrado ao *Clinidata XXI*.

5.4 Espaço Físico e Organização

O laboratório central é constituído por uma sala de colheitas, um balcão de receção de amostras, áreas administrativas, salas de lavagem e pelos setores de Imunologia, Microbiologia, Serologia, Hormonologia, Bioquímica (de rotina e urgência) e Hematologia, que se encontram associados a áreas de validação de resultados. De seguida, é apresentada uma descrição mais pormenorizada do modo de funcionamento da sala de colheitas e dos setores que frequentei, com uma abordagem mais detalhada das áreas escolhidas.

Este serviço, com o objetivo de reduzir o tempo de resposta aos pedidos de análises, bem como otimizar e simplificar o fluxo de trabalho, dispõe de uma cadeia laboratorial com um elevado grau de automatização, constituindo o *corelab*. Esta integra o *Bulk Input Module (BIM)*, que é o módulo de entrada em massa, o *Accelerator a3600* e o *Accelerator p540*, distribuidores

e alíquotadores de amostras, os sistemas de química clínica *Alinity c*, os sistemas de imunoensaio *Alinity i* e a cadeia robotizada de hematologia, *Sysmex XN-9000*, ligada ao *CellaVision DM1200*, que é um analisador digital da morfologia celular. Para além da cadeia laboratorial, o Serviço de Patologia Clínica apresenta um vasto número de equipamentos distribuídos pelos vários setores.

5.4.1 Sala de Colheitas

A sala de colheitas encontra-se aberta diariamente entre as 8h e as 15h30 e recebe uma média diária de 500 utentes. O seu espaço físico é constituído por doze postos de colheita e uma área de receção e triagem das amostras. Esta tem implementado um sistema de prioridade de doentes, com prioridade para os transplantados, diabéticos e doentes em consultas de oncologia.

5.4.2 Setor de Bioquímica

O setor de Bioquímica encontra-se sobretudo no *corelab*, sendo dos mais automatizados deste serviço. Numa sala individualizada, é efetuada a triagem e o tratamento de urinas, bem como a análise sumária de urina.

Neste setor, a maioria dos doseamentos é efetuada no soro e urina, sendo utilizado o sangue total em EDTA apenas para a determinação da hemoglobina glicada (HbA1c) e o plasma em EDTA para a determinação do amoníaco e do peptídeo natriurético do tipo B (BNP). Em menor escala, são também rececionadas amostras de LCR para a determinação da glucose e da proteína total, essencialmente.

De seguida, segue-se uma descrição dos equipamentos utilizados no Serviço de Patologia Clínica para a determinação dos parâmetros bioquímicos apresentados ao longo do ponto 8.1, incluindo as metodologias e o tipo de amostras processadas.

5.4.2.1 Equipamentos e Metodologias

Alinity c

O *Alinity c* é um sistema de química clínica que permite a análise de amostras de forma rápida e eficaz, através de métodos de espectrofotometria, turbidimetria e potenciometria, descritos de seguida. É neste equipamento que se realiza o doseamento da maioria dos parâmetros requisitados em amostras de soro e urina, mas também de LCR.

Espetrofotometria

A espectrofotometria é a quantificação da intensidade de luz que atinge um detetor, a um determinado comprimento de onda, após incidir na cuvete que contém a amostra. Na presença de substâncias absorventes, ao comprimento de onda utilizado, ocorre uma diminuição da intensidade do feixe de luz, que será detetada e medida, para posterior determinação da concentração do analito de interesse. Esta concentração é obtida com recurso à lei de Lambert-Beer, que define que a concentração da substância é diretamente proporcional à absorvância ¹.

Turbidimetria

A turbidimetria é uma técnica que mede a redução da intensidade da luz transmitida, devido ao efeito de dispersão. Esta dispersão é o resultado da interação do feixe de luz com partículas em suspensão, nomeadamente complexos antigénio-anticorpo. A diminuição da intensidade da luz transmitida será detetada e medida fotometricamente e o resultado obtido será convertido em concentração, por meio de curvas de calibração ¹.

Potenciometria

A potenciometria é uma técnica eletroquímica que mede a diferença de potencial elétrico entre dois elétrodos, de referência e indicador, numa célula eletroquímica. Esta é a técnica utilizada para a determinação do ionograma, no qual se recorre a elétrodos indicadores de membrana seletivos de iões. A permeabilidade seletiva da membrana ao ião de interesse fará com que o potencial desenvolvido corresponda apenas a esse ião, o qual será proporcional ao log da atividade iónica ou da sua concentração ¹.

Alinity i

O *Alinity i* é um sistema de imunoensaio que maximiza a produtividade utilizando uma tecnologia de quimioluminescência, descrita posteriormente. Neste equipamento, dos parâmetros mencionados ao longo deste relatório, são apenas determinados o BNP, o N-terminal do proBNP (NT-proBNP), a troponina I de alta sensibilidade (hs-cTnI), a proteína C e a ferritina.

Quimioluminescência

A quimioluminescência corresponde à emissão de luz, resultante de um processo de excitação provocado por uma reação química, na qual ocorre a oxidação de um composto orgânico. Este tipo de ensaio possui um limite de deteção muito baixo, o que lhe confere uma elevada

sensibilidade ¹. Atualmente, esta sensibilidade é frequentemente aliada à especificidade da imunorreação, num ensaio designado de imunoensaio quimioluminescente (CLIA).

No Serviço de Patologia Clínica, os doseamentos supracitados são efetuados por um imunoensaio quimioluminescente com micropartículas magnéticas (CMIA). Neste imunoensaio, são utilizadas micropartículas revestidas com anticorpos monoclonais contra o antígeno de interesse. Inicialmente, ocorre a ligação dos antígenos presentes na amostra aos anticorpos das micropartículas. Após uma lavagem, são adicionados anticorpos marcados com um composto luminescente (acridinia), que se irão ligar aos imunocomplexos previamente formados. Após uma nova lavagem, é adicionada uma solução ativadora, que induz a reação de quimioluminescência. Desta reação, resulta a emissão de luz, que será medida por um sensor ótico e traduzida em unidades relativas de luz (URL), as quais apresentam uma proporcionalidade direta com a concentração do antígeno presente na amostra ².

Variant II Turbo, Bio-Rad

O *Variant II Turbo* é um sistema automatizado, que utiliza a cromatografia líquida de alta precisão por troca catiónica (HPLC) para a determinação da hemoglobina glicada (HbA1c) no sangue total. Na determinação deste parâmetro é fundamental a utilização de um método com elevada precisão, uma vez que uma alteração de apenas 1 % na HbA1c representa uma variação de aproximadamente 30 mg/dL de glicose média no sangue ¹.

Cromatografia Líquida de Alta Precisão por Troca Catiónica

A HPLC baseia-se na separação das moléculas de uma mistura com base na sua carga. Aquando da ligação da glucose à hemoglobina há um aumento da carga negativa, o que permite a separação. Ao fazer passar a amostra na coluna catiónica, sob elevada pressão, ocorre a retenção dos analitos na fase estacionária carregada negativamente, através de ligações iónicas. Em resposta a um gradiente de força iónica crescente, proporcionado pela fase móvel, ocorre a eluição dos componentes em tempos diferentes, consoante a carga, sendo a deteção efetuada espectrofotometricamente a 415 nm e 690 nm. O resultado é expresso na forma de um cromatograma, que permite a identificação e quantificação do analito com base no tempo de retenção e na área do pico ^{3;4}.

AutionMAX AX-4820 e SediMAX AX-4030

O *AutionMAX* e o *SediMAX* são dois equipamentos automatizados utilizados na análise sumária de urina, a qual engloba o exame físico-químico e a análise do sedimento urinário.

O exame físico-químico é realizado no *AutionMAX* através de diferentes técnicas fotométricas. A determinação dos parâmetros químicos é efetuada com recurso a tiras-teste multirreativas, que consistem numa série de pequenas áreas reativas, onde estão impregnados os reagentes. Estas ao entrarem em contato com a urina desenvolvem uma série de reações, que resultam numa alteração da cor, que será detetada por refletância por duplo comprimento de onda. Por sua vez, as características físicas são avaliadas por refletância (cor), dispersão da luz (turvação) e índice de refração (densidade).

O *SediMAX* é constituído por uma centrífuga e um microscópio com uma câmara incorporada, que possibilita a obtenção de imagens de 15 campos. Estas imagens são transmitidas e avaliadas através do *software* do equipamento, sendo assim efetuada a análise do sedimento urinário ⁵.

5.4.3 Setor de Hematologia

O setor de hematologia, tal como o setor de bioquímica, apresenta um elevado grau de automatização. Relativamente ao espaço físico, este encontra-se dividido em diferentes áreas, consoante as determinações efetuadas, as quais são o hemograma e esfregaços sanguíneos, hemostase, citogenética, biologia molecular e citometria de fluxo. Neste relatório, será feita referência apenas ao hemograma, esfregaço sanguíneo e hemostase.

Nesta área, as amostras mais frequentes são o sangue total em EDTA K₃, para a determinação do hemograma e da velocidade de sedimentação (VS), e o plasma obtido a partir de sangue colhido para tubo com citrato trisódico (após centrifugação a 3000 rpm/15 min), para as provas da coagulação.

De seguida, encontram-se descritos os equipamentos utilizados no Serviço de Patologia Clínica para a determinação e avaliação dos parâmetros hematológicos apresentados no ponto 8.2, incluindo as metodologias e o tipo de amostras processadas.

5.4.3.1 Equipamentos e Metodologias

Sysmex XN-9000

O *Sysmex XN-9000* (*Sysmex Corporation*, Kobe, Japão) é uma cadeia robotizada constituída por três analisadores hematológicos da série XN e um preparador e corador de lâminas, o *Sysmex SP-10*.

O *Sysmex XN* trata-se de um equipamento multicanal (Anexo I) com um leque alargado de funcionalidades. É neste analisador que é efetuada a análise completa dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, cujos métodos utilizados estão apresentados no

Anexo 2, destacando-se a impedância eletrônica, a citometria de fluxo com fluorescência e a determinação da hemoglobina por espectrofotometria, que estão descritos de seguida.

Impedância Eletrônica

A contagem dos eritrócitos e plaquetas utiliza o princípio de Coulter, que se baseia na detecção e medição de alterações da corrente elétrica provocada pela resistência elétrica conferida pela passagem das células numa pequena abertura entre eletrodos. Essa alteração na voltagem origina um pulso elétrico proporcional ao tamanho da célula. O número de pulsos corresponde ao número de células e a altura do pulso ao volume da célula, traduzindo-se num histograma de distribuição de volume ¹.

Citometria de Fluxo com Fluorescência

A contagem total de leucócitos e a contagem diferencial são efetuadas por citometria de fluxo com fluorescência. Inicialmente, dá-se a sensibilização da membrana dos leucócitos, para posterior marcação das células com um corante fluorescente, que se combina com os ácidos nucleicos. As células são feitas passar uma a uma em frente a uma fonte de luz laser e a dispersão da luz resultante é avaliada em diferentes ângulos, o que possibilita a análise da complexidade celular (luz dispersa lateralmente), tamanho da célula (luz dispersa frontalmente) e conteúdo em ácidos nucleicos (luz fluorescente lateral). A contagem diferencial engloba as cinco diferentes populações de leucócitos e os granulócitos imaturos, sendo expressa em percentagem e número absoluto ⁶.

Estas contagens são efetuadas em dois canais distintos, o canal WNR (*white cell nucleated*) e o canal WDF (*white cell differential*). O canal WNR é usado para a contagem dos leucócitos, eritroblastos e basófilos, enquanto que o canal WDF determina a contagem dos neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e granulócitos imaturos. Ambos os canais utilizam a citometria de fluxo com fluorescência, descrita anteriormente ⁷.

Determinação da Hemoglobina por Espectrofotometria

A determinação da hemoglobina (Hb) é efetuada por medição da absorvância do lisado, após adição do lauril sulfato de sódio, que forma um produto estável com a Hb. Este produto é quantificado a um comprimento de onda de 555 nm e expresso em g/dL ⁶.

ACL TOP 750 ^{CTS}

O ACL TOP é um analisador de testes de coagulação automatizado, multiparamétrico, que utiliza métodos coagulimétricos, cromogénicos e imunoquímicos, cuja descrição é apresentada

de seguida. Os resultados são apresentados na forma de curvas de reação, que refletem a interação da amostra com os reagentes na cuvete do analisador.

Método Coagulimétrico

O método coagulimétrico mede o tempo necessário para a formação da fibrina, a qual é detetada por turbidimetria a 671 nm. É o método utilizado para a maioria das provas de coagulação de rotina, TP, APTT e testes associados.

Método Cromogénico

O método cromogénico é utilizado apenas para a determinação da atividade residual do fator Xa, na monitorização da terapêutica com heparina de baixa massa molecular (LMWH). Ao plasma do doente é adicionado um excesso de fator Xa, que ao clivar o substrato cromogénico (péptido-pNa) induz a libertação de paranitroanalina (pNa), um composto corado que é medido espectralmente a 405 nm. A absorvância medida será proporcional à quantidade de FXa e inversamente proporcional à concentração de LMWH⁸.

Método Imunoquímico

O método imunoquímico é um imunoensaio turbidimétrico, utilizado para a determinação dos D-Dímeros, onde são utilizadas partículas de látex revestidas com um anticorpo. Na presença deste produto de degradação ocorre aglutinação, o que confere uma maior turvação à amostra, a qual é detetada por turbidimetria a 405 ou 671 nm. O resultado é obtido pela diferença da turvação final e inicial⁹.

Test I BCL, AliFax

O *Test I BCL* é o equipamento utilizado para a medição da VS, por uma técnica de fotometria cinética capilar. O sangue é centrifugado e são efetuadas leituras de densidade ótica durante 20 segundos, diretamente relacionadas com a agregação dos eritrócitos. Para isto, o sistema utiliza um microfotómetro de raios infravermelho (950 nm) e um detetor de fotodiodo. Através de um algoritmo matemático, o resultado é convertido num valor do método Westergren (método clássico), expresso em milímetros por hora (mm/h)¹⁰.

5.4.4 Setor de Microbiologia

O setor de Microbiologia é constituído por quatro subsectores, os quais Bacteriologia, Parasitologia, Micologia e Tuberculose, sendo analisada uma ampla variedade de produtos biológicos, nomeadamente urina, sangue, fezes, exsudados vaginais, amostras do trato

respiratório, aspirado de ferida, pus de abscesso, biópsias, líquido peritoneal, sinovial, pleural, LCR e outros produtos, como pontas de cateter ou próteses. Comparativamente aos restantes setores, este ainda possui um baixo grau de automatização; contudo, encontra-se em constante evolução, sendo já vários os procedimentos manuais que estão a ser substituídos por tecnologias inovadoras, agilizando assim o fluxo de trabalho. Na Tabela 1 estão evidenciados alguns dos equipamentos disponíveis no laboratório de Microbiologia deste serviço.

Tabela 1 - Equipamentos utilizados no setor de Microbiologia.

Equipamento	Descrição
Bact/Alert 3D, BioMérieux	Sistema automatizado de deteção de crescimento microbiano, através de um sensor colorimétrico sensível à diminuição do pH
VITEK MS, BioMérieux	Sistema automatizado de identificação microbiana por espetrometria de massa, com recurso à tecnologia de Dessorção Ionização Assistida por Matriz - Tempo de Voo (MALDI-TOF)
VITEK 2, BioMérieux	Sistema automatizado para testes de identificação e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

5.4.5 Setor de Imunologia

O setor de Imunologia encontra-se dividido em Imunologia Geral e Autoimunidade, sendo as amostras mais frequentes o soro, urina de 24h e o LCR. De modo a dar resposta a todos os pedidos, este setor apresenta um leque alargado de equipamentos (Tabela 2).

Tabela 2 - Equipamentos utilizados no setor de Imunologia.

Equipamento	Descrição
BN ProSpec, Siemens Healthcare	Nefelómetro
Optilite	Analizador por turbidimetria
Alinity i, Abbott	Sistema de imunoensaio por quimioluminescência
Hidrasys, Sebia	Eletroforese de proteínas séricas e urinárias e imunofixação em gel de agarose
ImmunoCap 250, Phadia	Analizador para imunoensaio fluoroenzimático (FEIA)
Analyzer I, Euroimmun	Equipamento automatizado para ensaios ELISA
Bio-Flash, Werfen	Analizador de quimioluminescência
EUROBlot One, Euroimmun	Sistema automatizado de Immunoblot
Mago 4, DiaMedix Corporation	Equipamento automatizado para ensaios ELISA e preparação de lâminas para imunofluorescência
Wallac Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, PerkinElmer	Analizador para radioimunoensaio (RIA)

6. Controlo de Qualidade

Já em 1966, o Prof. Dr. Stamm afirmava “Um analista responsável não deverá efetuar qualquer análise sem organizar um controlo de qualidade. Nenhum médico consciencioso deverá aceitar um resultado de análise de química clínica sem a incerteza estabelecida por um controlo da qualidade.”.

O laboratório tem como dever assegurar a fiabilidade dos resultados analíticos dos pacientes, os quais irão dar apoio a um diagnóstico clínico e, em alguns casos, ao estabelecimento de uma terapêutica. É, portanto, essencial assumir uma postura preventiva e assegurar uma deteção precoce dos possíveis erros, de modo a corrigi-los e a evitar que um falso resultado seja dado, com todas as consequências que traria ao doente. Para isto, o laboratório efetua o controlo de qualidade através de procedimentos de controlo interno e da participação em avaliações externas da qualidade.

O controlo interno trata-se de um controlo intralaboratorial, em que são utilizados controlos com valores conhecidos para avaliar a imprecisão, ou seja, o coeficiente de variação (CV). De modo a avaliar diferentes níveis de decisão médica, é recomendada a utilização de mais de um nível de controlo. A frequência com que é efetuado este controlo depende do número de determinações diárias, sendo que de uma forma genérica é realizado no início e no final do dia. Os resultados são expressos na forma de carta de controlo, a qual é delimitada por limites

pré-estabelecidos para cada parâmetro. A observação de um resultado exterior ao intervalo admitido leva ao levantamento das possíveis causas e à implementação de medidas corretivas. É de notar que as repetições consecutivas do controlo até obtenção de um resultado aceitável não é um procedimento correto. O cumprimento de todo este procedimento torna possível garantir que o equipamento e os reagentes utilizados estão em ótimas condições para se prosseguir com a rotina laboratorial ¹.

No que concerne ao controlo de qualidade externo, o Serviço de Patologia Clínica participa em vários programas de avaliação externa de qualidade, nomeadamente no *Randox International Quality Assessment Scheme* (RIQAS) e no *United Kingdom External Quality Assurance Services* (UK NEQAS[®]). Este controlo trata-se de um processo interlaboratorial, em que os resultados obtidos por todos os participantes são tratados estatisticamente pelo programa em questão. Esta análise estatística permite a avaliação da imprecisão (% CV) e da inexatidão (bias, %), o que possibilita a determinação do erro total [ET=BIAS (%) + 1,65 CV% (IC 95%)] ¹.

7. Fase pré analítica

A fase pré-analítica compreende todo o processamento que antecede a análise da amostra, sendo caracterizada como a fase mais propícia à ocorrência de erros. Nesta secção será efetuada, de uma forma breve e geral a todas as valências, uma descrição do processo pré-analítico efetuado no Serviço de Patologia Clínica, incluindo uma abordagem aos métodos de colheita e características de algumas das amostras mais frequentes (7.1), bem como o processo de receção e triagem das amostras (7.2). No final é apresentado um caso clínico decorrente de um erro pré-analítico, visando assim enfatizar a importância desta fase em todo o procedimento analítico.

As análises efetuadas neste serviço são solicitadas pelo clínico ao doente mediante o preenchimento de uma requisição com a especificação dos parâmetros analíticos pretendidos. Este processo é efetuado diretamente no sistema *Clinidata XXI*, sendo atribuído um número de processo ao doente e às amostras. No que concerne à prática diária da sala de colheitas, o utente entra no posto de colheita e são rececionadas as amostras passíveis de serem colhidas pelo próprio. Em seguida, os tubos e contentores são rotulados com as etiquetas trazidas pelo utente e é efetuada a colheita das restantes amostras necessárias.

7.1 Colheita da Amostra

A colheita da amostra é uma etapa crucial da fase pré-analítica, sendo caracterizada como a etapa mais suscetível à ocorrência de erros, nomeadamente erros de identificação, volume insuficiente, proporção entre sangue total e anticoagulante incorreta, tubo incorreto e a pressão do garrote ¹¹. É de notar que para além dos erros técnicos, existem os erros biológicos, que estão relacionados diretamente com o paciente. Estes podem ser caracterizados como fatores endógenos, que são intrínsecos ao doente, e exógenos. Os fatores exógenos são diversos, nomeadamente *stress*, postura, dieta, álcool, medicação e a prática de exercício físico; contudo, são controláveis, sendo fundamental uma preparação adequada do doente para evitar este tipo de erros e obter resultados significativos ¹². De seguida, encontra-se uma breve descrição das características e do procedimento de colheita de algumas das amostras mais frequentes neste serviço, sendo estas soro, plasma e urina.

O sangue para análise pode ser obtido por punção venosa, arterial ou capilar, sendo o sangue venoso a amostra de eleição. A punção venosa pode ser efetuada com recurso a vários tipos de tubos, cujos de uso mais frequente estão apresentados na Tabela 3. Para a obtenção de soro, que representa a parte líquida do sangue após coagulação, utiliza-se um tubo sem aditivo ou com um ativador da coagulação. Por outro lado, o plasma é definido como a parte líquida do sangue não coagulado, sendo obtido após centrifugação do sangue total com anticoagulante. Os anticoagulantes mais comumente utilizados são o EDTA e o citrato de sódio, os quais exercem o seu efeito anticoagulante de forma similar através da quelatação do cálcio; contudo, a ligação do citrato de sódio ao cálcio é facilmente revertida pela adição de um excesso deste íão, o que o torna na amostra de eleição para os testes da hemostase.

