



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Vanessa dos Santos Azevedo

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas
orientado pelo Professor Doutor José Barata Antunes Custódio,
pela Doutora Helena Cunha Leal e pelo Doutor Luís Espírito
Santo Nina e apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Mestrado em Análises Clínicas

Vanessa dos Santos Azevedo

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientado pelo Professor Doutor José Barata Antunes Custódio, pela Doutora Helena Cunha Leal e pelo Doutor Luís Espírito Santo Nina e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Estágio Curricular desenvolvido no Laboratório Coimbralab em Coimbra, no período decorrido entre 6 de janeiro de 2020 a 14 de março de 2020, e no Instituto Português de Oncologia de Coimbra FG no período de 17 de agosto de 2020 a 16 de outubro de 2020, nas áreas de Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia. As duas primeiras áreas foram as valências eleitas para aprofundamento neste relatório.

Outubro de 2020

AGRADECIMENTOS

Todas as palavras são poucas.

Agradeço do fundo do coração à minha família por me ter proporcionado mais um momento académico. Aos meus pais, cujo apoio foi indescritível e que nunca desistiram de mim. À minha irmã, por toda a ajuda e carinho que me proporcionou ao longo destes anos e por todo o apoio.

Ao meu namorado e melhor amigo, por me apoiar em todos os meus momentos, incentivar-me a ser mais e melhor, e por fazer de mim uma pessoa mais feliz e completa.

À Professora Doutora Ana Miguel Matos, Coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas da Universidade de Coimbra, e a toda a instituição de ensino, por me terem proporcionado a aquisição de vastos conhecimentos e a oportunidade de ter realizado este estágio, que tanto me enriqueceu.

Segue-se a minha gratidão para com a Dra. Helena Cunha Leal e para com todas as pessoas que trabalham no Laboratório Coimbralab, que sempre se mostraram disponíveis para me auxiliar e esclarecer qualquer dúvida, contribuindo também para a minha adaptação. Muito obrigada! Assim como ao Dr. Luís Nina e à sua equipa pela orientação e ensinamentos.

Agradeço também ao Professor Doutor José Custódio, meu orientador interno, pela disponibilidade prestada e pela ajuda na elaboração do relatório.

A todos os professores que ao longo destes anos me ajudaram e incentivaram.

Um especial agradecimento à Catarina, à Joana e à Verónica, que me acompanharam e ajudaram ao longo de 2 anos.

A todos aqueles que, não estando aqui mencionados, de alguma forma me apoiaram na realização deste mestrado.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABELAS	VII
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT	XI
INTRODUÇÃO.....	I

Parte I – Coimbralab

CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO.....	5
ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	7
1. Bioquímica.....	7
1.1 Equipamentos e métodos utilizados.....	8
1.2 Controlo de qualidade interno e externo.....	8
1.3 Metabolismo glucídico.....	8
1.4 Metabolismo dos lípidos.....	11
1.5 Metabolismo das proteínas.....	13
1.6 Biomarcadores de avaliação hepática.....	17
1.7 Biomarcadores da função pancreática.....	21
1.8 Biomarcadores da função renal.....	22
1.9 Biomarcadores do metabolismo do ferro.....	27
1.10 Biomarcadores da lesão do miocárdio.....	29
1.11 Metabolismo mineral ósseo.....	31
1.12 Equilíbrio hidro-eletrolítico.....	33
1.13 Espermograma.....	34

Parte II – Instituto Português de Oncologia de Coimbra (IPO)

CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO.....	39
ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	39
1. Microbiologia.....	40
2. Hematologia.....	43
2.1 Equipamentos e métodos utilizados.....	43
2.2 Hematopoiese.....	44
2.3 Hemograma.....	45
2.4 Esfregaço sanguíneo.....	49
2.5 Velocidade de sedimentação (VS).....	51
2.6 Hemóstase.....	51
2.7 Análise genética do gene BCR-ABL.....	55
3. Imunologia.....	59
CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Perfil eletroforético normal das proteínas presentes no soro ¹⁸	14
Figura 2 – Perfil eletroforético do utente.	16
Figura 3 – Exame direto da amostra corado pela técnica de Gram do exsudato nasal purulento profundo.....	41
Figura 4 – Staphylococcus aureus e Citrobacter koseri	42
Figura 5 – Primoculturas repetidas 3 vezes, sendo que a última foi inoculada por inundação.	42
Figura 6 – Hierarquia das células hematopoiéticas durante a diferenciação normal de células estaminais derivadas da medula óssea em células sanguíneas de linhagem específica ³⁷	44
Figura 7 – Representação da cascata de coagulação ⁴⁷	52
Figura 8 – Esfregaço de sangue periférico com marcada anisocitose plaquetar e eritrocitária com células em alvo e eliptócitos. Observam-se basófilos e neutrófilos.....	58
Figura 9 – Aspirado de medula óssea que mostra proliferação principalmente da linhagem megacariocítica, com aumento do número de megacariócitos maduros com núcleos hiperlobulados.....	58
Figura 10 – Fragmento da medula óssea com hiper celularidade visível.	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Equipamentos e respetivos métodos e análises no Coimbralab.	7
Tabela 2 – Boletim analítico do caso clínico 1.....	16
Tabela 3 – Boletim analítico do caso clínico 3.....	20
Tabela 4 – Boletim analítico do caso clínico 4.....	20
Tabela 5 – Parâmetros analisados no exame físico-químico da urina e sua relação com a clínica ²⁴	23
Tabela 6 – Boletim analítico do caso clínico 6.....	27
Tabela 7 – Avaliação da vitalidade dos espermatozóides.....	35
Tabela 8 – Principais alterações encontradas na morfologia dos espermatozóides.....	35
Tabela 9 – Equipamentos e respetivos métodos e análises dos sectores de Microbiologia e Imunologia/hormonologia.	40
Tabela 10 – Equipamentos e respetivos métodos e análises do sector de hematologia.	43
Tabela 11 – Hemograma do caso clínico 8.....	56
Tabela 12 – Medulograma e Citomorfologia do caso clínico 8.....	57

