



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Joana Rita de Palhares Falcão Carvalho

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**  
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas  
orientado pelo Doutor Mário João Roque e apresentado à Faculdade de  
Farmácia da Universidade de Coimbra**

Setembro de 2020



**Joana Rita de Palhares Falcão Carvalho**

**Relatório de Estágio**  
**Mestrado em Análises Clínicas**

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

Setembro 2020



UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, tenho de agradecer ao Dr. Mário João Roque por me ter dado a possibilidade de estagiar no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, por toda sabedoria transmitida e pelo auxílio e disponibilidade prestados no decorrer do estágio e na elaboração deste relatório.

A toda a equipa técnica do Laboratório pela forma como fui recebida e integrada nesta instituição, pela transmissão de conhecimentos e pelo apoio incondicional demonstrado durante o estágio.

Agradeço, acima de tudo, à minha família, especialmente à minha mãe e ao meu irmão, pelo contributo na minha formação académica, por me terem sempre acompanhado e por me incentivarem a dar o melhor de mim no Mestrado de Análises Clínicas.

Ao meu namorado, Benjamin Varandas, por toda a paciência, carinho e apoio incondicional demonstrados nesta etapa da minha vida.

Por fim, agradeço aos meus amigos, por todos os momentos passados juntos, pelo companheirismo e compreensão durante este percurso académico.

## ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO.....	2
2.1.	RECURSOS HUMANOS .....	2
2.2.	ESPAÇO FÍSICO .....	2
2.3.	FLUXO DA AMOSTRAS.....	2
2.4.	SISTEMA INFORMÁTICO .....	2
3.	CONTROLO DE QUALIDADE .....	2
4.	FASE PRÉ-ANALÍTICA .....	3
5.	FASE ANALÍTICA .....	5
6.	HEMATOLOGIA.....	7
6.1.	EQUIPAMENTOS E METODOLOGIA .....	7
6.1.1.	CELL-DYN Ruby® .....	7
6.1.2.	BD Vacutainer® Sedi-15TM .....	8
6.1.3.	Yumizen® g400 .....	8
6.2.	HEMATOPOIESE .....	8
6.3.	HEMOGRAMA.....	10
6.3.1.	Eritrograma.....	10
6.3.2.	Leucograma .....	16
6.3.3.	Plaquetograma.....	16
6.4.	ESTUDO MORFOLÓGICO .....	18
6.4.1.	Avaliação Morfológica da Série Eritrocitária.....	19
6.4.2.	Avaliação da Série Leucocitária.....	25
6.4.3.	Avaliação da Série Plaquetar .....	28
6.5.	VELOCIDADE DE SEDIMENTAÇÃO.....	28
6.6.	HEMOSTASE .....	29
6.6.1.	Tempo de Protrombina.....	30
6.6.2.	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado.....	31
6.6.3.	Fibrinogénio .....	31
7.	IMUNOLOGIA / ENDOCRINOLOGIA .....	34
7.1.	SISTEMA IMUNITÁRIO .....	34

7.2.	EQUIPAMENTOS E METODOLOGIA.....	36
7.2.1.	Architect® ci 8200.....	36
7.3.	MARCADORES VÍRICOS.....	37
7.3.1.	Hepatites Virais.....	38
7.3.2.	HIV.....	45
7.4.	MARCADORES BACTERIANOS.....	47
7.4.1.	Sífilis.....	47
7.5.	MARCADORES TUMORAIS.....	48
7.5.1.	PSA.....	49
7.6.	MARCADORES DE AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO TIROIDEIA.....	49
7.6.1.	TSH.....	49
7.6.2.	Hormonas tiroideias.....	50
8.	BIOQUÍMICA.....	52
9.	MICROBIOLOGIA.....	53
10.	FASE PÓS-ANALÍTICA.....	54
11.	CONCLUSÃO.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Representação dos diferentes ângulos usados para a contagem diferencial de leucócitos. ....	8
Figura 2- Esquema representativo da hematopoiese.....	9
Figura 3- Classificação das anemias de acordo com o índice eritrocitário VCM. ....	14
Figura 4- Esfregaço sanguíneo de um indivíduo saudável, os eritrócitos apresentam um tamanho e coloração normais. ....	19
Figura 5- Esquema representativo da cascata de coagulação. ....	30
Figura 6- Histograma representando os dois picos eritrocitários. ....	32
Figura 7- Esfregaço sanguíneo do doente, após a transfusão sanguínea. ....	33
Figura 8- Representação da resposta imune primária e secundária.....	35
Figura 9- Imunoensaio de Quimioluminescência com Micropartículas.....	37
Figura 10- Perfil serológico da hepatite A.....	39
Figura 11- Perfil serológico da hepatite B aguda. ....	42
Figura 12- Perfil serológico da hepatite B crónica. ....	43
Figura 13-Perfil serológico da hepatite C.....	44
Figura 14- Perfil serológico do HIV.....	46

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Características dos tubos de colheita usados no laboratório.....	4
Tabela 2- Equipamentos existentes no laboratório, respetivas técnicas e testes realizados.....	5
Tabela 3- Critérios para elaboração de um esfregaço sanguíneo adotado no LACCSMC.....	18
Tabela 4- Alterações no tamanho dos eritrócitos.....	20
Tabela 5- Alterações na cor dos eritrócitos.....	21
Tabela 6- Alterações na forma dos eritrócitos.....	21
Tabela 7- Diferentes tipos de inclusões eritrocitárias.....	24
Tabela 8- Alterações na distribuição dos eritrócitos.....	25
Tabela 9- Diferentes tipos de granulócitos normalmente presentes na circulação sanguínea. .....	26
Tabela 10- Diferentes tipos de células mononucleares normalmente presentes na circulação sanguínea.....	27
Tabela 11- Representação das plaquetas normalmente encontradas na circulação sanguínea. .....	28
Tabela 12- Boletim analítico do doente após a realização de uma transfusão sanguínea.....	32
Tabela 13- Interpretação dos marcadores serológicos do vírus da hepatite B.....	43
Tabela 14- Boletim analítico do doente.....	51

## ABREVIATURAS

- AgHBc- Antígeno da cápside do vírus da hepatite B
- AgHBe- Antígeno solúvel do vírus da hepatite B
- AgHBs- Antígeno estrutural do core do vírus da hepatite B
- ALT- Alanina aminotransferase
- Anti-HBc- Anticorpo dirigido contra o AgHBc
- Anti-HBe- Anticorpo dirigido contra o AgHBe
- Anti-HBs- Anticorpo dirigido contra o AgHBs
- AST- Aspartato aminotransferase
- CDC- *Centers of Disease Control and Prevention*
- CHCM- Concentração de Hemoglobina Corpuscular média
- CMIA- *Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay*
- DNA- *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)
- DST- Doença Sexualmente Transmissível
- EDTA- Ácido Etilenodiaminotetra-acético
- HAV- *Hepatitis A Virus* (Vírus da Hepatite A)
- Hb- Hemoglobina
- HbA1c- Hemoglobina glicada
- HBV- *Hepatitis B Virus* (Vírus da Hepatite B)
- HCM- Hemoglobina Corpuscular Média
- HCT- Hematócrito
- HCV- *Hepatitis C Virus* (Vírus da Hepatite C)
- HIV- *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)
- Ig- Imunoglobulina
- INR- *International Normalized Ratio* (Razão Internacional Normalizada)
- ISI- *International Sensitivity Index* (Índice Sensibilidade Internacional)
- LACCSMC- Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra
- MAPPS- *Multi-Angle Polarized Scatter Separation*
- PLT- Plaquetas
- TP- Tempo de Protrombina
- PSA- *Prostate specific antigen* (Antígeno Específico da Próstata)
- RDW- *Red Cell Distribution Width*
- RIQAS- *Randox International Quality Assessment* (Distribuição do Tamanho dos eritrócitos)
- RLU's- *Relative Light Units* (Unidades Relativas de Luz)

RNA- *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

TF- *Tissue Factor* (Fator Tecidual)

TRH- *Thyrotropin Releasing Hormone* (Hormona libertadora da tireotropina)

TSH- *Thyroid Stimulating Hormone* (Hormona estimuladora da tiróide)

TTPa- Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

VCM- Volume Corpuscular Médio

VDRL- *Venereal Disease Research Laboratory*

VS- Velocidade de Sedimentação



## **RESUMO**

O presente relatório de estágio descreve o trabalho realizado ao longo de 6 meses no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

O principal objetivo do relatório prende-se com a descrição das atividades desenvolvidas nos diferentes setores do laboratório: Hematologia, Imunologia, Bioquímica e Microbiologia. Para além disso, é também descrita toda a dinâmica e processo laboratorial, desde a fase pré-analítica, até à fase pós-analítica.

No presente relatório, destacam-se as áreas da Hematologia e da Imunologia, abordada também no ponto de vista da Endocrinologia, as quais se encontram descritas de uma forma mais detalhada e aprofundada. Os setores da Microbiologia e da Bioquímica são também abordados, embora de uma forma mais superficial e genérica.

## **ABSTRACT**

The present report describes the work carried out over 6 months at the Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, in the ambit of the Master Degree of Clinical Analysis in Faculty of Pharmacy in the University of Coimbra.

The main objective of this report is to describe the activities developed in the different sectors of the laboratory: Hematology, Immunology, Biochemistry and Microbiology. In addition, it is also described the entire laboratory dynamics and process, from the pre-analytical phase to the post-analytical phase.

In this report, the areas of Hematology and Immunology (also addressed from the point of view of Endocrinology) are highlighted, being described in a more detailed and depth way. The Microbiology and Biochemistry sectors are described, however in a more superficial and generic way.



## **I. INTRODUÇÃO**

No âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, realiza-se um estágio com uma duração de 6 meses. O estágio permite a consolidação de conhecimentos teóricos e práticos laboratoriais adquiridos no decorrer do mestrado, mas também a aquisição de novos conhecimentos relativamente ao funcionamento de um laboratório de análises clínicas. O presente relatório de estágio tem como objetivo descrever o trabalho realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, sob orientação do Dr. Mário João Roque, durante um período compreendido entre Dezembro de 2019 e Julho de 2020, com uma interrupção entre os meses de Março e Maio.

O estágio revela-se extremamente importante, uma vez que permite um primeiro contacto com a rotina laboratorial, para além de se demonstrar fundamental na aquisição de autonomia para a realização do trabalho diário no laboratório. Permite, também, uma aprendizagem no que diz respeito ao manuseamento dos equipamentos e à sua manutenção, mas também a todo o processo de calibração, controlo de qualidade (tanto interno como externo) e à validação de resultados e interpretação dos mesmos, o que fomenta o espírito crítico no decorrer estágio.

O relatório descreve as atividades executadas no decorrer do estágio, de uma forma clara e pormenorizada. É descrito todo o processo, desde a fase pré-analítica até à validação biopatológica dos resultados (fase pós-analítica), passando pelo controlo de qualidade (interno e externo), funcionamento e metodologia dos equipamentos e pela fase analítica propriamente dita. Na fase analítica, inserem-se as quatro valências fundamentais num laboratório de análises clínicas: Bioquímica, Hematologia, Imunologia e Microbiologia. Contudo, o presente relatório apresenta maior ênfase nas áreas da Hematologia e da Imunologia, sendo a Microbiologia e Bioquímica abordadas de uma forma mais geral e sucinta.

## **2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO**

### **2.1. Recursos Humanos**

O Estágio foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, dirigido pelo Dr. Mário João Roque, Diretor Técnico e Farmacêutico especialista em Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos, contando ainda com 5 Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública e 2 Administrativas.

### **2.2. Espaço Físico**

O laboratório, localizado na Rua Vandelli, é composto por vários espaços funcionais: receção, sala de espera, sala de lavagens, área administrativa, gabinete destinado ao diretor técnico, sala de colheitas e os setores de Imunologia/Bioquímica, Hematologia e Microbiologia. Os Técnicos de Análises Clínicas trabalham com um sistema de rotatividade, alternando entre as diferentes valências, ao longo do tempo.

### **2.3. Fluxo da Amostras**

Diariamente, são processadas cerca de 20 a 30 amostras, exceto nos dias em que há Aprontamentos, Tropas Especiais e amostras vindas do exterior, em que o número de amostras aumenta significativamente, para cerca de 60 a 70.

### **2.4. Sistema Informático**

O programa informático utilizado para todo o processo analítico, desde a passagem dos dados do utente, registo das análises a realizar até à validação das mesmas, é o SISLAB/GLINTT.

## **3. CONTROLO DE QUALIDADE**

O controlo de qualidade é um processo que permite a monitorização da reprodutibilidade e da exatidão dos resultados obtidos, recorrendo a amostras de controlo. Os resultados obtidos apresentam um papel decisivo na segurança e saúde do doente, uma vez que influencia as decisões médicas (diagnóstico clínico, administração de uma terapêutica),

mas também na saúde pública. Um controlo de qualidade adequado é fundamental para o bom funcionamento do laboratório e para a obtenção de resultados fidedignos. <sup>1</sup>

Um controlo é uma amostra que apresenta uma composição semelhante ao sangue e que contém uma concentração conhecida do analito de interesse. Os controlos podem ser obtidos na forma líquida ou liofilizada. Dada a extrema importância dos controlos, o laboratório utiliza um controlo de qualidade interno e participa também em programas de qualidade externo. <sup>1,2</sup>

O controlo interno permite uma avaliação da precisão dos resultados. Laboratorialmente, existem três níveis de controlo (níveis patológicos baixo, normal e patológico alto), devendo ser usados pelo menos dois para cada um dos analitos. A frequência com que se usa os controlos internos depende de equipamento para equipamento, podendo ser diários ou semanais. Os resultados do controlo interno de qualidade são transpostos para o gráfico de Levey Jennings, permitindo uma representação gráfica de todos os valores do controlo para um dado parâmetro. A interpretação do gráfico é baseada nas regras de Westgard. Caso seja violada alguma das regras, o problema deve ser resolvido antes de se processar alguma amostra. <sup>2</sup>

Por outro lado, o controlo externo de qualidade permite a avaliação da exatidão dos resultados obtidos. O controlo externo usado no laboratório é o RIQAS (*Randox International Quality Assessment*), sendo realizado num intervalo de tempo estipulado pelo programa em questão. Os resultados são depois introduzidos no site indicado, permitindo uma comparação posterior dos resultados obtidos nos diferentes laboratórios.

#### **4. FASE PRÉ-ANALÍTICA**

A fase pré-analítica corresponde, habitualmente ao processo compreendido entre a chegada do doente ao laboratório até ao processamento da respetiva amostra. É a fase em que ocorrem mais erros laboratoriais, como erros na identificação do doente, má preparação do doente, escolha inapropriada do tubo, falha da inserção do pedido no sistema informático, armazenamento incorreto da amostra, entre muitos outros. <sup>2</sup>

Inicialmente, o utente dirige-se à receção com a prescrição médica das análises a serem realizadas. O pessoal administrativo é responsável pelo registo dos dados do utente e pela passagem das respetivas análises para o programa informático SISLAB. A cada utente é atribuído um número de identificação único que é impresso numa etiqueta contendo ainda um código de barras, o nome do utente e a data da colheita. O código de barras é depois lido por cada um dos equipamentos dos diferentes setores do laboratório. Posteriormente, na sala de

colheitas, os Técnicos de Análises Clínicas são os responsáveis pelas colheitas dos produtos biológicos adequados, mas também pela recepção de amostras que são colhidas pelo utente e provenientes do exterior. Os técnicos dispõem de uma folha de colheitas, garantindo que o sangue é colhido para o tubo adequado e de acordo com as análises pedidas pelo médico (Tabela I). Deve ser sempre tida em conta a ordem correta dos tubos a serem utilizados. Para uma identificação mais fácil, os tubos, apresentam tampas com cores diferentes de acordo com o anticoagulante nele presente, o que permite saber de imediato para qual das valências serão reencaminhados.

Tabela I- Características dos tubos de colheita usados no laboratório.

Cor da tampa	Anticoagulante	Amostra	Determinações
<b>Amarelo</b> 	Sem anticoagulante (possui um gel separador)	Soro	Bioquímica e Imunologia
<b>Azul</b> 	Citrato de sódio	Plasma	Provas de coagulação
<b>Roxo</b> 	EDTA tripotássico	Sangue total	Hemograma e Hemoglobina A <sub>1</sub> C
<b>Preto</b> 	Citrato de sódio	Sangue total	Velocidade de sedimentação

Os tubos e contentores são etiquetados com as etiquetas previamente impressas na receção e são enviados para a respetiva valência para serem processadas. Contudo, nem todas as análises são realizadas no laboratório, sendo as amostras colhidas e enviadas posteriormente para outro laboratório, seguindo as regras disponibilizadas pelo mesmo.

## 5. FASE ANALÍTICA

A fase analítica corresponde ao processamento da amostra, desde a sua chegada ao respectivo setor até à obtenção de um resultado. Nesta fase, a ocorrência de erros é bastante inferior, podendo dever-se sobretudo a resultados incorretos devido a interferentes ou erros causados pelo analisador. A maioria dos setores apresentam um elevado grau de automatização, o que reduz o volume de amostra necessário e a ocorrência de erros, aumenta a exatidão e a precisão e permite uma obtenção rápida dos resultados analíticos.<sup>1,2</sup>

Em cada um dos setores existem diferentes equipamentos e autoanalisadores para a realização das análises clínicas (Tabela 2).

Tabela 2- Equipamentos existentes no laboratório, respetivas técnicas e testes realizados.