O procedimento da colheita de urina depende das análises requeridas. Para a determinação da análise sumária de urina, a colheita deve ser efetuada de uma forma cuidada e limpa para um contentor estéril e deve ser recolhido o jato intermédio da primeira urina da manhã. Por ser, geralmente, a amostra mais concentrada, é a preferível para a análise microscópica e para a deteção de determinados constituintes, como as proteínas. Para a análise microbiológica, a colheita deve ser efetuada de forma assética para um contentor estéril. Quando é requisitada a urina de 24 horas é importante que os pacientes sigam de forma rigorosa as instruções de colheita, as quais devem ser entregues e explicadas pelo laboratório ou clínico. A colheita deve ser efetuada de modo a desprezar na totalidade a primeira urina da manhã e recolher a urina das micções seguintes, inclusive a micção ao fim das 24 horas; o recipiente deve ser armazenado num local refrigerado. Esta colheita tem como objetivo diminuir a interferência

de variações biológicas a curto prazo e é aconselhada para determinações bioquímicas, nomeadamente proteínas, creatinina e sais minerais ¹.

Tabela 3 - Tubos utilizados na colheita de sangue.

Cor da tampa	Descrição	Determinações
Vermelha	Tubo para soro com ativador e gel	Bioquímica, Imunologia e Endocrinologia
Azul	Tubo para plasma com citrato de sódio a 3,2 %	Testes de Coagulação
Roxa	Sangue total com EDTA K3	Hemograma, HbA1c, VS, etc.

7.2 Receção e Triagem das Amostras

Após a colheita, as amostras são recebidas no balcão de receção/triagem, juntamente com uma etiqueta com o nome do utente associado a um código de barras. Os produtos que requerem análise microbiológica são direcionados diretamente para o setor de Microbiologia, o qual possui uma área única de receção e triagem de amostras.

No momento da receção da amostra, é verificada a sua identificação e integridade, para posterior integração no sistema e impressão das etiquetas correspondentes às análises requeridas. É de notar que no caso de ser requerida a determinação dos testes da hemostase, a verificação da integridade da amostra inclui a avaliação da proporção 1:9 entre o anticoagulante e o sangue, a existência de coágulo e o hematócrito. No caso de ser pedida a pesquisa de anticorpo lúpico (LA), é necessário a execução de uma dupla centrifugação da amostra, para a obtenção de um plasma pobre em plaquetas ⁹.

Em seguida é efetuada a triagem das amostras, as que requerem análises efetuadas na cadeia automatizada são colocadas no *Bulk Input Module (BIM)*, que está associado ao *Accelerator a3600*, e as restantes são distribuídas pelos respetivos setores. Ao entrar na cadeia, as amostras são centrifugadas e/ou distribuídas pelos equipamentos consoante os parâmetros a analisar. Nos casos em que é exigida uma separação da amostra primária em alíquotas e as análises pedidas não são efetuadas na cadeia, os tubos são dirigidos para o *Accelerator p450*, o qual separa as alíquotas em diferentes suportes consoante os setores a que se destinam.

7.3 Caso Clínico

Uma doente do sexo feminino, de 73 anos, recorreu ao serviço de urgência por trombocitopenia ($10 \times 10^3/\mu\text{L}$ plaquetas) em análises realizadas em ambulatório. Esteve no serviço de urgência há 12 dias e mantém as queixas: mal-estar geral, cansaço, astenia, náuseas

e tonturas. Posto isto, foi efetuado o controlo analítico através da determinação do hemograma, da bioquímica e das provas da coagulação. O hemograma confirmou a trombocitopenia e as provas da coagulação não apresentaram qualquer alteração. Contudo, vários parâmetros bioquímicos surgiram alterados, sem qualquer contexto clínico. Após uma análise aprofundada do caso, surgiu a suspeita de utilização incorreta do tubo de colheita, o que levou ao pedido de uma nova colheita. No Anexo 3 estão apresentados os resultados bioquímicos de ambas as colheitas.

A discrepância dos resultados entre as colheitas deveu-se a uma incorreta utilização do tubo com EDTA K3 na primeira colheita. A presença de EDTA origina a quelatação do cálcio e a inibição da atividade de algumas enzimas, nomeadamente da fosfatase alcalina e da creatina cinase (CK), induzindo uma diminuição destes parâmetros. Por outro lado, uma vez que o anticoagulante se encontra na forma tripotássico, provoca um aumento nos níveis sanguíneos de potássio.

A suspeita de utilização do tubo incorreto foi então confirmada, uma vez que todos os parâmetros supracitados foram corrigidos quando os doseamentos foram efetuados no soro.

8. Fase Analítica

A fase analítica compreende todos os processos envolvidos na análise da amostra, sendo a fase que apresenta um maior grau de automatização, o que a torna na fase menos suscetível à ocorrência de erros. Ainda assim, é imprescindível o controlo da qualidade para garantir a fiabilidade dos resultados fornecidos. Nesta fase é importante o conhecimento dos equipamentos e metodologias utilizadas, bem como do método de controlo de qualidade utilizado.

O Serviço de Patologia Clínica executa um leque alargado de análises que estão associadas às diversas valências. Esta secção será dedicada à descrição dos parâmetros mais frequentemente determinados neste serviço, cuja apresentação será efetuada de uma forma individualizada para cada área. Os equipamentos e as metodologias utilizados para estas determinações já foram anteriormente abordados neste relatório (ver 5.4).

8.1 Bioquímica

A bioquímica é uma área multidisciplinar, através da qual é possível dosear analitos importantes para a homeostase corporal. Alterações nos mesmos podem ser sugestivas de determinadas patologias, o que auxilia no momento de decisão no diagnóstico. Para uma correta validação

dos resultados, é importante compreender o que poderá estar na base dessas possíveis alterações. Para isto, de seguida juntamente com os parâmetros determinados é apresentada uma breve explicação teórica. A seleção de parâmetros foi efetuada de um ponto de vista de maior utilidade e frequência na prática clínica.

8.1.1 Bioquímica da Avaliação Hepática

O fígado apresenta uma multiplicidade de funções e assume um contributo único para a homeostase corporal, através da transformação, síntese e libertação de componentes necessários a outros órgãos e pela remoção de substâncias tóxicas ao organismo. Essa eliminação é, em parte, efetuada por processos de biotransformação, os quais convertem substâncias nocivas em menos tóxicas ou mais fáceis de eliminar, para posterior excreção pela biliar ou urina. É de notar o papel central do hepatócito, célula funcional do fígado, ao nível do metabolismo dos glúcidos, lípidos e proteínas, nomeadamente na manutenção dos níveis sanguíneos de glucose, síntese de vários compostos lipídicos e proteínas e na produção da ureia. Os aminoácidos provenientes da dieta e do *turnover* proteico são desaminados no fígado com a formação de amónia, a qual é convertida em ureia pelo ciclo da ureia e excretada na urina. Uma eliminação ineficiente da amónia dá origem a uma situação de hiperamonémia, a qual pode levar ao desenvolvimento de encefalopatia hepática. Esta patologia surge como consequência do aumento da concentração da amónia no cérebro e do seu efeito neurotóxico, afetando o SNC^{1;12}.

A nível laboratorial, um reduzido número das funções supracitadas é passível de ser avaliado, sendo os testes de avaliação hepática baseados na avaliação da função excretora, na avaliação da síntese proteica e na determinação de enzimas hepáticas, as quais indicam lesão dos hepatócitos ou interferência no fluxo biliar. Estas determinações, quando efetuadas isoladamente, possuem uma reduzida especificidade e sensibilidade, daí ser recomendado a determinação conjunta de vários parâmetros no diagnóstico de uma hepatopatia. Ainda assim, estas determinações raramente sugerem um diagnóstico específico; contudo, permitem ao clínico uma orientação para uma determinada categoria de doença hepática, hepatocelular ou colestática¹³.

De seguida, segue-se a avaliação bioquímica das diferentes funções hepáticas, bem como os biomarcadores da chamada lesão hepatocelular, razão pela qual lhe chamamos bioquímica da avaliação hepática.

8.1.1.1 Teste da função hepática

Função excretora

Bilirrubina

A bilirrubina é um pigmento laranja-amarelado derivado da biotransformação química do anel porfirínico das proteínas que contêm o grupo heme, que resulta maioritariamente da destruição dos eritrócitos senescentes nas células reticuloendoteliais. Uma vez produzida, a bilirrubina é transportada para o fígado ligada à albumina. Já nos hepatócitos, sofre rapidamente glucuronidação, numa reação catalisada pela UDP-glucuroniltransferase (UDP-GT), e é excretada na bÍlis. No intestino, ocorre a hidrólise dos glucuronídeos pela ação da β -glucuronidase e a redução da bilirrubina não conjugada pela microflora intestinal, sendo a maioria convertida em urobilinogénio. Este é metabolizado em outros pigmentos, como o estercobilinogénio, que confere a coloração castanha das fezes, sendo excretado e uma pequena parte sofre reabsorção entero-hepática. Todo este mecanismo do metabolismo da bilirrubina encontra-se resumido na Figura 1^{1;12}.

Um aumento na concentração de bilirrubina é denominado de hiperbilirrubinémia, a qual pode ser caracterizada como não conjugada (aumento da bilirrubina indireta/hidrofóbica) ou como conjugada (aumento da forma direta/hidrossolúvel). As situações de hiperbilirrubinémia não conjugada são observadas na presença de distúrbios hemolíticos e em determinadas condições genéticas, como a síndrome de Gilbert e de Crigler-Najjar. Por sua vez, a hiperbilirrubinémia conjugada implica patologia hepática ou do trato biliar e é caracterizada pela presença de bilirrubinúria. Apesar desta diferenciação, na maioria das doenças hepáticas é habitual observar-se um aumento de ambas as frações¹³.

Um episódio de hiperbilirrubinémia pode ser a causa de determinadas situações clínicas, sendo a mais comum a presença de icterícia, que é caracterizada pelo tom amarelado da pele e olhos e, normalmente, surge em concentrações de bilirrubina superiores a 1,5 mg/dL¹⁴. Para além desta situação, mas com uma frequência muito reduzida, pode haver o desenvolvimento de kernicterus, uma síndrome neurológica devido à acumulação de bilirrubina no SNC, que ocorre especialmente em recém-nascidos de baixo peso, como consequência de uma hiperbilirrubinémia não conjugada. Isto acontece nos recém-nascidos, porque não têm uma barreira hematoencefálica desenvolvida, sendo permeável à bilirrubina, ao contrário dos adultos¹.

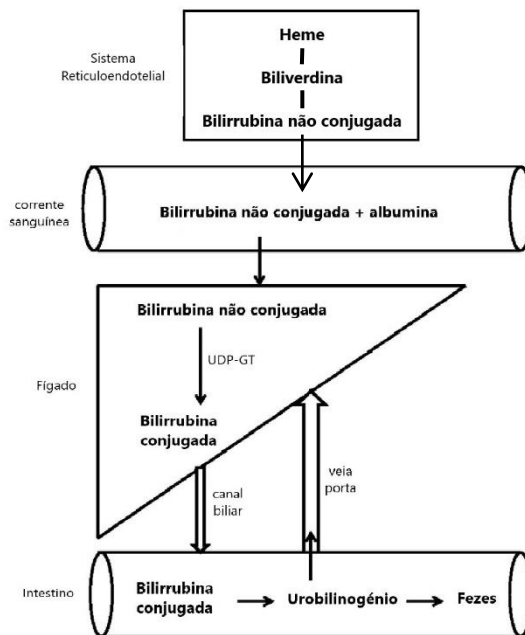


Figura 1 - Representação esquemática do metabolismo da bilirrubina.
 UDP-GT, uridinidifosfato-glucoroniltransferase

Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima amplamente distribuída, encontrando-se no fígado, osso, intestino, rim, placenta e leucócitos. Ainda assim, a atividade determinada na corrente sanguínea provém essencialmente da membrana dos canalículos biliares e do osso ¹⁵.

A determinação da ALP assume um papel importante no diagnóstico da doença hepatobiliar e da doença óssea com aumento da atividade osteoblástica ¹. Contudo, devido à sua inespecificidade, deve ser determinada em conjunto com a gamaglutamil-transferase (γ -GT). Deste modo, permite uma melhor orientação no diagnóstico, uma vez que um aumento na atividade sérica de ambas sugere uma alteração a nível hepático, enquanto que um aumento isolado da ALP orienta para a possibilidade de uma alteração a nível ósseo ¹². Na Tabela 4 estão apresentadas possíveis causas patológicas para ambas as situações referidas. De notar que no terceiro trimestre da gravidez e durante o crescimento ósseo, na infância e adolescência, são observados aumentos fisiológicos na atividade da ALP ¹⁵.

Tabela 4 - Causas associadas a aumentos nas atividades da fosfatase alcalina (ALP) e da gamaglutamil-transferase (γ -GT).

Aumento sérico da ALP	Obstrução biliar Cirrose biliar primária Colangite esclerosante primária Doença de Paget Metástases ósseas osteoblásticas	Aumento sérico da γ -GT	Doença Hepatobiliar Metástases hepáticas Doença pancreática Alcoolismo Doença pulmonar obstrutiva crónica Falência renal
-----------------------	---	--------------------------------	---

Gama-glutamiltransferase (γ -GT)

A γ -GT é uma enzima com uma elevada distribuição corporal, o que se traduz num amplo número de situações passíveis de originar um aumento dos seus níveis séricos, algumas das quais apresentadas na Tabela 4. Ainda assim, a atividade plasmática mensurada é sobretudo de origem hepática, em particular das células endoteliais dos dutos biliares, sendo utilizada como um marcador sensível da lesão hepatobiliar ¹⁶.

A determinação da γ -GT é especialmente útil em duas situações particulares, aquando de aumentos séricos de ALP e em casos de alcoolismo ¹². Trata-se de uma enzima indutível, ou seja, a sua síntese pode ser estimulada pela presença de determinadas substâncias, nomeadamente a fenitoína e o álcool ¹⁶.

Função de síntese

Proteínas totais

A maioria das proteínas plasmáticas, à exceção das imunoglobulinas, é sintetizada no fígado. Estas dividem-se em dois grupos, a albumina, que é a principal proteína plasmática, e as globulinas. Coletivamente, exercem um papel essencial na manutenção da pressão oncótica e como sistema tampão, para além das funções específicas de cada proteína ¹¹.

A concentração plasmática das proteínas reflete o equilíbrio entre a disponibilidade dos seus precursores, síntese, eliminação e distribuição. Posto isto, a sua determinação pode inferir no diagnóstico de patologias hepáticas e renais, mas também como biomarcador do estado nutricional, como exemplificado na Tabela 5.

No que concerne às hepatopatias, este parâmetro está dependente do tipo, severidade e duração da lesão hepática. Por exemplo, numa lesão hepática aguda, normalmente, não é observada uma alteração considerável do perfil proteico, enquanto que na cirrose avançada a concentração das proteínas plasmáticas sintetizadas pelo fígado diminui substancialmente. Na hepatite fulminante, a concentração plasmática de proteínas com um tempo de semivida curto,

como é o caso da protrombina, diminui consideravelmente, enquanto que as proteínas com um tempo de semivida longo se mantêm inalteradas ¹.

Em determinadas situações, podem surgir falsos aumentos na concentração de proteína, denominadas de pseudohiperproteinémias, nomeadamente por hemoconcentração devido à desidratação ou à ocorrência de estase venosa no momento da colheita ¹¹.

Tabela 5 - Causas associadas a alterações na proteinémia.

Hipoproteinémia	Deficiência nutricional Doença hepática grave Síndrome nefrótica Queimaduras	Hiperproteinémia	Hipergamaglobulinémia Estados hipovolémicos
-----------------	---	------------------	--

Albumina

A albumina é a proteína maioritária do plasma, constituindo 55 a 65 % da proteína plasmática total ¹¹, sendo por isto a maior responsável pela pressão oncótica no espaço intravascular. Para além de contribuir para a manutenção de uma normal distribuição da água, esta proteína é responsável pelo transporte de diversas substâncias na corrente sanguínea, nomeadamente ácidos gordos, bilirrubina e fármacos ¹².

A concentração plasmática de albumina quando alterada pode dar origem a situações de hipoalbuminémia ou hiperalbuminémia, cuja frequência é reduzida e sobretudo consequência de um estado de desidratação. Por outro lado, a hipoalbuminémia é uma situação clinicamente importante e frequente em doentes hospitalizados, podendo estar associada a uma diversidade de causas, tais como cirrose, desnutrição, síndrome nefrótica e sépsis ¹⁸. O desenvolvimento de hipoalbuminémia pode dar origem a uma série de situações clínicas secundárias, como a formação de edema, hiperbilirrubinémia e hiperlipidémia ¹⁹.

No que concerne à avaliação da função hepática, a concentração plasmática de albumina deve ser interpretada de uma forma cuidadosa, uma vez que são várias as causas extra-hepáticas associadas a uma diminuição desta proteína. Além disto, esta proteína apresenta um *turnover* lento, com uma vida média de cerca de 20 dias, o que limita o seu uso na avaliação de situações de disfunção hepática aguda. No entanto, em situações de insuficiência hepática crónica é comum uma diminuição acentuada da sua concentração ^{12;13}, sendo portanto um bom indicador da cronicidade da doença hepática ¹.

De modo a efetuar uma análise mais completa da capacidade de síntese hepática é recomendada a determinação da albumina em conjunto com o tempo de protrombina (TP), uma vez que este mostra uma maior utilidade no diagnóstico de situações agudas e apresenta

uma menor interferência por parte de condições extra-hepáticas ¹. O TP é abordado com mais detalhe na secção dedicada aos testes da coagulação (ver 8.2.5.1).

8.1.1.2 Avaliação da lesão hepatocelular

Aminotransferases

As aminotransferases são enzimas que catalisam, de forma reversível, a transferência do grupo amina de aminoácidos para cetoácidos. Deste grupo, destacam-se a aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT), ambas com uma ampla distribuição tecidual. A AST encontra-se no coração, fígado, músculo esquelético, rins, cérebro, eritrócitos e pulmões, enquanto que a ALT é encontrada principalmente no fígado e no rim ¹.

Em situações de lesão nas membranas dos hepatócitos e, conseqüente, aumento da sua permeabilidade, estas enzimas são libertadas para a corrente sanguínea, observando-se um aumento das suas concentrações plasmáticas ¹³. Na maioria destas situações, verifica-se uma atividade da ALT superior à da AST. Contudo, em situações de hepatite alcoólica, a atividade da AST é normalmente superior, sendo comum uma razão AST/ALT superior a dois ¹².

A determinação da atividade destas enzimas é útil na avaliação da lesão dos hepatócitos, para a qual apresentam uma elevada sensibilidade. Esta característica é particularmente bem demonstrada na hepatite viral, em que se verifica uma elevação marcada da atividade das aminotransferases em pacientes assintomáticos. Em contrapartida, a especificidade para o tecido hepático é limitada, tendo em conta a variedade de condições extra-hepáticas em que é observado um aumento da atividade plasmática destas enzimas. Todavia, a distinção entre uma atividade aumentada devido a patologia hepática e outras etiologias é possível através da determinação conjunta com outros parâmetros ¹².

8.1.2 Perfil Lipídico e Avaliação do Risco Cardiovascular

Os lípidos caracterizam-se por serem solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em água. O seu transporte na corrente sanguínea é efetuado pelas lipoproteínas, que são macromoléculas constituídas por triacilgliceróis, colesterol, fosfolípidos e proteínas, nomeadamente as apolipoproteínas. As diferentes proporções de lípidos e proteínas conferem-lhes densidades diferentes, o que permite classificá-las em cinco grupos principais, os quais são os quilomicron, VLDL (*very-low density lipoprotein*), IDL (*intermediate-density lipoprotein*), LDL (*low-density lipoprotein*) e HDL (*high-density lipoprotein*) ¹.

A determinação do perfil lipídico apresenta uma elevada importância na avaliação do risco cardiovascular, uma vez que os lípidos e as lipoproteínas estão intimamente relacionados com

o desenvolvimento do processo aterosclerótico e, conseqüentemente, de doença cardiovascular ¹¹. Esta determinação engloba o colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e os triacilgliceróis.

O desenvolvimento do processo aterosclerótico não se traduz apenas num processo de acumulação lipídica na parede das artérias, sendo a inflamação um mecanismo chave na patogênese desta doença. Por esta razão, nos últimos anos, tem sido demonstrado um crescente interesse na determinação dos biomarcadores inflamatórios para a monitorização do processo inflamatório aterosclerótico e avaliação do risco cardiovascular. Neste contexto, a Proteína C Reativa de alta sensibilidade (hs-PCR) é o biomarcador mais extensamente estudado e o que será abordado neste relatório ²⁰.

8.1.2.1 Colesterol Total

O colesterol encontra-se em todas as células corporais e deriva essencialmente da biossíntese a nível hepático, uma pequena fração provém da dieta ¹. Contrapondo toda a problemática associada ao colesterol, nomeadamente devido à condução de processos ateroscleróticos, esta molécula esteróide possui funções biológicas de extrema importância, tais como ser um componente essencial das membranas plasmáticas e o precursor da síntese de ácidos biliares e de hormonas esteróides ¹⁷. É importante salientar o papel fundamental dos ácidos biliares na absorção de lípidos e vitaminas lipossolúveis no intestino, nomeadamente a vitamina K ¹². A determinação do colesterol total é útil para o diagnóstico de dislipidémias e avaliação do risco cardiovascular. Contudo, não deve ser efetuada de forma isolada, devendo acompanhar-se da avaliação das lipoproteínas plasmáticas ^{12;17}.