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5'-NT - 5-nucleotidase

AAS - Ácido acetilsalicílico

AEQ - Avaliação Externa de Qualidade

ALP - Fosfatase alcalina

ALT - Alanina aminotransferase

aPTT - Tempo de tromboplastina parcialmente ativado

AST - Aspartato aminotransferase

ATP - Adenosina trifosfato

Ca²⁺ - Cálcio

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média

CK - Creatina cinase

CMI - Concentração mínima inibitória

DGS - Direcção-Geral de Saúde

Fe²⁺ - Ferro ferroso

Fe³⁺ - Ferro férrico

G-6-P - Glicose-6-fosfato

G-6-PD - Glicose-6-fosfato desidrogenase

GGT - Gama glutamiltransferase

H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio

HbA_{1c} - Hemoglobina glicada

HCM - Hemoglobina corpuscular média

HDL - *High-density lipoprotein*

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

hs-cTnl - High sensitivity - troponina I cardíaca

hs-PCR - *High Sensitivity* - Proteína C reativa

IDL - *Intermediate-density lipoprotein*

ISE - Eléctrodo seletivo de iões

IPO - Instituto Português de Oncologia de Coimbra

LDH - Lactato desidrogenase

LDL - Low-density lipoprotein

LMC - Leucemia mielóide crónica

MMSA - *Staphylococcus aureus* metilicina sensível

NAD⁺ - Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADH - Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - Proteína C Reativa

PT - Tempo de Protrombina

PTGO - Prova de tolerância oral à glicose

PTH - Hormona paratiroideia

RDW - Distribuição do tamanho dos eritrócitos

SEQC - Sociedade Espanhola de Laboratório Clínico

SNS - Serviço Nacional de Saúde

SPC - Serviço de Patologia Clínica

TFG - Taxa de filtração glomerular

TIBC - capacidade total de fixação do ferro

TT - Tempo de trombina

VCM - Volume corpuscular médio

VLDL - Very-low density lipoprotein

VS - Velocidade de sedimentação

RESUMO

O presente relatório tem como objetivo a descrição da aprendizagem teórica e prática relativa ao estágio no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Além de abordar a dinâmica laboratorial, de dois laboratórios (privado e público), referindo os equipamentos, as metodologias e os parâmetros mais frequentemente determinados, assim como as amostras correspondentes, este relatório também descreve o local de estágio.

Paralelamente à descrição dos parâmetros clínicos, são apresentadas situações de casos clínicos, enfatizando a importância das análises clínicas como diagnóstico complementar. Ao longo do relatório são abordadas, de uma forma genérica, todas as áreas em que trabalhei, com uma descrição mais detalhada das áreas de Bioquímica e Hematologia.

Palavras-chave: Análises clínicas, Microbiologia, Imunologia, Bioquímica, Hematologia.

ABSTRACT

This report aims to describe the theoretical and practical learning related to the internship within the scope of the Master's Degree in Clinical Analysis from the Faculty of Pharmacy, University of Coimbra. In addition to addressing the laboratory dynamics of two laboratories (private and public), referring to the most frequently determined equipment, methodologies and parameters, as well as the corresponding samples, this report also describes the location of the internship and the quality control of each one of the areas.

Parallel to the description of clinical parameters, situations of clinical cases are presented, emphasizing the importance of clinical analyzes as a complementary diagnosis. Throughout the report, all the areas in which I worked are covered, with a more detailed description of the areas of Biochemistry and Hematology.

Keywords: Clinical analysis, Microbiology, Immunology, Biochemistry, Hematology.

INTRODUÇÃO

Em 2012 os centros de saúde realizaram 1,4 milhões de atos complementares de diagnóstico – 67,3% dos quais relativos a análises clínicas ¹, já em 2018 aumentou para 154,6 milhões o número de atos complementares de diagnóstico realizados, isto é, exames ou testes necessários para o estabelecimento de um diagnóstico (análises laboratoriais, exames imagiológicos, endoscopias, biópsias e outros) ².

As análises clínicas são um meio complementar de diagnóstico, ou seja, são exames solicitados pelo médico, no sentido de ajudar a esclarecer hipóteses de diagnóstico, estabelecer prognósticos ou monitorizar o tratamento, indispensáveis para a qualidade elevada do Sistema Nacional de Saúde.

O estágio curricular desenvolveu-se em dois laboratórios, privado e público, em períodos distintos e por sua vez, o presente relatório encontra-se dividido em duas partes. A 1ª parte conta com uma a descrição do período de estágio realizado no Coimbralab, uma instituição privada, onde foi possível obter uma experiência bastante dinâmica, pois neste período foi possível observar todas as valências, das quais é descrita a bioquímica de forma detalhada. A Dra. Helena Cunha Leal foi responsável pela orientação. A 2ª parte é referente ao período de estágio no Instituto Português de Oncologia de Coimbra FG (IPO), uma instituição pública, em que observei uma abordagem multidisciplinar, que se dedica principalmente ao diagnóstico e tratamento da doença oncológica. Nesta parte é descrita a valência de hematologia detalhadamente, mas também a microbiologia e a imunologia de forma genérica.

Parte I

Coimbralab

CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O Laboratório Cruz de Celas - Coimbralab é duplamente certificado pelas Normas para Laboratórios Clínicos e pela EN NP ISSO:9001, cujos certificados são respetivamente: 2002/NLC 1808 e 2002/CEP 1808.

Foi o 1º Laboratório a ser duplamente certificado na zona centro, mantendo-se até aos dias de hoje.

O laboratório Cruz de Celas - Coimbralab iniciou a sua atividade a 16 de maio de 1984 na zona de Celas sob a Direção Técnica da Dra. Helena Cunha Leal. É especialista em Análises Clínicas e Especialista em Genética Humana pela Ordem dos Farmacêuticos.

É constituído por um laboratório central na zona do Vale das Flores, em Coimbra e diversos postos de colheitas situados em Coimbra e arredores: Vila Nova de Poiares, Brasfemes, Lousã, Penacova, Celas, São Martinho do Bispo, Figueira do Lorvão, Santa Clara, Taveiro e Góis. Possui também um serviço de colheita de amostras em lares e associações, medicinas do trabalho, tendo também ao dispor dos utentes serviço ao domicílio.

O laboratório Central é dividido em áreas distintas: Recepção e Atendimento; Área Laboratorial e Área Administrativa.