<b>Setor da Microbiologia</b>		
<b>Equipamento</b>	<b>Técnica</b>	<b>Teste</b>
Uritest® 300	Espetofotometria	Urina tipo II
<b>Setor da Imunologia</b>		
<b>Equipamento</b>	<b>Técnica</b>	<b>Teste</b>
Architect®ci 8200	Quimioluminescência com micropartículas	<p><b>Marcadores virais</b></p> <p>Hepatite A (Ac anti-HAV IgM, Ac anti-HAV IgG)</p> <p>Hepatite B (Ac anti-HBc total, Ac anti-HBs, HBsAg)</p> <p>Hepatite C (Ac anti-HCV total)</p> <p>HIV (HIV Ag/Ac)</p> <p><b>Marcadores bacterianos</b></p> <p>Sífilis (Ac anti-Treponema pallidum)</p> <p><b>Marcadores tumorais</b></p> <p>Próstata (PSA total e PSA livre)</p> <p><b>Marcadores tiroideus</b></p> <p>TSH, T<sub>3</sub>livre, T<sub>3</sub>total, T<sub>4</sub>livre, T<sub>4</sub>total</p>

<b>Setor da Hematologia</b>		
<b>Equipamento</b>	<b>Técnica</b>	<b>Teste</b>
CELL-DYN Ruby®	MAPSS e impedância	Hemograma completo e contagem de reticulócitos
BD Vacutainer® Sedi 15™	Westergren modificado	Velocidade de sedimentação
Yumizen® g400	Turbidimetria	Provas de coagulação (PT, APTT, fibrinogénio)
<b>Setor da Bioquímica</b>		
<b>Equipamento</b>	<b>Técnica</b>	<b>Teste</b>
Architect®ci 8200	Quimiluminescência com micropartículas, Potenciometria, Turbidimetria, Espetofotometria	<p><b>Função renal</b> (ureia, creatinina, ácido úrico, microalbuminúria)</p> <p><b>Função hepática</b> (bilirrubina total, bilirrubina direta, albumina, AST, ALT, <math>\gamma</math>-GT, fosfatase alcalina)</p> <p><b>Função pancreática</b> (amílase, lípase)</p> <p><b>Avaliação muscular</b> (CK, LDH)</p> <p><b>Equilíbrio hidroeletrólítico</b> (sódio, potássio, cloreto)</p> <p><b>Metabolismo mineral</b> (cálcio, fosfato, magnésio)</p> <p><b>Metabolismo lipídico</b> (colesterol total, HDL, LDL)</p> <p><b>Metabolismo da glicose</b> (glicémia, prova da tolerância à glucose)</p> <p><b>Biomarcadores cardíacos</b> (CK-MB, troponina I)</p>
ADAMS A <sub>1</sub> C® HA-8160	Cromatografia de alta pressão (HPLC)	Hemoglobina glicada (HbA <sub>1</sub> C)

## **6. HEMATOLOGIA**

A hematologia é um ramo da medicina que se dedica ao estudo do sangue e dos seus elementos formadores, incluindo, eritrócitos, leucócitos, plaquetas. É também, responsável pelo estudo do desenvolvimento de doenças relacionadas com o sangue, assim como pelas suas possíveis causas, prognóstico, tratamento e prevenção. <sup>1,3</sup>

### **6.1. Equipamentos e Metodologia**

#### **6.1.1. CELL-DYN Ruby®**

O CELL-DYN Ruby® é um autoanalisador de hematologia destinado a laboratórios médios, com a capacidade de analisar aproximadamente 76 amostras por hora (sangue total com K<sub>3</sub>EDTA). <sup>4,5</sup>

Analisa 22 parâmetros diferentes, incluindo a contagem diferencial de 5 populações diferentes de leucócitos: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. O equipamento usa duas metodologias diferentes para a contagem dos elementos figurados do sangue: a impedância e a tecnologia MAPSS (*multiple-angle polarized scatter separation*). <sup>4,5</sup>

Os eritrócitos, leucócitos e plaquetas são contados pela técnica da impedância. As células sanguíneas são fracos condutores elétricos. Na impedância, as células passam através de uma abertura, que contém dois elétrodos: um interno e outro externo. Na ranhura, é aplicada e ocorre a passagem de corrente elétrica. O fluxo das células pela ranhura, tem a capacidade de causar alterações na resistência elétrica, que são medidas como pulsos de tensão. A passagem das células faz com que haja um aumento da impedância, sendo este aumento proporcional ao volume de material condutor deslocado, ao volume da célula sanguínea. Procede-se à contabilização dos pulsos para que se faça uma contagem e medição dos diferentes tipos de células. <sup>1,6</sup>

A contagem diferencial de leucócitos é feita com base na técnica MAPSS, recorrendo à combinação da medição 4 ângulos diferentes. Os diferentes ângulos são capazes de fornecer diferentes informações: 0°-3° representa o tamanho da célula; 10° representa a complexidade interna; 90° luz polarizada fornece informação sobre a lobularidade; 90° despolarizada usada para identificação dos eosinófilos (Figura 1). <sup>4,5</sup>

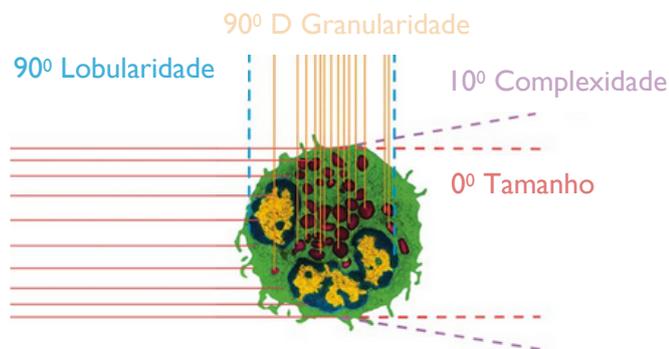


Figura 1- Representação dos diferentes ângulos usados para a contagem diferencial de leucócitos. (Adaptado de <https://www.corelaboratory.abbott/int/pt/offerings/brands/cell-dyn/cell-dyn-ruby>)

### 6.1.2. BD Vacutainer® Sedi-15™

O BD Vacutainer® Sedi-15™ é um equipamento automatizado para a determinação da velocidade de sedimentação, a qual é obtida pelo método de Westergren modificado, em 27 minutos. Procedese à colheita de sangue num tubo estreito e alongado contendo citrato de sódio, o qual é posteriormente colocado no equipamento para que ocorra a deposição dos eritrócitos no fundo do mesmo.

### 6.1.3. Yumizen® g400

O Yumizen g400 é um equipamento semiautomático de hemostase, faz a medição dos tempos de coagulação a uma temperatura estável, de aproximadamente 37°C. O funcionamento do equipamento tem como princípio de funcionamento a turbidimetria.

A turbidimetria é uma técnica analítica que mede a turbidez da amostra, isto é, faz a medição do decréscimo da intensidade da luz transmitida. É uma técnica usada para determinar a luz dispersa, neste caso em concreto, mede a dispersão da luz a um comprimento de onda 640nm, causada pela formação do coágulo. À medida que a coagulação se processa, a dispersão da luz ocorre gradualmente até que ocorre a coagulação completa, culminando na formação do coágulo. <sup>1</sup>

## 6.2. Hematopoiese

A hematopoiese é o processo contínuo de produção, diferenciação e maturação de células sanguíneas. Nas primeiras semanas de gestação do feto, a hematopoiese ocorre no saco vitelino. Contudo, verifica-se que a partir das 6 semanas de gestação do feto até aos 6 a 7 meses, a hematopoiese ocorre predominantemente no fígado, baço e placenta. No final da gestação e na infância, a medula óssea é o principal órgão hematopoético. Na fase adulta,

verifica-se que a hematopoiese ocorre no esqueleto central e nas extremidades do fêmur e do úmero. A medula óssea é um órgão linfóide primário e o maior órgão hematopoiético, responsável pela libertação das células sanguíneas para a circulação sanguínea.<sup>3,7,8</sup>

A hematopoiese tem início com uma célula estaminal pluripotente, a qual tem a capacidade de autorrenovação e é a responsável pela produção contínua e diária das células sanguíneas das diferentes linhagens celulares. As células estaminais pluripotentes dão origem a duas células progenitoras distintas: a célula progenitora da linha linfóide e a célula progenitora da linha mieloide. A célula progenitora da linha linfóide dá origem às células B e T, às células *natural killer* (NK) e às células dendríticas, por sua vez, a célula progenitora da linha mielóide dá origem a 4 linhagens celulares diferentes: granulocítica, monocítica, eritróide e megacariocítica (Figura 2). Na medula óssea verifica-se a existência de um microambiente único que favorece a formação das células sanguíneas, uma vez que permite a ancoragem das células estaminais hematopoiéticas, mas também dos fatores que controlam a sua proliferação e diferenciação e maturação, os fatores de crescimento hematopoiéticos e as citocinas.<sup>3,7,8</sup>

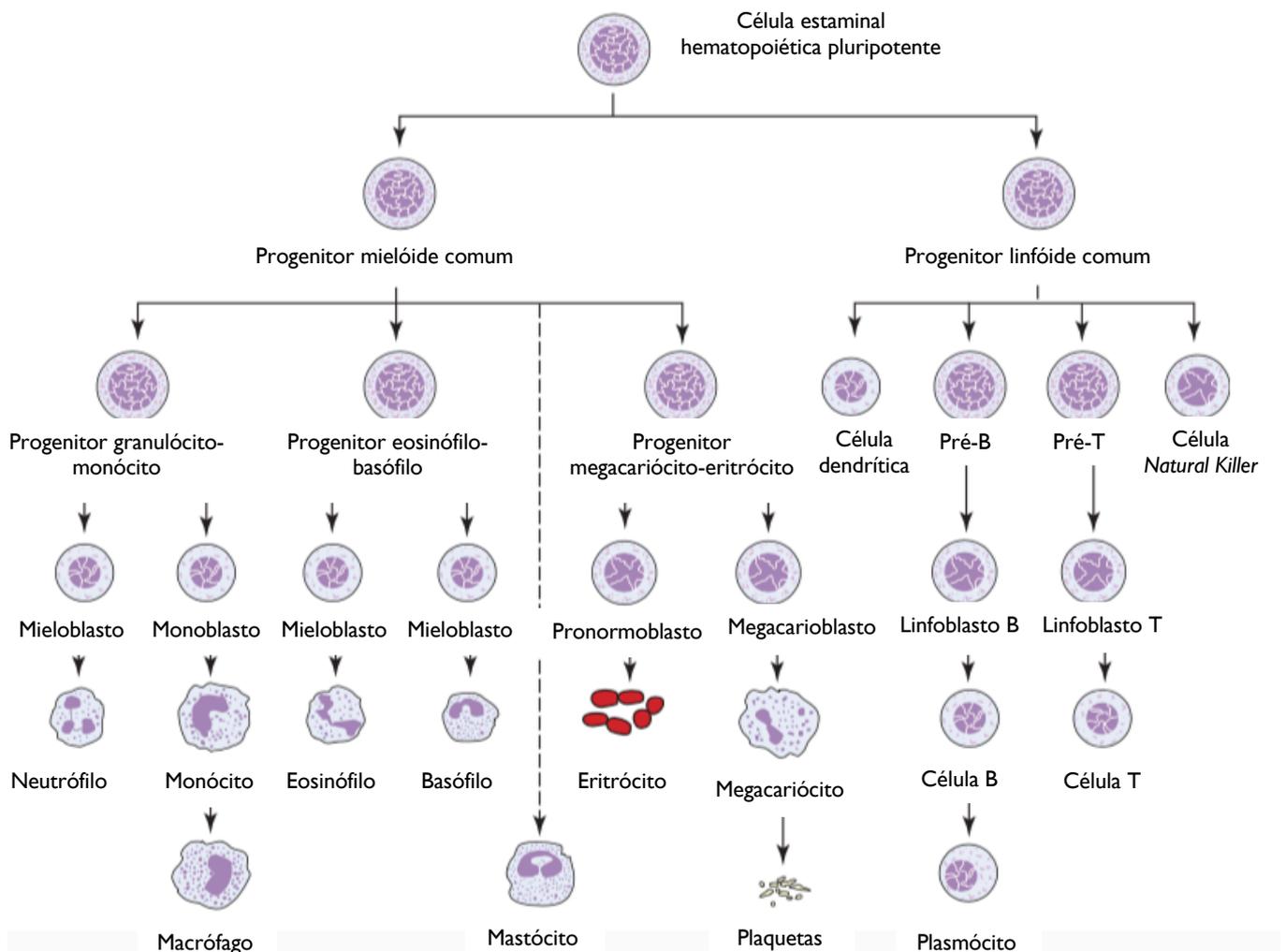


Figura 2- Esquema representativo da hematopoiese. (Adaptado de Keohane et al., 2016)

### **6.3. Hemograma**

O hemograma é um procedimento básico de rotina realizado no setor hematologia, que inclui a contagem de eritrócitos, leucócitos, plaquetas, concentração de hemoglobina, hematócrito e a contagem diferencial de leucócitos. Apesar de não fazer parte do hemograma propriamente dito, a contagem de reticulócitos também é realizada no autoanalisador do laboratório. O hemograma é particularmente útil uma vez que fornece informações sobre o estado de saúde do doente, fazendo com que seja o parâmetro analítico frequentemente mais solicitado pelo clínico. <sup>1,3,8</sup>

#### **6.3.1. Eritrograma**

Os eritrócitos são células sanguíneas anucleadas, com uma forma bicôncava e o seu interior é composto maioritariamente por uma proteína, a hemoglobina. Contudo, possuem ainda outras proteínas e enzimas no seu interior. São células especializadas no transporte de oxigénio dos pulmões para os diversos tecidos, realizando o transporte reverso do dióxido de carbono. No eritrograma são avaliados diversos parâmetros relacionados com os eritrócitos, tais como, a contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT), os 3 índices eritrocitários, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). É também avaliada a distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW), a morfologia dos glóbulos vermelhos e a contagem de reticulócitos. <sup>7,8</sup>

#### **→ Contagem de Eritrócitos**

Os eritrócitos são as células sanguíneas mais abundantes no sangue, cerca de 700 vezes mais numerosas do que os leucócitos e 17 vezes mais numerosos do que as plaquetas. A contagem de eritrócitos, cujo resultado é expresso em número de células por litro de sangue, varia consoante o género, as mulheres apresentam valores significativamente mais baixos do que os homens, 4,8 milhões de eritrócitos por microlitro de sangue e 5,4 milhões de eritrócitos por microlitro, respetivamente. Verifica-se, que certas patologias alteram a contagem de eritrócitos. No entanto, a contagem de eritrócitos é também influenciada, fisiologicamente, pela idade, assim como pela prática de exercício físico, pela altitude, sofrendo ainda alterações ao longo do dia. <sup>8,9</sup>

## → **Concentração de Hemoglobina**

A hemoglobina é uma proteína que ocupa cerca de 95% do citoplasma dos eritrócitos, cuja principal função é o transporte de oxigênio para os tecidos. A síntese de hemoglobina é um processo que começa na medula óssea, com a produção dos eritrócitos, sendo que a maioria é sintetizada no decorrer do processo de maturação dos eritrócitos. A hemoglobina é constituída por 4 cadeias polipeptídicas, as globinas e por 4 grupos heme. As cadeias polipeptídicas correspondem à porção proteica da hemoglobina. O grupo heme consiste num anel de protoporfirina IX (constituído por átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio).<sup>3,8</sup>

No decorrer do desenvolvimento e crescimento do ser humano, podem ser encontrados diferentes tipos de hemoglobinas fisiológicas, a hemoglobina F (HbF), a hemoglobina A (HbA) e a hemoglobina A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>). A hemoglobina F, constituída por duas cadeias alfa ( $\alpha$ ) e duas cadeias gama ( $\gamma$ ), representa a hemoglobina fetal, predominante no feto e no recém-nascido. Geralmente, encontra-se associada a uma eritropoiese hepática. A HbF é gradualmente substituída até que é atingido um valor normal nos adultos, aproximadamente 2%. Contudo, é normal que persista ligeiramente aumentada até aos 2 anos de idade. A hemoglobina A (HbA), constituída por duas cadeias alfa ( $\alpha$ ) e duas cadeias beta ( $\beta$ ), é a hemoglobina predominante num indivíduo, representando cerca de 95% a 97% da hemoglobina total. A hemoglobina A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>), constituída por duas cadeias alfa ( $\alpha$ ) e duas cadeias delta ( $\delta$ ), representa aproximadamente 2,5% do total de hemoglobina. As hemoglobinopatias resultam de substituição de aminoácidos ou diminuição da produção de uma das cadeias polipeptídicas.

3

A concentração de hemoglobina é expressa em gramas por decilitro de sangue (g/dL), sendo influenciada por diversos fatores, tais como idade, género, gravidez, altitude, doença associada. Os valores de referência variam de acordo com o género. A concentração de hemoglobina é particularmente útil no diagnóstico de anemia, a qual é caracterizada por uma diminuição da capacidade dos eritrócitos para transportar oxigênio. Considera-se anemia quando se verifica um valor de concentração de hemoglobina abaixo do valor de referência, tendo em conta o género e a idade. Contudo, a anemia pode ser resultado de alguma deficiência ou doença subjacente, como doença hepática, alcoolismo, hipotireoidismo, mielodisplasia. Logo, as possíveis causas da anemia devem ser investigadas de imediato.<sup>1,3,8</sup>

## → Hematócrito (HCT)

O hematócrito é a razão entre o volume ocupado pelos eritrócitos e o volume de sangue total. Geralmente, o seu valor é expresso em porcentagem relativa do volume de eritrócitos e é influenciado por fatores como a idade, gênero e altitude. O hematócrito deve ser aproximadamente o triplo do resultado da concentração de hemoglobina, assumindo que os eritrócitos apresentam um tamanho e coloração normais. Clinicamente, é um marcador útil no auxílio do diagnóstico de anemia, policitemia, hemodiluição e hemoconcentração. Uma vez que o hematócrito é influenciado pelo tamanho dos eritrócitos, não deve ser usado isoladamente no diagnóstico de anemia, devendo sempre fazer-se acompanhar pela concentração de hemoglobina. <sup>1,3,8</sup>

## → Índices Eritrocitários

Existem três índices eritrocitários: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Estes parâmetros são calculados com base nos resultados anteriormente obtidos. Fornecem informações relativamente ao tamanho, conteúdo de hemoglobina e concentração média de hemoglobina do eritrócito. Os índices eritrocitários são usados para a classificação dos diferentes tipos de anemias.