8.1.2.2 Colesterol HDL

A lipoproteína de alta densidade (HDL) é uma partícula pequena com uma multiplicidade de atividades biológicas benéficas, como anti-oxidante, anti-inflamatória, anti-apoptótica e anti-trombótica. Esta lipoproteína possui também a capacidade de realizar o transporte reverso do colesterol, ou seja, a remoção do excesso de colesterol celular para o fígado, o que lhe confere uma atividade anti-aterogénica.

A concentração sérica do colesterol das HDL apresenta uma relação inversa com o risco cardiovascular, pelo que uma diminuição da concentração do colesterol HDL está associada a um aumento do risco cardiovascular ¹.

8.1.2.3 Colesterol LDL

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é constituída maioritariamente por colesterol e é responsável pelo seu transporte até aos tecidos. Os níveis plasmáticos de LDL são regulados pelo número de recetores presentes no fígado, o qual é influenciado pelo teor de colesterol no hepatócito. Posto isto, quanto maior for a concentração de colesterol na célula, menor será o número de recetores e maior será a concentração de colesterol LDL na corrente sanguínea. Este aumento desencadeia situações de hipercolesterolemia, com possibilidade de desenvolvimento de processos ateroscleróticos, dado o efeito pró-aterogénico desta molécula, conferido pela sua capacidade em se depositar na parede das artérias.

A determinação do colesterol das LDL é crucial na avaliação do risco cardiovascular, sendo que uma concentração elevada desta lipoproteína está associada a um aumento do risco cardiovascular ¹.

8.1.2.4 Triacilgliceróis

Os triacilgliceróis (TG) são constituídos por três moléculas de ácidos gordos e uma molécula de glicerol. Estes podem ser de origem endógena, sobretudo fígado e tecido adiposo, ou ser de origem exógena, sendo que representam cerca de 95 % dos lípidos provenientes da dieta ¹⁷.

Um aumento na concentração dos TG, para além do efeito pró-aterogénico *per se*, está associado à formação de LDL mais pequenas e densas, com maior poder aterogénico ¹². Deste modo, é evidente a associação entre um aumento sérico desta molécula e um maior risco cardiovascular.

8.1.2.5 Proteína C Reativa

A proteína C reativa (PCR) é produzida no fígado em resposta a situações de lesão tecidual, infeção ou inflamação, sendo uma proteína positiva de fase aguda. Deve-se notar que um aumento significativo desta proteína no plasma, em regra, é decorrente de uma situação de infeção bacteriana ²¹.

Por outro lado, níveis muito baixos desta proteína, cuja deteção pelos métodos convencionais não é possível, têm demonstrado um importante papel na avaliação do risco cardiovascular. Esta descoberta levou ao desenvolvimento de novos métodos com baixos limites de deteção, capazes de detetar baixas concentrações de PCR, designados de PCR de alta sensibilidade (hs-PCR). Assim, permitiu o uso da hs-PCR na avaliação do risco cardiovascular associado à inflamação vascular crónica do processo aterosclerótico, tendo sido demonstrado por vários

estudos uma associação positiva entre os níveis de hs-PCR e um aumento do risco cardiovascular ²⁰.

8.1.3 Biomarcadores Cardíacos

Os biomarcadores cardíacos são determinados para avaliar a ocorrência de lesão ou disfunção do miocárdio. Nesta secção serão abordados biomarcadores de lesão do miocárdio, utilizados no diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio (EAM), e o Peptídeo Natriurético do tipo B, utilizado no diagnóstico de insuficiência cardíaca.

O enfarte agudo do miocárdio é caracterizado pela necrose dos miócitos devido a isquemia prolongada, geralmente, associada a um processo aterosclerótico. Esta condição pode ser detetada através do aumento da concentração sérica dos biomarcadores cardíacos, como a mioglobina, a fração MB da creatina-cinase (CK-MB) e, em especial, as troponinas, nomeadamente a troponina T cardíaca (cTnT) e a troponina I cardíaca (cTnI), que apresentam especificidade, sensibilidade e padrões de libertação distintos, que se descreve posteriormente ¹².

8.1.3.1 Troponina cardíaca I de alta sensibilidade

A troponina é um complexo de três proteínas (troponina C, I e T) que se liga à tropomiosina e à actina, atuando como regulador do processo de contração muscular. Esta é expressa tanto no músculo esquelético, como no músculo cardíaco; contudo, a troponina cardíaca I (cTnI) e a troponina cardíaca T (cTnT) são distintas das expressas no músculo esquelético, o que lhes confere uma especificidade para o músculo cardíaco. O mesmo não acontece com a troponina C, uma vez que esta apresenta uma forma única distribuída por todo o tecido muscular, não sendo utilizada como biomarcador cardíaco ¹².

A cTnI e a cTnT localizam-se essencialmente nas miofibrilas, sendo uma pequena parte encontrada no citoplasma, o que lhes confere um padrão de libertação bifásico ¹². Em situações de lesão do miócito, estas aumentam na corrente sanguínea 4 a 9 horas após a lesão, com um pico entre as 12 e as 24 horas e mantêm-se na durante 7 a 10 dias, sendo o biomarcador com uma maior janela de deteção ²².

As novas diretrizes da cardiologia recomendam a utilização de ensaios de alta sensibilidade. Neste seguimento, no CHUC, os testes convencionais de determinação da cTn foram substituídos pelo ensaio da troponina I de alta sensibilidade (hs-cTnI) da *Abbott Diagnostics*. Estes testes são caracterizados por possuir um coeficiente de variação inferior a 10 % no valor do percentil 99 de uma população de referência normal (*cut-off* de decisão médica) e um baixo

limite de detecção, que possibilita a detecção de valores de cTn em pelo menos 50 % das amostras de indivíduos saudáveis. Estas características permitem uma detecção mais precoce da troponina e um aumento na sensibilidade do diagnóstico de EAM. Para uma utilização otimizada da hs-cTnI, foram desenvolvidos algoritmos que permitem a confirmação ou exclusão de EAM^{23;24}, conferindo uma maior rapidez no processo de triagem dos pacientes com suspeita deste diagnóstico no serviço de urgência. No Anexo 4 está evidenciado o algoritmo utilizado no CHUC.

8.1.3.2 Creatina cinase-MB

A creatina cinase (CK) é uma enzima que catalisa a refosforilação do ADP em ATP, estando presente no músculo cardíaco, no músculo esquelético e no cérebro. Esta é constituída por duas subunidades designadas de M e B, sendo as três isoenzimas resultantes denominadas de CK-1 (BB), a CK-2 (MB) e a CK-3 (MM), as quais apresentam uma especificidade distinta¹. A CK-MB é a isoforma de maior interesse na avaliação da lesão do miocárdio, uma vez que apresenta uma maior especificidade para o músculo cardíaco, quando comparada com as restantes. Ainda assim, níveis mensuráveis desta isoenzima citosólica podem derivar do músculo esquelético, nomeadamente em situações de doença muscular crónica ou de exercício físico intenso¹². Após a necrose dos miócitos, a CK-MB começa a aumentar na corrente sanguínea em 4 a 9 horas, com um pico pelas 24 horas e um retorno ao nível basal após 48 a 72 horas²².

8.1.3.3 Mioglobina

A mioglobina é uma heme-proteína de baixo peso molecular encontrada no citoplasma das células do músculo cardíaco e esquelético, cujo aumento na corrente sanguínea sugere uma situação de lesão muscular. A sua determinação é utilizada no diagnóstico de EAM, para o qual se apresenta como um marcador sensível, uma vez que surge precocemente na corrente sanguínea (cerca de 1 a 4 horas após a lesão). No entanto, a sua baixa especificidade e o seu baixo período de detecção (24 a 36 horas), resultante da sua rápida eliminação por vira renal, limitam a sua utilidade^{12;22}.

8.1.3.4 Peptídeo Natriurético Tipo B

O peptídeo natriuréticos do tipo B (BNP) é um marcador da função cardíaca, sendo sintetizado pelos ventrículos em resposta a situações de *stress* cardíaco, nomeadamente de estiramento cardíaco¹. Nestas situações ocorre a produção de pro-BNP que se decompõe e dá origem às

principais formas circulantes, a porção N-terminal do pró-BNP (NT-proBNP) e a forma fisiologicamente ativa, o BNP, que contribui para a homeostase cardíaca ¹.

A determinação da concentração plasmática do BNP e do NT-proBNP mostra ser útil no diagnóstico e monitorização da insuficiência cardíaca, na qual ocorre o aumento de ambas as concentrações ¹². Este aumento é mais evidente na concentração do NT-proBNP, fruto da sua maior estabilidade e de uma eliminação mais lenta, comparativamente ao BNP. Em doentes com insuficiência cardíaca sob terapêutica, os níveis plasmáticos de BNP e NT-proBNP tendem a diminuir, evidenciando uma adesão à terapêutica. Além disto, esta determinação fornece informações relevantes sobre o prognóstico de situações de enfarte agudo do miocárdio ²².

8.1.4 Avaliação da Função Renal

Os rins desempenham um papel central na homeostase corporal, o que justifica a associação entre uma redução da função renal e um aumento da morbidade e mortalidade ¹.

Cada rim contém cerca de um milhão de unidades funcionais, denominadas de nefrónios, constituídas pelo corpúsculo renal, túbulo contornado proximal, ansa de Henle, túbulo contornado distal e tubo coletor. É ao nível destes que ocorre a produção de urina e esta está dependente de três processos essenciais (filtração, reabsorção e secreção), que determinam a quantidade de determinada substância eliminada na urina. Para além da sua função excretora, o rim apresenta funções reguladoras e endócrinas, nomeadamente na regulação do balanço hidro-eletrolítico, da pressão arterial e do equilíbrio ácido-base e na síntese de eritropoietina e calcitriol, fundamentais na eritropoiese e absorção do cálcio no trato gastrointestinal, respetivamente ^{13;17}.

De modo a avaliar a função renal, procede-se ao doseamento da creatinina, ureia e ácido úrico, cuja eliminação do organismo ocorre por via renal, após filtração glomerular; à determinação da taxa de filtração glomerular (TFG) e à análise sumária de urina ¹.

8.1.4.1 Creatinina

A creatinina resulta da hidrólise da creatina e fosfocreatina a nível muscular. A sua velocidade de produção é relativamente constante e a sua eliminação é quase exclusivamente por filtração glomerular, o que promove a sua utilização como um marcador da função renal ¹.

A concentração plasmática da creatinina é utilizada para avaliar a TFG, para a qual apresenta uma relação inversamente proporcional. No entanto, o seu uso é limitado, visto que há uma série de fatores extra-renais que podem interferir com esta determinação, nomeadamente a idade, sexo, massa muscular e o consumo de carne. Além disto, os seus níveis não aumentam

de forma detetável até que haja um comprometimento considerável a nível renal, o que lhe confere uma baixa sensibilidade ¹.

Assim, este parâmetro não deve ser utilizado de forma isolada para a avaliação da função renal, uma vez que um valor dentro dos limites de referência não é significado de uma função renal normal. Por exemplo, com o aumento da idade, há uma menor eliminação da creatinina; todavia, esta diminuição pode não se refletir num aumento da concentração sérica da creatinina, uma vez que também ocorre uma menor produção ¹².

De modo a colmatar a baixa sensibilidade deste parâmetro e as restantes limitações apresentadas, é sugerida a determinação da clearance da creatinina para a avaliação da função glomerular.

8.1.4.2 Clearance da Creatinina

A determinação da TFG é a forma mais frequentemente utilizada para avaliar a função renal, sendo efetuada através da clearance da creatinina, que se apresenta como um biomarcador sensível e específico. A clearance expressa a quantidade de soluto que é eliminado do plasma por minuto, refletindo a velocidade de eliminação por filtração glomerular. Para esta análise, para além do soro, é necessária uma amostra de urina de 24 horas, de modo a permitir o seguinte cálculo:

$$Clearance = \frac{U}{P} \times V$$

Em que U é a concentração de creatinina na urina, V o débito urinário e P a concentração sérica de creatinina, sendo expressa em mililitros por minuto (mL/min) ¹².

8.1.4.3 Ureia

A ureia é o principal produto resultante do catabolismo das proteínas, sendo sintetizada no fígado e livremente filtrada no glomérulo, uma pequena fração é reabsorvida no túbulo proximal.

A concentração sérica da ureia pode ser influenciada por diversos fatores extra-renais, nomeadamente a dieta, *turnover* proteico, estados de desidratação, função hepática e diminuição da perfusão. Posto isto, a sua utilidade clínica é limitada, adquirindo um maior interesse clínico quando determinada em conjunto com a creatinina sérica, uma vez que a razão ureia/creatinina auxilia na diferenciação de urémias de origem pré e pós-renal. Em situações de urémia pré-renal, geralmente, a creatinina encontra-se normal, enquanto a ureia está aumentada. Na urémia pós-renal ocorre uma elevação de ambas, com um aumento mais evidente da ureia ^{1:25}.

8.1.4.4 Ácido Úrico

O ácido úrico é o produto principal da degradação dos nucleosídeos de purina (adenosina e guanosina), os quais podem derivar da dieta, da síntese endógena de purinas e do catabolismo dos ácidos nucleicos^{1,26}. Este composto nitrogenado é, maioritariamente, eliminado por via renal, num processo complexo de filtração, reabsorção e secreção, que resulta numa excreção urinária de 6 a 12 % da quantidade inicialmente filtrada. Uma alteração tanto na produção, como na eliminação do ácido úrico pode dar origem a situações de hipouricémia ou, mais frequentemente, de hiperuricémia¹.

A hiperuricémia pode ser resultado de uma diminuição da TFG, mas também de uma dieta rica em purinas ou de um aumento da destruição das nucleoproteínas, nomeadamente na quimioterapia. Este desequilíbrio pode levar à precipitação de uratos em vários tecidos, nomeadamente nos rins e articulações, como consequência da sua reduzida solubilidade¹⁷. Quando a deposição destes cristais ocorre nas articulações pode dar origem ao desenvolvimento da Gota²⁷.

A determinação deste parâmetro é especialmente útil no diagnóstico e monitorização da Gota e na monitorização de doentes em quimioterapia, para evitar a deposição renal de uratos¹¹.

8.1.4.5 Análise Sumária de Urina ou Urina tipo II

A análise sumária de urina, também denominada de Urina tipo II, contribui para a avaliação da função renal, apresentando uma elevada utilidade no rastreio, diagnóstico e monitorização de doenças renais e infeções do trato urinário. Esta inclui o exame físico-químico e a análise do sedimento urinário e é preferencialmente executada numa amostra do jato intermédio da primeira urina da manhã; contudo, também pode ser efetuado em amostras de urina aleatórias. Na análise físico-química são avaliados parâmetros físicos (cor, turvação e densidade) e químicos, os quais glucose, proteínas, bilirrubina, urobilinogénio, pH, hemoglobina, corpos cetónicos, nitritos, esterase de leucócitos⁵. Na Tabela 6 é apresentada uma correlação desses parâmetros com a aplicação clínica, sendo que na avaliação da doença renal os critérios mais relevantes são a proteinúria e a hematuria¹.

A avaliação do sedimento urinário, obtido após centrifugação de uma amostra de urina, compreende a deteção e classificação de eritrócitos, leucócitos, agregados linfocitários, células epiteliais escamosas, células epiteliais não escamosas, cilindros hialinos, cilindros patológicos, cristais (oxalato de cálcio monohidratado, oxalato de cálcio dihidratado, ácido úrico, trifosfato), bactérias, leveduras, muco e espermatozóides.

A presença de cilindros geralmente é indicativa de patologia renal, nomeadamente cilindros de eritrócitos e cilindros de leucócitos. A observação de cilindros de eritrócitos implica hematuria, possivelmente decorrente de patologia glomerular, nomeadamente glomerulonefrite, enquanto a presença de cilindros de leucócitos está associada a patologia tubular, nomeadamente pielonefrite (geralmente com bacteriúria). Em contraste, em situações de infeção do trato urinário inferior não são observados cilindros, apenas leucócitos. A presença de cilindros granulosos surge em várias doenças renais, mas está intimamente relacionada com situações de necrose tubular aguda ¹².

Tabela 6 - Correlação dos parâmetros analisados no exame físico-químico da urina com a aplicação clínica.

Cor	Em situações normais, apresenta uma coloração entre amarelo claro e âmbar escuro. A presença de uma coloração mais escura pode ser indicativa de uma urina mais concentrada ou da presença de pigmentos, nomeadamente hemoglobina, mioglobina e pigmentos biliares. Em situações de infeção por <i>Pseudomonas</i> sp., pode ser visível uma coloração verde/azul.
Densidade	Reflete a capacidade de concentração renal, sendo uma avaliação indireta da osmolalidade urinária. Em situações de desidratação e Diabetes Mellitus, surge aumentada, enquanto que na insuficiência renal apresenta-se diminuída.
Turvação	Sugere a presença de bactérias, eritrócitos, leucócitos, lípidos, cálculos ou refrigeração com deposição de cristais amorfos. A formação de espuma é sugestiva de proteinúria.
Glicose	A glicosúria surge quando a concentração de glucose excede o limiar de reabsorção renal e na presença de uma deficiente reabsorção tubular (sem hiperglicémia).
Proteínas	A proteinúria é uma característica importante da doença renal (ver 0). A sensibilidade para as globulinas e proteína de Bence-Jones é reduzida, o que pode originar falsos negativos.
Bilirrubina	Um resultado positivo pode ser sugestivo de lesão hepatocelular, colestase ou distúrbios hemolíticos.
Urobilinogénio	Reflete o metabolismo da bilirrubina. Um resultado positivo pode dever-se a doença hepatocelular, distúrbios hemolíticos, obstipação e exercício físico.
pH	Reflete a capacidade do rim em manter o equilíbrio ácido-base. A urina é, geralmente, acídica (entre 5,5 e 6,5), sendo observadas variações na presença de desequilíbrios ácido-base, infeções e litíase renal.
Sangue	Deteta a presença de heme-proteínas (hemoglobina e mioglobina).
Corpos cetónicos	A cetonúria encontra-se associada, essencialmente, à cetoacidose diabética.
Nitritos	Indicador de infeção do trato urinário, devido à capacidade de algumas bactérias em converter os nitratos em nitritos. De notar que um resultado negativo não descarta a hipótese de infeção.
Esterase dos leucócitos	Indicador de infeção do trato urinário, o qual deteta leucócitos esterase positiva (neutrófilos e monócitos).

8.1.4.6 Proteinúria

O doseamento de proteínas na urina é útil para a avaliação da função renal. Em condições normais, as proteínas de elevado tamanho ficam retidas na corrente sanguínea e as de baixo peso molecular são filtradas, mas são rapidamente reabsorvidas ao nível do túbulo proximal, observando-se uma quantidade muito reduzida de proteína na urina ¹².

As situações de proteinúria podem ser consequência de lesão glomerular, lesão tubular, excesso de proteínas de baixo peso molecular ou de causa pós-renal. A proteinúria glomerular é caracterizada por albuminúria e resulta do aumento da permeabilidade glomerular. A albuminúria quando é superior a 30 mg/24h e igual ou inferior a 300 mg/24h é denominada de microalbuminúria, sendo um indicador precoce da lesão glomerular. No caso de doentes com *Diabetes Mellitus*, esta determinação é especialmente útil uma vez que constitui um fator de risco para o desenvolvimento de nefropatia diabética, uma das principais complicações desta doença.

Contudo, a proteinúria não é um sinal exclusivo de patologia renal, podendo surgir em outras situações, tais como febre, exercício físico intenso ou devido à postura (proteinúria ortostática). Na gravidez, até 300 mg por dia é considerado normal, valores superiores podem ser sugestivos de pré-eclâmpsia ¹.

8.1.5 Equilíbrio Hidro-eletrolítico

A água é o elemento mais abundante no corpo humano, constituindo cerca de 60 % do peso corporal distribuído pelo meio extracelular (20 %) e intracelular (40 %). O compartimento extracelular (EC) compreende essencialmente o plasma e o fluido intersticial, com um predomínio iónico de sódio e cloreto. Em contrapartida, no compartimento intracelular (IC), os catiões maioritários são o potássio e o magnésio, enquanto as proteínas e os fosfatos orgânicos representam os principais aniões ²⁸. Esta diferença na composição química dos fluidos IC e EC é conseguida pela presença de bombas $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase na membrana das células ¹².

O controlo da osmolaridade e do volume do compartimento extracelular é conseguido através de mecanismos de regulação efetuados pelo hipotálamo, pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona, pelos peptídeos natriuréticos e pelo rim. Em relação ao compartimento intracelular, esse controlo está dependente sobretudo da integridade da membrana celular e das forças osmóticas e eletroquímicas ²⁸.

O desenvolvimento de desequilíbrios hidro-eletrolíticos pode ser a causa ou consequência de diversas patologias, sendo avaliado laboratorialmente pelo doseamento do Na^+ , K^+ e Cl^-

(ionograma). A quantidade destes iões, a nível corporal, é o reflexo do balanço entre a ingestão e a eliminação (maioritariamente pela via renal e em menor grau pelo trato GI e pele) ²⁸. É de notar que uma alteração na quantidade dos iões não está necessariamente associada a variações na sua concentração plasmática.

8.1.5.1 Sódio

O sódio é o principal catião extracelular, contribuindo fortemente para a osmolalidade plasmática e para a pressão osmótica ¹¹, o que lhe confere um papel fundamental na homeostase da água.