Recepção e Atendimento

Aqui os utentes são atendidos por colaboradores com elevada formação para que no ato da inscrição no sistema informático não ocorram erros. É atribuído um número que sai acompanhado de várias etiquetas com códigos de barras correspondentes aos vários tipos de tubos de acordo com os pedidos do clínico, que serão agrafados na requisição do utente.

Após a inscrição dos utentes, estes são chamados pelo próprio nome, pelo flebotomista que seguirão para a sala de colheitas.

Aqui é efetuada a leitura cuidadosa pelo flebotomista, do pedido de análises efetuada pelos clínicos e serão selecionados os respetivos tubos (pois conforme os pedidos os tubos contêm anticoagulantes específicos), sendo colocada em cada um a respetiva etiqueta. Segue-se a colheita de sangue ao utente.

Área Laboratorial

A Área Laboratorial integra uma zona de triagem. Aqui as amostras que provêm da sala de colheitas da unidade central e dos diferentes postos de colheita (são transportadas devidamente acondicionadas em malas térmicas, às quais é controlada a temperatura e registada em folha própria à sua chegada). Na zona de triagem, as amostras que necessitam de centrifugação, são centrifugadas e depois os diferentes tubos marcados com os códigos de barras são distribuídos para as respetivas secções. É um local muito dinâmico no qual se integram vários setores funcionais, sendo estes: Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia.

Uma vez que os tubos estão marcados com o código de barras, podem entrar de imediato nos equipamentos pois estes já estão devidamente calibrados e controlados e como se encontram ligados ao sistema informático, é possível graças à utilização de um leitor ótico associar o tubo que o equipamento está a processar ao utente correspondente. Após a obtenção de um resultado os equipamentos enviam-no para o sistema informático. O Técnico Superior valida os resultados tendo sempre em atenção os critérios de validação e de rejeição, para cada analito assim como o histórico de cada utente.

Segue-se a fase da validação biopatológica pela Diretora Técnica.

Uma vez os resultados validados biopatologicamente serão entregues aos utentes conforme seu pedido (CTT, mão própria, email, enviado ao Centro de Saúde, etc.).

O laboratório tem em média 192 utentes por dia, sendo no laboratório central que a maior parte das análises é processada. As análises que não podem ser processadas no laboratório são enviadas a um laboratório subcontratado, ou para o laboratório central da Unilabs no Porto.

Área Administrativa

Na Área Administrativa, é feita uma nova conferência dos dados dos utentes e retificado o pedido das análises, sendo depois efetuada a sua faturação para os diferentes organismos.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o período de estágio no Coimbralab, tive a oportunidade de contactar com quatro valências das Análises Clínicas: Bioquímica, Microbiologia, Imunologia e Microbiologia. Acompanhei todo o processamento laboratorial desde a fase pré-analítica à pós-analítica, sendo de referir, que a fase pós-analítica foi apenas de acompanhamento com a Diretora Técnica na validação biopatológica. Ao longo de todo o processo, fui contactando com todos os técnicos e adquirindo conhecimentos sobre o funcionamento de cada área. Ao ter a oportunidade de acompanhar as diferentes etapas durante todo o processo analítico, pude observar os procedimentos comuns a todas as valências, tais como: manutenção diária dos equipamentos; preparação de reagentes e reconstituição de controlos (Controlo de Qualidade Interno) e calibradores. Também tomei conhecimento como efetuar a preparação e programação de amostras para a Avaliação Externa de Qualidade (AEQ). A automatização dos equipamentos para a determinação dos diferentes parâmetros (Tabela I) permite dar a resposta ao número elevado de amostras, pelo que se torna importante perceber o funcionamento de todos os equipamentos no laboratório.

Tabela I – Equipamentos e respetivos métodos e análises no Coimbralab.

Equipamento	Método	Análise
Olympus® AU680	Ensaios fotométricos, cinéticos, enzimáticos e imunoturbidimétricos	Bioquímica
Minicap®	Eletroforese capilar	Proteinograma
Hb-9210 Premier®	Cromatografia líquida de alta eficiência	HbA _{1c}
Architect® i2000SR	Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência	Imunologia
Pentra® 80	Citometria de fluxo + Espetrometria de UV/Visível + Impedância	Hemograma e Plaquetas
Trombolyser®	Ótico	PT e aPTT
Vesmatic®	Diesse	VS
Aution Max® 4280	Espectrometria UV/Visível + Refratometria	Urina tipo II

I. Bioquímica

A bioquímica analisa diversos parâmetros que constituem uma grande importância no diagnóstico e monitorização de algumas patologias. A glicémia, o colesterol, a creatinina, entre muitas outras são fundamentais em situações como a diabetes, avaliação do risco cardiovascular ou mesmo avaliação da função renal, respetivamente.

1.1 Equipamentos e métodos utilizados

Como descrito na Tabela I, o Olympus® AU680 realiza a determinação da maioria dos parâmetros bioquímicos. As técnicas realizadas podem ser divididas de acordo com o seu princípio teórico: ensaios cinéticos, ensaios fotométricos, ensaios enzimáticos, imunoturbidimétricos e possui ainda uma unidade ISE (Eléctrodo Seletivo de Iões) onde são determinados os iões.

A hemoglobina glicada (HbA_{1c}) é quantificada no Hb-9210 Premier®, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Tabela I). Para a análise deste parâmetro utiliza-se sangue total, colhido em tubo de EDTA.

A urianálise é efetuada no Aution Max® 4280 e o sedimento é observado no microscópio ótico. A eletroforese de proteínas séricas é feita no Minicap®, obtendo-se as diferentes bandas do proteinograma por eletroforese capilar.

1.2 Controlo de qualidade interno e externo

No Olympus® AU680 a calibração da creatinina, cálcio e bilirrubinas no soro é feita diariamente e a creatinina urinária assim como as proteínas específicas são calibradas uma vez por semana. Já os restantes parâmetros são calibrados apenas quando ocorre uma mudança de lote ou sempre que necessário. O controlo interno é constituído por dois níveis: Normal e o Patológico. São efetuados diariamente. Caso alguma das técnicas não esteja dentro dos limites de confiança do controlo de qualidade (regras de Westgard) não se poderá prosseguir com o serviço. Existem ações corretivas para resolver o problema. Após a sua resolução pode-se dar início à execução das análises.