### **Volume Corpuscular Médio**

O volume corpuscular médio (VCM), que exprime o volume médio dos eritrócitos, em fentolitros (fL), é calculado da seguinte forma:

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hematócrito (\%)} \times 10}{\text{Contagem de glóbulos vermelhos}}$$

O VCM apresenta um intervalo de referência entre os 80 fL e os 100 fL, indicando se os eritrócitos apresentam um tamanho reduzido (micrócitos se o VCM < 80 fL), normal ou um tamanho superior (macrócitos se o VCM > 100 fL). Assim, o VCM permite uma classificação morfológica das anemias com base no tamanho dos eritrócitos. <sup>3,8</sup>

As anemias microcíticas resultam numa diminuição da síntese de hemoglobina, podendo estar associada a uma diminuição da síntese do grupo heme, geralmente resultante da deficiência de ferro (a causa mais comum da anemia microcítica), anemia das doenças crónicas, pode também estar associada a uma diminuição da síntese de protoporfirina, como no caso da anemia sideroblástica. Alterações na síntese de globina, como é o caso da talassémia, podem causar anemia microcítica (Figura 3).<sup>8</sup>

Relativamente às anemias normocíticas, os eritrócitos apresentam um tamanho normal (VCM 80-100 fL). Contudo, deve proceder-se ao estudo morfológico da amostra, uma vez que o VCM pode apresentar um resultado dentro dos valores de referência mas apresentar, simultaneamente, populações de macrócitos e micrócitos. No caso das anemias normocíticas, procede-se à contagem de reticulócitos para determinar a causa de anemia. Nas anemias hemolíticas, em que se verifica um aumento do número de reticulócitos, ocorre uma destruição prematura dos eritrócitos e o seu tempo de vida é encurtado. As anemias hemolíticas podem ser o resultado de causas intrínsecas, como é o caso das hemoglobinopatias e deficiências enzimáticas, mas também, de causas extrínsecas. Por outro lado, verifica-se uma diminuição do número de reticulócitos nalguns casos, tais como: anemia aplásica, anemia da doença renal, infeções e anemia das inflamações crónicas (Figura 3).<sup>8</sup>

Por fim, as anemias macrocíticas podem ser de dois tipos: megalobásticas e não megalobásticas. As anemias megalobásticas são o resultado de uma síntese de DNA deficiente, causada pela deficiência de vitamina B<sub>12</sub> ou de folato. As anemias não megalobásticas apresentam um VCM aumentado, contudo, normalmente o seu valor não ultrapassa os 115 fL. É uma anemia comum em doentes com doença hepática crónica ou em casos de alcoolismo (Figura 3).<sup>8</sup>

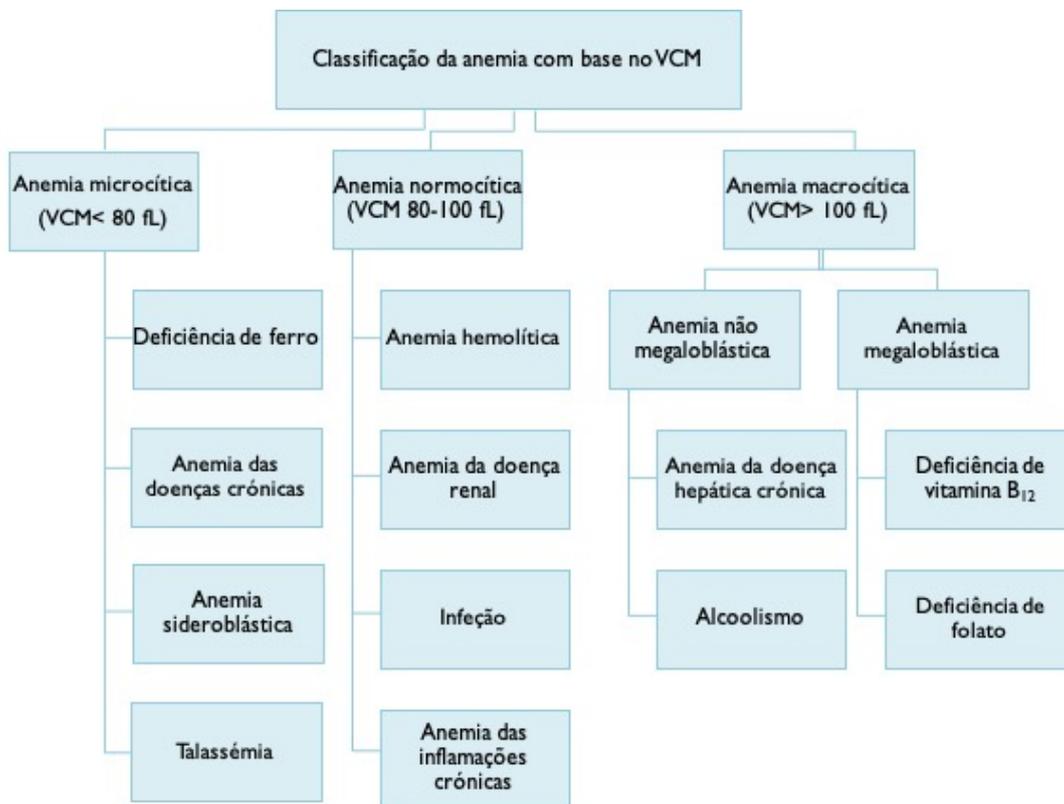


Figura 3- Classificação das anemias de acordo com o índice eritrocitário VCM. (Adaptado de Keohane et al, 2016)

### Hemoglobina Corpuscular Média

A hemoglobina corpuscular média (HCM), cujo resultado é expresso em picogramas (pg), reflete o conteúdo médio de hemoglobina no eritrócito. Este índice eritrocitário deve correlacionar-se com os outros, VCM e CHCM. Ao contrário destes dois índices eritrocitários, o HCM geralmente não é tido em conta na classificação dos diferentes tipos anemias.<sup>1,8</sup> É calculado da seguinte forma:

$$HCM = \frac{\text{Concentração de hemoglobina} \times 10}{\text{Contagem de glóbulos vermelhos}}$$

### Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) representa a concentração média de hemoglobina no eritrócito, sendo o seu valor expresso em gramas por decilitro (g/dL). Apresenta um intervalo de referência que varia entre 32 g/dL e 36 g/dL, sendo particularmente útil na classificação das anemias como hipocrómicas, normocrómicas e

hipercrômicas, consoante o valor do CHCM se encontre abaixo (CHCM < 32 g/dL), dentro (CHCM 32-36 g/dL) ou acima (CHCM > 36 g/dL) dos valores de referência, respetivamente. <sup>1</sup> É calculado da seguinte forma:

$$CHCM = \frac{\text{Concentração de hemoglobina}}{\text{Hematócrito(\%)}} \times 100$$

### → Distribuição do Tamanho dos Eritrócitos

A distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW- *Red Cell Distribution Width*), indica o grau de anisocitose, isto é, a variabilidade no tamanho dos eritrócitos. O resultado é expresso em percentagem e calcula-se diretamente a partir do histograma. O seu valor apresenta utilidade na classificação das anemias, sendo o primeiro marcador a manifestar alterações nos casos de anemias causadas por deficiências nutricionais, tais como nas anemias por deficiência de ferro, vitamina B<sub>12</sub> e folato (RDW aumenta). Nos casos de hemoglobinopatias, verifica-se um aumento do RDW de acordo com o grau de anemia que acompanha a doença. Em certos tipos de anemias, existe uma correlação entre o índice eritrocitário VCM e o RDW, contudo, estas classificações não são absolutas, devendo ser realizados testes adicionais. <sup>1,3,8</sup>

### → Contagem de Reticulócitos

Os reticulócitos são eritrócitos imaturos, que apesar de não possuírem núcleo, ainda contêm RNA. A sua contagem, normalmente expressa em percentagem, reflete a atividade eritropoiética, isto é, indica a taxa de produção de eritrócitos na medula óssea. Numa situação normal, quando se verifica um decréscimo no número de eritrócitos, a medula óssea tem a capacidade de produzir mais reticulócitos, de modo a que o organismo volte à homeostase. <sup>1,3,9</sup>

O número de reticulócitos pode encontrar-se alterado, podendo estar acima ou abaixo dos valores de referência, reticulocitose e reticulopenia, respetivamente. Existem várias causas que podem provocar um aumento do número de reticulócitos, tais como: anemia hemolítica; perda de sangue; resposta à terapia em doentes com anemia por deficiências nutricionais; administração de eritropoietina. Por sua vez, a reticulopenia pode ser causada por: anemia por deficiência de ferro, vitamina B<sub>12</sub>, folato; anemia das doenças crónicas; leucemia aguda; mielodisplasia. <sup>6</sup>

### **6.3.2. Leucograma**

Os leucócitos são células envolvidas na imunidade, quer ela seja inata ou adaptativa, na fagocitose e na produção de anticorpos. Estão, assim, envolvidos na proteção do organismo contra agentes infecciosos e doenças neoplásicas. Existem 5 populações de leucócitos diferentes: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Cada população de leucócitos apresenta uma função única, podendo agir de forma independente, mas também cooperar com outras células.<sup>3,8</sup> O leucograma permite uma avaliação da série leucocitária através da contagem total de leucócitos e de uma contagem diferencial dos mesmos.

#### **→ Contagem Total de Leucócitos**

A contagem de leucócitos, expressa em número de células por litro de sangue, pode ser usada para estudar a presença de determinadas infecções e seguir a progressão de algumas doenças. Contudo, este parâmetro isoladamente tem pouco valor clínico, sendo necessária a realização de análises adicionais, como a contagem diferencial de leucócitos.<sup>1,8</sup>

A contagem total de leucócitos pode encontrar-se alterada por diversas razões, varia ao longo do dia, aumenta após a realização de exercício físico intenso, em situações de stress emocional e ansiedade. A leucopenia, contagem total de leucócitos abaixo dos valores de referência, pode ocorrer devido a certas infecções virais, como no caso de hepatite, mas também em certos casos de malária, artrite reumatóide, cirrose, anemia perniciosa. No que diz respeito ao aumento do número total de leucócitos, leucocitose, esta pode ser causada por infecções agudas, especialmente de origem bacteriana, apendicite, carcinomas, leucemias, pode ser resultado de certos tipos de anemia ou pode surgir no decorrer da gravidez.<sup>1,3</sup>

#### **→ Contagem Diferencial de Leucócitos**

A contagem diferencial de leucócitos, permite a diferenciação e contagem dos leucócitos nas suas diferentes populações: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos. Expressa-se tanto em valores relativos de percentagem como em valores absolutos, em número de leucócitos por litro.<sup>8</sup>

### **6.3.3. Plaquetograma**

As plaquetas são fragmentos celulares com origem nos megacariócitos, não possuem núcleo e são extremamente pequenas. Apresentam uma função fundamental na manutenção

e reparação dos vasos sanguíneos, na manutenção do mecanismo hemostático. O plaquetograma permite a avaliação da série plaquetar, através da contagem total de plaquetas e do volume plaquetar médio.<sup>8</sup>

### → **Contagem total de plaquetas**

A contagem total de plaquetas (PLT), expressa em número de células por litro de sangue, apresenta valores ligeiramente mais elevados nas mulheres do que nos homens, verificando-se uma ligeira redução do número total de plaquetas para ambos os sexos a partir dos 65 anos.<sup>8</sup>

O número total de plaquetas pode encontrar-se abaixo ou acima dos valores de referência, trombopenia e trombocitose, respetivamente. A trombocitopenia pode ser causada por uma falha na produção de plaquetas, a qual está muitas vezes associada a uma falha na produção de células na medula óssea, que pode ser causada por certas doenças infecciosas, determinado tipo de anemias (anemia perniciosa, anemia aplásica, anemia megaloblástica), mieloma múltiplo, leucemias agudas. A trombocitopenia pode também resultar de um aumento da destruição de plaquetas, sendo normalmente de origem autoimune. Um aumento do número de plaquetas, trombocitose, pode ser o resultado de uma intervenção cirúrgica, febre reumática, asfixia.<sup>1,7</sup>

Em determinadas situações, a contagem de plaquetas pode encontrar-se falsamente diminuída, pseudotrombocitopenia, devido à formação de coágulos ou à formação de agregados plaquetares. Deste modo, deve ter-se especial atenção à baixa contagem de plaquetas.<sup>3</sup>

### → **Volume Plaquetar Médio**

O volume plaquetar médio (VPM), expresso em femolitros (fL), indica o volume médio das plaquetas na amostra. Em indivíduos saudáveis, verifica-se a existência de uma relação de proporcionalidade inversa entre o número total de plaquetas e o seu tamanho, enquanto o volume aumenta, a contagem total de plaquetas diminui. Assim, o VPM não deve ser considerado isoladamente, mas tendo sempre em conta a contagem total de plaquetas.<sup>3</sup>

O VPM pode encontrar-se alterado, apresentando valores abaixo ou acima dos valores de referência. Níveis mais baixos de VPM estão muitas vezes associados a certos tipos de anemia (anemia aplásica, anemia megaloblástica), bem como a quimioterapia. Por sua vez, níveis mais elevados de VPM ocorrem em situações em que ocorre uma destruição das plaquetas,

sendo o aumento do VPM proporcional à severidade da trombocitopenia. Um aumento nos níveis de VPM ocorre também em doenças mieloproliferativas, talassémia, trombocitopenia idiopática.<sup>3</sup>

#### 6.4. Estudo Morfológico

O estudo morfológico, fornece informações complementares ao hemograma e úteis sobre o estado de saúde de um indivíduo. Permite que sejam analisados os elementos figurados do sangue, incluindo uma avaliação morfológica das 3 linhas celulares, uma contagem relativa de leucócitos e plaquetas e uma contagem diferencial de leucócitos, o que auxilia no diagnóstico de determinadas patologias. Esta análise permite uma comparação dos resultados do hemograma obtidos no autoanalisador.<sup>8</sup>

O esfregaço de sangue periférico só é realizado quando tal se justifica, dependendo de determinados critérios (Tabela 3), bem como do histórico do doente.

Tabela 3- Critérios para elaboração de um esfregaço sanguíneo adotado no LACCSMC.

♀ Concentração de hemoglobina $\leq 11,0$ g/dL ou $\geq 15,0$ g/dL
♂ Concentração de hemoglobina $\leq 12,0$ g/dL ou $\geq 17,0$ g/dL
RDW $\geq 15,0\%$ CV
PLT $< 150 \times 10^3 / \mu\text{L}$ ou $> 500 \times 10^3 / \mu\text{L}$ sem histórico
Contagem total de leucócitos $\leq 3,0 \times 10^9 / \text{L}$ ou $\geq 12,0 \times 10^9 / \text{L}$
Monócitos $\geq 15,0\%$
Basófilos $\geq 3,0\%$
Eosinófilos $\geq 15,0\%$
Qualquer inversão de fórmula com contagem de leucócitos $\geq 8,0 \times 10^9 / \text{L}$ ou Linfócitos $\geq 50\%$
Inversões de fórmula com diferença de 10% Linfócitos $>$ Neutrófilos
VCM $< 75$ fL ou $> 105$ fL
CHCM $> 37,0$ g/dL

### 6.4.1. Avaliação Morfológica da Série Eritrocitária

Os eritrócitos são células anucleadas e que apresentam uma forma bicôncava. Por vezes, no esfregaço de sangue periférico, é passível de se observarem algumas alterações no seu tamanho, cor e forma, para além disso, pode também verificar-se a presença de inclusões eritrocitárias e alterações na distribuição dos eritrócitos, todas estas alterações são descritas no decorrer desta secção. <sup>3</sup> Na figura 4, encontra-se representado um esfregaço sanguíneo de um indivíduo saudável, em que os eritrócitos apresentam um tamanho e coloração normais, são normocrómicos e normocíticos.

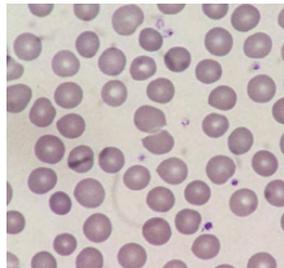
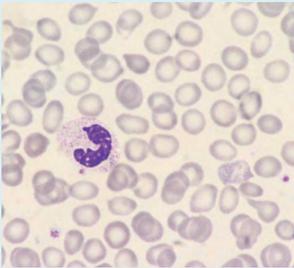
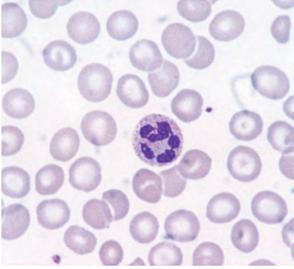


Figura 4- Esfregaço sanguíneo de um indivíduo saudável, os eritrócitos apresentam um tamanho e coloração normais. (Adaptado de Bain, 2015)

#### → Tamanho

O eritrócito apresenta um diâmetro médio de aproximadamente 7,2  $\mu\text{m}$ , contudo pode variar entre os 6,2  $\mu\text{m}$  e os 8,2  $\mu\text{m}$ . Um eritrócito com o tamanho normal (diâmetro compreendido entre 6,2  $\mu\text{m}$  e 8,2  $\mu\text{m}$ ) designa-se de normócito. Alterações no tamanho dos eritrócitos designa-se de anisocitose, no entanto este termo não indica o tipo de variação presente no tamanho do eritrócito, não sendo específico. O grau de anisocitose é refletido pela Distribuição do Tamanho dos Eritrócitos (RDW). Os eritrócitos que apresentam um tamanho superior ao normal (superior a 8,2  $\mu\text{m}$ ) designam-se de macrócitos, sendo que no caso de se verificar um aumento do diâmetro da maioria dos eritrócitos, conseqüentemente o valor do VCM encontrar-se-á aumentado. Por sua vez, eritrócitos com um tamanho inferior ao normalmente observado (inferior a 6,2  $\mu\text{m}$ ) são denominados de micrócitos, podendo também ocorrer uma alteração generalizada no tamanho dos eritrócitos e uma redução do valor do VCM (Tabela 4). <sup>1,3,6</sup>

Tabela 4- Alterações no tamanho dos eritrócitos.

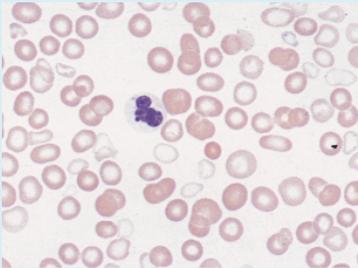
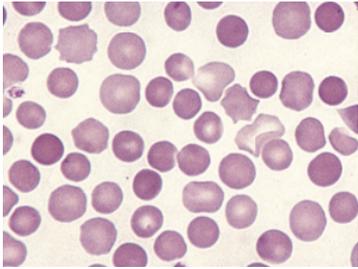
Alteração no tamanho	Diâmetro	Doenças / condições associadas
<p><b>Microcitose</b></p> 	Inferior a 6,2 $\mu\text{m}$	<p>Anemia por deficiência de ferro;</p> <p>Anemia das doenças crônicas;</p> <p>Anemia sideroblástica;</p> <p>Certas hemoglobinopatias. <sup>3,8</sup></p>
<p><b>Macrocitose</b></p> 	Superior a 8,2 $\mu\text{m}$	<p>Anemia por deficiência de vitamina B<sub>12</sub> / folato;</p> <p>Anemia megaloblástica;</p> <p>Síndrome mielodisplásica;</p> <p>Doença hepática crônica;</p> <p>Falha na medula óssea. <sup>3,8</sup></p>

### → Cor

Geralmente, o eritrócito apresenta uma coloração rosa avermelhada e o centro da célula ligeiramente mais descorado, o qual, normalmente, não excede um terço do diâmetro do eritrócito, sendo designados de normocrômicos. A cor do eritrócito reflete o conteúdo da célula em hemoglobina. Alterações na coloração dos eritrócitos designa-se de anisocromia, sendo este um termo não é específico. <sup>3</sup>

Os eritrócitos com uma zona central que excede um terço do diâmetro da célula ou com uma coloração mais pálida são designados de hipocrômicos. A hipocromia pode estar associada a duas diferentes causas: diminuição da concentração de hemoglobina ou uma alteração na espessura dos eritrócitos. Clinicamente, a hipocromia está associada a anemia por deficiência de ferro, embora possa ser causada por diferentes patologias. Uma hipocromia severa pode resultar numa redução do índice eritrocitário CHCM. Por sua vez, os glóbulos vermelhos com uma coloração forte e sem palidez central denominam-se hiperocrômicos. A hiperocrromia está associada a macrócitos e a eritrócitos com uma forma anormalmente redonda (esferócitos) (Tabela 5). A hiperocrromia pode ser acompanhada por um aumento do CHCM, o que indica que não há alterações apenas na coloração do eritrócito, mas também na concentração de hemoglobina, que é superior ao que é considerado normal. <sup>3,6,9</sup>

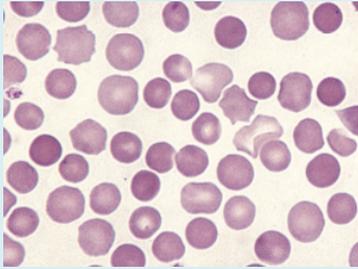
Tabela 5- Alterações na cor dos eritrócitos.