Uma alteração na homeostase do sódio está normalmente associada a desequilíbrios da água ¹² e pode dar origem a episódios de hiponatrémia ou hipernatrémia. A hiponatrémia advém de um excesso de água ou de uma perda de sódio, enquanto que a hipernatrémia, normalmente, resulta de condições em que há uma perda de água superior à de sódio ²⁸. Há ainda situações de pseudohiponatrémia, que podem surgir em indivíduos com hipertrigliceridémias ou hiperproteinémias ¹². Na Tabela 7 estão descritas as condições clínicas onde podem ser observadas alterações nas concentrações séricas de sódio.

Tabela 7 - Causas associadas a alterações na natrémia.

Hipernatrémia	<p>Hiperaldosteronismo</p> <p>Solução salina hipertónica</p> <p>Privação de água</p> <p>Sudorese excessiva</p>	Hiponatrémia	<p>SIADH</p> <p>Polidipsia</p> <p>Perdas GI</p> <p>Queimaduras</p> <p>Diuréticos</p> <p>Doença de Addison</p>
---------------	--	--------------	---

8.1.5.2 Potássio

O potássio é o principal catião intracelular, sendo que aproximadamente 98 % da totalidade deste ião se encontra no interior das células, intervindo nos processos de excitação e contração celular ¹¹.

Em condições normais, a concentração sérica do potássio aumenta de forma transitória, devido ao controlo efetuado pela insulina e pela aldosterona, que promovem a entrada do potássio para o meio IC e um aumento da sua secreção, respetivamente. Contudo, uma redistribuição do potássio ou um desequilíbrio na ingestão ou excreção pode dar origem a episódios de hipocaliémia ou hiperkaliémia, cujas causas estão apresentadas na Tabela 8. Além destas, a presença de hemólise e leucocitose pode induzir um falso aumento do potássio, denominado de pseudohiperkaliémia ^{12,28}.

Tabela 8 - Causas associadas a alterações na caliémia.

Hiperkaliémia	Acidose metabólica Rabdomiólise Deficiência de insulina Hipoaldosteronismo	Hipocaliémia	Alcalose Diuréticos Deficiência dietética Perdas GI/urina Hiperaldosteronismo Diurese osmótica
---------------	---	--------------	---

8.1.5.3 Cloretos

Os cloretos são os principais aniões extracelulares e uma alteração na sua concentração sérica está normalmente associada a alterações do sódio. Contudo, em duas situações particulares é possível verificar uma variação do cloro independente do nível de sódio, sendo estas a acidose e a alcalose metabólica por perda e aumento da reabsorção de bicarbonato, respetivamente ¹¹.

8.1.6 Metabolismo Glucídico

Os glúcidos são compostos orgânicos com uma multiplicidade de funções, nomeadamente como constituintes essenciais dos ácidos nucleicos e como fonte e armazenamento de energia. A digestão destas moléculas é levada a cabo pela ação da amílase salivar, amílase pancreática e dissacaridases, tendo como produto principal a glucose. Esta hexose, após ser absorvida no trato gastrointestinal por simporte mediado por um gradiente de iões sódio, é conduzida até ao fígado pelo sistema porta. Uma vez no tecido hepático, o metabolismo prossegue consoante as necessidades do organismo ¹.

8.1.6.1 Glucose

A glucose é a principal fonte de energia para o ser humano e pode derivar da dieta ou das vias da glicogenólise e da neoglicogénese.

A glicémia, concentração de glucose no sangue, resulta da interação de múltiplas vias reguladas por várias hormonas, nomeadamente a insulina, glucagon e adrenalina. Uma alteração na homeostase da glucose pode desencadear situações de hiperglicémia, sendo a causa mais comum a *Diabetes Mellitus*, ou hipoglicémia, que pode resultar de uma insulino-terapia descontrolada, septicémia e intoxicação por etanol (agravado se em conjunto com desnutrição) ^{1,11}.

A determinação da glucose é muito comum e apresenta uma elevada utilidade no diagnóstico e monitorização de doentes com *Diabetes Mellitus*.

8.1.6.2 Diagnóstico e Monitorização da Diabetes Mellitus

A Diabetes Mellitus é um grupo de doenças metabólicas associada a hiperglicémia, cujos critérios de diagnóstico são apresentados de seguida. Consoante a etiologia, pode ser classificada como Diabetes Mellitus tipo 1, Diabetes Mellitus tipo 2, Diabetes Gestacional ou outros tipos específicos de diabetes. A Diabetes Mellitus tipo 1 resulta de uma deficiência de insulina, provocada pela destruição dos ilhéus de Langerhans, o que leva à dependência de insulino-terapia. É, em regra, mais comum na infância ou adolescência e apresenta sintomatologia, como poliúria, polidipsia e perda de peso. Para além disto, apresenta uma maior suscetibilidade a cetoacidose e complicações diabéticas, como cataratas e nefropatia. Por outro lado, a Diabetes Mellitus tipo 2 é uma doença heterogénea, caracterizada por concentrações variáveis de insulina, associada a defeitos genéticos e metabólicos na ação e/ou secreção desta hormona ¹³. Geralmente, surge depois dos 40 anos e tende a não apresentar sintomatologia ¹. A Diabetes Mellitus tipo 2 é responsável por cerca de 90 % dos casos de diabetes a nível mundial e, muitas vezes, está associada à obesidade ¹.

A Diabetes Gestacional é definida como qualquer grau de intolerância à glucose reconhecido, pela primeira vez, durante a gravidez. Esta desenvolve-se em situações em que o aumento da insulina não é suficiente para reverter o aumento da resistência a esta hormona natural durante a gravidez ¹.

De acordo com a norma da Direcção-Geral de Saúde (DGS), o diagnóstico da diabetes é efetuado com base nos seguintes parâmetros para a população em geral:

- a) Glicémia em jejum ≥ 126 mg/dl; **ou**
- b) Sintomas clássicos associados a um valor de glicémia ocasional ≥ 200 mg/dl; **ou**
- c) Glicémia ≥ 200 mg/dl às 2 horas, na prova de tolerância à glucose oral (PTGO) com 75 g de glucose; **ou**
- d) Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$.

No que concerne ao diagnóstico da diabetes gestacional, um valor de glicémia em jejum superior a 92 mg/dL e inferior a 126 mg/dL, na primeira consulta de gravidez, faz o diagnóstico; se inferior a 92 mg/dL implica a realização da PTGO às 24-28 semanas de gestação ²⁹.

Prova de Tolerância à Glucose Oral

A prova de tolerância à glucose consiste no doseamento da glicémia antes e 2 horas após a administração de 75 g de glucose, para a população em geral. Em mulheres grávidas, as colheitas e posteriores determinações devem ser efetuadas às 0, 1 e 2 horas ¹.

Hemoglobina Glicada

Num adulto saudável 97 % da hemoglobina é do tipo HbA e apenas 6 % desta se encontra na forma glicada, a qual está dependente da concentração de glicose e da vida média do eritrócito. Um aumento nesta percentagem surge em situações de hiperglicémia, como resultado da ligação não enzimática da glicose à hemoglobina ⁴.

A determinação da hemoglobina glicada (HbA1c) tem especial importância na monitorização de doentes com *Diabetes Mellitus*, uma vez que reflete a concentração da glicose nos últimos 2-3 meses, sendo considerada o melhor método para uma avaliação retrospectiva dos níveis de glicose ³⁰.

8.1.7 Avaliação da Função Pancreática

O pâncreas é composto por tecido endócrino e exócrino. A fração endócrina é constituída pelos ilhéus de Langerhans, que secretam a insulina e o glucagon para a corrente sanguínea. A fração exócrina consiste numa glândula acinar, a qual secreta as enzimas digestivas necessárias para a digestão dos glúcidos, lípidos e proteínas, sendo estas a amilase pancreática, a lipase pancreática e as enzimas proteolíticas, respetivamente. Estas enzimas são libertadas para o duodeno, via duto pancreático, como constituintes do suco pancreático, o qual também possui iões bicarbonato, importantes para a neutralização do pH ¹⁷.

Esta abordagem da função pancreática irá incidir na determinação das enzimas amilase e lipase, uma vez que são os biomarcadores séricos mais comuns para o diagnóstico de patologia pancreática, mais especificamente pancreatite aguda. A maioria dos pacientes com esta patologia demonstra aumentos de três vezes ou mais das concentrações séricas de ambas as enzimas. Contudo, é necessário ter em atenção que a amilase pode estar aumentada em muitas outras situações ^{1:13}.

8.1.7.1 Amilase

A amilase é uma enzima digestiva que catalisa a hidrólise do amido e do glicogénio, encontrando-se em maior concentração nas glândulas salivares (tipo S) e no pâncreas exócrino (tipo P), embora esteja presente em diversos órgãos e tecidos. Em situações normais, a atividade da amilase no sangue é baixa e constante.

Em episódios de pancreatite aguda, verifica-se um aumento súbito da concentração da amilase sérica após 5 a 8 horas do início dos sintomas, com um pico entre as 12 e as 72 horas e um retorno ao nível basal após 3 ou 4 dias. Contudo, valores elevados de amilase podem ser igualmente observados noutras situações, nomeadamente na lesão das glândulas salivares ou

secreção ectópica por diversos tumores, o que lhe confere uma baixa especificidade como biomarcador de diagnóstico de pancreatite. Todavia, quanto maior for a magnitude do aumento da amilásia, maior será a probabilidade de ser uma pancreatite aguda ^{1,13}.

8.1.7.2 Lípase

A lípase é uma enzima glicoproteica que hidrolisa ésteres de glicerol de ácidos gordos de cadeia longa, na presença de uma co-lípase e sais biliares ¹. A sua produção ocorre essencialmente no pâncreas e a excreção por filtração glomerular, com uma total reabsorção nos túbulos proximais, fazendo com que não seja fisiologicamente detetada na urina ¹¹. Tal como a amílase, a sua determinação é utilizada no diagnóstico da pancreatite aguda, diferindo na cinética de libertação, como está patente na Figura 2. Após um episódio de pancreatite aguda, a atividade sérica da lípase surge aumentada em 4 a 8 horas, com um pico às 24 horas e um retorno ao nível basal entre 7 a 14 dias. Comparativamente à amílase, a lípase mostra ser mais específica e apresenta uma maior janela de deteção ¹.

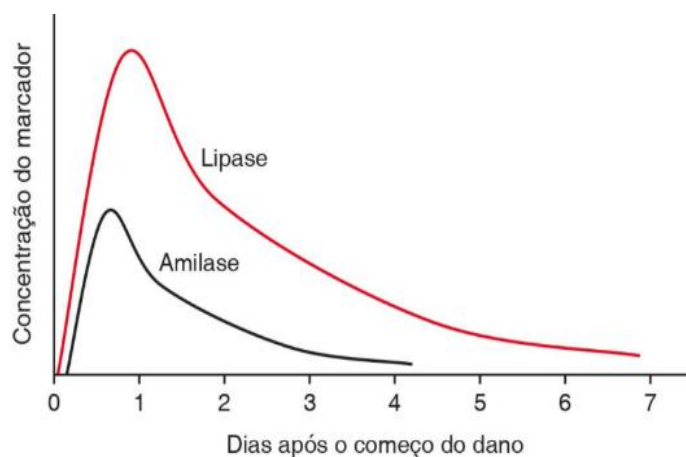


Figura 2 - Concentrações séricas da amilase e lípase em função do tempo, após um episódio de pancreatite aguda (Adaptado de Burtis e Bruns, 2015).

8.1.8 Avaliação do Ferro

O ferro é um elemento essencial para a funcionalidade de todas as células, desempenhando uma multiplicidade de funções como parte integrante de proteínas e enzimas, nomeadamente no transporte de oxigénio pela hemoglobina e na transferência de eletrões e geração de energia pelo citocromo c ¹³. Num adulto normal, o conteúdo corporal de ferro é de cerca de 3-4 g, sendo que aproximadamente dois terços se encontram na hemoglobina.

A absorção do ferro ocorre no duodeno e apenas cerca de 10 a 15 % do ferro ingerido é absorvido ¹², sendo a maioria do ferro plasmático proveniente do sistema reticuloendotelial.

No plasma, o ferro encontra-se ligado à transferrina e a sua internalização na célula é antecedida pela ligação do complexo ferro-transferrina aos recetores específicos da transferrina. Uma vez na célula, o ferro é libertado e armazenado na forma de ferritina ou consumido no decorrer de algum processo metabólico; a transferrina retorna à circulação sanguínea, juntamente com uma pequena fração do recetor, o qual é determinado na forma de recetor solúvel da transferrina.

A hepcidina exerce uma regulação negativa na homeostase do ferro, por diminuir a absorção e libertação do ferro pelos macrófagos, através da ligação e degradação da ferroportina (nos enterócitos e macrófagos). Esta hormona é estimulada pelo excesso de ferro e estados inflamatórios e inibida pelo défice de ferro, hipoxia e eritropoiese ineficaz ^{12;13}.

A avaliação do estado do ferro é particularmente importante para o diagnóstico diferencial de anemias e para a monitorização da terapêutica de anemias por défice de ferro. Esta inclui a determinação do ferro sérico, da ferritina sérica, da capacidade total de fixação do ferro (TIBC) e da percentagem de saturação da transferrina.

8.1.8.1 Ferro

O ferro é fundamental para a formação da hemoglobina e de outros elementos essenciais, como a mioglobina e o citocromo c.

A concentração sérica do ferro reflete a quantidade de ferro circulante ligada à transferrina e é utilizada no diagnóstico diferencial de anemias e na monitorização de anemias ferropénicas. Uma diminuição deste pode estar presente numa anemia causada por défice de ferro ou por doença crónica, bem como num estado pós-operatório ¹². Em contrapartida, um aumento é verificado em situações de hemocromatose, em intoxicações agudas por ferro e ainda em patologias hepáticas agudas ¹.

8.1.8.2 Ferritina

A ferritina é uma proteína de armazenamento celular de ferro, com uma capacidade de 4000 átomos de ferro, sendo encontrada na maioria dos tecidos ¹². Esta capacidade de armazenamento confere-lhe um efeito protetor ao nível da célula, uma vez que impede a presença de ferro livre e os consequentes danos oxidativos ¹.

A concentração da ferritina sérica é utilizada como indicador do ferro armazenado; contudo, perante estados inflamatórios não se verifica uma correlação direta entre os níveis de ferritina e os níveis de ferro. Nestas situações, ocorre um aumento da síntese de ferritina pelo fígado, dado ser uma proteína positiva de fase aguda, sem um aumento da quantidade de ferro. Por outro lado, apenas um défice de ferro pode induzir uma diminuição da ferritina inferior aos

valores de referência ⁹. Assim, a determinação deste parâmetro mostra uma elevada utilidade para a diferenciação de anemia causada por déficit de ferro ou por doença crónica inflamatória ¹¹. Além disto, mesmo com o inconveniente mencionado anteriormente, é o parâmetro mais adequado para avaliar as reservas de ferro ¹³.

8.1.8.3 Capacidade Total de Fixação do Ferro

A capacidade total de fixação do ferro (TIBC) representa uma medida indireta da transferrina circulante e dos locais de ligação disponíveis para o ferro no plasma ¹³. Para esta determinação é adicionado um excesso de ferro para promover a saturação da transferrina. Em seguida, o ferro que não se ligou é removido e mede-se a quantidade de ferro ligado à transferrina ⁹.

A determinação deste parâmetro assume um importante papel no diagnóstico diferencial de anemias, nomeadamente da anemia por déficit de ferro, em que está diminuído, e da anemia por doença inflamatória crónica, na qual está aumentado ⁹.

8.1.8.4 Saturação da Transferrina

A saturação da transferrina resulta do rácio entre o ferro sérico e o TIBC, expresso em percentagem. Deve-se notar que ambos os parâmetros devem ser expressos nas mesmas unidades ⁹.

Em indivíduos saudáveis, normalmente, apenas um terço dos sítios de ligação do ferro estão ocupados ¹, sendo observada uma diminuição neste valor em situações de anemia por déficit de ferro e anemia das doenças crónicas ⁶. Por outro lado, em situações de hemocromatose ocorre um aumento da saturação da transferrina ⁹.

8.1.9 Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo

O osso é um tecido dinâmico em constante remodelação, através de processos de formação e reabsorção óssea, protagonizados pelos osteoblastos e osteoclastos, num processo designado de *turnover* ósseo ¹. Esta remodelação é fundamental para manter a integridade estrutural do tecido ósseo, bem como para assegurar a sua função ao nível da homeostase mineral como reservatório de vários iões ¹². Esta função de reservatório integra cerca de 99 % do cálcio, 85 % do fosfato e 55 % do magnésio da totalidade presente a nível corporal.

A concentração plasmática dos iões referenciados, para além do *turnover* ósseo, está dependente da absorção intestinal e da excreção renal. Estes processos são regulados, essencialmente, pela Hormona Paratiroide (PTH) e pela Vitamina D ativa e uma vez alterados originam variações na concentração sérica destes iões, cujas causas estão apresentadas na Tabela 9 ¹.

Tabela 9 - Causas associadas a alterações na calcémia, fosfatémia e magnesémia.

Hipercalcémia	Paget ósseo Hiperparatireoidismo 1° Neoplasias Intoxicação por vitamina D Insuficiência renal aguda ou crônica	Hipocalcémia	Insuficiência renal crônica ↓ Magnésio Hipoparatiroidismo ↓ vitamina D
Hiperfosfatémia	Insuficiência renal Hipoparatiroidismo Acromegalia Necrose celular extensa	Hipofosfatémia	Hiperparatiroidismo 1°/2° Administração de glicose oral ou intravenosa Antiácidos ligadores de fosfato
Hipermagnesémia	Aporte excessivo de magnésio Insuficiência renal	Hipomagnesémia	Síndrome de má absorção Diarreia Alcoolismo Doenças renais Diuréticos

8.1.9.1 Cálcio

O cálcio é um elemento essencial para o organismo com um importante papel em diversos processos fisiológicos, nomeadamente na coagulação sanguínea e na contração muscular. Este surge no plasma de três formas distintas, sendo 10 % combinado com substâncias aniónicas, 40 % ligado a proteínas plasmáticas, principalmente à albumina, e 50 % na forma livre (ionizada) ¹.

A concentração sérica do cálcio é altamente influenciada pela PTH e pela vitamina D ativa, que induzem um aumento da absorção intestinal e da reabsorção tubular. Uma alteração nesta concentração está, frequentemente, associada a situações de hiperparatiroidismo primário e neoplasias, que constituem as principais causas de hipercalcémia. Por outro lado, a hipocalcémia surge, em muitos casos, como consequência de uma situação de hipoalbuminémia, pois 1,0 mg de albumina liga-se a 0,8 mg de cálcio na corrente sanguínea. Nestes casos, designa-se de pseudohipocalcémia e exige uma correção dos níveis de cálcio, sendo geralmente efetuada pelo equipamento e expressa na forma de “cálcio corrigido”.

A determinação do cálcio mostra-se útil no diagnóstico e monitorização de patologias ósseas, bem como na deteção de distúrbios da vitamina D, das glândulas paratiroides, do trato GI e de doenças renais ¹¹.

8.1.9.2 Fosfato

O fósforo é um importante componente intracelular, onde surge na forma de fosfato orgânico, constituindo moléculas como fosfolípidos, ácidos nucleicos, NADP e ATP. Além disto, tem a capacidade de atuar como tampão ¹⁷.

A concentração sérica de fosfato sofre grandes variações ao longo do dia, verificando-se um aumento imediato num estado pós-prandial, devido à elevada disponibilidade de fosfato nos alimentos e a uma eficiente absorção intestinal. Essa eficiência no processo de absorção faz com que a sua concentração seja essencialmente determinada pela excreção renal, a qual será maior ou menor consoante o nível de fosfato no líquido extracelular.

Em situações de insuficiência renal, há uma maior retenção do fosfato com um consequente aumento dos seus níveis séricos, sendo esta uma característica importante desta patologia. Em contrapartida, uma diminuição da concentração sérica de fosfato deriva essencialmente de um aumento da excreção renal, nomeadamente como consequência de hiperparatiroidismo, ou de uma redistribuição do fosfato, cuja frequência em doentes hospitalizados é elevada, devido sobretudo à insulinoaterapia e à administração de glicose intravenosa ¹³.

8.1.9.3 Magnésio

O magnésio é um importante cofator de uma variedade de enzimas, nomeadamente da ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$, e contribui, a par com o cálcio, para uma normal atividade neuromuscular. A sua distribuição é sobretudo intracelular, excluindo o magnésio a nível ósseo, encontrando-se apenas cerca de 1 % no meio extracelular ¹³.

A concentração sérica do magnésio é controlada principalmente pela reabsorção renal (maioritariamente na ansa de Henle), a qual pode ser aumentada pela PTH. Uma alteração nesta concentração está frequentemente associada a variações noutras iões e pode originar uma situação de hipomagnesémia ou hipermagnesémia. A hipomagnesémia é clinicamente mais relevante que a hipermagnesémia e está, geralmente, associada a perdas a nível do trato GI ou a uma deficiente reabsorção renal, enquanto que a hipermagnesémia é, maioritariamente, de origem iatrogénica, decorrente do consumo de antiácidos, enemas e administração de nutrição parenteral ³¹. Estas situações, em que há um aumento dos níveis séricos de magnésio, são raras perante um bom funcionamento renal ¹³.

8.2 Hematologia

A Hematologia é a área que se destina ao estudo dos elementos figurados do sangue e dos diversos parâmetros associados a estes, fazendo uma avaliação da causa, diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças relacionadas com o sangue.

Neste capítulo abordar-se-á, de um ponto de vista teórico, o processo de formação das células sanguíneas, designado de hematopoiese, e a hemóstase, para uma melhor compreensão dos exames efetuados. No que concerne à parte prática, serão apresentados os diferentes parâmetros analíticos que constituem o hemograma, a análise morfológica das células sanguíneas pela observação do esfregaço de sangue periférico, a determinação da velocidade de sedimentação e, por fim, as provas da coagulação, para uma avaliação do processo hemostático.