O Controlo Externo (Avaliação Externa da Qualidade) é realizado uma vez por mês. São analisados 26 parâmetros enviados pela entidade SEQC (Sociedade Espanhola de Laboratório Clínico), tendo-se obtido um score total de elevada satisfação.

1.3 Metabolismo glucídico

Os glúcidos estão envolvidos numa multiplicidade de funções, nomeadamente como fonte e armazenamento de energia. A digestão destas moléculas é levada a cabo pela ação da amilase salivar, amilase pancreática e dissacaridases, tendo como produto principal a glicose. A glicose é usada em diferentes vias metabólicas, de forma a manter a homeostase e é

armazenada no fígado e músculo esquelético na forma de glicogénio e no tecido adiposo após a conversão em triglicerídeos ³.

A diabetes *mellitus* é a mais conhecida perturbação do metabolismo dos hidratos de carbono. A diabetes afeta 10% da população portuguesa entre os 25 e os 74 anos, sobretudo os homens e os grupos etários com mais idade: 23,8% dos indivíduos entre os 65 e os 74 anos⁴.

1.3.1 Glicose

A glicose é um monossacarídeo e é uma das principais fontes de energia das células. A glicose é sintetizada a nível hepático e renal a partir de intermediários como o lactato, o glicerol e outros produtos do metabolismo (neoglicogénese) ⁵, ou pode ser obtida através da dieta.

A concentração de glicose no sangue é regulada por uma interação complexa de múltiplas vias bioquímicas reguladas por diferentes hormonas, como é o caso da insulina e do glucagon. Alterações a nível hormonal levam à alteração da homeostase da glicose levando a níveis anormalmente altos (hiperglicemia) ou anormalmente baixos (hipoglicemia) ⁶.

As medições de glicose são utilizadas no diagnóstico e tratamento de desordens no metabolismo dos hidratos de carbono, incluindo diabetes *mellitus*, hipoglicemia neonatal e hipoglicemia idiopática, e de carcinoma de células dos ilhéus pancreáticos.

O método usado para a determinação da glicose consiste na fosforilação da glicose, através da hexocinase, de forma a produzir glicose-6-fosfato (G-6-P). A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6P-DH) oxida especificamente G-6-P, formando-se 6-fosfogluconato, com redução simultânea de NAD⁺ e formação de NADH. A quantidade de NADH produzido é diretamente proporcional à quantidade de glicose na amostra e é medida pelo aumento da absorvância a 340 nm ⁶.

1.3.2 Hemoglobina glicada

A hemoglobina glicada (HbA_{1c}) desempenha um papel fundamental no controlo clínico da diabetes *mellitus*. A diabetes *mellitus* é um conjunto de doenças metabólicas muito prevalente, que se divide principalmente em dois grandes grupos a diabetes *mellitus* tipo I e a diabetes *mellitus* tipo II. A diabetes *mellitus* tipo I consiste numa deficiência absoluta de insulina resultante da destruição das células beta dos ilhéus de Langerhans do pâncreas, responsáveis pela sua produção. Na diabetes *mellitus* tipo II, responsável por cerca de 90% dos casos, ocorre uma resistência à insulina levando a hiperglicemia. A obesidade, hipertensão e a dislipidémia

são fatores de risco para este tipo de diabetes ⁷. A diabetes gestacional corresponde a qualquer grau de anomalia do metabolismo da glicose documentado, pela primeira vez, durante a gravidez ⁸.

A determinação da HbA_{1c} é amplamente usada para a monitorização da concentração da glicose a longo prazo em pacientes com diabetes tipo I e tipo II. A HbA_{1c} é uma medida de percentagem de hemoglobina glicada nos eritrócitos circulantes, e correlaciona-se com os níveis médios de glicose no sangue. A HbA_{1c} fornece um índice do nível médio de glicose no sangue nos últimos 2 a 3 meses, avaliando assim os níveis retrospectivamente ⁹.

De acordo com a norma da Direcção-Geral de Saúde (DGS) sobre o Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus, o diagnóstico da diabetes é realizado com base nos seguintes parâmetros para a população em geral:

- a) Glicémia em jejum ≥ 126 mg/dl; **ou**
- b) Sintomas clássicos associados a um valor de glicémia ocasional ≥ 200 mg/dl; **ou**
- c) Glicémia ≥ 200 mg/dl às 2 horas, na prova de tolerância à glucose oral (PTGO) com 75 g de glucose; **ou**
- d) Hemoglobina glicada A_{1c} (HbA_{1c}) $\geq 6,5\%$.

O método utilizado para a determinação da HbA_{1c} é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), sendo a HbA_{1c} e outras frações de hemoglobina separadas por diferenças de cargas ⁶.

1.3.3 Prova de tolerância oral à glucose (PTGO)

A Prova de Tolerância à Glucose Oral (PTGO) consiste na determinação da glucose pelo método da hexocinase, como descrito anteriormente, às 1 e 2 horas após o paciente ingerir 75 mg de glucose.

O diagnóstico da diabetes gestacional faz-se com base nos seguintes valores, de acordo com a norma da DGS anteriormente referida:

- a) Glicémia de jejum, a realizar na 1.^a consulta de gravidez, ≥ 92 mg/dl e < 126 mg/dl;
- b) Se glicémia de jejum < 92 mg/dl, realiza-se PTGO com 75 g de glucose, entre as 24 e as 28 semanas de gestação. É critério para diagnóstico de diabetes gestacional, a confirmação de um ou mais valores de glicémia às 0 horas superior a 92 mg/dl, à 1 hora superior a 180 mg/dl e às 2 horas superior a 153 mg/dl.

1.4 Metabolismo dos lípidos

Os lípidos são moléculas muito versáteis apresentando diversas funções tais como, precursores de hormonas, fonte de energia e componentes estruturais em membranas celulares. Os lípidos são transportados na corrente sanguínea na forma de lipoproteínas, complexos macromoleculares constituídos por lípidos e proteínas ⁶.

As lipoproteínas têm diferentes propriedades físico-químicas e podem subdividir-se em quilomicron, VLDL (*very-low density lipoprotein*), IDL (*intermediate-density lipoprotein*), LDL (*low-density lipoprotein*) e HDL (*high-density lipoprotein*).