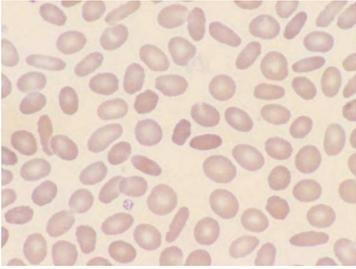
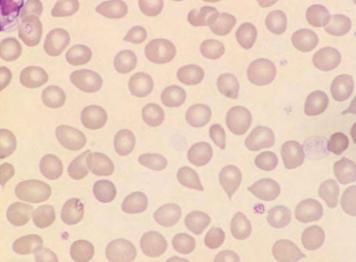
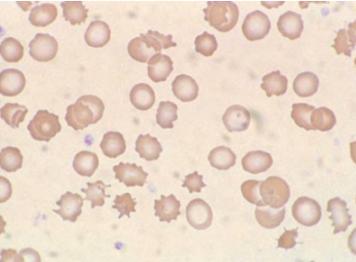
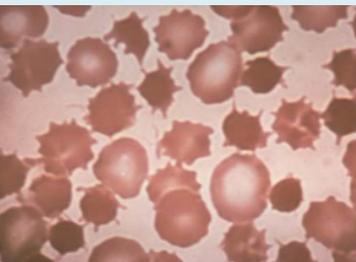
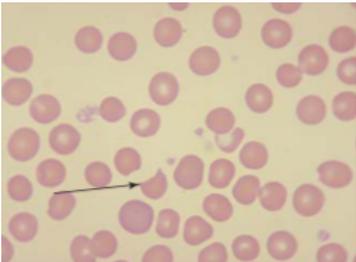
Alteração na cor	Doenças / condições associadas
<p><b>Hipocromia</b></p> 	<p>Anemia por deficiência de ferro Anemia das doenças crônicas Talassemia <sup>6,9</sup></p>
<p><b>Hipercromia</b></p> 	<p>Macrocitose Esferocitose <sup>6,9</sup></p>

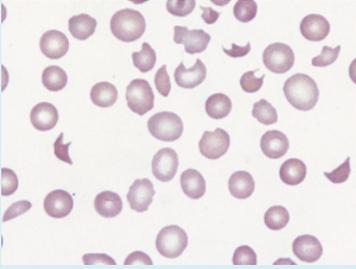
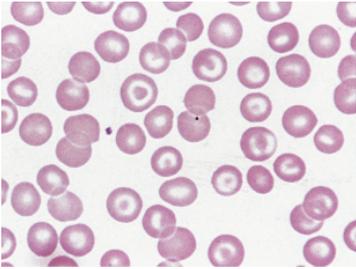
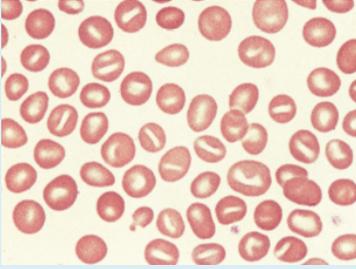
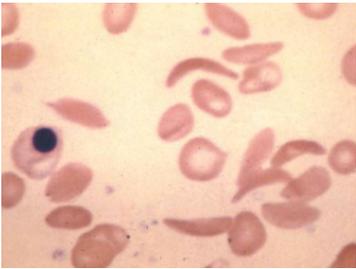
→ **Forma**

O eritrócito apresenta uma forma bicôncava, eritrócitos com formas diferentes da normalmente observada são designados poiquilócitos. Geralmente, os poiquilócitos apresentam formas que se assemelham a objetos comuns. <sup>3</sup> Na Tabela 6 encontram-se representadas algumas alterações na forma dos eritrócitos.

Tabela 6- Alterações na forma dos eritrócitos.

Alterações na forma	Descrição da célula	Doenças / condições associadas
<p><b>Esferócitos</b></p> 	<p>Eritrócito pequeno (com um diâmetro inferior ao normal), redondo, ausência da zona central descorada</p>	<p>Esferocitose hereditária Anemia hemolítica imune Queimaduras extensas <sup>3,8</sup></p>

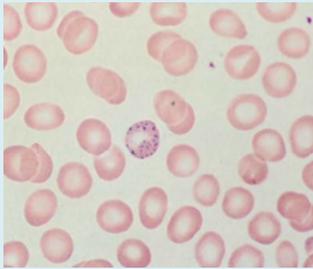
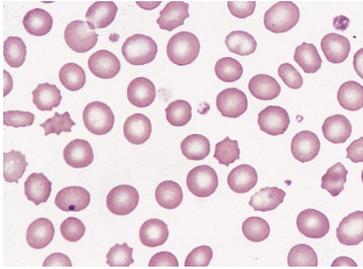
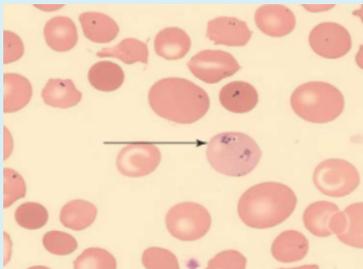
<p><b>Eliptócitos e ovalócitos</b></p> 	<p>Eliptócito- forma de cigarro Ovalócito- forma de ovo</p>	<p>Eliptocitose ou ovalocitose hereditárias Anemia por deficiência de ferro Anemia megaloblástica Síndromes mielodisplásicas Talassemia <sup>3,8</sup></p>
<p><b>Dacriócitos</b></p> 	<p>Células em lágrima</p>	<p>Anemia hemolítica Anemia megaloblástica Talassemia major Mielofibrose <sup>3,8</sup></p>
<p><b>Equinócitos</b></p> 	<p>Eritrócitos com pequenas projeções na superfície da célula</p>	<p>Urémia Deficiência da piruvato cinase <sup>3,8</sup></p>
<p><b>Acantócitos</b></p> 	<p>Eritrócito pequeno e com projeções de vários comprimentos que se distribuem irregularmente</p>	<p>Abetalipoproteinemia hereditária Hipobetalipoproteinemia hereditária Doença hepática <sup>3,8</sup></p>
<p><b>Queratócito</b></p> 	<p>Eritrócitos com pares de espículas, normalmente 2, podendo ser 4 ou 6</p>	<p>Queimaduras Anemia hemolítica Anemia por deficiência de ferro Anemia da doença crônica <sup>3,8</sup></p>

<p><b>Esquizócitos</b></p> 	<p>Fragmentos de glóbulos vermelhos</p>	<p>Anemia hemolítica Queimaduras extensas <sup>3,8</sup></p>
<p><b>Células em alvo</b></p> 	<p>Eritrócitos que apresentam uma superfície grande quando comparada com o seu volume. Hemoglobina concentrada na zona central e na periferia, citoplasma sem coloração ou com uma coloração mais suave, lembrando um alvo.</p>	<p>Doença hepática Hemoglobinopatias Talassémia <sup>3,8</sup></p>
<p><b>Estomatócitos</b></p> 	<p>Eritrócitos que apresentam na zona bicôncava central, algo que se assemelha a uma fenda</p>	<p>Estomatocitose hereditária Estomatocitose adquirida (doença hepática, alcoolismo) <sup>3,8</sup></p>
<p><b>Drepanócito / Célula falciforme</b></p> 	<p>Células em foice Eritrócito alongado, podendo ser curvo, com as duas pontas pontiagudas</p>	<p>Anemia falciforme <sup>3,8</sup></p>

## → Inclusões Eritrocitárias

Por vezes, no estudo morfológico, é possível observarem-se algumas inclusões eritrocitárias, as quais podem ser inclusões parasitárias, como é o exemplo da malária. Contudo, podem ser encontradas outras estruturas como ácidos nucleicos (RNA ou DNA), agregados mitocondriais, partículas de ferro e ribossomas (Tabela 7).<sup>3</sup>

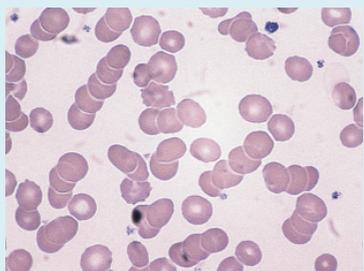
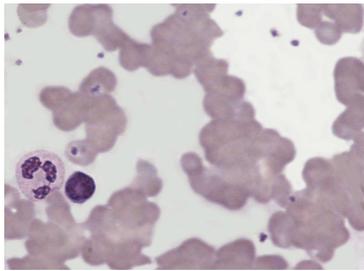
Tabela 7- Diferentes tipos de inclusões eritrocitárias.

Inclusão	Descrição e Composição da inclusão	Doenças / condições associadas
<p><b>Pontilhado basofílico</b></p> 	<p>Pequenas inclusões basofílicas, com uma coloração azul arroxeadada, distribuídas no citoplasma da célula.</p> <p>Composta por RNA precipitado.</p>	<p>Talassémias (minor e major)</p> <p>Hemoglobinopatias</p> <p>Anemia megaloblástica</p> <p>Anemia hemolítica</p> <p>Síndrome mielodisplásica</p> <p>Doenças hepática</p> <p>Envenenamento por metais pesados<sup>3,6,8,9</sup></p>
<p><b>Corpos de Howell-Jolly</b></p> 	<p>Inclusões citoplasmáticas de tamanho médio, densas, redondas, com uma coloração azul arroxeadada; geralmente apresenta-se apenas um por célula.</p> <p>Composta por fragmentos de material genético (DNA).</p>	<p>Anemia megaloblástica</p> <p>Anemia hemolítica</p> <p>Talassémia</p> <p>Síndrome mielodisplásica</p> <p>Hipoesplenismo<sup>3,6,8,9</sup></p>
<p><b>Corpos de Pappenheimer</b></p> 	<p>Inclusões basofílicas irregulares, localizadas na periferia do eritrócito, com uma coloração azul escura; um eritrócito que apresenta estes corpos designa-se de siderócito.</p> <p>Composta por ferro.</p>	<p>Anemia sideroblástica</p> <p>Anemia megaloblástica</p> <p>Hemoglobinopatias</p> <p>Talassémias</p> <p>Síndrome mielodisplásica</p> <p>Hipoesplenismo<sup>3,6,8,9</sup></p>

## → Alterações na Distribuição dos Eritrócitos

No esfregaço de sangue periférico, é possível observar-se a formação de rouleaux e aglutinação (Tabela 8).<sup>3</sup>

Tabela 8- Alterações na distribuição dos eritrócitos.

Alteração na distribuição	Descrição	Observações
<b>Rouleaux</b> 	Eritrócitos empilhados, assemelhando-se a pilhas de moedas	Existe com frequência no esfregaço sanguíneo; o aumento da sua formação é significativo e pode ser patológico. Aumento da sua formação: gravidez, condições inflamatórias, mieloma múltiplo <sup>3,6,9</sup>
<b>Aglutinação</b> 	Aglomerados irregulares	A sua formação resulta da presença de anticorpos que reagem com os antígenos existentes na membrana do eritrócito. Aumento da sua formação: anemia hemolítica autoimune, paraproteinémias <sup>3,6,9</sup>

### 6.4.2. Avaliação da Série Leucocitária

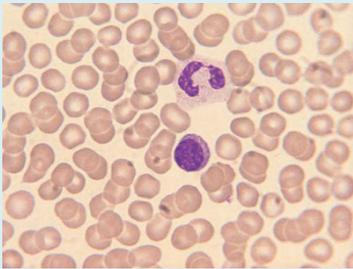
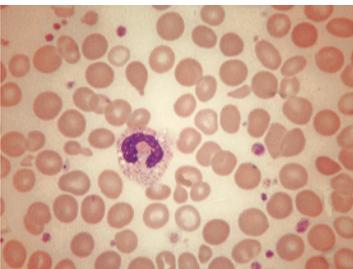
Os leucócitos são células sanguíneas maiores e mais complexas do que os eritrócitos. Existem cinco populações diferentes de leucócitos: os neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, os quais se diferenciam pelo seu tamanho, forma e coloração. O núcleo, geralmente, apresenta uma coloração roxa, localiza-se no centro da célula e pode ser segmentado, oval ou redondo. O citoplasma pode apresentar várias colorações de acordo com o seu conteúdo.<sup>1</sup>

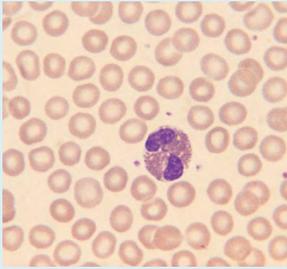
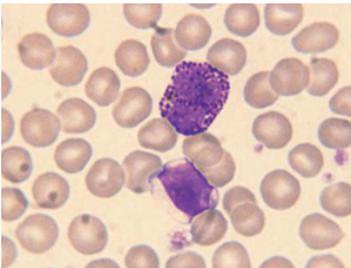
Os leucócitos podem ser classificados, morfológicamente, como células polimorfonucleares ou granulócitos e mononucleares. Os granulócitos, que incluem

neutrófilos, eosinófilos e basófilos, apresentam um núcleo segmentado ou lobulado e grânulos citoplasmáticos, cuja coloração varia consoante o tipo de granulócito (Tabela 9). As células mononucleares, representadas pelos monócitos e linfócitos, podem também apresentar grânulos citoplasmáticos, mas não tão perceptíveis e o seu núcleo é redondo ou oval (Tabela 10).<sup>1,6,8</sup>

### → Granulócitos

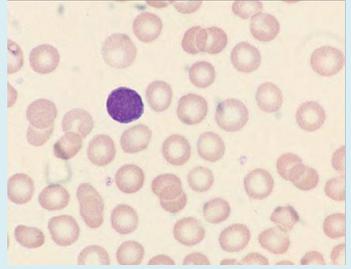
Tabela 9- Diferentes tipos de granulócitos normalmente presentes na circulação sanguínea.

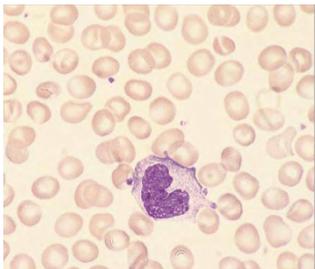
Granulócito	Descrição
<p data-bbox="320 779 525 875"><b>Neutrófilo segmentado</b></p> 	<p data-bbox="687 678 1374 768">São os leucócitos e granulócitos mais abundantes na circulação sanguínea (cerca de 59% dos leucócitos);</p> <p data-bbox="668 786 1393 824">O núcleo geralmente é lobular e apresenta 2 a 5 lobos;</p> <p data-bbox="632 842 1433 880">Cromatina nuclear densa, apresentando uma coloração roxa;</p> <p data-bbox="636 898 1426 987">Citoplasma apresenta uma coloração cor de rosa, contendo pequenos grânulos, normalmente roxos;</p> <p data-bbox="628 1005 1434 1261">Por vezes, verifica-se um aumento no número de lóbulos dos neutrófilos, um desvio à direita, podendo estar associado a anemia megaloblástica, deficiência de ferro, infeção, síndrome mielodisplásica, hipersegmentação dos neutrófilos hereditária.<sup>1,6</sup></p>
<p data-bbox="252 1305 596 1339"><b>Neutrófilo em banda</b></p> 	<p data-bbox="647 1283 1414 1373">Num indivíduo saudável, apenas existem alguns neutrófilos em banda (aproximadamente 3%);</p> <p data-bbox="807 1391 1254 1429">Forma mais imatura de neutrófilo;</p> <p data-bbox="711 1447 1350 1485">Não possui o núcleo lobulado, mas sim curvado;</p> <p data-bbox="632 1503 1430 1648">Um aumento do número de neutrófilos em banda designa-se de desvio à esquerda, podendo estar associado a gravidez, infeção, inflamação, hipóxia, choque.<sup>1</sup></p>

<p style="text-align: center;"><b>Eosinófilo</b></p> 	<p>Os eosinófilos representam aproximadamente 6% dos leucócitos circulantes;</p> <p>Ligeiramente maiores do que os neutrófilos;</p> <p>Núcleo normalmente bilobulado, podendo também ser trilobulado (raramente);</p> <p>Grânulos esféricos, uniformemente distribuídos no citoplasma e maiores do que os dos neutrófilos, apresentando uma coloração vermelha alaranjada;</p> <p>Citoplasma ligeiramente basofílico. <sup>1,6</sup></p>
<p style="text-align: center;"><b>Basófilo</b></p> 	<p>Os basófilos apenas constituem até 1% dos leucócitos totais;</p> <p>Aproximadamente o mesmo tamanho que os neutrófilos;</p> <p>Núcleo apresenta uma forma irregular, sendo ligeiramente maior do que o dos neutrófilos, o qual apresenta uma coloração roxa ou azul;</p> <p>Citoplasma incolor;</p> <p>Grânulos basofílicos grossos, redondos ou angulares, apresentando uma coloração roxa ou preta;</p> <p>Grânulos podem sobrepor-se ao núcleo. <sup>1,6</sup></p>

### → Células mononucleares

Tabela 10- Diferentes tipos de células mononucleares normalmente presentes na circulação sanguínea.

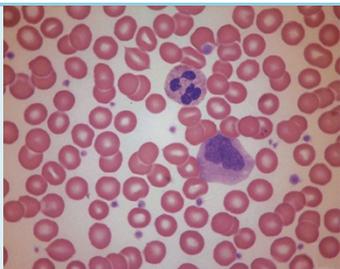
Célula mononuclear	Descrição
<p style="text-align: center;"><b>Linfócito</b></p> 	<p>Representam cerca de 34% dos leucócitos;</p> <p>Apresentam tamanhos variáveis, existindo linfócitos maiores e outros mais pequenos;</p> <p>Linfócitos mais pequenos são os mais abundantes;</p> <p>Núcleo redondo e condensado, com uma coloração roxa, ocupando praticamente toda a célula;</p> <p>Citoplasma escasso, apresenta uma coloração pálida, podendo apresentar grânulos azurofílicos. <sup>1,6</sup></p>

<p><b>Monócito</b></p> 	<p>Constituem aproximadamente 4 a 6% dos leucócitos totais;  Núcleo grande e irregular, podendo apresentar várias formas (redondo, oval, lobular, segmentado, entre outras);  Núcleo apresenta uma coloração roxa;  Citoplasma abundante, com uma coloração azul acinzentada, contém uma elevada quantidade de pequenos grânulos azurofílicos, designada de poeira azul;  Presença de vacúolos. <sup>1,6</sup></p>
--	--

### 6.4.3. Avaliação da Série Plaquetar

Quando se procede à avaliação das plaquetas num esfregaço sanguíneo, deve-se ter em consideração o seu número, tamanho e morfologia e a possível presença de fenómenos como agregação plaquetar, sateletismo plaquetar ou fagocitose das plaquetas. <sup>6</sup>

Tabela II - Representação das plaquetas normalmente encontradas na circulação sanguínea.