8.2.1 Hematopoiese

A hematopoiese é o processo contínuo e regulado de formação, desenvolvimento e especialização de todas as células sanguíneas, as quais são libertadas da medula óssea para a corrente sanguínea⁹. Todo este processo está dependente de um microambiente único, constituído por células do estroma e uma rede microvascular. Estas células são a principal fonte de fatores de crescimento, cuja função é regular a proliferação e diferenciação das células progenitoras, bem como a função das células sanguíneas maduras. A hematopoiese (Figura 3) inicia-se através de uma célula tronco pluripotente, que para além de originar as diferentes linhagens celulares, possui capacidade de autorrenovação³². Numa primeira fase, a célula estaminal hematopoiética dá origem a células progenitoras comprometidas com a linhagem linfóide ou mielóide, as quais são a célula progenitora linfóide comum, que prolifera e se diferencia em linfócitos T e B; e a célula progenitora mielóide comum que dá origem às linhagens eritroide, granulocítica, monocítica e megacariocítica. Ao longo da hematopoiese, as células passam por diferentes estadios de maturação, adquirindo diferentes denominações consoante a linha celular, como é possível observar na Figura 3^{8;32}.

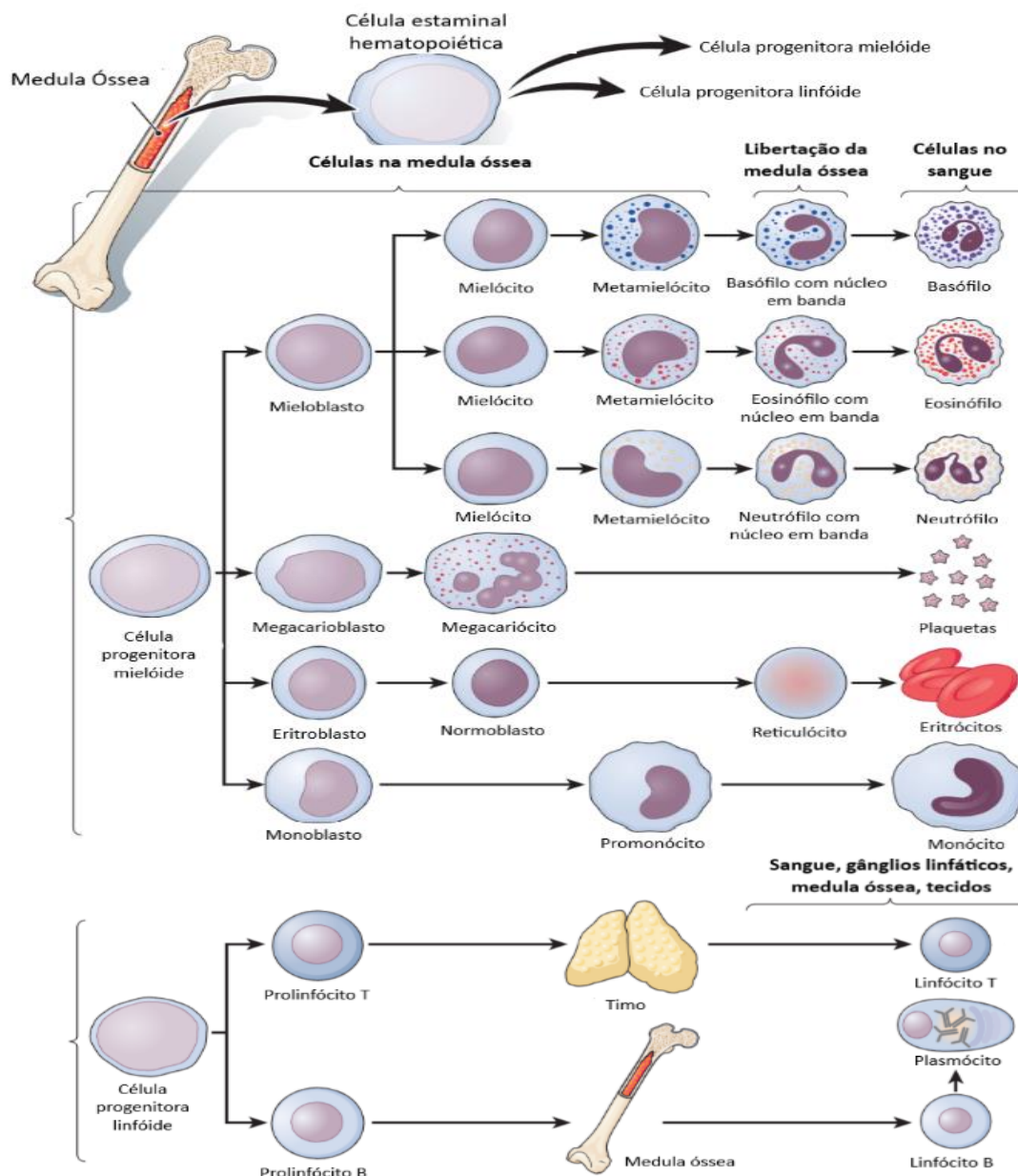


Figura 3 - Hematopoiese. A partir de uma célula comum são originados os dois grandes grupos de células sanguíneas, mielóides e linfóides (Adaptado de Turgeon, 2018).

8.2.2 Hemograma

O hemograma é um exame laboratorial de rotina que permite uma avaliação qualitativa e quantitativa dos elementos figurados do sangue, fornecendo informações clínicas valiosas sobre o estado de saúde do doente. Este exame é fundamental para o diagnóstico, acompanhamento e monitorização da terapêutica de distúrbios hemolíticos e não hemolíticos⁹. Todas estas características fazem com que seja dos exames mais pedidos na prática clínica, nomeadamente no Serviço de Patologia Clínica, em que são efetuados mais de mil hemogramas no período entre as 8 e as 16 horas.

Esta análise integra o eritrograma, o leucograma e o plaquetograma, cuja descrição é apresentada de seguida. Além das determinações habituais, o contador automático utilizado neste serviço permite ainda a contagem de reticulócitos (RET), eritroblastos (NRBC), granulócitos imaturos (GI), a fração de plaquetas imaturas (IPF) e o rácio de plaquetas gigantes (P-LCR). No Anexo 5 estão expostos os intervalos de referência dos diferentes parâmetros analisados.

8.2.2.1 Eritrograma

O eritrograma avalia parâmetros quantitativos e qualitativos referentes à série vermelha. A avaliação quantitativa engloba a contagem de eritrócitos (CBC), a concentração de hemoglobina (Hb) e o hematócrito (HTC), enquanto que a avaliação qualitativa diz respeito aos índices eritrocitários, os quais são o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Para além destes, também é efetuada a determinação da distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW) e a contagem dos reticulócitos e dos eritroblastos.

Contagem de eritrócitos

Um adulto contém cerca de 5 milhões de eritrócitos por microlitro de sangue, que representam cerca de 95 % do volume dos elementos figurados do sangue ¹⁷.

A contagem de eritrócitos é expressa em número de células por microlitro e é um indicador da produção e tempo de meia vida dos eritrócitos ⁹. Este parâmetro deve ser interpretado em conjunto com os restantes parâmetros mencionados de seguida.

Concentração de hemoglobina

A hemoglobina é uma proteína cuja principal função é o transporte de oxigénio. Esta é constituída por dois pares de cadeias polipeptídicas, cada uma ligada a um grupo heme (protoporfirina IX com um átomo de ferro no centro) ¹⁴.

A determinação da concentração de Hb, normalmente expressa em g/dL, é fundamental para o diagnóstico de anemias, nas quais apresenta uma diminuição inferior aos valores de referência para a idade e o sexo. Por outro lado, um aumento deste parâmetro é passível de ser observado em doenças pulmonares ou cardíacas avançadas, bem como em resposta fisiológica a altitudes elevadas ¹¹.

Hematócrito

O hematócrito corresponde ao volume ocupado pelos eritrócitos no volume de sangue total e apresenta-se, normalmente, na forma de percentagem ⁹. Para além de ser utilizado no diagnóstico de anemias, é útil para a avaliação do estado de hidratação, uma vez que é observado o seu aumento em situações de desidratação, nomeadamente em queimados e idosos ¹¹. É de notar que o valor do hematócrito pode ser influenciado pelo tamanho dos eritrócitos, sendo um aspeto importante a ter em conta aquando da interpretação deste parâmetro ⁹.

Índices eritrocitários

Os índices eritrocitários são obtidos a partir dos valores previamente determinados, cujas fórmulas utilizadas estão apresentadas no Anexo 2.

A determinação dos índices eritrocitários permite uma avaliação do tamanho, quantidade e concentração da hemoglobina no eritrócito, sendo utilizada para a caracterização e classificação morfológica de anemias ³³. É importante salientar que são valores médios, portanto na presença de populações polimórficas podem não apresentar uma avaliação totalmente correta ⁸.

Volume Corpuscular Médio

O volume corpuscular médio (VCM) representa o volume médio de cada eritrócito, expresso em fentolitros (fL). Este parâmetro permite classificar morfológicamente as anemias como microcíticas (< 80 fL), normocíticas (80-100 fL) e macrocíticas (> 100 fL) ⁹.

As anemias microcíticas resultam de uma deficiente síntese de hemoglobina e estão frequentemente associadas a situações de hipocromia. Alguns exemplos deste tipo de anemias são a anemia por défice de ferro, anemia das doenças crónicas, anemia sideroblástica e as talassémias.

Por outro lado, as anemias macrocíticas podem ser diferenciadas em anemias megaloblásticas e não-megaloblásticas. As anemias megaloblásticas resultam de uma deficiência na síntese de DNA, nomeadamente por défice de vitamina B12 ou folato, enquanto que as anemias não-megaloblásticas resultam de uma alteração da membrana e são frequentemente observadas em situações de alcoolismo e doença hepática crónica ⁹. No caso das anemias não-megaloblásticas, geralmente, o VCM apresenta valores entre 100 e 110 fL, enquanto que nas anemias megaloblásticas, em regra, é observado um aumento mais evidente ⁸.

Hemoglobina Corpuscular Média

A hemoglobina corpuscular média (HCM) representa o conteúdo médio de hemoglobina em cada eritrócito, expressa em picogramas (pg). Geralmente, não é utilizada na classificação das anemias, sendo preferível a utilização da CHCM ⁹.

Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) representa a concentração média de hemoglobina em cada eritrócito, expressa em g/dL, a qual permite a classificação das anemias como hipocrômicas, quando diminuída, ou normocrômicas, quando dentro do intervalo de referência.

Por outro lado, quando é observada uma ligeira elevação pode indicar a presença de esferócitos, enquanto que aumentos mais significativos são sugestivos de determinadas características da amostra que interferem na medição da hemoglobina, nomeadamente lipêmia e icterícia, ou devido à presença de aglutininas a frio. Nesta situação, geralmente o valor de CHCM é superior a 37 g/dL, sendo necessário proceder à incubação da amostra a 37°C durante 30 minutos e repetir a contagem, de modo a confirmar ou a descartar a presença de aglutininas a frio ⁹.

Distribuição do Tamanho dos Eritrócitos

A distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW) representa a heterogeneidade do volume dos eritrócitos presentes na amostra, refletindo o índice de anisocitose. Este parâmetro pode ser apresentado sob duas formas, RDW-SD (largura verificada a 20 % da altura do pico do histograma de contagem dos eritrócitos), expresso em fL e RDW-CV (medido como coeficiente de variação), expresso em percentagem. Esta determinação é especialmente útil no diagnóstico diferencial de anemias microcíticas, em que permite a distinção entre anemia por défice de ferro (RDW frequentemente aumentado) e talassémias heterozigóticas (RDW frequentemente normal). Contudo, não dispensa a realização de outros testes confirmatórios, uma vez que não possui valor de diagnóstico ⁸.

Reticulócitos

Os reticulócitos são as células que antecedem ao eritrócito maduro, não contêm núcleo, mas ainda possuem RNA e organelos. Em condições normais, estas células permanecem cerca de 1 dia na corrente sanguínea antes de originarem o eritrócito maduro ⁹.

A contagem dos reticulócitos é, geralmente, expressa em percentagem do total de eritrócitos e reflete a atividade eritropoiética da medula óssea. Deste modo, permite a caracterização das

anemias como regenerativas ou hiporregenerativas, no caso de aumento ou diminuição dos reticulócitos, respetivamente ⁸.

8.2.2.2 Leucograma

A avaliação da série branca é efetuada através do leucograma, o qual engloba a contagem total de leucócitos e a contagem diferencial ou fórmula leucocitária. Neste serviço, é também efetuada a contagem dos granulócitos imaturos.

Contagem total de leucócitos

A contagem de leucócitos é expressa em número de células por microlitro de sangue. A presença de alterações nesta contagem, sendo estas uma diminuição (leucopenia) ou um aumento (leucocitose) dos leucócitos, não deve ser interpretada sem a fórmula leucocitária, cuja determinação permite identificar qual ou quais as populações que estão alteradas ⁹.

A leucocitose está frequentemente associada a um aumento dos neutrófilos, cuja etiologia pode derivar de uma infeção, hemorragia aguda, gravidez, pós-operatório e leucemia. Todavia, uma leucopenia pode surgir após radioterapia, anemia perniciosa e em situações de pós-quimioterapia, em que a diminuição é repentina e substancial ⁸.

Fórmula leucocitária

A fórmula leucocitária fornece, em números absolutos e percentuais, a contagem de cada tipo de leucócito. Deste modo, é possível avaliar a distribuição das cinco populações leucocitárias: neutrófilos (incluindo neutrófilos em banda), linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos ⁶. Para não induzir em erro, é aconselhado a interpretação dos valores absolutos, ao invés dos percentuais ⁹.

Granulócitos imaturos

Os granulócitos imaturos, normalmente, não surgem no sangue periférico, quando presentes pode ser sugestivo de infeção ou malignidade, nomeadamente leucemia. No caso dos neutrófilos, perante um aumento de neutrófilos em banda ou de células mais imaturas denomina-se de desvio à esquerda ⁹.

8.2.2.3 Plaquetograma

A avaliação da série plaquetária é efetuada através do plaquetograma, o qual engloba a contagem de plaquetas, volume plaquetário médio (VPM), plaquetócrito (PCT), fração de plaquetas imaturas (IPF), distribuição do tamanho plaquetário (PDW) e o rácio de plaquetas gigantes (P-LCR).

Contagem de Plaquetas

A contagem de plaquetas é expressa em número de células por microlitro de sangue e mostra-se útil no rastreamento e diagnóstico de distúrbios hemostáticos.

Este parâmetro pode surgir alterado devido a uma série de condições que provocam uma diminuição do número de plaquetas (trombocitopenia) ou um aumento (trombocitoses), cuja etiologia pode derivar de uma hemorragia aguda, esplenectomia ou trombocitemia essencial. Por outro lado, as trombocitopenias podem ser o resultado de uma produção insuficiente de plaquetas, como na anemia aplásica, leucemia, síndrome mielodisplásica e radioterapia. Pode surgir também como consequência do aumento do consumo de plaquetas, como na coagulação intravascular disseminada (CIVD), púrpura trombocitopénica autoimune (PTI) e púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). Para além destas, também se verifica uma diminuição do número de plaquetas em situações de esplenomegália, transfusões massivas (perda dilucional) e trombocitopenias induzidas por fármacos ³². A formação de agregados plaquetares, satelitismo e a geração de coágulos são causas de falsas trombocitopenias, o que pode levar a más interpretações ⁸.

Volume plaquetário médio

O volume plaquetar médio (VPM) representa o volume médio de cada plaqueta, expresso em femtolitros (fL), cuja determinação permite uma avaliação do *turnover* plaquetar. Assim, auxilia no diagnóstico diferencial de trombocitopenias e trombocitoses.

Numa situação de trombocitopenia, um VPM aumentado sugere uma destruição periférica das plaquetas, nomeadamente PTI e CIVD ³³, enquanto que um VPM diminuído está associado a uma baixa produção de plaquetas pela medula óssea. Por outro lado, em casos de trombocitose, geralmente, um VPM alto indica uma trombocitose primária e um VPM baixo indica uma trombocitose reativa ³⁴.

Plaquetócrito

O plaquetócrito (PCT) é análogo ao hematócrito, representando o volume ocupado pelas plaquetas no volume de sangue total, expresso em percentagem. Este parâmetro apresenta uma relação direta com a contagem total das plaquetas e com o seu volume, tendo um reduzido significado clínico ³³.

Fração de plaquetas imaturas

A fração de plaquetas imaturas (IPF) é um parâmetro de avaliação recente, que reflete a percentagem de plaquetas reticuladas existentes no sangue periférico, sendo utilizado como

indicador da atividade megacariocítica na medula óssea. Esta determinação mostra ser útil no diagnóstico diferencial de trombocitopenias, onde aumentos estão, geralmente, associados a situações em que há uma rápida destruição das plaquetas, enquanto que diminuições são sugestivas de uma produção insuficiente por parte da medula óssea ³⁴.

Distribuição do tamanho plaquetário

A distribuição do tamanho plaquetário (PDW) representa a heterogeneidade do volume das plaquetas, refletindo o índice de anisocitose plaquetária, expresso em fL. Esta determinação é útil no diagnóstico diferencial entre trombocitemia essencial (PDW aumentado) e trombocitose reativa (PDW normal) ³³.

Rácio de plaquetas gigantes

O rácio de plaquetas gigantes (P-LCR) reflete a percentagem de plaquetas com um VPM superior a 12 fL. Um aumento neste parâmetro pode ser causado pela presença de plaquetas gigantes em situações de destruição imune, mas também por agregação plaquetária ou pela presença de fragmentos celulares ³³.

8.2.3 Esfregaço Sanguíneo

O esfregaço de sangue periférico (ESP) é uma técnica com elevado interesse para a avaliação hematológica, permitindo uma contagem diferencial dos leucócitos e uma avaliação da morfologia das células sanguíneas. Deste modo, possibilita a identificação de anemias, leucemias e anormalidades plaquetárias de uma forma mais eficiente. Esta técnica é efetuada de forma totalmente automatizada no *Sysmex SP-10*, que realiza o esfregaço e a coloração de May-Grünwald e Giemsa, sendo a observação e avaliação do esfregaço sanguíneo efetuada pelo *Cella Vision*.

Na prática clínica, o ESP só é efetuada nas situações em que seja justificável, mesmo com o auxílio do *Cella Vision*, que efetua uma análise digital da morfologia celular, é impensável proceder à avaliação microscópica de todas as amostras num laboratório com a dimensão do Serviço de Patologia Clínica. Posto isto, a decisão de efetuar o esfregaço de sangue periférico tem em conta os resultados obtidos no hemograma, bem como o histórico do doente e as circunstâncias clínicas em que o mesmo se encontra.

8.2.3.1 Avaliação da série vermelha

O eritrócito possui uma forma bicôncava, com ausência de núcleo, apresentando a parte central (cerca de um terço da célula) descorada com uma coloração mais carregada na periferia ⁹. Pela observação do ESP é possível proceder à avaliação da aparência e morfologia do eritrócito, sendo que em determinadas situações patológicas são observadas alterações ao nível do tamanho, forma, cor, presença de inclusões eritrocitárias ou da distribuição, cuja descrição se encontra de seguida.

Anteriormente à avaliação dessas situações patológicas é importante saber identificar o que é normal, por conseguinte na Figura 4 encontra-se evidenciado um esfregaço de sangue periférico normal com um pequeno linfócito, cujo tamanho do núcleo se assemelha ao tamanho de um eritrócito normal.

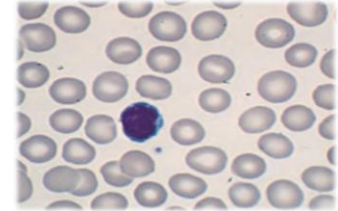
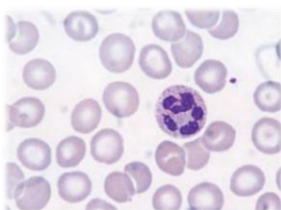


Figura 4 - Esfregaço de sangue periférico com um pequeno linfócito no centro (Adaptado de Turgeon,2018).

Tamanho

Em condições normais, o eritrócito apresenta um diâmetro médio de cerca de 7,2 μm , sendo denominado de normócito. O desenvolvimento de alterações no tamanho pode resultar em macrócitos (eritrócitos com um diâmetro superior a 8,2 μm) ou em micrócitos (eritrócitos com um diâmetro inferior a 6,2 μm) ⁸, os quais se encontram representados na Figura 5. Deve-se notar que a presença de micrócitos ou macrócitos no ESP pode tratar-se de uma alteração generalizada, caso em que se verifica uma alteração no VCM, ou restringir-se apenas a uma pequena população, não alterando o VCM ⁶. Além desta situação, a coexistência de micrócitos e macrócitos pode resultar num valor de VCM normal, uma vez que se trata de um valor médio. É importante salientar que na presença de uma população dimórfica, nomeadamente após transfusões sanguíneas, devem ser reportadas as características de ambas as populações ⁸.

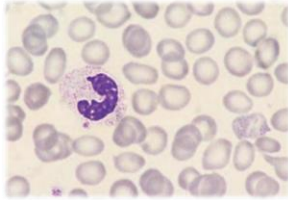
A observação de uma heterogeneidade no tamanho celular é denominada de anisocitose, sendo caracterizada como uma anormalidade não específica, que pode ser igualmente comprovada pelo aumento do RDW ⁸.