Defeitos no aumento da síntese e no catabolismo das lipoproteínas resultam em dislipidémia que têm um papel significativo no desenvolvimento da aterosclerose. O excesso de LDL associado a uma redução de HDL resulta na formação de placas de colesterol que se depositam nas artérias. Estima-se que 70% dos indivíduos com doença coronária prematura apresentam dislipidémia ⁹.

1.4.1 Colesterol total

O colesterol é uma molécula essencial existente no nosso organismo, em que uma parte é produzida no fígado, e outra parte é obtida através da alimentação. O colesterol elevado pode advir de determinadas condições médicas como diabetes ou fatores genéticos, como a hipercolesterolemia familiar ¹¹.

A taxa de prevalência de colesterol total elevado é de 63,3% de acordo com 1.º Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico 2015 ¹².

A análise do colesterol sérico total é um dos parâmetros do perfil lipídico útil no diagnóstico das dislipidémias e do risco cardiovascular. O colesterol LDL e HDL, em conjunto com a determinação dos triglicérides, fornecem informações valiosas para a previsão da doença cardíaca coronária.

O método utilizado para a determinação do colesterol total consiste na hidrolisação dos ésteres de colesterol no soro. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase em colest-4-en-3-ona com a produção simultânea de peróxido de hidrogénio (H₂O₂), o qual condensa oxidativamente com 4-aminoantipirina e fenol na presença de peroxidase para produzir quinoneimina, pode ser medido espectrofotometricamente a 550 nm ⁶.

1.4.2 Colesterol HDL

As concentrações de colesterol HDL (40 a 45 g/dL) são um biomarcador de diminuição do risco de doença cardiovascular verificando-se que, níveis baixos constituem um prognóstico altamente fiável do risco cardiovascular ⁶. O colesterol HDL apresenta efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes e protege contra a aterosclerose ¹³.

A concentração de colesterol associado às HDL é determinada após as lipoproteínas não HDL serem fisicamente removidas ou mascaradas, por ligação do anticorpo anti-lipoproteína- β -humana às lipoproteínas, exceto às HDL. Os complexos antigénio-anticorpo formados, bloqueiam as reações enzimáticas e o colesterol HDL é quantificado através da presença de um sistema de cromogénio enzimático a 505 nm, como descrito para o colesterol total ⁶.

1.4.3 Colesterol LDL

O colesterol LDL constitui a maior parte da lipoproteína LDL, formada através da ação da lipoproteína lípase na VLDL. O colesterol LDL está diretamente relacionado com o risco cardiovascular. Elevadas concentrações de Apo B, apoproteínas que existem principalmente nas LDLs, estão associadas a um risco acrescido de aterosclerose ¹⁴.

De acordo com a norma da DGS n.º 019/2011 relativa à abordagem terapêutica das dislipidémias no adulto, de 11 de maio de 2019, uma pessoa com risco cardiovascular baixo a moderado deve manter colesterol LDL inferior a 115 mg/dl, uma pessoa assintomática com risco cardiovascular alto o valor de colesterol deve ser inferior a 100 mg/dl e já as pessoas com risco cardiovascular muito alto devem manter o colesterol LDL inferior a 70 mg/dl ¹⁵. Como se pode verificar quanto maior o risco cardiovascular menor deve ser o valor da concentração de colesterol LDL.

Na medição do colesterol LDL, este é mascarado, de forma a que todas as lipoproteínas não LDL sejam decompostas através da reação com a colesterol esterase e a colesterol oxidase. O H₂O₂ produzido por esta reação é decomposto pela catalase. Por fim, o colesterol LDL é desmascarado e a catalase é inativada, o colesterol LDL pode então ser quantificado.

1.4.4 Triglicerídeos

Os triglicerídeos são marcadores que fazem parte do perfil lipídico de um indivíduo. Estudos clínicos demonstraram que a redução dos níveis de triglicerídeos está associada à

diminuição do risco cardiovascular, pelo que os níveis de triglicerídeos elevados são um marcador de risco cardiovascular ¹⁵.

Situações de hipertrigliceridemia muito elevada, superior a 1000 mg/dL, estão muito associadas a pancreatites ¹⁶.

O método utilizado para a determinação dos triglicerídeos consiste na hidrólise dos triglicerídeos pela lipoproteína lipase em glicerol e ácidos gordos. O glicerol é fosforilado numa reação que requer ATP, catalisada pela glicerol cinase produzindo glicerol-3-fosfato, que é oxidado pela glicerol-3-fosfato oxidase em dihidroxiacetona fosfato e H₂O₂. O H₂O₂ formado é medido como descrito para o colesterol total ⁶.

1.5 Metabolismo das proteínas

As proteínas apresentam inúmeras funções essenciais, das quais a catálise de reações químicas, incluindo a síntese de DNA, RNA e proteínas, produção de energia, transporte de moléculas, defesa imunitária, entre muitas outras funções. Assim, as proteínas apresentam grande diversidade estrutural ⁶.

Estas também apresentam grande interesse na clínica, sendo usadas no diagnóstico e monitorização de diferentes patologias.

1.5.1 Proteínas totais

As proteínas totais são determinadas usando o método do Biureto, que consiste na reação das proteínas e dos polipeptídeos que contêm, pelo menos, duas uniões de péptidos e que reagem com os iões cúpricos numa solução alcalina produzindo um complexo de cor violeta. A absorvância a 540/660 nm deste complexo é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra ⁶.

Além das proteínas totais, é importante conhecer a concentração das diferentes frações, realizando o proteinograma. Na clínica podem ser observadas tanto hiperproteinémias como hipoproteinémias devido a, respetivamente, aumentos e diminuições das diferentes frações. Assim as medições de proteínas totais são utilizadas no diagnóstico e no tratamento de diversas doenças que envolvem o fígado, os rins ou a medula óssea, bem como outras perturbações metabólicas e nutricionais ¹⁷.

Para além da avaliação das proteínas totais pode-se proceder à separação das diferentes proteínas presentes no soro, formando um perfil eletroforético onde se pode observar a

presença de cinco bandas distintas: albumina, alfa-1-globulina, alfa-2-globulina, beta-globulinas e gama-globulinas (Figura 1) ¹⁸.