Plaqueta	Descrição
	<p>Fragmentos celulares de tamanho reduzido;  Não apresentam núcleo;  Contêm vários tipos de grânulos. <sup>6</sup></p>

### 6.5. Velocidade de Sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS), expressa em milímetros por hora (mm/h), refere-se à deposição dos eritrócitos no fundo do tubo no decorrer de uma hora. Os seus valores de referência variam de acordo com o sexo e com a idade. É usado na prática clínica para auxiliar na deteção e monitorização do curso de doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide, artrite temporal, infeções (em particular na tuberculose), situações de malignidade. Contudo, este é um marcador pouco específico e sensível, dependendo de alguns fatores como o número e tamanho dos eritrócitos e a presença de determinados fatores plasmáticos. Uma vez que apresenta uma baixa especificidade, pode estar aumentada por causas como gravidez, enfarte agudo do miocárdio, anemia e devido ao avançar da idade, não sendo recomendável a sua utilização para o diagnóstico de doenças infecciosas em indivíduos sem sintomatologia. <sup>1,3,8</sup>

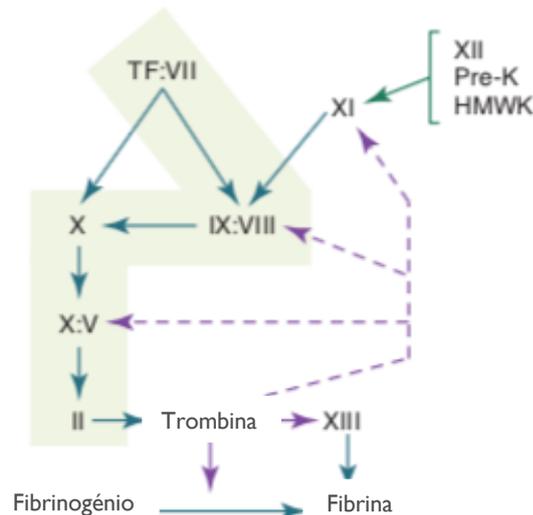
## 6.6. Hemostase

A hemostase envolve um sistema complexo constituído pela parede vascular, plaquetas, fatores de coagulação, inibidores da coagulação e pelo sistema fibrinolítico, que contribuem para a formação e dissolução do coágulo, após a lesão de um vaso sanguíneo. A hemostasia é mantida graças ao equilíbrio entre os processos de hemorragia e coagulação, sendo fundamental para a sobrevivência. É um processo altamente controlado para prevenir uma hemorragia extensa e a formação excessiva de coágulos, bem como para promover a dissolução do coágulo, quando se completar o processo de reparação do vaso sanguíneo. <sup>3,7,8</sup>

A hemostase pode ser subdividida em hemostase primária, hemostase secundária e fibrinólise. A hemostase primária caracteriza-se por apresentar uma resposta rápida e de curta duração, após a ocorrência de um pequeno dano num vaso sanguíneo. Nesta fase, os vasos sanguíneos e as plaquetas são elementos fundamentais. Ocorre vasoconstrição para que haja uma redução do fluxo sanguíneo, as plaquetas são ativadas e aderem ao local da lesão, contribuindo para a formação do tampão plaquetar primário e instável. A hemostase secundária, por sua vez, caracteriza-se por apresentar uma resposta mais demorada e de longa duração, que leva à ativação das proteínas plasmáticas, designados de fatores de coagulação, e culmina com a formação do coágulo de fibrina. Os fatores de coagulação encontram-se na circulação sanguínea na forma de proteínas inativas, tornando-se ativos no decorrer do processo de coagulação, o que contribui para a geração de trombina, que por sua vez converte o fibrinogénio plasmático em fibrina. A fibrina é essencial para a formação do tampão hemostático estável e definitivo (Figura 5). Este processo depende de cálcio, uma vez que é necessário para a formação de certos complexos de coagulação. Contudo, há também vários fatores de coagulação que dependem de vitamina K. Por fim, tem de ocorrer a dissolução do coágulo de fibrina, a plasmina tem a capacidade de degradar a fibrina e normalizar o fluxo sanguíneo. <sup>7,8</sup>

A cascata da coagulação é composta por 3 vias diferentes: via intrínseca, via extrínseca e via comum. Estas designações são muito usadas para a interpretação de resultados laboratoriais, bem como para a identificação de deficiências nos fatores de coagulação.

Na rotina laboratorial, para a avaliação da coagulação sanguínea, determina-se o Tempo de Protrombina (TP), o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPa) e o Fibrinogénio.



**Figura 5- Esquema representativo da cascata de coagulação.** O fator tecidual (TF) ativa o fator VII, o qual, por sua vez, ativa os fatores IX e X. Por outro lado, o complexo formado pelos fatores IX e VIII tem a capacidade de ativar o fator X. Forma-se o complexo X:V que ativa o fator II, o qual corresponde à protrombina. Forma-se trombina que ativa o fator XIII e que tem a capacidade de converter o fibrinogênio em fibrina, essencial para a formação do tampão hemostático. A trombina tem também capacidade de ativar os fatores V, VIII, XI e as plaquetas. (Adaptado de Keohane et al, 2016)

### 6.6.1. Tempo de Protrombina

O tempo de protrombina (TP) é o tempo necessário para que ocorra a coagulação do plasma, após a adição de uma quantidade ideal de tromboplastina do cérebro do coelho (contendo fator tecidual, lípidos e cálcio). Este teste, avalia as vias extrínseca (fator VII) e comum (fibrinogênio, protrombina, fatores V, X). Testa, assim, a geração da trombina e a conversão do fibrinogênio em fibrina. O TP permite a monitorização da terapia com anticoagulantes orais (por exemplo, os antagonistas da vitamina K), triagem de deficiências de determinados fatores de coagulação em distúrbios da coagulação hereditários ou adquiridos e deteção de distúrbios hepáticos.<sup>1,7</sup>

O seu resultado pode ser fornecido em segundos, contudo, para uma padronização dos resultados, deve ser dado pela Razão Internacional Normalizada (INR). O INR permite a comparação de testes realizados em diferentes laboratórios, com diferentes tromboplastinas e equipamentos distintos.<sup>1,7</sup> O INR é obtido através do cálculo do TP do doente e do TP controlo, tendo em conta o Índice de Sensibilidade Internacional (ISI), do seguinte modo:

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

### **6.6.2. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado**

O Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPa) é o tempo necessário para que o plasma coagule, após a junção de um componente fosfolipídico da tromboplastina, cloreto de cálcio e um ativador. Permite uma avaliação das vias intrínseca (fatores VIII, IX, XI e XII) e comum (fibrinogénio, protrombina, fatores V, X). É particularmente útil para a monitorização da terapêutica com anticoagulantes, nomeadamente heparina. <sup>1,7</sup>

Aumentos de TTPa estão associados a deficiências nos fatores de coagulação, que representam os distúrbios mais comuns, contudo também se pode dever à presença de anticoagulante lúpico ou de anticoagulantes circulantes. <sup>1,3</sup>

### **6.6.3. Fibrinogénio**

O fibrinogénio é uma proteína plasmática envolvida na cascata de coagulação. O seu doseamento baseia-se no método de Clauss, o qual mede o tempo de coagulação, após a adição de uma concentração elevada de trombina, responsável pela conversão do fibrinogénio em fibrina. Verifica-se a existência de uma relação de proporcionalidade inversa entre o tempo de formação do coágulo e a concentração de fibrinogénio. Uma diminuição dos níveis de fibrinogénio está associada a doença hepática severa, enquanto aumentos dos seus níveis ocorre em casos de gravidez e de doença inflamatória crónica. <sup>8</sup>

## Caso Clínico I

Um indivíduo de 67 do sexo masculino, dirigiu-se ao laboratório para realizar algumas análises clínicas, após a realização de uma transfusão sanguínea, uma vez que apresentava anteriormente baixos valores de hemoglobina (anemia). Os resultados obtidos no hemograma foram os seguintes:

Tabela 12- Boletim analítico do doente após a realização de uma transfusão sanguínea.

Parâmetro	Resultado	Valores de referência
Eritrócitos	$2,76 \times 10^{12}/L$	$4,5-6,5 \times 10^{12}/L$
Hemoglobina (Hb)	8,8 g/dL	13,0-17,0 g/dL
Hematócrito (HCT)	25,2%	40-50 %
VCM	91,4 fL	83-101 fL
HCM	32,1 pg	27-32 pg
CHCM	35,1 g/dL	31,5-34,5 g/dL
RDW	20,4%	0,00-15,0 %

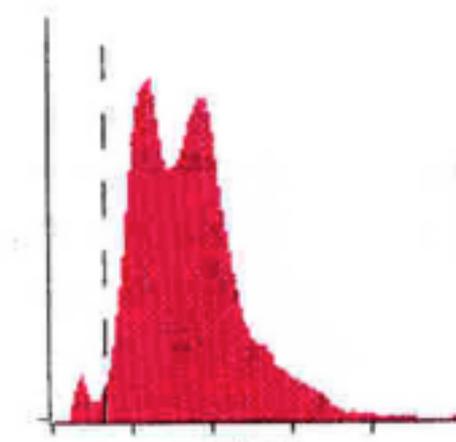


Figura 6- Histograma representando os dois picos eritrocitários.

Após a realização da transfusão sanguínea, o doente continuou a apresentar baixos valores de eritrócitos e de hemoglobina, estando anêmico ( $Hb < 13,0$  g/dL). O valor do RDW encontra-se bastante elevado, o que é indicativo de anisocitose, isto é, eritrócitos de diversos tamanhos. A anisocitose é uma consequência da transfusão sanguínea, uma vez que no sangue do doente existem duas populações distintas de eritrócitos, tal como se pode visualizar no histograma (Figura 6). No histograma é visível a existência de dois picos eritrocitários (dimorfismo eritrocitário) que correspondem a duas populações distintas de eritrócitos, uma

que corresponde à que pertence ao indivíduo e outra que é o resultado da transfusão sanguínea.

Uma vez que se verifica a alteração de diversos parâmetros do hemograma e de acordo com os critérios do laboratório, procedeu-se à elaboração de um esfregaço sanguíneo (Figura 7).

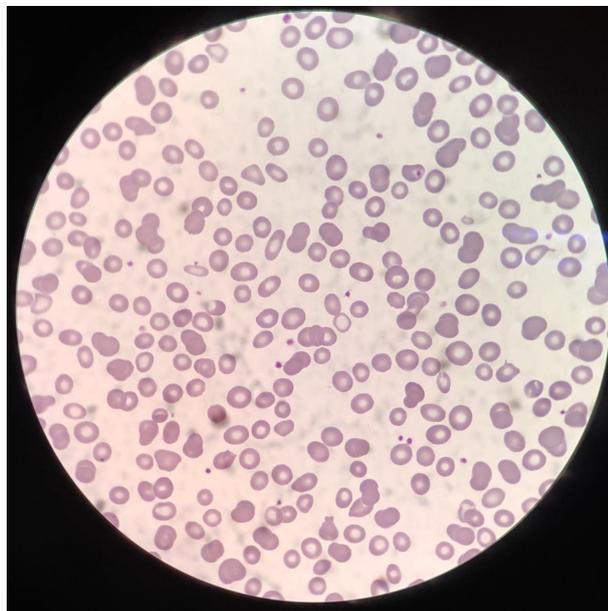


Figura 7- Esfregaço sanguíneo do doente, após a transfusão sanguínea.

No esfregaço sanguíneo, é evidente que existe uma anisocitose acentuada, isto é, eritrócitos com diversos tamanhos, tal como seria de esperar dado que o RDW apresenta um valor bastante elevado e devido à transfusão sanguínea. Existem eritrócitos com um tamanho mais reduzido e outros maiores. Para além disso, verificam-se alterações na coloração dos eritrócitos, anisocromia. Existem eritrócitos que apresenta uma coloração mais intensa, eritrócitos hiperocrómicos, logo apresentam uma concentração de hemoglobina mais elevada, o que está de acordo com o hemograma. Observam-se também, eritrócitos com uma coloração normal, isto é, a zona central do eritrócito ocupa aproximadamente um terço do diâmetro do eritrócito.

## **7. IMUNOLOGIA / ENDOCRINOLOGIA**

A imunologia é um ramo da ciência que se dedica ao estudo do sistema imunitário, o qual é um sistema complexo de estruturas e processos que atuam com o objetivo de proteção da doença. É uma ciência com extrema relevância, auxiliando no diagnóstico e evolução de patologias, na monitorização da terapêutica e na avaliação da eficácia da vacinação.<sup>10</sup>

Neste setor, os ensaios imunológicos são também usados para determinação de parâmetros na área da endocrinologia, entre outras.

### **7.1. Sistema Imunitário**

O sistema imunitário é composto por um conjunto de células específicas, órgãos, tecidos e moléculas que reconhecem e eliminam os agentes patogénicos, protegendo o ser humano de doenças infecciosas e do desenvolvimento de cancro. Quando funciona corretamente, identifica uma grande variedade de ameaças incluindo vírus, bactérias, parasitas. O sistema imunitário pode ser dividido em dois tipos, que caracterizam dois tipos de respostas diferentes: a imunidade inata, que apresenta respostas rápidas e com baixa especificidade e a imunidade adaptativa, a qual é representada por respostas altamente específicas.<sup>11-14</sup>

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa do organismo, com a qual já se nasce. Produz uma resposta rápida, uma vez que atua rapidamente aquando a invasão do organismo por um agente patogénico, e não é específica para um patógeno em particular. A imunidade inata é composta por barreiras físicas, celulares, fisiológicas e inflamatórias. As barreiras físicas representam os mecanismos constitutivos, elementos que são permanentemente expressos, da imunidade inata e incluem a pele, o muco e os cílios. O muco ao ser secretado sobrepõem-se nas células epiteliais gastrointestinais, genitourinárias e respiratórias. As barreiras celulares são compostas por células fagocíticas, como os neutrófilos, macrófagos e monócitos. Por fim, as barreiras fisiológicas e inflamatórias, incluem proteínas do sistema complemento e defensas, que fazem parte dos mecanismos constitutivos do sistema imunitário. Incluem, ainda, citocinas, enzimas, interferões, lípidos mediadores da inflamação, entre muitas outras proteínas e moléculas, que são indutíveis, uma vez que são libertadas a partir de outras células.<sup>15</sup>

Os mecanismos de defesa da imunidade adaptativa são ativados após a não remoção do agente patogénico pelos mecanismos de imunidade inata. A resposta produzida é mais lenta, podendo demorar dias ou semanas a ser detetada, no entanto, é específica para o agente patogénico, tendo a capacidade de o reconhecer e eliminar seletivamente, apresenta memória,

contribuindo para uma resposta mais rápida e eficaz num segundo contacto com o mesmo antigénio, conferindo imunidade a longo prazo contra inúmeros agentes. A imunidade adaptativa é representada pelas células B e pelas células T, mediadoras da imunidade humoral e celular, respetivamente. As células B diferenciam-se em células B de memória e plasmócitos, sendo as últimas, as células responsáveis pela produção de imunoglobulinas. As células T diferenciam-se em células T supressoras, células T citotóxicas e células T auxiliares.<sup>15,16</sup>

Na resposta adaptativa, primeiramente, ocorre a ativação do linfócito B *naive* por interação com um antigénio ou com uma célula T auxiliar, induzindo uma resposta imune primária. Após a ativação do linfócito B, ocorre a proliferação e diferenciação em plasmócitos, produtores de imunoglobulinas, geralmente do tipo IgM e células B de memória. Verifica-se o aparecimento de anticorpos cerca de 5 a 7 dias após o contacto com o agente patogénico e o pico é atingido 14 dias após o mesmo contacto. Num segundo contacto com o mesmo antigénio, é induzida uma resposta imune secundária, caracterizada por ser mais rápida, as imunoglobulinas são produzidas em quantidades mais elevadas e verifica-se o aparecimento das mesmas 1 a 2 dias após o contacto com o mesmo patogénio. Os anticorpos produzidos são sobretudo do tipo IgG, tal como é visível na Figura 8.<sup>15</sup>

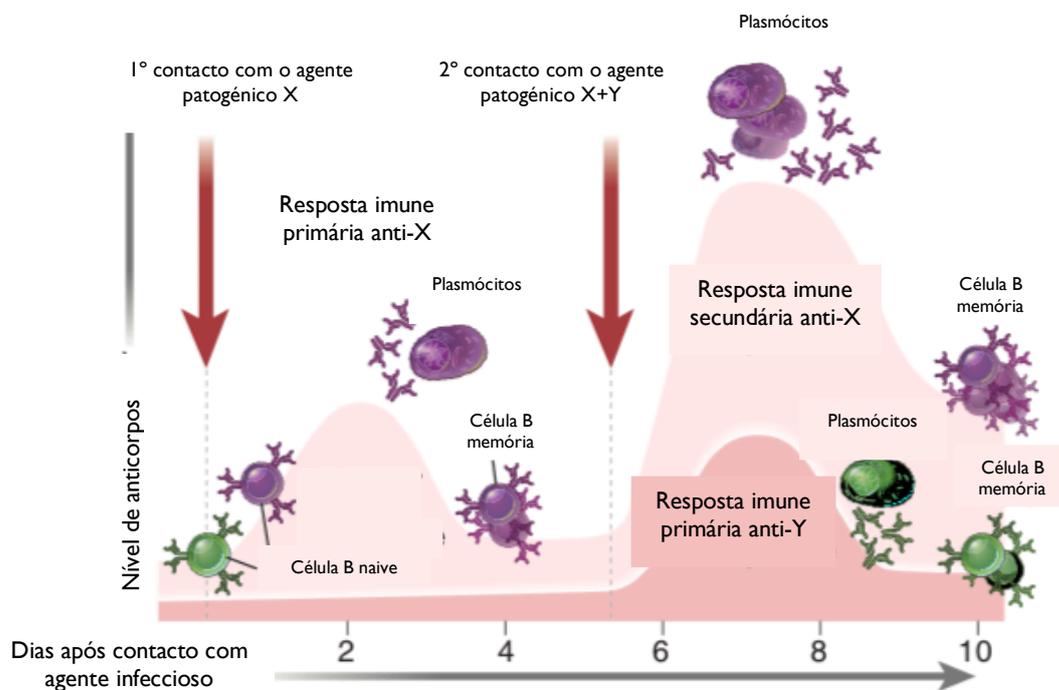


Figura 8- Representação da resposta imune primária e secundária. (Adaptado de Abbas et al., 2018)

Contudo, a imunidade inata e a imunidade adaptativa não são sistemas separados, são sistemas interativos e cooperam um com o outro, de modo a garantir uma resposta mais eficaz. A imunidade inata, sendo a primeira linha de defesa do organismo, é aquela que inicia a resposta imunitária e que tem capacidade de ativar e potencializar a imunidade adaptativa. No entanto, a imunidade adaptativa, depois de ativada, também tem a capacidade de estimular e aumentar a eficácia da resposta adaptativa. O sistema imunitário quando funciona corretamente, tem a capacidade de reconhecer os agentes estranhos tanto de origem externa como os patogênicos mas também os de origem interna, como o cancro. <sup>14,15</sup>

Em particular, a doença infecciosa é estabelecida quando um microrganismo (bactéria, vírus, fungo, parasita) consegue sobreviver à primeira linha de defesa do organismo e a imunidade adaptativa não é capaz de o eliminar. No entanto, aquando da invasão do organismo pelo agente infeccioso, as células intervenientes na imunidade adaptativa, têm a capacidade de produzir anticorpos, os quais são específicos para o agente patogénico. <sup>12</sup>

## **7.2. Equipamentos e Metodologia**

### **7.2.1. Architect® ci 8200**

No setor da imunologia, são realizados imunoensaios, para deteção de antígenos, anticorpos, hormonas, recorrendo-se ao equipamento Architect® ci 8200 da Abbot. A amostra preferencialmente processada neste setor é o soro, obtido por centrifugação do tubo amarelo. A técnica instrumental base destes imunoensaios é a Quimioluminescência com Micropartículas.