Adaptado de Bain, 2015

Macrócito: Eritrócito com um diâmetro superior a 8,2 μm ⁸

Observado nas seguintes situações: Anemia megaloblástica, síndrome mielodisplásica, hepatopatia, alcoolismo, anemia hemolítica/hemorragia (reticulocitose) e em recém-nascidos (de uma forma fisiológica) ⁶



Adaptado de Turgeon, 2018

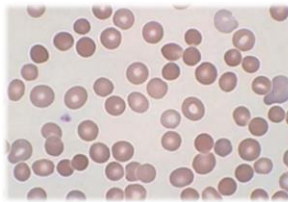
Micrócito: Eritrócito com um diâmetro inferior a $6,2 \mu\text{m}$ ⁸

Observado nas seguintes situações: Anemia por déficit de ferro, anemia das doenças crônicas e hemoglobinopatias ⁶

Figura 5 - Alterações no tamanho do eritrócito. Esfregaço de sangue periférico, descrição e causas associadas.

Forma

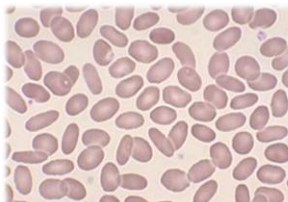
Em condições normais, o eritrócito maduro apresenta, geralmente, uma forma bicôncava. Contudo, como resultado de uma eritropoiese deficiente ou de danos após a formação, o eritrócito pode adotar formas anormais, passando a designar-se de poiquilócito. Estas formas adquirem diferentes denominações e estão associadas a diferentes patologias, como exemplificado na Figura 6 ³³.



Adaptado de Tinggaard, 2011

Esferócito: eritrócito pequeno, redondo, denso, sem palidez central ⁶

Observado nas seguintes situações: Esferocitose hereditária, doença hemolítica do recém-nascido e anemia hemolítica autoimune ³³

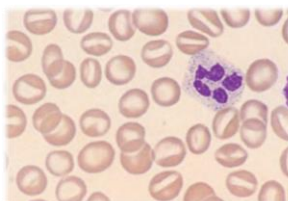


Adaptado de Tinggaard, 2011

Eliptócito: forma elítica, em “forma de charuto” ⁹

Ovalócito: célula em “forma de ovo” ⁹

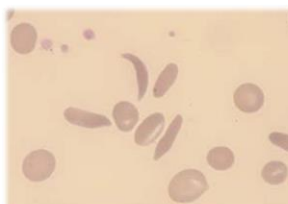
Observados nas seguintes situações: Eliptocitose/ovalocitose hereditária, talassémia major, anemia por déficit de ferro ⁹, anemia megaloblástica (macro-ovalócitos) ⁶



Adaptado de Bain, 2015

Estomatócito: eritrócito caracterizado por possuir uma ampla fenda central ⁹

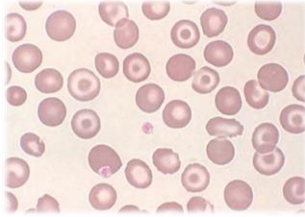
Observado nas seguintes situações: Estomatocitose hereditária, alcoolismo, hepatopatia, anemia hemolítica auto-imune ⁹



Adaptado de Turgeon, 2018

Drepanócito: eritrócito fino, denso, alongado, com extremidades pontiagudas, pode ser curvo; “célula em foice” ⁹

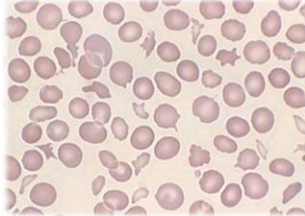
Observado na seguinte situação: Anemia falciforme (Hb S) ⁸



Adaptado de Tinggaard, 2011

Célula em alvo: eritrócito com hemoglobina concentrada no centro e na periferia, assemelhando-se a um alvo ⁹

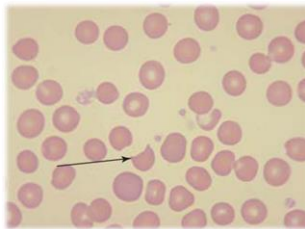
Observado nas seguintes situações: Anemia por déficit de ferro, hepatopatia, hemoglobinopatias e pós-esplenectomia ⁶



Adaptado de Tinggaard, 2011

Esquizócito: Fragmentos de eritrócitos com forma e tamanho variável, menores que os eritrócitos normais ³³

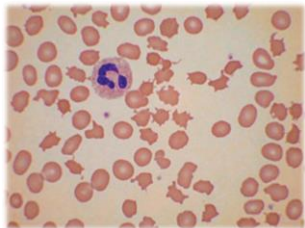
Observado nas seguintes situações: Anemia hemolítica microangiopática, queimaduras extensas (juntamente com microsferócitos) ⁹



Adaptado de Turgeon, 2018

Queratócito: eritrócito parcialmente deformado, com um ou dois pares de espículas; denominado como “*bite cell*”. Pode ser resultado da remoção dos corpos de Heinz ou danos mecânicos ⁶

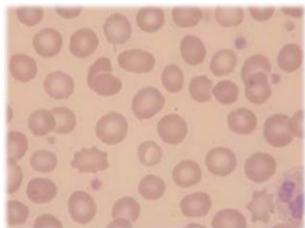
Observado nas seguintes situações: Anemia hemolítica microangiopática, CIVD e lesão oxidativa ⁶



Adaptado de Bain, 2015

Acantócito: eritrócito pequeno, denso, com poucas espículas de formas variadas e distribuídas de forma irregular ⁹

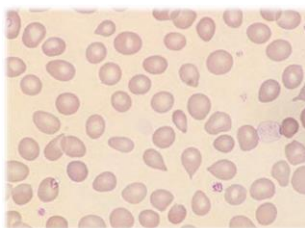
Observado nas seguintes situações: Hepatopatia grave e abetalipoproteinemia hereditária ⁹



Adaptado de Turgeon, 2018

Equinócito: eritrócito com numerosas espículas curtas e distribuídas de forma regular ⁹

Observado nas seguintes situações: Deficiência piruvato cinase e urémia ⁹



Adaptado de Bain, 2015

Dacriócito: eritrócito com uma extensão pontiaguda única; célula em forma de lágrima ⁹

Observado nas seguintes situações: Mielofibrose primária, talassémia e anemia megaloblástica ⁹

Figura 6 - Alterações na forma do eritrócito. Esfregaço de sangue periférico, descrição e causas associadas.

Cor

Em condições normais, os eritrócitos apresentam uma coloração mais carregada na periferia com a parte central descorada, sendo denominados de normocrômicos. A visualização de eritrócitos hipocrômicos (Figura 7), em que o centro descorado ocupa mais de um terço do diâmetro da célula, é característica de uma formação inadequada de hemoglobina e está clinicamente associada à anemia por déficit de ferro ⁸. Em oposição, o termo hiperocrômico é um equívoco, uma vez que perante aumentos da produção de hemoglobina o volume da célula tende a aumentar e não a ficar mais escuro ³⁶. Sendo apenas duas as situações em que se verifica uma maior intensidade da cor, nos esferócitos e em células contraídas irregularmente ⁶. Uma alteração na cor também pode estar relacionada com a presença de formas imaturas, denominada de policromasia (Figura 8). Nesta situação, verifica-se a presença de células anucleadas maiores com uma coloração azulada em todo o citoplasma, conferida pela existência de RNA residual. Um aumento nestas células está associado a um aumento da atividade da medula óssea ⁸.

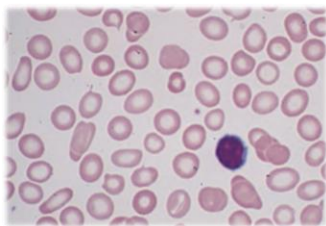


Figura 7 - Hipocromia
(Adaptado de Longo, 2012).

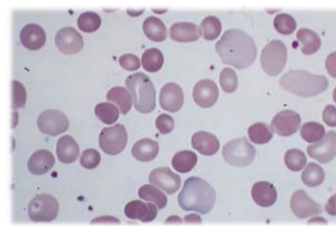
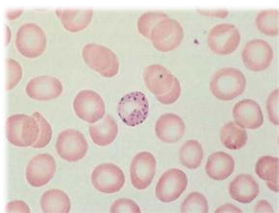


Figura 8 - Policromasia.
Presença de células grandes ligeiramente azuladas (Adaptado de Longo, 2012).

Inclusões eritrocitárias

No esfregaço de sangue periférico podem ser observados vários tipos de inclusões eritrocitárias, algumas das quais evidenciadas na Figura 9. A maioria destas inclusões são visíveis na coloração de May-Grünwald e Giemsa; contudo, para a visualização dos corpos de Heinz é necessário recorrer a uma coloração supravital, com azul de metileno novo, por exemplo ⁸.

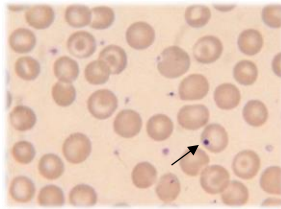


Adaptado de Turgeon, 2018.

Ponteados Basófilos: Numerosos grânulos azul/violeta escuro, finos ou grossos, dispersos pelo citoplasma.

Composição: RNA precipitado

Observado nas seguintes situações: Distúrbios na hematopoiese (síntese anormal do heme), envenenamento por chumbo e anemias severas

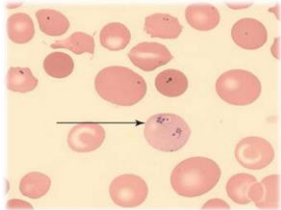


Adaptado de Bain, 2015.

Corpos Howell-Jolly: Grânulo redondo, denso, azul/violeta escuro; normalmente, um por célula.

Composição: DNA remanescente

Observado nas seguintes situações: Hiposplenismo, pós-esplenectomia, anemia hemolítica e anemia megaloblástica

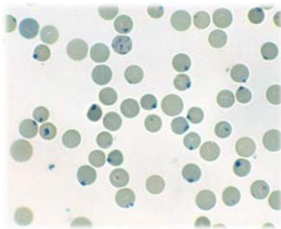


Adaptado de Turgeon, 2018.

Corpos Pappenheimer/ siderócito: Aglomerados azuis irregulares de pequenos grânulos; poucos por célula e, geralmente, na periferia

Composição: Ferro

Observado nas seguintes situações: Anemia sideroblástica, pós-esplenectomia e anemia hemolítica.



Adaptado de Tinggaard, 2011.

Corpos de Heinz: Grânulo azul/violeta escuro ligado à membrana interna do eritrócito

Composição: Hemoglobina desnaturada

Observado nas seguintes situações: Deficiência glucose-6-fosfato desidrogenase, hemoglobina instável e fármacos/químicos oxidantes.

Figura 9 - Inclusões eritrocitárias. Esfregaço de sangue periférico, descrição e causas associadas.

Alterações na distribuição

A formação de *rouleaux* (Figura 10) e a aglutinação (Figura 11) são duas alterações na distribuição dos eritrócitos passíveis de serem avaliadas no esfregaço de sangue periférico. O fenômeno de *rouleaux*, em que os eritrócitos estão dispostos em pilha, está associado a um aumento das proteínas plasmáticas, sendo as causas mais comuns a gravidez, processos inflamatórios e mieloma múltiplo. Além disto, uma demora na realização do esfregaço também provoca um aumento artificial de *rouleaux* ⁶. É de notar que na parte espessa do esfregaço de sangue periférico é natural ocorrer este fenômeno, sem associação patológica. Por outro lado, a aglutinação, que se apresenta como um aglomerado de eritrócitos, resulta da presença de anticorpos que reagem contra os antígenos do glóbulo vermelho, nomeadamente hemaglutininas a frio ⁸.

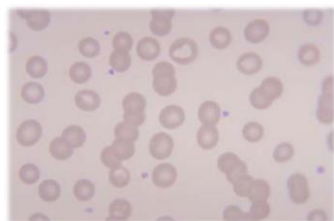


Figura 10 - Formação de *rouleaux* (Adaptado de Turgeon, 2018).

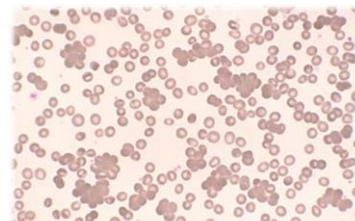


Figura 11 - Aglutinação dos eritrócitos (Adaptado de Bain, 2015).

8.2.3.2 Avaliação da série branca

No sangue periférico, os leucócitos são caracterizados como polimorfonucleares ou mononucleares. Os polimorfonucleares englobam os granulócitos, que incluem os neutrófilos, eosinófilos e basófilos, os quais apresentam núcleos lobulados, com formas variadas, e grânulos citoplasmáticos com diferentes características de coloração, consoante a classe ⁶. Os corantes ácidos, como a eosina, coram as proteínas básicas, conferindo uma coloração alaranjada (eosinófilo), enquanto que os corantes básicos, como o azul de metileno, coram as proteínas ácidas, conferindo uma coloração violeta escuro (basófilo). As granulações neutrófilas apresentam uma coloração rosa, devido a reagirem com ambos os corantes. As células mononucleares, monócitos e linfócitos, possuem núcleos não segmentados, com uma forma redonda, oval ou dobrada ⁹. Na Figura 12 estão evidenciadas as cinco populações de leucócitos, cuja descrição se encontra de seguida.

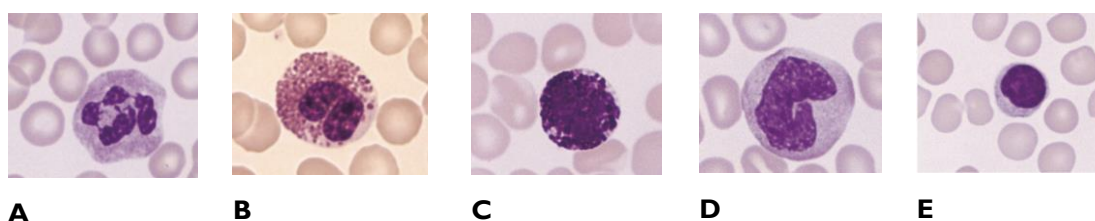


Figura 12 - Leucócitos. A. neutrófilo **B.** eosinófilo **C.** basófilo **D.** monócito **E.** linfócito (Adaptado de Hoffbrand e Moss, 2013).

Neutrófilos

Os neutrófilos são parte integrante do sistema imunológico inato e têm como principal função a fagocitose e destruição dos microrganismos e de material estranho ao organismo, representando a defesa primária a uma infeção bacteriana ⁹. Estas células apresentam uma forma arredondada, com 10 a 14 μm de diâmetro, um núcleo lobulado constituído por dois a cinco lóbulos interligados por filamentos de cromatina ³⁶ e um citoplasma, normalmente, com grânulos finos com uma coloração rosa, dispersos uniformemente ⁹. No sangue periférico, para além dos neutrófilos segmentados podem surgir neutrófilos em banda (Figura 13A), que são células imaturas com um núcleo em “forma de U”. Um aumento destas células é designado de desvio à esquerda e ocorre como resposta à infeção, de forma fisiológica no decorrer da gravidez ou em qualquer outra situação onde haja estimulação da medula óssea ⁶.

A identificação de determinadas anormalidades morfológicas nos neutrófilos pode apresentar um importante significado clínico no diagnóstico, sendo apresentado na Figura 13 as mais comumente observadas. De seguida, segue-se uma enumeração dessas anormalidades e a

correlação com a aplicação clínica: (B) neutrófilos com um núcleo hipersegmentado são característicos da anemia megaloblástica; (C) a vacuolização do citoplasma e a presença de granulações tóxicas, que são grânulos maiores e mais corados que o normal, são sugestivas de sépsis bacteriana; (D) a presença de corpos de Döhle, pequenas inclusões citoplasmáticas azuis frequentemente na periferia, estão associadas a infecção, queimaduras ou outros estados inflamatórios ⁶.

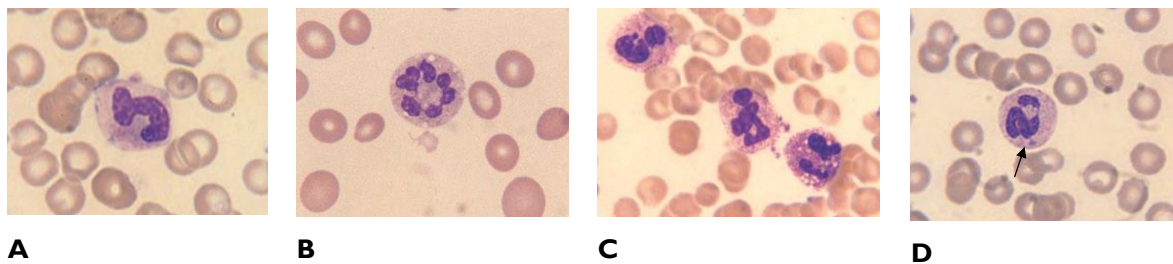


Figura 13 - Neutrófilos anormais. **A.** Neutrófilo em banda **B.** núcleo hipersegmentado **C.** vacuolização e granulações tóxicas **D.** corpo de Döhle (Adaptado de Bain, 2015).

Eosinófilos

Os eosinófilos possuem diversas funções, com um papel principal nas respostas alérgicas, respostas antiparasitárias e na remoção de fibrina formada durante a inflamação ³². Estas células são ligeiramente maiores que os neutrófilos, com 12 a 17 μm de diâmetro. O núcleo é, geralmente, bilobado e o citoplasma apresenta grandes grânulos esféricos eosinófilos (alaranjados). Após desgranulação, é possível a visualização do citoplasma azul-claro, geralmente obscurecido pelos grânulos ⁶.

Basófilos

Os basófilos são os leucócitos menos numerosos na corrente sanguínea. Apresentam um tamanho similar aos neutrófilos, com 10 a 14 μm de diâmetro ⁶, um núcleo denso e compacto e um citoplasma com grânulos grandes violeta/azul escuro, que normalmente obscurecem o núcleo ³³.

Linfócitos

Os linfócitos presentes na corrente sanguínea apresentam diversas formas e tamanhos. Contudo, a maioria é caracterizada por possuir um formato arredondado pequeno, com 10 a 12 μm de diâmetro, um núcleo redondo com cromatina condensada e um citoplasma azul-claro, o qual pode conter um número reduzido de grânulos azurofílicos. Em determinadas situações, nomeadamente na mononucleose infecciosa, são observados linfócitos atípicos

(Figura 14). Estas células apresentam alterações morfológicas pouco específicas, das quais se destacam um aumento do tamanho da célula, imaturidade do núcleo, evidência de um nucléolo, núcleo lobulado ou com contorno irregular, citoplasma basofílico, vacuolização, grânulos citoplasmáticos e um formato irregular.

Deve-se notar que, em latentes e crianças, os linfócitos tendem a ser maiores e com um maior pleomorfismo, sendo uma característica importante a ter em conta aquando da observação do ESP ⁶.

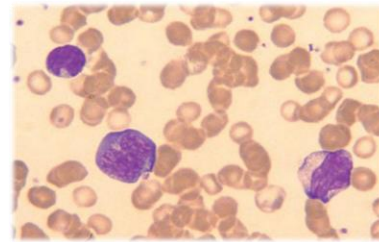


Figura 14 - Esfregaço de sangue periférico de uma infeção por citomegalovírus evidenciando linfócitos atípicos (Adaptado de Bain, 2015).

Monócitos

Os monócitos são os maiores leucócitos no sangue periférico, com um diâmetro de 15 a 18 μm , um núcleo grande e irregular com cromatina fina e menos compacta e um citoplasma azul acinzentado com finos grânulos azurofílicos. Por vezes, é complicado a distinção de monócitos com determinados linfócitos atípicos ³³.

8.2.3.3 Avaliação da série plaquetar

As plaquetas são células pequenas (diâmetro de 1 a 3 μm), sem núcleo, com uma forma irregular e com finos grânulos no citoplasma. A avaliação da série plaquetar deve abordar o número, o tamanho e as características morfológicas das plaquetas, bem como a presença de fenómenos passíveis de causar pseudotrombocitopenia, evidenciados na Figura 15 ³³.

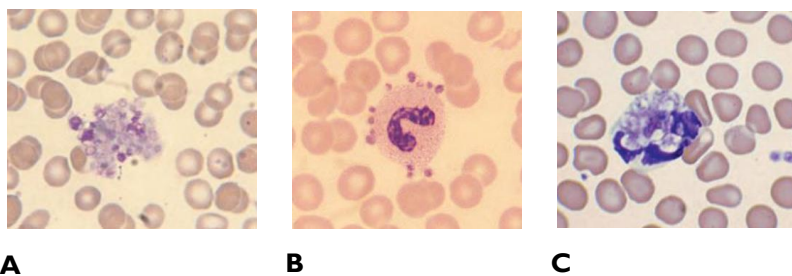


Figura 15 - Causas de pseudotrombocitopenias. **A.** Agregados plaquetares **B.** Satelitismo plaquetário **C.** fagocitose das plaquetas (Adaptado de Bain, 2015).

8.2.4 Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) tem como fundamento a avaliação da distância percorrida pelos eritrócitos numa coluna vertical (sob influência da gravidade) no período de 1 hora, a qual é expressa em mm/h. Este parâmetro é solicitado essencialmente para detetar e monitorizar processos inflamatórios, como artrite inflamatória e processos infecciosos ⁹.

Em situações normais, os eritrócitos tendem a repelir-se devido à carga negativa da superfície da célula. Todavia, aquando de aumentos de proteínas plasmáticas carregadas positivamente (nomeadamente, o fibrinogénio), essa repulsão tende a ser neutralizada e desenvolve-se o fenómeno de *rouleaux* com um aumento na velocidade de deposição dos eritrócitos. Contudo, um aumento da VS não é uma consequência exclusiva do aumento das proteínas de fase aguda, podendo ocorrer devido a outras situações como anemia, mieloma múltiplo e situações fisiológicas, como a gravidez e idade avançada, o que lhe confere uma baixa especificidade ⁹. Posto isto, de modo a aumentar a fiabilidade do resultado, é recomendada a determinação em paralelo da proteína C reativa ³³.