O perfil eletroforético, como teste de diagnóstico apresenta uma variedade de usos que facilitam o diagnóstico. Este teste é particularmente útil no diagnóstico e monitorização do mieloma, mas pode se encontrar alterado também em situações inflamatórias agudas e crônicas, doenças hepáticas ou renais, e patologias hereditárias ¹⁸.

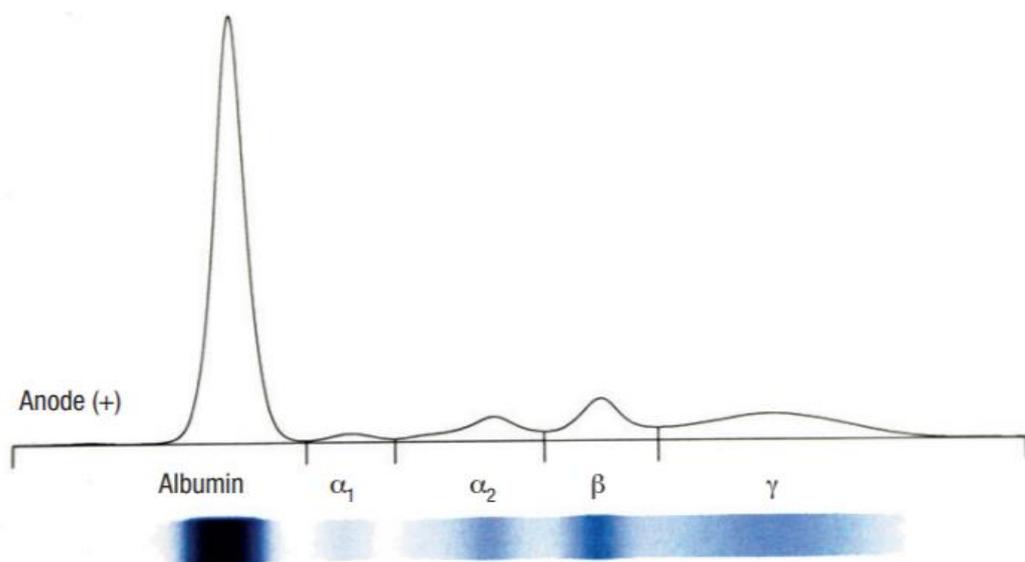


Figura 1 – Perfil eletroforético normal das proteínas presentes no soro ¹⁸.

O método utilizado para a determinação das diferentes frações de proteínas é a eletroforese capilar, que permite a separação das proteínas em solução livre. As moléculas carregadas são separadas em função da mobilidade eletroforética ⁶.

1.5.2 Albumina

A albumina é a proteína mais abundante e é sintetizada a nível hepático. A meia-vida normal da albumina no plasma é de 15 a 19 dias, enquanto a maioria das restantes proteínas plasmáticas apresentam uma meia-vida de 7 dias ou menos. A albumina é um importante transportador de vários compostos, como ácidos gordos, bilirrubina, cálcio ou fármacos ⁶.

Níveis elevados de albumina no soro são normalmente resultado de desidratação. Níveis reduzidos de albumina no soro são detetados em várias condições, incluindo doença renal, doença hepática, inflamação, edema, ascite e desnutrição proteica ⁶.

A um pH de 4,2, o verde de bromocresol reage com a albumina, formando um complexo verde intenso. A absorvância do complexo é medida espectrofotometricamente a 600/800 nm e é proporcional à concentração de albumina na amostra ⁶.

1.5.3 Alfa-1, Alfa-2, Beta e Gama

A proteína alfa-1 é a fração do proteinograma que inclui a α_1 -lipoproteína, α_1 -antitripsina e α -fetoproteína. Uma ausência desta banda pode indicar doença hepática ou deficiência da α_1 -antitripsina. O aumento da banda pode ter várias patologias subsequentes como por exemplo, neoplasias hepáticas, estados inflamatórios ou gravidez ¹⁸.

A fração alfa-2 inclui as proteínas: α_2 - macroglobulina, haptoglobulina e ceruloplasmina. As doenças hepáticas, hemólise e má nutrição são algumas das patologias onde se observa uma diminuição nesta fração. Um aumento desta pode ser devido a situações de insuficiência renal, uso de esteróides e síndrome nefrótica ¹⁸.

As Beta proteínas podem dividir-se em duas frações, sendo que a transferrina e a β_1 -lipoproteína fazem parte da fração Beta-1, e a β_2 -microglobulina e o C3 fazem parte da fração Beta-2. Diminuições da fração podem indicar má nutrição ou consumo de C3, enquanto os aumentos podem indicar estados inflamatórios, deficiência de ferro e hiperlipidémias ¹⁸.

As imunoglobulinas fazem parte da fração gama do perfil eletroforético e a sua diminuição indica doenças renais, sepsis ou infeção viral, enquanto que o seu aumento pode ser indicativo de mieloma múltiplo ¹⁸.

1.5.4 Proteína C reativa (PCR)

A proteína C reativa (PCR) no soro é amplamente utilizada na clínica como um marcador sensível da inflamação. A PCR tem um papel na eliminação de bactérias e células mortas e alteradas ¹⁹.

A concentração da PCR no soro pode aumentar drasticamente após enfarte do miocárdio, stress, trauma, infeção, inflamação, cirurgia ou proliferação neoplástica. O aumento ocorre num prazo de 24 a 48 horas e o nível pode ser 2000 vezes superior ao normal. No entanto, como o aumento não é específico, não pode ser interpretado sem um historial clínico completo e, mesmo assim, só deve ser interpretado através da comparação dos valores anteriores ⁶.

Estudos recentes demonstraram que valores ligeiramente elevados podem indicar um aumento do risco de doenças cardíacas em pacientes assintomáticos ¹⁹. Para a análise de risco

cardíaco, além da hs-PCR, devem ser realizados em paralelo testes específicos, assim como biomarcadores sensíveis e exatos para avaliar o risco cardiovascular.

O método utilizado para a determinação da PCR consiste na formação de complexos imunes em solução que dispersam a luz. O aumento na absorvância através das partículas suspensas na solução é o resultado dos complexos formados durante a reação imunológica ⁶.