Os imunoensaios baseiam-se na reação específica que ocorre entre um antígeno e um anticorpo e na formação do complexo antígeno-anticorpo. Laboratorialmente, os antígenos e os anticorpos são usados como reagentes específicos neste tipo de ensaios. Os imunoensaios podem ser de dois tipos: imunoensaios homogêneos, em que está envolvida apenas uma fase líquida, não sendo necessárias lavagens, e imunoensaios heterogêneos, em que estão envolvidas duas fases, uma fase sólida e uma fase líquida, assim, são necessárias lavagens para a remoção dos antígenos ou anticorpos que não se ligaram. Os imunoensaios heterogêneos apresentam uma maior sensibilidade comparativamente aos imunoensaios homogêneos. A quimioluminescência insere-se neste tipo de imunoensaios heterogêneos. <sup>1</sup>

A Quimioluminescência refere-se à emissão de radiação visível aquando da passagem do eletrão do estado excitado para o estado fundamental, como resultado de uma reação química, estando, geralmente, envolvida uma reação de oxidação-redução. O antígeno ou o

anticorpo é marcado com um reagente quimioluminescente. A intensidade da luz emitida é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra. <sup>17,18</sup>

Particularmente, a Quimioluminescência com Micropartículas é um imunoenensaio que envolve dois passos, permitindo uma determinação quantitativa e qualitativa do analito. Primeiramente, a amostra é incubada juntamente com as micropartículas revestidas com antigénio ou anticorpo e com o diluente. Ocorre uma interação entre o antigénio/anticorpo que reveste as micropartículas e a amostra, se o analito em questão estiver presente. Seguidamente, é realizada uma lavagem para a remoção dos reagentes não ligados.

Após a lavagem, é adicionado um anticorpo secundário marcado com acridina e procede-se a um novo ciclo de lavagem. Por fim, são adicionadas as soluções pré-ativadora e ativadora, esta última, é a que inicia a fase final da reação, sendo emitida radiação quimioluminescente que é medida em unidades relativas de luz (RLU's) (Figura 9). Tal como foi explicado anteriormente, verifica-se uma relação de proporcionalidade direta entre a quantidade de analito em estudo e as unidades relativas de luz. <sup>19</sup>

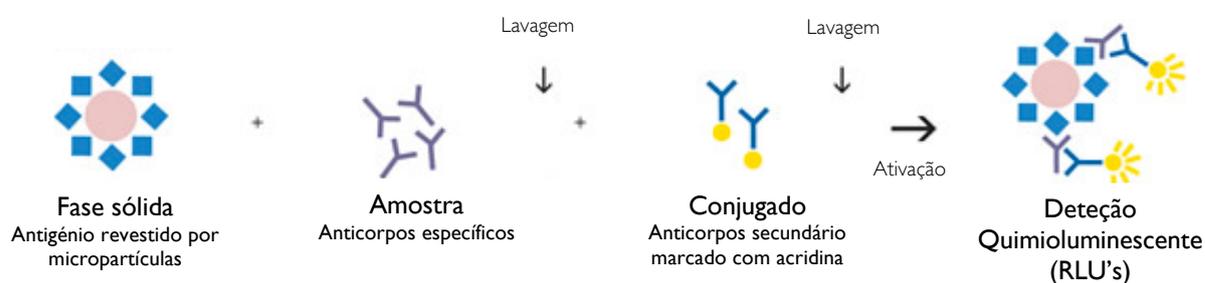


Figura 9- Imunoensaio de Quimioluminescência com Micropartículas (Adaptado de <https://www.menarinidiag.pt/pt-pt/home/produtos-para-laborat%C3%B3rio/autoimunidade/zenitra/caracteristicas/vantagens>)

Os imunoenensaio são usados em inúmeras áreas do laboratório de análises clínicas que incluem não só a imunologia, mas também a microbiologia, a química clínica, a toxicologia, a endocrinologia e a hematologia. <sup>12</sup>

### 7.3. Marcadores Víricos

Os vírus são organismos que apresentam um tamanho muito pequeno, submicroscópicos. São constituídos apenas por um tipo de ácido nucleico, RNA ou DNA, o qual pode estar em cadeia simples ou dupla cadeia, podendo ainda ser linear, circular ou segmentado. O genoma viral encontra-se envolvido por uma camada proteica, a cápside. Algumas espécies virais apresentam uma membrana exterior, o envelope. Os vírus são

parasitas intracelulares obrigatórios, não crescem nem se reproduzem por divisão, reproduzem-se no interior das células hospedeiras.<sup>20,21</sup>

### **7.3.1. Hepatites Virais**

O termo hepatite corresponde a uma inflamação do fígado, a qual pode ser causada por determinados fármacos, pela ingestão excessiva de álcool, mas também pode ser de origem bacteriana e vírica. Existem vários vírus capazes de causar hepatite, contudo, os mais frequentes e que se destacam são os vírus das hepatites A, B, C, D, E.<sup>22</sup> No presente relatório apenas são abordados os vírus responsáveis pelas hepatites A, B e C.

Geralmente, a hepatite é uma doença aguda e auto-limitada mas pode evoluir para uma infeção crónica, o que causa uma inflamação hepática persistente, podendo levar à ocorrência de falha hepática, carcinoma hepatocelular e cirrose. As manifestações clínicas são bastante variáveis, existindo indivíduos assintomáticos, com sintomas ligeiros, severos ou mesmo fatais. A grande variabilidade de manifestações clínicas e o facto de não serem específicas para um dado vírus, faz com que não seja possível a distinção dos diferentes tipos de vírus e, assim, o diagnóstico não pode ser realizado com base nas mesmas. Deste modo, é necessário recorrer a testes serológicos para identificar o tipo de vírus responsável pela infeção.<sup>11,12,22</sup>

#### **→ Hepatite A**

O vírus da hepatite A (HAV) pertencente à família *Picornaviridae*, é um pequeno vírus de RNA de cadeia simples com polaridade positiva (ssRNA), não envelopado.<sup>11</sup>

A hepatite A, também chamada de hepatite infecciosa ou de curto período de incubação, é uma doença tipicamente aguda e auto-limitada, não evoluindo para uma hepatite crónica.<sup>12</sup>

O vírus, que apresenta uma grande prevalência nos países em desenvolvimento, transmite-se por via fecal-oral, através de água e alimentos contaminados, mas também se pode transmitir horizontalmente, devido ao contacto pessoa-pessoa. Raramente ocorre transmissão por via parenteral, devido exposição a sangue. A prevalência do vírus tem vindo a diminuir ao longo do tempo devido ao aumento das condições socioeconómicas, de higiene e sanitárias e à existência de uma vacina.<sup>11</sup>

Verifica-se um período de incubação, em média, de 4 semanas (30 dias) e um período de aproximadamente 4 semanas (30 dias), em média, desde o contacto com o vírus da hepatite A até ao aparecimento dos primeiros sintomas. Contudo, muitos indivíduos, especialmente crianças não apresentam sintomas da infeção. Pelo contrário, indivíduos mais velhos

apresentam maior suscetibilidade, sendo as manifestações clínicas mais severas. A suscetibilidade à infecção é independente da raça e do sexo. As manifestações clínicas mais comuns são: icterícia, urina escura, fezes descoloradas, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, febre. <sup>12,22</sup>

Relativamente à cinética do vírus e ao perfil serológico, verifica-se a presença do HAV na corrente sanguínea (virémia) antes do aparecimento de qualquer sintoma, sendo este um período curto. Do mesmo modo, a excreção do vírus nas fezes ocorre antes do aparecimento das manifestações clínicas, atingindo o valor máximo aquando do aumento das transaminases (ALT) e baixando após o aparecimento dos sintomas. Os níveis de anticorpos anti-HAV começam a ser detetáveis depois do aumento das transaminases. O primeiro anticorpo a ser detetado, durante a fase aguda da doença, é o anti-HAV IgM e antes do abaixamento dos níveis deste, começam a aumentar os níveis de anti-HAV IgG (Figura 10). <sup>22-24</sup>

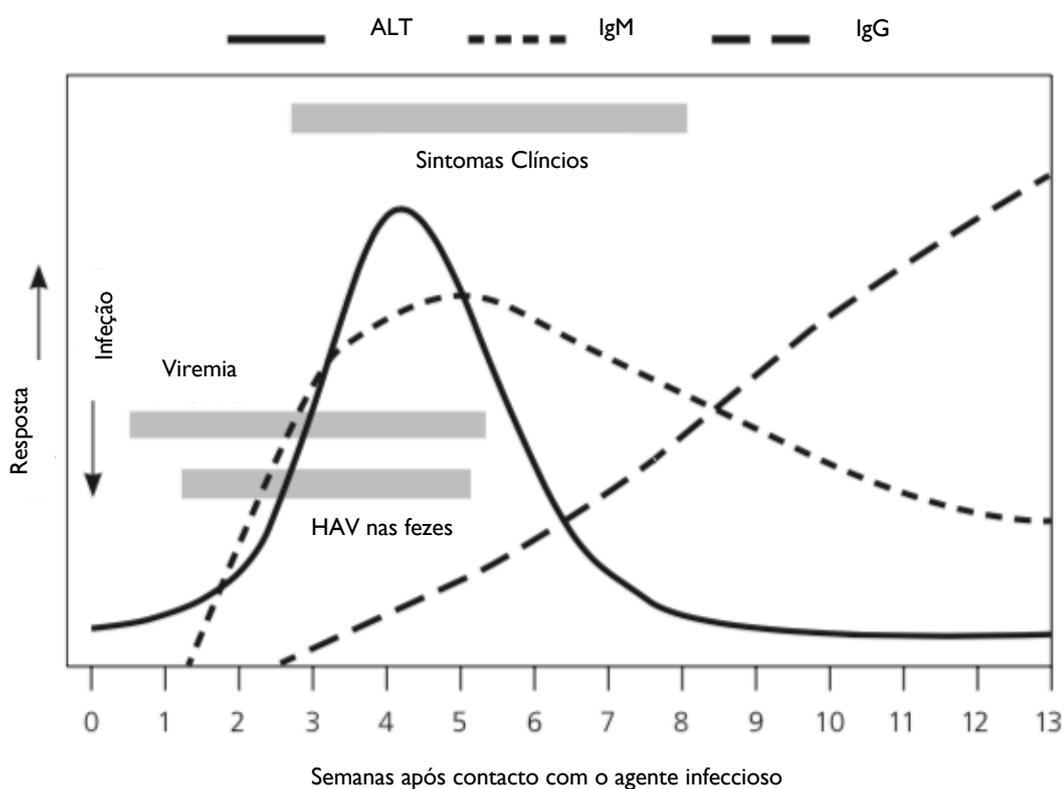


Figura 10- Perfil serológico da hepatite A. (Adaptado de Matheny & Kingery, 2012)

Os **Anticorpos anti-HAV IgM** surgem na fase aguda da doença, são os primeiros anticorpos a serem detetados. Podem persistir no soro 3 a 6 meses após a infecção. Deste modo, são anticorpos que estão presentes tanto na fase aguda como na fase de convalescença, sugerindo uma infecção recente. <sup>23</sup>

Os **Anticorpos anti-HAV IgG** surgem antes do decaimento dos níveis de anti-HAV IgM. São anticorpos detetáveis durante toda a vida, uma vez que são protetores, conferindo imunidade a longo prazo. Quando os dois tipos de anticorpos, anti-HAV IgM e anti-HAV IgG, são detetáveis em simultâneo, significa que a infecção é recente. Por outro lado, níveis aumentados de anticorpos anti-HAV IgG, isoladamente, significa que a infecção foi resolvida ou o indivíduo em questão foi vacinado.<sup>23</sup>

## → Hepatite B

A hepatite B, também é designada de hepatite sérica ou de longo período de incubação, é uma doença que infeta cerca de 240 milhões de pessoas em todo o mundo. Cerca de 95% dos indivíduos afetados apresentam uma doença aguda e auto-limitada, recuperando ao fim de algum tempo, contudo, pode evoluir para uma hepatite fulminante ou infecção crónica, podendo resultar em carcinoma hepatocelular ou cirrose.<sup>11,25</sup>

O vírus da hepatite B (HBV) é um vírus de DNA circular de dupla cadeia (dsDNA), em que uma das cadeias é parcialmente incompleta. É um vírus envelopado pertencente à família *Hepadnaviridae*. O virião infeccioso é composto por: um envelope rico em lipoproteínas, onde se encontra o antigénio de superfície viral, HBsAg; a cápside, formada pelo antigénio estrutural do core, HBcAg, e pelo antigénio solúvel, HBeAg; DNA polimerase.<sup>22</sup>

O HBV é a infecção crónica viral mais comum no mundo, apresentando três modos de transmissão principais, transmissão vertical, isto é, de mãe para filho, sexual e transmissão percutânea, devido a agulhas contaminadas, transfusões sanguíneas ou hemodiálise. O vírus não tem capacidade de atravessar a pele nem as mucosas, logo é necessário haver algum tipo de quebra nestas barreiras para que ocorra a transmissão do mesmo por via mucocutânea.<sup>12,25</sup>

Apesar do número elevado de infetados, a implementação da vacinação nos recém-nascidos e nos adultos de elevado risco, tem um papel importante não só na diminuição da incidência do vírus, mas também na diminuição de casos de carcinoma hepatocelular. A pesquisa de DNA e antigénios virais nos doadores de sangue também se tem demonstrado ser fundamental para a redução da transmissão.<sup>25</sup>

Verifica-se que menos de 15% dos indivíduos infetados com HBV desenvolvem sintomatologia e menos de metade destes têm icterícia como sintoma. As manifestações clínicas geralmente observadas incluem fadiga, mal-estar, náuseas, febre, urina escura, fezes descoradas. A sintomatologia depende da idade e da maturidade do sistema imunológico,

assim, recém-nascidos e crianças raramente apresentam sintomas, havendo uma grande probabilidade de progredir para uma infeção crónica.<sup>22</sup>

No Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar, são determinados 3 marcadores serológicos fundamentais no auxílio do diagnóstico: HBsAg, anti-HBs e anti-HBc.

O **HBsAg**, produzido pelo gene da superfície viral, é um marcador de infeção, quer seja uma infeção aguda ou crónica. No caso de uma infeção aguda, o HBsAg, geralmente desaparece em 4 a 6 meses após a sua deteção. A persistência do HBsAg por um período superior a 6 meses é um indicador de uma infeção crónica.<sup>25</sup>

O **Anti-HBs** é o último anticorpo a ser detetado no soro, cerca de 6 meses após a infeção e depois do desaparecimento do HBsAg. Este anticorpo confere imunidade, protegendo contra reinfeção, desenvolve-se durante o período de recuperação da infeção aguda por HBV. No entanto, também é um marcador presente em indivíduos que adquiriram imunidade através da vacinação.<sup>12,22,25</sup>

O **Anti-HBc (total)** é o primeiro anticorpo a ser detetado no perfil serológico, surgindo 1 a 2 semanas após a deteção do HBsAg. Durante a fase aguda são produzidos os anticorpos do tipo IgM, sendo substituídos pelos anticorpos do tipo IgG em 3 a 6 meses. Uma vez detetados, estes anticorpos permanecem detetáveis durante toda a vida. Deste modo, através da quantificação do anti-HBc total, não é possível saber qual o momento da infeção, se é uma infeção recente ou passada. Permite diferenciar um indivíduo que já esteve em contacto com o vírus de outro que foi vacinado.<sup>12,22,25</sup>

O **HBeAg** é geralmente detetado 1 a 2 semanas após a deteção do HBsAg. É um marcador de replicação viral, logo um resultado positivo significa que a replicação viral se encontra ativa. Assim que o HBeAg desaparece, tornando-se indetetável, aparece o anticorpo **anti-HBe**.<sup>12</sup>

Relativamente ao perfil serológico do HBV, este é diferente para a infeção aguda e para a infeção crónica. Contudo, há algumas semelhanças entre os dois, em ambos é detetada a presença do DNA viral 2 a 5 dias após a exposição ao agente infeccioso, 2 a 10 semanas após a mesma exposição verifica-se a presença do antigénio de superfície viral (HBsAg) no soro, antes do aparecimento de qualquer sintoma e do aumento das transaminases. O primeiro

anticorpo a ser detetado, tanto na hepatite aguda como na crónica, é dirigido para a proteína do core, o anti-HBc, o qual surge 1 a 2 semanas após a deteção do HBsAg.<sup>22,25</sup>

No perfil serológico da infeção aguda, o primeiro marcador serológico a ser detetado é o HBsAg, marcador de infeção. De seguida, é detetado o primeiro anticorpo, dirigido para as proteínas do core, anti-HBc. Primeiramente surgem os anticorpos do tipo IgM e só depois do tipo IgG, de modo que anti-HBc total é sempre detetável. Verifica-se a existência de um período janela, que compreende o desaparecimento do HBsAg e a deteção do anti-HBs, o que indica recuperação da infeção. Inicialmente, HBeAg é detetável, o que significa que está a ocorrer replicação viral, contudo, os seus níveis começam a diminuir e o anticorpo anti-HBe torna-se positivo (Figura 11).<sup>12,22</sup>