8.2.5 Hemostase

A hemostase é um conjunto de eventos que ocorre após a lesão vascular, envolvendo a interação entre a parede vascular, as plaquetas, os fatores de coagulação, os inibidores da coagulação e o sistema fibrinolítico. O sistema hemostático é extremamente controlado, de modo a manter um equilíbrio entre mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes. Uma alteração nesse equilíbrio pode dar origem a eventos hemorrágicos ou trombóticos ³².

A resposta hemostática divide-se em hemóstase primária, secundária e fibrinólise. A hemóstase primária refere-se à ação dos vasos sanguíneos e das plaquetas, enquanto a hemóstase secundária é um processo dependente de proteínas que circulam inativas no plasma, designadas de fatores de coagulação, as quais ao serem ativadas desencadeiam a cascata da coagulação (Figura 16). Todo este processo é bastante complexo e envolve várias reações, algumas das quais dependentes de Ca^{2+} e de determinadas moléculas (como os fosfolípidos), culminando na formação de um coágulo de fibrina. Por fim, ocorre a dissolução do coágulo pela ação da plasmina, que provoca a hidrólise da fibrina, num processo denominado de fibrinólise. Anormalidades na função hemostática podem dever-se a doenças vasculares, trombocitopenia, alteração da função plaquetar ou defeitos na coagulação do sangue.

Nesta secção são abordados os testes de screening da coagulação, bem como outros testes que auxiliam no diagnóstico destas anormalidades, nomeadamente o doseamento dos D-Dímeros e testes complementares para a determinação da atividade de fatores deficitários ou identificação e quantificação de inibidores. No final, é feita uma breve referência à monitorização da terapêutica com anticoagulantes (8.2.5.4).

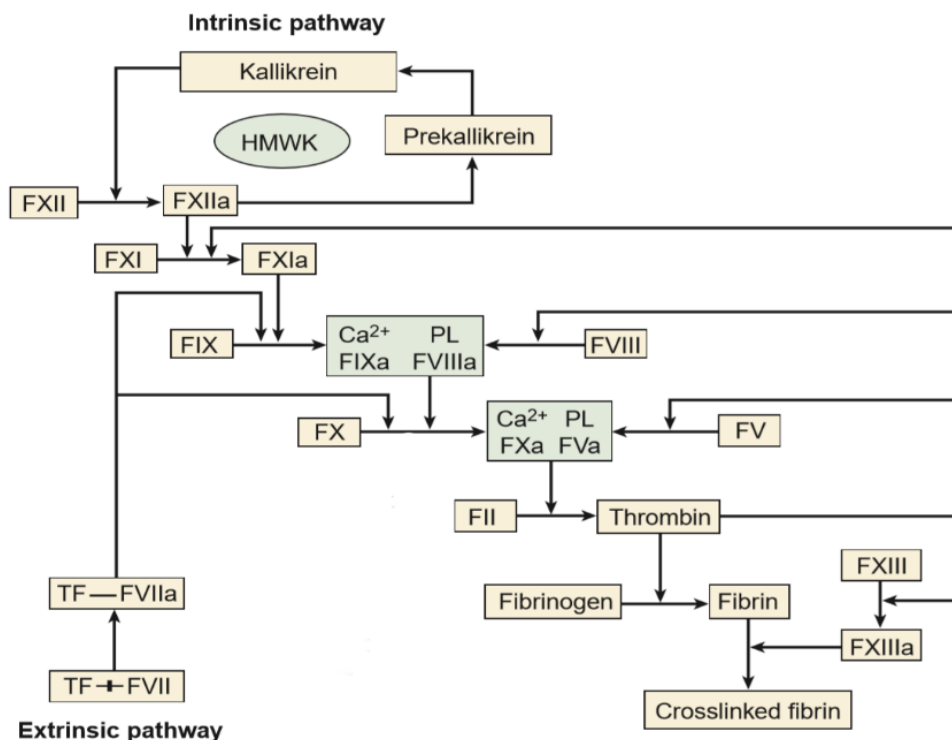


Figura 16 - Representação esquemática da cascata da coagulação (adaptado de Bain et al., 2011). HMWK, quininogênio de alto peso molecular; PL, Fosfolípidos; TF, Fator Tecidual.

8.2.5.1 Testes de Screening da Coagulação

Os testes de *screening* da coagulação permitem a avaliação da via extrínseca e intrínseca da coagulação, bem como a conversão do fibrinogênio em fibrina. Normalmente, são solicitados para investigação de pacientes com hemorragias agudas, suspeita de tendência hemorrágica, como indicador de risco hemorrágico antes de um procedimento invasivo ou para a monitorização da terapêutica. O padrão de anormalidades obtido nestas provas sugere de forma clara o próximo conjunto de determinações que deve ser efetuado, como será discutido posteriormente. Estes testes englobam o Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT), Tempo de Trombina (TT) e o Fibrinogênio (FIB). É importante perceber que este conjunto de determinações avalia apenas uma parte do mecanismo hemostático, portanto a ausência de anormalidades nestas provas não deve descartar a hipótese da presença de determinada desordem hemostática³³. Como em qualquer outra situação, os resultados laboratoriais devem ser interpretados em conjunto com a história clínica do paciente, a fim de chegar ao diagnóstico final.

Tempo de Protrombina

O Tempo de Protrombina (TP) determina o tempo de coagulação do plasma citratado, na presença de uma concentração ótima de tromboplastina tecidular (incorpora o fator tecidular, fosfolípidos e cálcio ionizado). Este teste é realizado, essencialmente, para a avaliação da via extrínseca (fator VII), mas também permite explorar a via comum (fator II, V, X e fibrinogénio). Além desta avaliação, é também utilizado para a monitorização da terapêutica com anticoagulantes orais, sendo o mais comumente utilizado a varfarina.

No contexto da monitorização da terapêutica anticoagulante oral, os resultados não devem ser expressos sob a forma de tempo de formação de coágulo em segundos. Pois, as tromboplastinas utilizadas pelos laboratórios apresentam uma elevada variabilidade, o que provoca uma inconsistência nos resultados do TP, sendo necessário uma normalização deste resultado. Posto isto, e com o objetivo de padronizar os resultados obtidos, o TP é, normalmente, reportado por meio da Razão Internacional Normalizada (INR). Esta é obtida através da razão entre o TP do doente e o TP do controlo, elevado ao índice de sensibilidade internacional (ISI), o qual é indicado pelo fornecedor do reagente. Assim, permite aos doentes a realização do controlo da terapêutica em laboratórios diferentes ^{9,32}.

As situações mais comuns em que se observa um prolongamento do TP são a administração de anticoagulantes orais antagonistas da vitamina K, patologia hepática, hipovitaminose K e coagulação intravascular disseminada (CIVD) ³³.

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

O APTT mede o tempo de coagulação do plasma na presença de uma quantidade ótima de fosfolípidos, íões cálcio (fornecidos pelo cloreto de cálcio) e um ativador de contato carregado negativamente (na ausência de fator tecidular). No Serviço de Patologia Clínica, o reagente utilizado possui na sua constituição partículas de sílica, de modo a simular a superfície de contato. Desta forma, avalia a eficácia da via intrínseca (fatores XII, XI, IX, VIII) e comum. Para além disto, é igualmente utilizado na monitorização da terapêutica com heparina e na pesquisa do anticorpo lúpico.

Este parâmetro encontra-se prolongado em situações de deficiência ou inibição de um ou mais fatores da via intrínseca e/ou comum, nomeadamente na Hemofilia A (défice do fator VIII), hemofilia B (défice fator IX), doença de von Willebrand (défice da proteína transportadora do fator VIII), presença de anticorpo lúpico e contaminação com heparina. No caso de hipovitaminose K pode encontrar-se igualmente alongado; contudo, não é tão sensível como o TP, uma vez que o primeiro fator dependente da vitamina K a ser afetado é o fator VII ⁸.

Tempo de Trombina

O tempo de trombina (TT) avalia o tempo de coagulação após a adição de trombina ao plasma, a qual catalisa a conversão do fibrinogênio em fibrina. Este parâmetro pode surgir aumentado em situações de hipofibrinogêmia (<100 mg/dL)⁸, disfibrinogêmia e presença de um inibidor da trombina, nomeadamente a heparina, cuja presença induz um prolongamento acentuado. Nestas situações, é posteriormente determinado o tempo de reptilase, para confirmar ou descartar a presença deste anticoagulante^{9;33}.

Fibrinogênio

O Fibrinogênio é uma glicoproteína sintetizada no fígado, que circula livremente no plasma, sendo convertido em fibrina, numa reação catalisada pela trombina. Este parâmetro é quantificado pelo método de Clauss, onde é adicionado um excesso de trombina ao plasma diluído. Assim, o tempo de coagulação não depende da concentração de trombina e, uma vez diluído, a interferência por parte de possíveis inibidores é menor³³.

Em situações de infecção ou inflamação, ocorre uma maior produção do fibrinogênio, uma vez que se trata de uma proteína positiva de fase aguda. Em contrapartida, uma diminuição na concentração do fibrinogênio pode ser observada em situações de doença hepática muito avançada e CIVD. Nestas situações, verifica-se um alongamento do TP, APTT e TT, uma vez que o tempo de formação do coágulo é inversamente proporcional à concentração de fibrinogênio^{9;11}.

8.2.5.2 Teste de Fibrinólise

D-Dímeros

A determinação dos D-Dímeros, apesar de não integrar os testes de *screening* da coagulação, é efetuada na rotina deste serviço.

Os D-Dímeros resultam da degradação da fibrina, cuja presença indica a ocorrência de fibrinólise e, conseqüentemente, a formação de coágulo²⁶. A sua determinação possui uma importância relevante na suspeita de trombose venosa profunda e de embolismo pulmonar, apresentando um valor, essencialmente, preditivo negativo⁸.

8.2.5.3 Testes Complementares

A deteção de anormalidades nos testes de *screening* da coagulação (Tabela 10), descritos anteriormente, direciona o diagnóstico para a presença de possíveis condições e determina o procedimento adicional apropriado. É de salientar que esta abordagem é efetuada de uma

forma genérica, com base na informação clínica do doente o procedimento analítico pode prosseguir de forma distinta.

Nas situações em que se verifica um prolongamento no APTT ou TP implica a realização de testes de mistura, para compreender se se trata de um défice de fatores ou da presença de um inibidor, sendo com base nestes testes que prossegue o procedimento analítico, como será discutido posteriormente. No caso de se observar um prolongamento do TP, APTT e TT é efetuado imediatamente o teste de reptilase, para confirmar ou descartar a presença de heparina ³³.

Para além dos testes aludidos nesta secção, é de salientar a importância das determinações bioquímicas da função hepática no diagnóstico de determinados distúrbios hemostáticos, nomeadamente em situações de défice de múltiplos fatores ³³.

Tabela 10 - Interpretação de anormalidades nos testes de screening da coagulação (Adaptado de Bain et al., 2011).

PT	APTT	TT	FIB	Condições possíveis
↑	N	N	N	Défice fator VII Terapêutica anticoagulante oral precoce
N	↑	N	N	Défice fator VIII, IX, XI, XII ou fator de contato Anticorpo Lúpico
↑	↑	N	N	Défice do fator II, V ou X Anticoagulantes orais Défice combinado dos fatores V e VIII Défice de múltiplos fatores (e.g. falha hepática) Hipovitaminose K
↑	↑	↑	N/↓	Hipo- ou disfibrinogenémia Heparina Doença hepática CIVD

↑, aumentado; ↓, diminuído; N, normal; PT, Tempo de Protrombina; APTT, Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada; TT, Tempo de Trombina; FIB, Fibrinogénio; LA, Anticorpo Lúpico; CIVD, Coagulação Intravascular Disseminada

Testes de Mistura

A presença de um prolongamento inexplicável no APTT ou no TP pode ser sugestivo de um défice de fatores ou da presença de inibidores, sendo a distinção efetuada com recurso aos testes de mistura. Estes testes consistem em misturar o plasma do doente com um plasma normal, numa proporção 1:1 e, em seguida, medir o TP e/ou APTT. Se ocorrer uma correção do tempo de coagulação indica um défice de fator ou a existência de um inibidor tardio (nomeadamente, anticorpos contra o fator VIII), para proceder à diferenciação é efetuada uma

incubação durante 2 horas a 37 °C³³. Após esta incubação, a ausência de correção do tempo de coagulação é sugestiva da presença de um inibidor, que pode ser específico de fatores ou inespecífico, como é o caso do LA. Na Tabela II está apresentada a interpretação dos resultados deste teste com base nas alterações no APTT, sendo através desta que segue o procedimento analítico.

Numa situação de déficit de fatores, é determinada a atividade do fator deficitário. Para este fim, é adicionado um plasma deficiente nesse fator ao plasma diluído do doente e determinado o APTT ou o TP, no caso de ser o fator VII. O plasma empobrecido no fator apresenta um tempo de coagulação prolongado e o efeito corretivo observado é proporcional à atividade do fator presente no plasma do doente. O resultado é expresso em percentagem de atividade⁹. Para além do déficit de fatores, um prolongamento no tempo de coagulação, nomeadamente no APTT, pode ser provocado pela presença de inibidores específicos de fatores, inespecíficos ou pela presença de heparina³³. De seguida, abordar-se-á o procedimento analítico para a pesquisa do LA, que é um inibidor inespecífico, e o tempo de reptilase, cuja determinação é efetuada na suspeita de contaminação por heparina.

Tabela II - Interpretação da pesquisa de inibidores através do APTT (Adaptado de Bain et al., 2011).

Conteúdo	Tempo de Coagulação		
Plasma Normal	N	N	N
Plasma do Doente	↑	↑	↑
Mistura plasma do doente:normal (50:50); sem incubação	N	↑	N
Mistura plasma do doente:normal (50:50); incubação 2h	N	↑	↑
Interpretação	Deficiência em fatores	Inibidor de ação imediata	Inibidor tardio

↑, aumentado; N, normal

Pesquisa do Anticorpo Lúpico

O anticorpo lúpico (LA) pertence ao grupo dos anticorpos anti-fosfolípidos dirigidos contra fosfolípidos de carga negativa ou complexos entre fosfolípidos e proteínas. A presença deste anticorpo está associada a trombozes e abortos recorrentes e é caracterizada por um prolongamento nos tempos de coagulação dependentes de fosfolípidos, nomeadamente o APTT, *sílica clot time* (SCT) e o Teste de Veneno de Víbora de Russell Diluído (dRVVT).

A pesquisa do LA é efetuada em situações de aumentos inexplicáveis do APTT, através de testes de coagulação dependentes de fosfolípidos (PL). No Serviço de Patologia Clínica, são realizados dois testes, baseados em princípios diferentes, o dRVVT e o SCT, que possuem como ativadores do processo de coagulação o veneno de víbora e a sílica, respetivamente. Para estes dois ensaios são efetuados um teste *screening*, com uma baixa concentração de PL, e um teste confirmatório com uma elevada concentração de PL (neutraliza o LA), sendo o rácio entre ambos que dita a positividade ou negatividade do LA. A amostra é considerada LA positiva quando o rácio *screening*/confirmatório é superior a 1,2, fruto da correção do tempo de coagulação na presença de um excesso de fosfolípidos. Um resultado positivo é conclusivo, independentemente do teste, sendo que o SCT só é efetuado quando o dRVVT se apresenta negativo ^{9;37;38}.

Tempo de Reptilase

A reptilase é uma enzima isolada do veneno da serpente *Bothrops atrox*, que mimetiza a atividade da trombina (cliva o fibrinopéptido A). Contrariamente à trombina, esta não é inibida pela heparina. Portanto, um TT alongado com um tempo de reptilase normalizado é indicativo da presença de heparina. Nas restantes situações em que se verifica um aumento do TT, os tempos de coagulação permanecem alongados ^{9;33}. A determinação deste teste só se justifica após a confirmação de um prolongamento do APTT e TT.

8.2.5.4 Monitorização da Terapêutica com Anticoagulantes

Os anticoagulantes são muito utilizados como terapêutica do tromboembolismo venoso. A nível laboratorial, surge de forma rotineira pedidos para a determinação da heparina e varfarina, assim como dos novos anticoagulantes, que não serão abordados neste relatório.

O mecanismo de ação da heparina passa por estimular a atividade da antitrombina (a qual irá inativar a trombina e os fatores IXa, Xa e XIa) e diminuir a funcionalidade das plaquetas, sendo administrada por via intravenosa ou subcutânea. A heparina de baixa massa molecular (LMWH) é administrada apenas por via subcutânea e a sua função anticoagulante baseia-se sobretudo na capacidade em inibir o fator Xa. Em comparação à heparina não fracionada, a LMWH apresenta um tempo de semivida mais longo e uma redução dos efeitos colaterais, nomeadamente ao nível do risco de hemorragia. O controlo laboratorial da heparina é efetuado através do APTT e do ensaio cromogénico anti-Xa, que permite a deteção de baixos níveis terapêuticos de LMWH, que não provocam qualquer alteração do APTT ^{33;32}.

A varfarina é um anticoagulante oral antagonista da vitamina K, o que irá provocar uma diminuição dos fatores de coagulação dependentes desta vitamina (Protrombina, VII, IX e X).

Destes fatores, destaca-se o fator VII, que apresenta uma redução rápida e significativa logo após a administração de varfarina, provocando um alongamento do TP. O controlo dos níveis deste anticoagulante é efetuado através do TP, com recurso ao INR ³².

8.3 Microbiologia

A área da microbiologia desempenha um papel fundamental no diagnóstico e controlo de doenças infecciosas ³⁹, na qual é analisada uma ampla variedade de produtos biológicos, nomeadamente urina, sangue, fezes, exsudados vaginais, amostras do trato respiratório, aspirado de ferida, pus de abscesso, biópsias, líquido peritoneal, sinovial, pleural, LCR e outros produtos, como pontas de cateter ou próteses. A breve descrição do procedimento analítico que se segue é focada nas atividades desenvolvidas no subsetor de bacteriologia e é abordada de uma forma generalizada.

Nesta área, o procedimento analítico é efetuado de modo a recuperar os microrganismos presentes na amostra. Para este fim, procede-se à inoculação da amostra nos meios mais adequados para posterior incubação. Após a incubação, procede-se à observação das culturas, para analisar o possível crescimento microbiano (nos meios sólidos por crescimento de colónias e nos meios líquidos por aparecimento de turvação). Na presença de turvação, são efetuadas repicagens para meios sólidos, com vista à obtenção de colónias.

A presença de uma colónia pode ser indicativa de contaminação, microbiota ou infeção. Portanto, no momento de observação das colónias é importante ter espírito crítico e saber o que valorizar. Nesta fase, é efetuada a avaliação da morfologia das colónias, a qual permite uma identificação presuntiva dos microrganismos presentes ³⁹.

De modo a prosseguir com a análise, é imprescindível a obtenção de colónias isoladas. Uma vez isolada, é efetuada a identificação final por espetrometria de massa, na qual o espetro resultante (representativo da composição proteica do microrganismo) é comparado com uma base de dados de referência. Desta comparação resulta a identificação do microrganismo associada a um nível de confiança, dado pela precisão da correspondência entre os espetros. No Serviço de Patologia Clínica, a técnica utilizada é a MALDI-TOF, uma técnica inovadora, rápida e precisa para a identificação de isolados de bactérias e fungos, permitindo assim uma redução no tempo de hospitalização do doente e, conseqüentemente, dos custos inerentes ⁴⁰. Posteriormente, é efetuado o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA), cuja execução é crítica para o estabelecimento da terapêutica. Na maioria dos casos é efetuado no VITEK 2, o qual fornece o valor da concentração mínima inibitória (CMI) e o resultado na forma de suscetível ou resistente.

8.4 Imunologia

A imunidade refere-se à capacidade que o ser humano tem em resistir aos organismos e toxinas que tendem a causar danos nos tecidos e órgãos, a qual pode ser caracterizada como imunidade inata ou adquirida¹⁴.

Neste setor, é realizado um conjunto de determinações que possibilitam o diagnóstico e monitorização de doenças associadas ao sistema imunitário. Estas determinações, cujos equipamentos e metodologias já foram anteriormente apresentados (ver 5.4.5), baseiam-se sobretudo na especificidade da ligação antígeno-anticorpo, sendo a deteção e quantificação do imunocomplexo efetuada por nefelometria e turbidimetria.

A realização destes imunoensaios permite a quantificação de diversas proteínas, nomeadamente a albumina, imunoglobulinas, β -2-microglobulina, fator reumatóide, ceruloplasmina e proteínas do complemento. Para além disto, é também efetuado o estudo das proteínas séricas e urinárias através do perfil eletroforético, imunofixação em gel de agarose e a pesquisa da IgE específica e total, por um imunoensaio fluoroenzimático, para o estudo das alergias.

O subsetor da autoimunidade dedica-se à pesquisa de autoanticorpos no soro, apresentando uma elevada utilidade no diagnóstico de doenças autoimunes. Esta pesquisa é efetuada através dos métodos de imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), quimioluminescência, imunoblotting e radioimunoensaio (RIA). Como *screening* na pesquisa da maioria dos autoanticorpos recorre-se à IFI, onde são avaliados os níveis de fluorescência e as características dos diferentes constituintes celulares, visando a identificação de padrões de fluorescência característicos. O procedimento prossegue consoante o que se observa na IFI, com recurso aos métodos referidos anteriormente, de modo a confirmar ou a identificar o tipo de anticorpo.

9. Fase pós analítica

Na fase pós analítica é realizada a validação biopatológica dos resultados, onde se procede à interpretação dos mesmos, de modo a avaliar a concordância com a informação clínica e o histórico do doente.