Caso Clínico I

Homem de 81 anos realizou uma eletroforese das proteínas séricas e obtiveram-se os seguintes resultados (Tabela 2) e perfil eletroforético (Figura 2):

Tabela 2 – Boletim analítico do caso clínico I.

Proteínas totais	6,8		g/dL	6,6 - 8,3
Albumina	* 43,3%	2,9	g/dL	55,8 - 66,1
Glob. Alfa 1	* 7,1%	0,5	g/dL	2,9 - 4,9
Glob. Alfa 2	* 12,2%	0,8	g/dL	7,1 - 11,8
Glob. Beta 1	6,7%	0,5	g/dL	4,7 - 7,2
Glob. Beta 2	* 23,6%	1,6	g/dL	3,2 - 6,5
Glob. Gama	* 7,1%	0,5	g/dL	11,1 - 18,8
Rel. A/G	* 0,8%			0,9 - 2,0

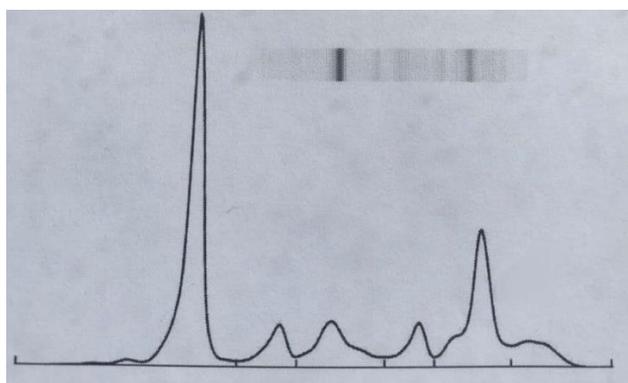


Figura 2 – Perfil eletroforético do utente.

Os dados obtidos são característicos de uma **síndrome nefrótica**, que é definida por uma albuminémia inferior a 30 g/l e uma proteinúria superior a 3 g/dia (sem dados). O perfil eletroforético tem o aspeto de um duplo pico com elevação das globulinas alfa 2 e beta globulinas e uma diminuição das gama globulinas.

Caso Clínico 2

Mulher de 76 anos que apresenta sintomas de infecção urinária dirige-se ao laboratório e no exame cultural observa-se crescimento de *Escherichia coli* (10^6 UFC/ml), a bactéria é multirresistente. Nas análises realizadas também foi pedido a PCR que apresenta um valor de 16,30 mg/dL. O valor da PCR, que apesar de inespecífica, ajuda a ter uma resposta rápida se há ou não infecção, pois é um biomarcador de inflamação.

1.6 Biomarcadores de avaliação hepática

As análises laboratoriais permitem avaliar várias funções hepáticas, estas complementam o historial do paciente e o exame físico. Estas análises podem ser solicitadas como parte de uma avaliação de triagem ou para avaliar melhor os sinais e sintomas clínicos, levando em consideração doenças hepáticas, como hepatomegalia, ascite, icterícia, urina escura, fezes com coloração clara ou sangramento gastrointestinal ¹⁰.

Este painel inclui tipicamente medições de proteína total, albumina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase (GGT), bilirrubina (conjugada e não conjugada), tempo de protrombina (PT), entre outros ¹⁰.

1.6.1 Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST)

A AST e a ALT são enzimas intracelulares, que quando ocorre lesão celular estas são libertadas para a corrente sanguínea. A ALT é encontrada predominantemente nos hepatócitos, e um aumento na sua concentração é mais específico do que um aumento na concentração da AST para doenças hepáticas (por exemplo, hepatite viral e cirrose) ¹⁰.

A AST é uma enzima principalmente mitocondrial e também está presente no coração, músculo, rim e cérebro. Níveis elevados são observados em necrose hepática, enfarte do miocárdio, lesão muscular e insuficiência cardíaca congestiva ²⁰.

Na maioria das doenças hepáticas (por exemplo, hepatite viral), os níveis de ALT são maiores ou iguais aos níveis de AST. Na doença hepática alcoólica, no entanto, a AST geralmente é duas vezes maior que a ALT (razão AST / ALT > 2). Uma relação AST / ALT maior que 3 é 97% específica para o álcool como causa subjacente. Níveis de transaminase extremamente altos (15 vezes o limite superior normal) geralmente indicam necrose

hepatocelular aguda por causas virais ou tóxicas, que indicam obstrução aguda do ducto biliar ou isquemia hepática ¹⁰.

O método utilizado para a determinação da ALT e da AST consiste na redução da absorvância devido ao consumo de NADH, que é medida a 340 nm e é proporcional à atividade de ALT e da AST na amostra ⁶.

1.6.2 Gama glutamiltransferase (GGT)

A gama glutamiltransferase (GGT) é uma enzima microsomal presente no fígado, mas também em muitos outros tecidos e a sua atividade pode ser induzida pelo consumo de álcool e pela doença hepática. Não indica doença hepática se os outros testes bioquímicos hepáticos são normais, nomeadamente a fosfatase alcalina (ALP).

A GGT aumenta paralelamente à ALP na colestase, pois possui uma via de excreção semelhante. Isso também se aplica à 5-nucleotidase (5'-NT), outra enzima microsomal que pode ser analisada ²⁰.

A GGT catalisa a transferência do grupo gama-glutamil do substrato, para glicilglicina produzindo 5-amino-2-nitrobenzoato. O 5-amino-2-nitrobenzoato é medido por espectrofotometria a 410/480 nm e é diretamente proporcional à atividade do GGT na amostra ⁶.

1.6.3 Fosfatase Alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina (ALP) está presente nas membranas canaliculares e sinusoidais hepáticas, no osso, intestino e placenta ²⁰. Outras enzimas são libertadas dos hepatócitos para a corrente sanguínea, simultaneamente 5'-NT e GGT, confirmando que a ALP elevada é de origem hepática ¹⁰.

A ALP sérica aumenta na doença colestática intra-hepática e extra-hepática de qualquer causa. Níveis elevados também ocorrem com infiltrações hepáticas (por exemplo, metástases) e em situações de cirrose, frequentemente na ausência de icterícia ²⁰.