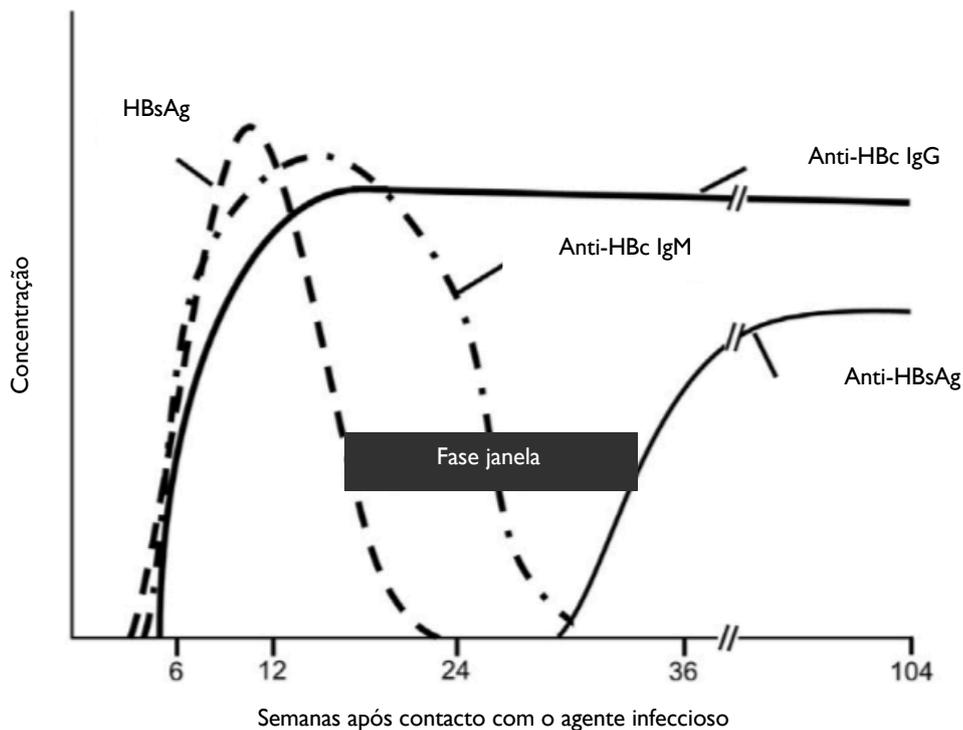


Figura 11- Perfil serológico da hepatite B aguda. (Adaptado de Prasadhrathsint and Stapleton, 2019)

Em indivíduos com infeção crónica por HBV, no perfil serológico, o HBsAg permanece detetável mais do que 6 meses, podendo ser detetado durante anos. O anticorpo anti-HBc (total) é um marcador serológico presente em todas as infeções crónicas, quer sejam sintomáticas ou assintomáticas, embora o anti-HBc do tipo IgM represente uma fração mínima. Não são detetáveis os anticorpos que conferem imunidade, anti-HBs. O HBeAg permite a distinção entre um doente com uma infeção crónica com replicação viral ativa, de outro com replicação viral não ativa. O perfil serológico da hepatite B crónica encontra-se representado na Figura 12.<sup>12</sup>

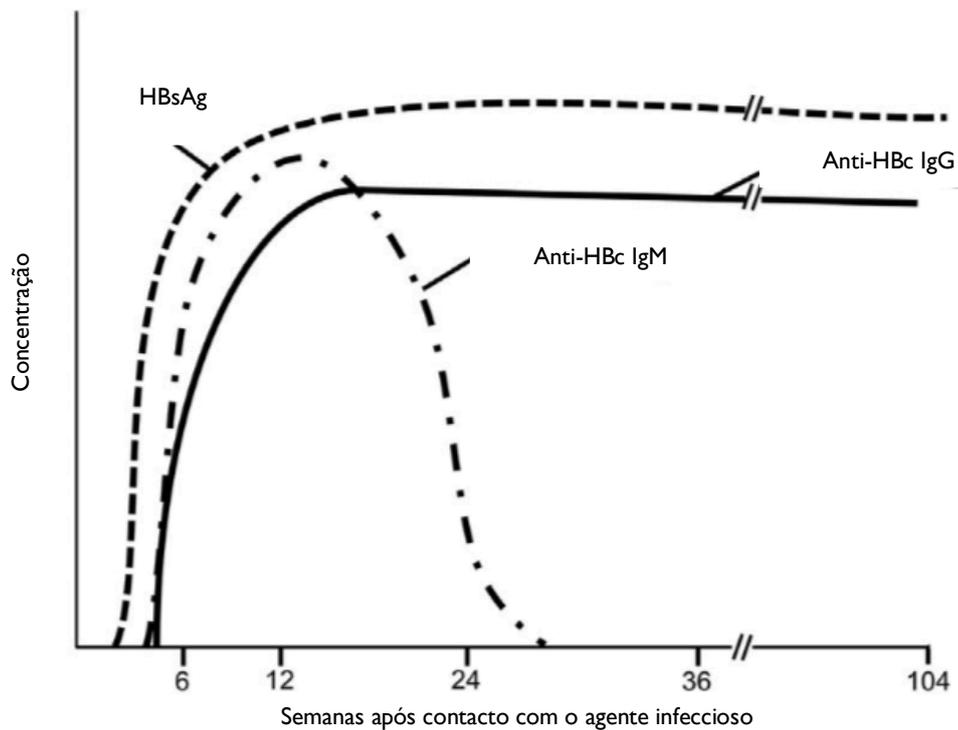


Figura 12- Perfil serológico da hepatite B crônica. (Adaptado de Prasadthathsint and Stapleton, 2019)

Tabela 13- Interpretação dos marcadores serológicos do vírus da hepatite B (Adaptado de Turgeon, 2014)

HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc (total)	Interpretação
-	-	-	Suscetível (ausência de contacto com o vírus)
+	-	+	Infeção aguda (se IgM anti-HBc +) ou crónica (se IgM anti-HBc -)
-	+	+	Imunidade devido a infeção Recuperação da infeção aguda
-	+	-	Imunidade conferida por vacinação
-	-	+	Infeção passada com perda de anti-HBs Recuperação de uma infeção aguda Resultado falso positivo (susceptível) Infeção crónica em que os níveis de HBsAg não são detetáveis

## → Hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV) pertence à família *Flaviviridae*. É um vírus de RNA de cadeia simples (ssRNA), esférico e envelopado. Uma vez que é um vírus de cultura difícil, as técnicas imunológicas e moleculares têm um papel relevante no auxílio do diagnóstico, bem como na monitorização da terapêutica. <sup>22,26</sup>

A hepatite C pode manifestar-se como uma doença aguda ou progredir e evoluir para uma infeção crónica. Os sintomas são variáveis, podendo não existir qualquer sintomatologia, ou podendo apresentar sintomas leves, severos, prolongados ou fatais. Na infeção aguda, a maioria dos indivíduos não apresenta manifestações clínicas, o que dificulta o diagnóstico. Os indivíduos que apresentam sintomas, que representam a minoria, têm sintomas inespecíficos como febre. Menos de 25% dos infetados apresentam icterícia. A infeção crónica é definida por durar mais de 6 meses e raramente há sintomatologia, provocando uma infeção hepática que pode evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular. Os níveis das transaminases são flutuantes no decorrer da infeção crónica. <sup>12,22</sup>

A transmissão do HCV ocorre mais frequentemente por via parenteral, devido a agulhas contaminadas, transfusões sanguíneas e verticalmente, de mãe para filho. Outro modo de transmissão, embora não tão frequente, é por via sexual. <sup>12</sup>

Relativamente ao perfil serológico e à cinética do vírus, o primeiro marcador detetável é o RNA viral, 1 a 3 semanas após o contacto com o vírus, e só depois é que se verifica um aumento das transaminases (ALT), apresentando flutuações no decorrer da infeção. Após o pico das transaminases são detetados os anticorpos anti-HCV totais (Figura 13). <sup>22,26</sup>

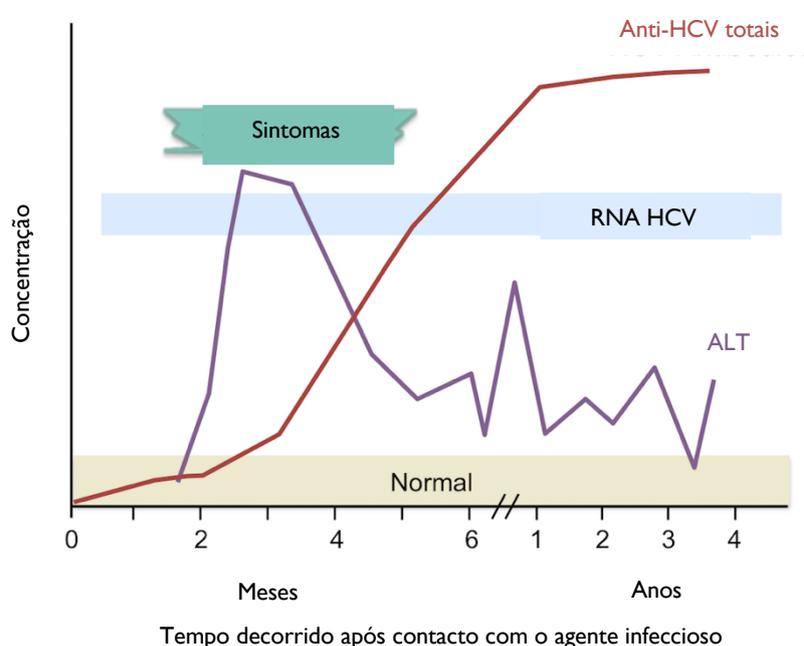


Figura 13-Perfil serológico da hepatite C. (Adaptado de CDC, consultado dia 12/09/2020)

Os anticorpos anti-HCV surgem no soro 4 a 24 semanas após o aparecimento dos sintomas. Primeiramente surgem os anticorpos anti-HCV do tipo IgM e só depois surgem do tipo IgG, contudo, o ensaio não faz a distinção entre os dois tipos. Desta forma, **anti-HCV total** não indica o estado da infeção, não diferenciando uma infeção recente de uma passada. Quando o resultado é positivo, significa que o doente já teve a infeção ou está infetado, sendo necessário fazer uma pesquisa do genoma viral (RNA) para posterior confirmação. <sup>11</sup>

### 7.3.2. HIV

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) infeta cerca de 35 milhões de pessoas no mundo, causando uma infeção crónica incurável. É o principal responsável pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). <sup>1,27</sup>

É um vírus de RNA composto por uma única cadeia (ssRNA), envelopado e pertencente à família *Retroviridae*. O genoma viral é composto por 3 genes principais (*pol*, *gag*, *env*) e 6 genes acessórios. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais da cápside, nucleocápside e matriz, a p24, p17 e p7, respetivamente. Por sua vez, o gene *env* codifica as glicoproteínas gp120 e gp41, associados ao envelope viral. Por fim, o gene *pol* codifica a transcriptase reversa, uma enzima essencial à replicação do genoma viral. <sup>12</sup>

Verifica-se a existência de 2 espécies virais capazes de causar a infeção por HIV, sendo a maioria causada por HIV-1, que foi o primeiro a ser identificado e responsável pela SIDA epidémica. O HIV-2 é estruturalmente semelhante ao HIV-1, contudo, é menos virulento e apresenta uma distribuição geográfica mais limitada, sendo endémico na África Ocidental, tendo sido também identificado noutros locais do mundo, embora com frequências muito mais baixas. O HIV transmite-se por via sexual e parenteral, mas também, verticalmente, de mãe para filho, in útero, no decorrer do parto e no processo de aleitamento. <sup>12,27,28</sup>

A glicoproteína do HIV, gp120, liga-se ao recetor CD4, preferencialmente dos linfócitos T, mas também a outras células que expressam CD4 como monócitos, macrófagos entre outras. A ligação da partícula viral ao recetor CD4 induz alterações conformacionais no envelope viral, permitindo a posterior a ligação ao corecetor CCR5 ou CXCR4. A subunidade gp41 do envelope viral, permite a fusão da membrana do vírus com a membrana da célula hospedeira. Após a fusão das membranas, o genoma viral fica exposto, permitindo a ação da transcriptase reversa, que tem a capacidade de converter o RNA viral em DNA, o qual é integrado no genoma do indivíduo infetado. Como resultado das reações que ocorrem normalmente na célula, como a transcrição e a translação, são produzidas novas partículas virais, o que se traduz na existência de cada vez mais células infetadas. <sup>12,29</sup>

Tipicamente, existem 3 fases de infecção num indivíduo infetado e não sujeito a tratamento. Durante estas fases, a replicação viral leva à apoptose dos linfócitos T CD4. No decorrer da primeira fase, designada de fase aguda ou infecção primária, verifica-se uma multiplicação rápida e disseminação do vírus, uma diminuição de células T CD4 e o aparecimento do antígeno p24 (proteína do core) na circulação sanguínea. Os indivíduos podem apresentar sintomatologia típica de uma gripe como dores de cabeça e febre. Verifica-se, a existência de uma fase janela, que compreende o período desde o contacto com o agente infeccioso até ao aparecimento de anticorpos. A segunda fase, caracterizada por ser assintomática, é caracterizada por latência clínica, mas não viral. No decorrer desta fase, continua a ocorrer a multiplicação do vírus, embora a níveis reduzidos, não se verificando virémia. Os anticorpos produzidos pelo sistema imunitário ligam-se ao antígeno p24 para a formação de complexos antígeno-anticorpo, resultando num decréscimo do antígeno p24 livre. Por fim, durante a última fase, SIDA, a replicação viral continua resultando numa destruição de linfócitos T CD4, que atinge valores inferiores a 200 células/  $\mu\text{L}$ . Estes valores são críticos e levam a uma diminuição da função imune, o que faz com que as defesas do organismo entrem em colapso, contribuindo para o aumento do risco de desenvolvimento de infeções oportunistas e sintomas. Os sintomas desta última fase incluem febre, perda rápida de peso, perda de memória, depressão. As infeções oportunistas, geralmente são causadas por microrganismos comuns, contudo nesta fase são capazes de causar infeções mais severas, podendo conduzir à morte. Para além disso, pode ainda contribuir para o desenvolvimento de linfomas e cancro (Figura 14).<sup>12,30</sup>

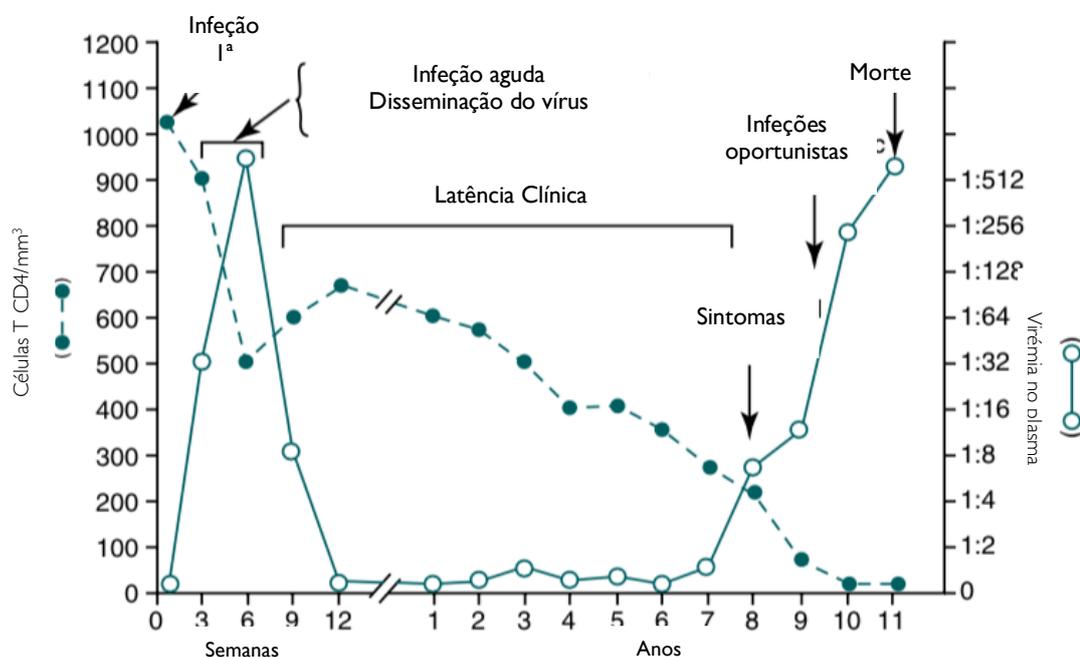


Figura 14- Perfil serológico do HIV (Adaptado Turgeon, 2014)

O teste **HIV Ag/Ac** é um imunoenensaio de 4ª geração, permitindo a detecção de um marcador de antigenemia, p24, proteína estrutural do core do HIV-1 e dos anticorpos dirigidos contra HIV tipo 1 (HIV-1) e HIV tipo 2 (HIV-2). Uma vez que detecta o antígeno p24, permite diagnosticar a infecção numa fase inicial, antes da seroconversão e da detecção de anticorpos. Contudo, não permite a distinção individual entre a detecção do antígeno p24, anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2.<sup>30</sup>

## **7.4. Marcadores Bacterianos**

As bactérias são microrganismos constituídos por uma única célula (unicelulares) e sem membrana nuclear, o material genético é encontrado disperso no citoplasma (procariontes). Estes microrganismos têm uma grande capacidade de adaptação a diferentes ambientes, através da seleção de mutantes. Clinicamente, são uma grande causa de doenças infecciosas.<sup>31</sup>

### **7.4.1. Sífilis**

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível (DST) que infeta cerca de 12 milhões de pessoas por ano. É causada por uma espiroqueta, *Treponema pallidum*, uma bactéria que não é corada pela coloração de gram e não cultivável em meios artificiais. A sífilis é transmitida por via sexual, mas também por via vertical, de mãe para filho durante a gestação ou no parto.<sup>1,12</sup>

Quando não é tratada, a sífilis é uma doença crónica, em que os indivíduos apresentam períodos assintomáticos alternados com períodos sintomáticos. Tipicamente, existem 3 estádios da infecção: a sífilis primária, secundária e terciária, podendo verificar-se a existência de um período de latência entre a sífilis secundária e terciária. Na sífilis primária, forma-se uma lesão inflamatória, cancro duro, no local de entrada das espiroquetas. Na maioria dos casos verifica-se a existência de apenas uma lesão, contudo, também podem ocorrer múltiplas lesões. Duas a oito semanas após o aparecimento do cancro duro, verifica-se o aparecimento de sintomatologia típica da sífilis secundária. Esta é a fase mais contagiosa, pois a bactéria atinge a circulação sanguínea e dissemina-se noutros tecidos. É caracterizada por uma doença generalizada (dores de cabeça e de garganta, febre, erupções cutâneas que contêm grande número de espiroquetas, linfadenopatia). No entanto, por vezes os sintomas da sífilis primária e secundária são leves e os doentes não se apercebem dos mesmos. Por fim, a sífilis terciária, que pode aparecer 3 a 10 anos a infecção primária, é responsável por problemas médicos severos. As lesões são variáveis conforme os órgãos atingidos.<sup>1,12</sup>

Serologicamente, são produzidos dois tipos de anticorpos diferentes: anticorpos específicos para *Treponema pallidum* e anticorpos não específicos para a mesma espiroqueta, designados de anticorpos antitreponema e anticorpos não treponémicos ou reaginas, respetivamente. Relativamente aos anticorpos antitreponema, aproximadamente 2 semanas após a exposição ao agente infeccioso, surgem os anticorpos do tipo IgM e 2 semanas após a produção destes, detetam-se os do tipo IgG, os quais se tornam predominantes. O grande aumento nos níveis de anticorpos antitreponema do tipo IgG ocorre na sífilis secundária. As reaginas, anticorpos não específicos, são produzidas em indivíduos infetados com sífilis, mas também são resultado de outras doenças infecciosas com lepra, tuberculose, malária, hepatite, bem como de determinadas doenças autoimunes. Estes anticorpos são detetados nas primeiras 4 semanas após a infeção primária e os seus valores são praticamente constantes durante aproximadamente 6 meses.<sup>12,32</sup>

O diagnóstico da sífilis é realizado com base em testes serológicos, uma vez que a bactéria responsável pela doença (*T.pallidum*) não é capaz de crescer em meios de cultura artificiais. Deste modo, são realizados testes treponémicos e não treponémicos. Os testes não treponémicos, como VDRL, baseiam-se na deteção de reaginas. Contudo, necessitam de confirmação através de um teste treponémico.<sup>32</sup>

O teste da **sífilis TP** (Abbott Diagnosis) é um teste treponémico, baseado na deteção de anticorpos específicos contra a espiroqueta causadora da doença. Este teste permite o diagnóstico da doença, sendo também usado para a confirmação de resultados positivos obtidos através de testes não treponémicos.