Nesta fase, é igualmente importante ter em consideração as características da amostra, já avaliadas na fase pré-analítica, nomeadamente a presença de bilirrubina, hemólise e lipémia, cujos níveis são fornecidos pelo equipamento. Nas diferentes áreas muitas das metodologias de quantificação utilizadas baseiam-se em métodos fotométricos, cuja presença de substâncias

que absorvam na gama de comprimentos de onda utilizada pode levar a uma deturpação dos resultados, como é o caso da bilirrubina aos 460 nm e da hemoglobina aos 417 e 575 nm. Além da interferência espectral, a hemólise provoca uma alteração dos parâmetros que se encontram em maior concentração no eritrócito que no plasma, como a lactato desidrogenase (LDH), o potássio e o fósforo. A lipémia severa também tem interferência, uma vez que a turvação que confere à amostra provoca a dispersão da luz¹. Posto isto, na presença de alguma destas situações é fundamental uma análise mais cuidada dos resultados, para avaliar uma possível interferência por parte destas substâncias.

No momento da validação dos resultados não devem ser reportados valores que sejam inferiores ou superiores ao limite de quantificação do equipamento. O intervalo entre esses valores corresponde à faixa de medição, na qual são cumpridas as especificações de desempenho do método¹. Portanto, valores externos a este intervalo devem ser apresentados como inferiores ou superiores aos limites impostos.

Após a validação dos resultados pelo médico ou técnico superior de saúde, estes tornam-se disponíveis para o clínico.

10. Conclusão

A mudança do paradigma, de estudante para estagiária, permitiu-me a assimilação e sedimentação de conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado, bem como a aquisição de competências na prática laboratorial. A oportunidade de estagiar num laboratório com a dimensão do Serviço de Patologia Clínica dos CHUC foi benéfica do ponto de vista da diversidade de amostras e situações clínicas que surgiram diariamente. Além disto, o elevado fluxo de amostras impulsionou o desenvolvimento das minhas capacidades de organização e responsabilidade.

Em contrapartida, o elevado grau de automatização e a sobrecarga de trabalho da equipa técnica não me permitiu, em muitos casos, o acompanhamento de todo o processo analítico. Contudo, é este o futuro das análises clínicas, sendo igualmente importante entender como funciona esta crescente automatização e o impacto que tem nesta área, o qual me foi transmitido ao longo deste estágio.

Em suma, sinto que este estágio foi sem dúvida uma mais valia na minha formação profissional, bem como pessoal. Além disto, fez-me estar ciente do importante papel dos profissionais de saúde e da importância da colaboração entre as várias classes profissionais. Pois, todos exercem funções fundamentais em diferentes fases do processo analítico, tendo sempre como objetivo comum o bem-estar do doente. Neste contexto, o fornecimento de resultados fidedignos é crucial, visto que são valores de apoio a um diagnóstico clínico e, em alguns casos, ao estabelecimento de uma terapêutica e não apenas números.

11. Bibliografia

1. Burtis, C., Bruns, D., 2015. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 7. ed. USA, Saunders Elsevier. ISBN 9781455741656.
2. Wang, C., Wu, J., Zong, C., Xu, J., Ju, H., 2012. Chemiluminescent Immunoassay and its Applications. Chinese Journal of Analytical Chemistry. 40, 3-10.
3. Sharma, P., Das, R., 2016. Cation-exchange high-performance liquid chromatography for variant hemoglobins and HbF/A2: What must hematopathologists know about methodology?. World Journal of Methodology. 6, 20-24.
4. Lenters-Westra, E., Schindhelm, R.K., Bilo, H. J., Slingerland, R.J., 2013. Haemoglobin A1c: Historical overview and current concepts. Diabetes Research and Clinical Practice. 99, 75-84.
5. Palmieri, R., Falbo, R., Cappellini, F., Soldi, C., Limonta, G., Brambilla, P., 2018. The development of autoverification rules applied to urinalysis performed on the AutionMAX-SediMAX platform. Clinica Chimica Acta. 485, 275-281.
6. Bain, B.J., 2015. Blood Cells: A Practical Guide. 5. ed. New Jersey, Wiley Blackwell. ISBN 9781118817339.
7. Kim, H., Hur, M., Choi, S.G., Oh, K.M., Moon, H.W., Yun, Y.M., 2015. Comparison of white blood cell counts by WNR, WDF, and WPC channels in Sysmex XN hematology analyzer. International Journal of Laboratory Hematology. 37, 869-875.
8. Turgeon, M.L., 2018. Clinical Hematology Theory & Procedures. 6. ed. Philadelphia, Wolters Kluwer. ISBN 9781496332288.
9. Keohane, E.M., Smith, L.J., Walenga, J.M., 2016. Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications. 5. ed. USA, Elsevier Saunders. ISBN 9780323239066.
10. Cha, C.H., Park, C.J., Cha, Y.J., Kim, H.K., Kim, D.H., Honghoon, Bae, J.H., Jung, J.S., Jang, S., Chi, H.S., Lee, D.S., Cho, H.I., 2009. Erythrocyte sedimentation rate measurements by test 1 better reflect inflammation than do those by the westergren method in patients with malignancy, autoimmune disease, or infection. American Journal of Clinical Pathology. 131, 189-194.
11. Williamson, M. A., Snyder, L. M., 2011. Wallach's Interpretation of Diagnostic Tests. 9. ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 9781605476674.

12. Marshall, W.J., Lapsley, M., Day, A.D., Ayling, R.M., 2014. *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. 3.ed. London, Churchill Livingstone. ISBN 9780702054785.
13. Longo, D.L., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Jameson, J.L., Loscalzo, J., 2011. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18. ed. New York, McGraw-Hill. ISBN 9780071748896.
14. Hall, J.E., 2011. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 12. ed. Philadelphia, Saunders. ISBN 9781416045748.
15. Limdi, J.K., Hyde, G.M., 2003. Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Medical Journal*. 79, 307-312.
16. Martin, P., Friedman, L.S., 2017. Assessment of liver function and diagnostic studies. In: *Handbook of Liver Disease*. 4. ed. USA, Elsevier. pp. 1-17.
17. Seeley, R.R., Stephens, T.D., Tate, P., 2008. *Anatomia & Fisiologia*. 8. ed. Loures, Lusociência. ISBN 9789728930622.
18. Gatta, A., Verardo, A., Bolognesi, M., 2012. Hypoalbuminemia. *Internal and Emergency Medicine*. 7, 193-199.
19. Busher, J.T., 1990. Serum Albumin and Globulin. In Walker, H.K., Hall, W.D., Hurst, J.W. (Eds.), *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3.ed. Boston, Butterworths, pp 497-499.
20. Silva, D., Pais de Lacerda, A., 2012. High-sensitivity C-reactive protein as a biomarker of risk in coronary artery disease. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 31, 733–745.
21. Sproston, N.R., Ashworth, J.J., 2018. Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Frontiers in Immunology*. 9, 754.
22. Dasgupta, A., Wahed, A., Dasgupta, A., Wahed, A., 2014. Cardiac Markers. In: *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*. 1. ed. USA, Elsevier, pp. 127-144.
23. Vasile, VC, Jaffe, A.S., 2018. High-sensitivity cardiac troponin in the evaluation of possible AMI. *Journal of the American College of Cardiology*.
24. Garg, P., Morris, P., Fazlanie, A.L., Vijayan, S., Dancso, B., Dastidar, A.G., Plein, S., Mueller, C., Haaf, P., 2017. Cardiac biomarkers of acute coronary syndrome: from history to high-sensitivity cardiac troponin. *Internal and Emergency Medicine*. 12, 147-155.

25. Weiner, I.D., Mitch, W.E., Sands, J.F., 2015. Urea and Ammonia Metabolism and the Control of Renal Nitrogen Excretion. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 10, 1444-1458.
26. Caquet, R., 2004 - *Análises Clínicas - Guia Prático de Medicina*. 1. ed. Lisboa, Climepsi. ISBN: 9789727960248.
27. Giordano, C., Karasik, O., King-Morris, K., Asmar, A., 2015. Uric Acid as a Marker of Kidney Disease: Review of the Current Literature. *Disease Markers*.
28. Lorenz, J.M., 2010. Physiology and Pathophysiology of Body Water and Electrolytes. In: *Clinical Chemistry*. 5. ed. USA, Elsevier, pp. 527-549.
29. Norma da Direcção-Geral de Saúde, Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus, N° 002/2011, 14/01/2011.
30. Nathan, D.M., Turgeon H., Regan S., 2007. Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. *Diabetologia*. 50, 2239–2244.
31. Lum, G., 2008. Clinical Utility of Magnesium Measurement. *Laboratory Medicine*. 35, 106-111.
32. Hoffbrand, A.V., Moss, P.A., 2013. *Fundamentos em Hematologia*. 6. ed. Porto Alegre, Artmed. ISBN 9788565852296.
33. Bain, B., Bates, I., Laffan, M., Lewis, S., 2011. *Dacie and Lewis Practical Hematology*. 11. ed. USA, Elsevier. ISBN 9780702034084.
34. Schomoeller, D., Picarelli, M.M., Paz Munhoz, T., Poli de Figueiredo, C.E., Staub, H.L., 2017. Mean Platelet Volume and Immature Platelet Fraction in Autoimmune Disorders. *Frontiers in Medicine*.
35. Rozenberg, G., 2011. *Microscopic Haematology. A Practical Guide for the Laboratory*. 3. ed. London, Churchill Livingstone. ISBN 9780729540728.
36. Longo, D.L., 2012. Atlas of Hematology and Analysis of Peripheral Blood Smears. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. New Work, McGraw-Hill, pp. 1-12.
37. Goodwin, A., 2015. Silica Clot Time (SCT) Assay and Discontinuation of Platelet Neutralization Procedure. *Pathology & Laboratory Medicine*.
38. Flieder, T., Weiser, M., Eller, Th, Dittrich, M., Bargen, K.,V., Alban, S., Kuhn, J., Knabbe, C.

Birschamann, I., 2018. Interference of DOACs in different DRVVT assays for diagnosis of lupus anticoagulants. *Thrombosis Research*. 165, 101-106.

39. Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A., 2015. *Medical Microbiology*. USA, Elsevier. ISBN 9780323299565.

40. Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., Viridi, J.S., 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*. 6, 1-16.

12. Anexos

SYXMEX XN

Anexo 1 - Canais do Sysmex XN e respectivas funcionalidades.

Canal RBC/PLT	Impedância por focagem hidrodinâmica. As plaquetas são medidas entre 2 a 30 fL e os eritrócitos entre 25 a 250 fL. Possui um discriminador fixo a 12 fL, de modo a quantificar as plaquetas gigantes.
Canal WDF	Contagem total de leucócitos e contagem diferencial, após a lise dos eritrócitos. No diagrama de dispersão, as células são diferenciadas de acordo com a sua complexidade celular e intensidade de fluorescência.
Canal RET	Os reticulócitos emitem um sinal de fluorescência maior que os eritrócitos (que não possuem RNA); contudo, significativamente inferior aos leucócitos, o que permite a diferenciação das células. O nível de fluorescência dá indicação da maturação dos reticulócitos, os quais podem ser classificados como de baixa, média ou elevada fluorescência. Os de alta e média fluorescência constituem a fração de reticulócitos imaturos (IRF), que permitem uma avaliação da produção de reticulócitos.
Canal PLT-F	Determinação das plaquetas por fluorescência. Teste <i>reflex</i> de contagens não fiáveis de plaquetas, nomeadamente em trombocitopenias significativas e anormalidades no histograma das plaquetas. É utilizado um fluorocromo específico para as plaquetas, a oxalina, que se liga ao retículo endoplasmático rugoso e à mitocôndria. Neste canal, é também efetuada a deteção de plaquetas imaturas (maior fluorescência).
Canal WNR	Ocorre a lise dos eritrócitos e dos eritroblastos e a sensibilização da membrana dos leucócitos. O uso de um pH baixo estabiliza os basófilos e reduz o tamanho das restantes células. Combinando a informação da fluorescência com o tamanho celular obtém-se um diagrama de dispersão, que permite a diferenciação entre eritroblastos, basófilos e os restantes leucócitos. A quantificação dos eritroblastos é efetuada de forma automática em todos os hemogramas, no caso de serem detetados é realizada uma correção na contagem de leucócitos.
Canal WPC	Teste <i>reflex</i> para avisos sugestivos de blastos e linfócitos anormais pelo canal WDF.
RET: Reticulócitos; PLT: plaquetas; WDF: <i>White cell differential channel</i> ; WNR: <i>White cell nucleated channel</i> ; WPC: <i>White progenitor cell</i>	

Anexo 2 - Parâmetros e respetivos métodos de determinação do Sysmex XN (Adaptado de Keohane, Smith e Walenga, 2016).

Parâmetro	Método
WBC, CBC, DIFF, RET, NRBC	Citometria de fluxo com fluorescência
RBC	Impedância eletrónica
Hb	Hb-Lauril sulfato de sódio (555 nm)
HCT	Deteção da altura do pulso elétrico na contagem dos eritrócitos
VCM	$(HCT/RBC) \times 10$
HCM	$(HGB/RBC) \times 10$
CHCM	$(HGB/HCT) \times 100$
PLT	Impedância; citometria de fluxo com fluorescência; deteção ótica
RDW	RDW-SD (fL) ou RDW-CV (%)
CBC, contagem de eritrócitos; CHCM, concentração da hemoglobina corpuscular média; CV, coeficiente de variação; DIFF, fórmula leucocitária; Hb, hemoglobina; HCM, hemoglobina corpuscular média; HCT, hematócrito; NRBC, eritroblastos; PLT, plaquetas; ; RBC, eritrócitos; RDW, distribuição do tamanho dos eritrócitos; RET, reticulócitos; SD, desvio padrão; VCM, volume corpuscular médio; WBC, contagem dos leucócitos	

Anexo 3 - Boletim de análises clínicas referente ao caso clínico decorrente de um erro pré-analítico.

A. Resultados da primeira colheita efetuada em tubo com EDTA **B.** Resultados da segunda colheita efetuada em tubo para obtenção de soro.

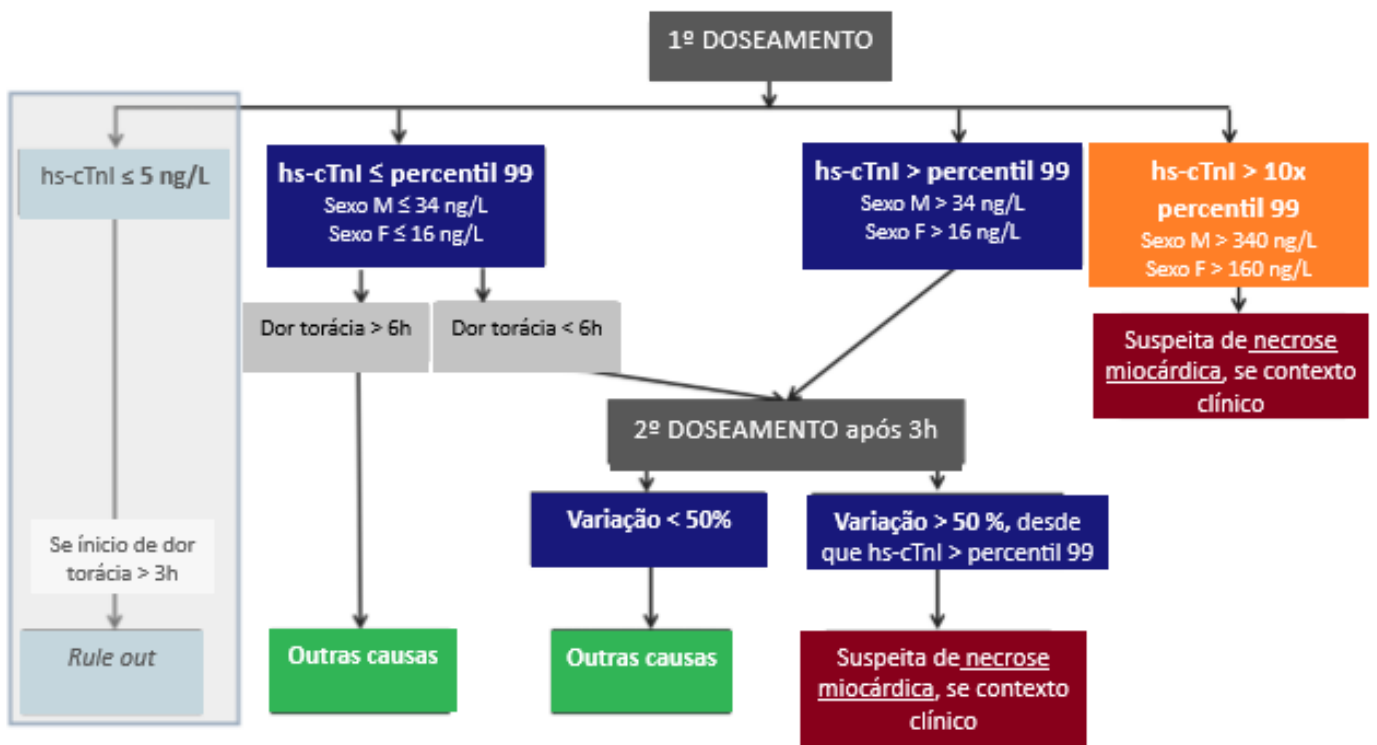
	Resultados / Unidades		Valores Referência	Resultados Anteriores		
				28-09-2015	27-09-2015	05-10-2015
Lab. Urgência						
Azoto Ureico	21	mg/dL	7,94-20,9	46	57	69
	3,5	mmol/L	1,3-3,5			
Creatinina	1,46	mg/dL	0,55 - 1,02	2,21	2,61	2,37
	121,33	µmol/L	48,62-90,17			
(método: IDMS)						
Sódio	153	mmol/L	136-146	153	150	139
Potássio	>10,0	mmol/L	3,5-5,1	3,3	4,6	4,9
Cloro	124	mmol/L	101-109	116	107	102
Glicose	211	mg/dL	60-109	114	404	80
	11,8	mmol/L	3,3-6,0			
Calcio	3,7	mg/dL	8,8-10,6	8,4	8,7	9,5
	1,1	mmol/L	2,2-2,6			
Calcio corrigido (albumina)	4,3			9,3		
Osmolalidade	261	mOsm/Kg	260-302	316	331	297
Proteínas Totais	5,0	g/dL	6,6-8,3	5,4		
	49,9	g/L	66,0-83,0			
Albumina	2,5	g/dL	3,5-5,2	2,9		
	25,1	g/L	35,0-52,0			
L.D.H.	218	U/L	125 - 220	202	327	
AST (GOT)	18	U/L	<31	21	26	
ALT (GPT)	9	U/L	<34	13	17	
Fosfatase Alcalina	38	U/L	40-150	43	60	
G.G.T.	5	U/L	<38	6	11	
Bilirubina Total	0,3	mg/dL	0,3-1,2	0,5	0,6	
	11,8	µmol/L	5,1-20,5			
C.K.	5	U/L	<145	55	70	
Proteína C Reactiva - Ultra Sensível	< 0,02	mg/dL	0 - 0,5	< 0,02	< 0,02	< 0,02

A

Azoto Ureico	21	mg/dL	
	3,5	mmol/L	
Creatinina	1,34	mg/dL	
	118,46	µmol/L	
(método: IDMS)			
Sódio	151	mmol/L	
Potássio	4,9	mmol/L	
Cloro	116	mmol/L	
Glicose	87	mg/dL	
	4,8	mmol/L	
Calcio	7,8	mg/dL	
	1,9	mmol/L	
Calcio corrigido (albumina)	8,9		
Osmolalidade	302	mOsm/Kg	
Proteínas Totais	4,9	g/dL	
	49,0	g/L	
Albumina	2,6	g/dL	
	26,0	g/L	
L.D.H.	220	U/L	
AST (GOT)	17	U/L	
ALT (GPT)	9	U/L	
Fosfatase Alcalina	51	U/L	
G.G.T.	5	U/L	
Bilirubina Total	0,3	mg/dL	
	5,1	µmol/L	
C.K.	20	U/L	
Proteína C Reactiva - Ultra Sensível	< 0,02	mg/dL	

B

Anexo 4 - Algoritmo da Troponina de Alta Sensibilidade (hs-cTnI) implementado no CHUC



Notas para correta utilização do algoritmo:

- Utilizar em contexto clínico de suspeita de síndrome coronário agudo
- Apenas aplicar após ECG inicial tiver excluído supra desnivelamento do segmento ST
- Adaptação às unidades da atual Troponina em ng/L, enquanto o ensaio anterior era apresentado em ng/mL

Anexo 5 - Valores de referência do Hemograma.

Parâmetro	Valores de Referência¹
RBC	H: 4,5 - 5,5 ×10 ⁶ /μL M: 3,8 - 4,8 ×10 ⁶ /μL
Hb	H: 13,0 - 17,5 g/dL M: 12,0 - 16,0 g/dL
HTC	H: 40,0 - 50,0 % M: 36,0 - 46,0 %
VCM	80,0 - 100,0 fL
HCM	27,0 - 32,0 pg
CHCM	32,0 - 35,0 g/dL
RDW	11,6 - 14,0 fL
Reticulócitos	0,5 - 2,0 %
WBC	4,0 - 10,0 ×10 ³ /μL
Neutrófilos	2,0 - 7,0 ×10 ³ /μL
Linfócitos	1,0 - 3,0 ×10 ³ /μL
Monócitos	0,2 - 1,0 ×10 ³ /μL
Eosinófilos	0,02 - 0,5 ×10 ³ /μL
Basófilos	0,02 - 0,1 ×10 ³ /μL
PLT	160 - 370 ×10 ³ /μL
VPM	8,17 - 9,65 fL
PCT	0,167 - 0,293 %
PDW	14,7 - 17,4 fL
IPF	1 - 7,3 %

¹ Valores de referência para adultos (>18 anos), fornecidos pelo CHUC