## **7.5. Marcadores Tumorais**

Os marcadores tumorais são substâncias produzidas pelo tumor ou pelo sistema imunitário em resposta ao mesmo, mas também podem ser substâncias presentes no tumor, permitindo diferenciar uma célula normal e saudável de uma célula tumoral. Alguns marcadores tumorais são usados para rastrear e diagnosticar cancro, contudo, são pouco específicos, apresentando maior utilidade na monitorização da doença.<sup>1</sup>

### 7.5.1. PSA

O Antígeno Específico da Próstata (PSA) é uma glicoproteína produzida pela próstata, tornando-o um marcador específico para o tecido da próstata. Contudo, não é um marcador específico para o cancro da próstata, uma vez que níveis elevados de PSA não indicam sempre a presença de um cancro da próstata, podendo estar aumentados quando ocorrem alterações na estrutura glandular devido a uma inflamação benigna ou maligna, prostatites e infeções do trato urinário. Da mesma forma, resultados dentro dos valores de referência também não indicam a ausência de cancro da próstata. Os níveis de PSA permitem uma monitorização da progressão do tumor e da resposta do sistema imunitário ao tratamento. <sup>1,33</sup>

A medição do **PSA total** inclui duas frações distintas, a fração que circula no sangue complexado ou ligado a proteínas e a que existe livremente na circulação sanguínea (PSA livre). Este é um marcador que apresenta uma baixa especificidade na distinção entre cancro da próstata e hipertrofia benigna da próstata. <sup>34,35</sup>

O **PSA livre**, existe livremente na circulação sanguínea, sendo um marcador mais específico do que o PSA total e que permite a distinção entre cancro da próstata e hipertrofia prostática benigna. Laboratorialmente, este marcador só é doseado se o valor de PSA total for superior a 4 ng/mL. <sup>34</sup>

Geralmente, após determinação do PSA total e do PSA livre é calculada a razão PSA livre / PSA total. Contudo, a avaliação da razão PSA livre / PSA total é particularmente útil para valores de PSA total compreendidos entre 4 e 12 ng/mL. Valores mais baixos da relação estão associados a um maior risco de cancro da próstata, podendo ser necessário a realização de uma biópsia. Por outro lado, valores mais elevados estão mais relacionados com doença prostática benigna. Sendo assim, a determinação da mesma razão reduz a realização de biópsias desnecessárias. <sup>1,33</sup>

## 7.6. Marcadores de Avaliação da Função Tiroideia

### 7.6.1. TSH

A TSH (hormona estimuladora da tiróide) é uma hormona regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise. É produzida na hipófise, atuando ao nível da glândula da tiróide. A sua

produção e libertação é estimulada pela TRH (hormona libertadora de tireotropina), produzida no hipotálamo. A TSH apresenta um papel importante na modulação das hormonas produzidas pela tiróide, estimulando as células foliculares a produzir e secretar  $T_3$  e  $T_4$ . O controlo da secreção de TSH ocorre por feedback negativo, uma vez que uma diminuição nos níveis das hormonas tiroideias resulta num aumento da secreção sendo que contrário também se verifica, aumentos nos níveis de hormonas da tiróide traduz-se numa supressão da TSH. Apresenta utilidade no auxílio do diagnóstico da maioria dos indivíduos com suspeita de hipertiroidismo e hipotiroidismo.<sup>36</sup>

Um valor de TSH aumentado é o marcador principal e indicativo de hipotiroidismo primário. O hipotiroidismo primário é uma condição clínica caracterizada pela deficiente produção de hormonas da tiróide, tendo várias etiologias e diferentes manifestações clínicas. A baixa concentração de hormonas tiroideias resulta num aumento da secreção de TSH, o que resulta em níveis elevados de TSH.<sup>37</sup>

### 7.6.2. Hormonas tiroideias

A glândula da tiróide é estimulada pela TSH, produzindo e secretando duas hormonas principais: triiodotironina ( $T_3$ ) e tiroxina ( $T_4$ ). Contudo, as hormonas tiroideias não são produzidas em proporções iguais, a  $T_4$  é produzida em maior quantidade e só aproximadamente 20% de  $T_3$  é que se produz na tiróide. Verifica-se que a maioria da  $T_3$  resulta de uma reação de desiodinação, que ocorre nos tecidos periféricos.<sup>36,38</sup>

As hormonas tiroideias, geralmente encontram-se ligadas a proteínas transportadoras, permitindo o aumento do seu tempo de meia vida e o transporte das mesmas. Entre as proteínas de transporte destacam-se a globulina de ligação à tiroxina (TGB), que apresenta uma elevada afinidade pelas hormonas tiroideias, mas que existe em baixas concentrações e a albumina, que por outro lado apresenta uma afinidade reduzida pelas mesmas hormonas. No entanto, a ligação da  $T_3$  e da  $T_4$  a às proteínas transportadoras torna-as inativas.<sup>36,38</sup>

Apenas cerca de 0,04% da  $T_3$  é que se encontra na sua forma livre ( $T_3$  livre), a forma biologicamente ativa. No caso da  $T_4$  cerca de 0,02% é que se encontra na forma livre ( $T_4$  livre). A  $T_4$  tem uma afinidade baixa pelo recetor nuclear da hormona da tiróide, o que indica que a  $T_3$  necessita de ser convertida na forma ativa  $T_3$ .<sup>36,38</sup>

A avaliação da função da tiróide é realizada tendo por base os 5 marcadores básicos referidos anteriormente: **TSH,  $T_3$  total,  $T_3$  livre,  $T_4$  total e  $T_4$  livre**. Contudo, a  $T_3$  livre e a  $T_4$  livre são os marcadores mais relevantes para a avaliação da função e das doenças da tiróide.<sup>38</sup>

## Caso Clínico 2

Um indivíduo de 25 anos do sexo masculino dirigiu-se ao laboratório, no âmbito da saúde operacional, após a chegada de uma missão militar. Foram realizados alguns parâmetros analíticos. Os resultados obtidos e o seu histórico encontram-se representados na Tabela 14:

Tabela 14- Boletim analítico do doente.

Parâmetro	Resultado (10-01-2020)	Resultado (06-12-2018)	Valores de referência
AST	32 UI/L	25 UI/L	<34 UI/L
ALT	54 UI/L	54 UI/L	<55 UI/L
$\gamma$ -GT	29 UI/L	46 UI/L	<64 UI/L
Ac anti-HAV IgG	Positivo	Negativo	-

Analisando os valores obtidos, podemos verificar que não existe nenhum dano hepatocelular, uma vez que as transaminases (AST e ALT) e a  $\gamma$ -GT apresentam resultados dentro dos valores de referência.

Contudo, verifica-se que o marcador da hepatite A, Ac anti-HAV IgG, apresenta um valor positivo, sendo que este parâmetro anteriormente apresentava um resultado negativo. O vírus da hepatite A é responsável por uma doença aguda e auto-limitada, nunca evoluindo para uma infeção crónica, além disso, alguns indivíduos infetados não apresentam sintomatologia. Deste modo, há duas hipóteses possíveis: o indivíduo esteve em contacto com o vírus da hepatite A, tendo sido a infeção resolvida, ou foi vacinado.

Os Ac anti-HAV IgG conferem proteção contra a reinfeção pelo vírus da hepatite A, sendo detetáveis durante toda a vida. Caso se tratasse de um caso de infeção, seria possível saber se esta se trataria de uma infeção recente ou de uma infeção passada, recorrendo-se ao doseamento dos Ac anti-HAV IgM. Se se tratasse de uma infeção recente, os dois marcadores (Ac anti-HAV IgG e Ac anti-HAV IgM) poderiam ser detetados em simultâneo.

## **8. BIOQUÍMICA**

A Bioquímica é uma área da ciência multidisciplinar que apresenta utilidade no auxílio do diagnóstico e monitorização de determinadas patologias e na monitorização da terapêutica. Para além disso, é também neste setor que são realizados os testes toxicológicos para a pesquisa de determinadas drogas de abuso.

Este é um dos setores que apresenta maior grau de automatização, estando sujeito a alterações contínuas devido ao aparecimento e introdução de novas tecnologias e ao aparecimento de equipamentos cada vez mais sofisticados.

Permite a avaliação de uma grande variedade de fluidos corporais, sendo as amostras mais comumente analisadas o soro, plasma e a urina, analisados no equipamento Architect®ci 8200, e o sangue total, analisado no equipamento ADAMS A<sub>1</sub>C® HA-8160.

Verifica-se a existência de diversos parâmetros bioquímicos, os quais permitem a avaliação de diversas funções do organismo, como as seguintes funções: renal, hepática, pancreática e cardíaca. Para além disso, permite a realização da avaliação muscular e o estudo do equilíbrio hidroeletrolítico, do metabolismo mineral, do metabolismo lipídico e do metabolismo da glicose.

## 9. MICROBIOLOGIA

A microbiologia permite o isolamento e identificação que organismos que não são visíveis a olho nu, microrganismos. Alguns microrganismos existem naturalmente num dado local do organismo, microbiota normal, enquanto outros são capazes de causar doença, sendo microrganismos patogénicos. Estes podem ser bactérias, vírus, fungos, parasitas. É, assim, importante diferenciar a microbiota normal dos microrganismos patogénicos capazes de causar doença, num dado local específico do organismo. <sup>1</sup>

No setor da microbiologia podem ser analisadas uma ampla variedade de amostras, contudo, as mais comuns no laboratório são: urina, fezes e exsudados nasais. Com menor frequência, são também avaliados exsudados purulentos de feridas, exsudados vaginais e raspados de unhas.

Para a diferenciação dos diversos microrganismos, primeiro procede-se à inoculação da amostra em meios de cultura apropriados. Posteriormente, procede-se à incubação, tendo sempre em conta uma temperatura e percentagem de oxigénio (O<sub>2</sub>) adequadas, que são fatores com elevada importância para o crescimento dos microrganismos. Após a incubação, observam-se as culturas e as características de crescimento do microrganismo, sendo por vezes necessário recorrer-se à coloração de gram (para no caso de se tratar de uma bactéria, diferenciar bactérias gram positivos de gram negativos). Para a identificação de microrganismo presente, é necessária a obtenção de uma cultura pura, colónias obtidas a partir de uma única colónica, de uma única célula. É também a partir de uma cultura pura que se realiza o antibiograma, isto é, determina-se a suscetibilidade dos microrganismos a diversos tipos de antibióticos e variadas dosagens. Deste modo, o clínico tem capacidade de escolher o antibiótico mais eficaz contra o agente patogénico em questão. <sup>1</sup>

## **10.FASE PÓS-ANALÍTICA**

Finalmente, após o processamento das amostras, os resultados são sujeitos a uma primeira validação por cada um dos técnicos responsáveis pela valência em questão, sendo a validação final feita pelo Diretor Técnico, Dr. Mário João Roque. Na validação dos resultados, é sempre tido em conta o historial do doente e as condições da amostra.

Após a validação, os resultados são transmitidos ao doente, eletronicamente ou impressos e entregues em mão. Quando são encontrados resultados críticos, estes devem ser comunicados de imediato. <sup>1</sup>

## **II. CONCLUSÃO**

O estágio curricular inserido no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas permite um contacto direto e diário com a rotina laboratorial. Para além disso, possibilita a consolidação e aplicação de todos os conhecimentos teóricos adquiridos no decorrer do mestrado à componente prática laboratorial. É, ainda, uma oportunidade para a aquisição de novos conhecimentos, conceitos e para o contacto com diferentes métodos e técnicas.

Uma vez que se verifica, cada vez mais, um aumento do grau de automatização nos diferentes setores das análises clínicas, é fundamental a existência de espírito crítico, tanto para a interpretação dos resultados obtidos, como para a sua validação. Sendo assim, é essencial ter em conta o histórico do doente. Consequentemente, reduz-se a possibilidade de serem transmitidos resultados incorretos.

Por último, o estágio foi uma etapa final no mestrado de extrema relevância, contribuindo para a formação profissional e pessoal e para a fomentação do espírito de trabalho em equipa, permitindo ainda a aquisição de autonomia.

## 12.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Turgeon ML. *Linné & Ringsrud's Clinical Laboratory Science*. 6th ed. Elsevier; 2012. ISBN 978-0-323-06782-9
2. Dasgupta A, Wahed A. *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*. Elsevier; 2014. ISBN 978-0-12-407821-5
3. Turgeon ML. *Clinical Hematology Theory and Practice*. 6th ed. Wolters Kluwer; 2018. ISBN 9781496332288
4. Lehto T, Hedberg P. Performance evaluation of Abbott CELL-DYN Ruby for routine use. *Int J Lab Hematol*. Published online 2008. doi:10.1111/j.1751-553X.2007.00971.x
5. Leers MPG, Goertz H, Feller A, Hoffmann JJML. Performance evaluation of the Abbott CELL-DYN Ruby and the Sysmex XT-2000i haematology analysers. *Int J Lab Hematol*. Published online 2011. doi:10.1111/j.1751-553X.2010.01230.x
6. Bain BJ. *Blood Cells a Practical Guide*. 5th ed. Willey Blackwell; 2015. ISBN 9781118817339
7. Hoffbrand AV, Moss PAH. *Fundamentos de Hematologia*. 7th ed. Artmed; 2018. ISBN 9781118408674/1118408675
8. Keohane EM, Smith LJ, Walenga JM. *Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications*. 5th ed. Elsevier; 2016. ISBN 9780323239066
9. Bain BJ, Bates I, Laffan MA. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 12th ed. Elsevier; 2017. ISBN 9780702066962
10. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock Biology of Microorganisms*. 13th ed. Pearson; 2015. ISBN 10: 0-321-64963-X
11. Mohsen W, Levy MT. Hepatitis A to E: what's new? *Intern Med J*. 2017;47(4):380-389. doi:10.1111/imj.13386
12. Turgeon ML. *Immunology & Serology in Laboratory Medicine*. 5th ed. Elsevier; 2014. ISBN 978-0-323-08518-2
13. Vivier E, Malissen B. Innate and adaptive immunity: Specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol*. 2005;6(1):17-21. doi:10.1038/ni1153
14. Tak M, Saunders M, Jett B. *Primer to the Immune Response*. Academic Cell; 2014. ISBN 9780123854612
15. Punt J, Stranford S, Jones P, Owen JA. *Kuby Immunology*. 7th ed.; 2013. ISBN 9781493990047
16. Chaplin DD. Overview of the Immune Response. Published online 2010. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980.

17. Ju H, Lai G, Yan F. Chemiluminescent immunoassay. *Immunosensing Detect Protein Biomarkers*. Published online 2017:143-169. doi:10.1016/b978-0-08-101999-3.00005-0
18. Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Autoimmun Highlights*. 2017;8(1). doi:10.1007/s13317-017-0097-2
19. Morota K, Fujinami R, Kinukawa H, et al. A new sensitive and automated chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of hepatitis C virus core antigen. *J Virol Methods*. 2009;157(1):8-14. doi:10.1016/j.jviromet.2008.12.009
20. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Molecular virology. *Mol Virol*. 2013;9783642207:1-1016. doi:10.1007/978-3-642-20718-1
21. Simmonds P, Aiweesakun P. Virus classification – where do you draw the line? *Arch Virol*. 2018;163(8):2037-2046. doi:10.1007/s00705-018-3938-z
22. Prasadthratsint K, Stapleton JT. Laboratory Diagnosis and Monitoring of Viral Hepatitis. *Gastroenterol Clin North Am*. 2019;48(2):259-279. doi:10.1016/j.gtc.2019.02.007
23. Dentinger CM. Hepatitis A. 2009;351(8):197-210. doi:10.1097/01.NAJ.0000358491.84054.09
24. Matheny SC, Kingery JE. Hepatitis A. *Am Fam Physician*. 2012;86(11). doi:10.7748/ns2011.05.25.37.59.c8522
25. Trépo C, Chan HLY, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2014;384(9959):2053-2063. doi:10.1016/S0140-6736(14)60220-8
26. Chakravarty R. Diagnosis and monitoring of chronic viral hepatitis: serologic and molecular markers. Published online 2011:156-167. doi:10.2741/s141
27. Lucas S, Nelson AM. HIV and the spectrum of human disease. Published online 2015. doi:10.1002/path.4449
28. Branson BM. HIV Diagnostics: Current Recommendations and Opportunities for Improvement. *Infect Dis Clin North Am*. 2019;33(3):611-628. doi:10.1016/j.idc.2019.04.001
29. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. Molecular Mechanisms of HIV Entry. Published online 2012. doi:10.1007/978-1-4614-0980-9\_10
30. Parekh BS, Ou CY, Fonjungo PN, et al. Diagnosis of human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(1):1-55. doi:10.1128/CMR.00064-18
31. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 8th ed. Elsevier; 2016. ISBN 978-0-323-29956-5

32. Seña AC, White BL, Sparling PF. Novel *Treponema pallidum* Serologic Tests: A Paradigm Shift in Syphilis Screening for the 21st Century . *Clin Infect Dis*. 2010;51(6):700-708. doi:10.1086/655832
33. Pezaro C, Woo HH, Davis D. Prostate cancer: measuring PSA. Published online 2013. doi:10.1111/imj.12407
34. Sikaris K. Prostate cancer screening. Published online 2012. doi:10.1097/PAT.0b013e32834fbb2c
35. Gjertson CK, Albertsen PC. Use and assessment of PSA in prostate cancer. *Med Clin North Am*. 2011;95(1):191-200. doi:10.1016/j.mcna.2010.08.024
36. Mullur R, Liu YY, Brent GA. Thyroid hormone regulation of metabolism. Published online 2014. doi:10.1152/physrev.00030.2013
37. Chaker L, Bianco AC, Jonklaas J, Peeters RP. Hypothyroidism. Published online 2017. doi:10.1016/S0140-6736(17)30703-1
38. Welsh KJ, Soldin SJ. How reliable are free thyroid and total T3 hormone assays? Published online 2016. doi:10.1530/EJE-16-0193