Um nível elevado isolado de ALP pode ser a única pista para obstrução dos ductos biliares ou doença hepática neoplásica ou granulomatosa. Na icterícia colestática, os níveis podem ser de quatro a seis vezes o limite normal ²⁰. Os níveis séricos elevados de ALP associados a níveis normais de 5'-NT e GGT geralmente sugerem uma causa não-hepática (por exemplo, doença óssea, gravidez, insuficiência renal crónica, linfoma, insuficiência cardíaca congestiva) ¹⁰.

A atividade da fosfatase alcalina é determinada através da medição da taxa de conversão de p-nitro-fenilfosfato na presença de 2-amino-2-metil-1-propanol. O p-nitro-fenilfosfato é medido por espectrofotometria a 410/480 nm e é diretamente proporcional à concentração de ALP na amostra ⁶.

1.6.4 Bilirrubina

A bilirrubina está presente no soro de duas formas: não conjugada (indireta) e conjugada (direta). A bilirrubina é um produto final do catabolismo do heme das hemoproteínas. É conjugada com o ácido glucurônico no fígado e a forma conjugada é eliminada da circulação por excreção na bÍlis. A forma não conjugada da bilirrubina circula na corrente sanguínea ligada à albumina ²¹.

A hiperbilirrubinemia é um aumento da concentração de bilirrubina no sangue, que pode levar à icterícia, ou seja deposição de pigmentos biliares na pele, em membranas mucosas, que levam a uma aparência amarelada do utente ⁶.

A bilirrubina pode aumentar na corrente sanguínea devido a situações de hemólise, que se caracterizam por um aumento de bilirrubina não conjugada. A bilirrubina apenas é excretada eficientemente se for conjugada, pelo que deficiências a nível hepático responsáveis pelo decréscimo da conjugação e por sua vez levam à hiperbilirrubinemia ²¹.

O aumento da bilirrubina total associado à icterícia obstrutiva é provocado principalmente pelo aumento da bilirrubina conjugada, não havendo excreção biliar da bilirrubina para o intestino e esta atinge a corrente sanguínea causando hiperbilirrubinemia ⁶.

O 3,5-diclorofenil diazónio tetrafluoroborato reage com a bilirrubina formando a azobilirrubina, a sua absorvância a 546 nm é proporcional à concentração de bilirrubina na amostra ⁶.

Caso Clínico 3

Homem de 72 anos dirigiu-se ao laboratório para realizar análises e os valores obtidos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Boletim analítico do caso clínico 3.

AST	* 227	UI/L	< 50
ALT	* 213	UI/L	< 50
GGT	* 2243	UI/L	< 55
ALP	* 936	UI/L	30 - 120
Bilirrubina Total	* 15,16	mg/dL	0,30 - 1,20
Bilirrubina Direta	* 8,03	mg/dL	< 0,20
Bilirrubina Indireta	* 7,13	mg/dL	< 1,00

De acordo com os resultados obtidos verifica-se que as enzimas AST e ALT estão aumentadas, assim como a GGT e a ALP, o que indica uma possível **colestase intra-hepática e pós-hepática**. Outro biomarcador indicativo do diagnóstico proposto é a bilirrubina aumentada, tanto a direta como a indireta, o que pode indicar também uma hemólise. Os dados relativos a qualquer tipo de terapêutica não são fornecidos ao laboratório.

Caso Clínico 4

Homem de 23 anos após uma gripe, para a qual tomou medicação, fez análises e apresentou o seguinte boletim analítico (Tabela 4):

Tabela 4 – Boletim analítico do caso clínico 4.

Análise	03/01/2020	09/01/2020	27/02/2020		
AST	* 108	* 89	32	UI/L	< 50
ALT	* 60	* 219	* 59	UI/L	< 50
GGT	27	30	15	UI/L	< 55
LDH	* 406	* 259	149	UI/L	< 248
PCR	* 8,65	* 0,67	-	mg/dL	< 0,5

O valor da LDH encontra-se elevado, a AST está mais elevada do que a ALT no dia 3, o que se inverte no dia 9, como se pode observar na Tabela 4. Com o passar dos dias os valores regressam à normalidade o que pode indicar uma possível **hepatite tóxica de origem medicamentosa** e citólise.

1.7 Biomarcadores da função pancreática

O pâncreas é uma glândula com funções endócrinas e exócrinas. Como glândula exócrina produz suco pancreático que contém enzimas digestivas, como a amilase, a lipase e as proteases, quando endócrino é responsável pela produção de hormonas, como a insulina e o glucagon.

A pancreatite aguda é uma síndrome de inflamação do pâncreas que pode ser avaliada através do doseamento da amilase, tanto sérica como urinária.

1.7.1 Amilase

A amilase é principalmente sintetizada pelas células acinares pancreáticas e pelas glândulas salivares. Os Humanos apenas contêm uma isoenzima, a α -amilase. Os níveis elevados no soro estão associados a pancreatite aguda e outras perturbações pancreáticas²².

A concentração de amilase no soro reflete normalmente o balanço entre a sua síntese e remoção e no caso de uma pancreatite aguda, o aumento da amilase no soro é até 3 vezes superior ao limite normal. A amilase é uma proteína relativamente pequena e, por isso, é rapidamente filtrada e eliminada na urina. A enzima pode ser detetada em concentrações elevadas, após um episódio de pancreatite, na urina por períodos mais longos em comparação com o soro²².

A amilase na urina exclui situações de macroamilasémia, em que a amilase se encontra ligada a imunoglobulinas, o que leva a um decréscimo da função renal e um prolongamento da presença da amilase no soro⁶.

A hiperamilasémia pode ocorrer devido a outras perturbações pancreáticas como obstrução e cancro a nível do pâncreas. Condições não pancreáticas que podem estar envolvidas no aumento da amilase incluem: hepatite, cirrose, gravidez e queimaduras²².

O método utilizado para a determinação da amilase consiste na reação do 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriósido com a α -amilase. A libertação de 2-cloro-4-nitrofenol resulta no aumento da absorvância a 410/480 nm, que está diretamente relacionado com a atividade de α -amilase na amostra⁶.

I.8 Biomarcadores da função renal

Os rins apresentam um papel fundamental na manutenção da composição e quantidade dos fluidos corporais, e uma falha renal é manifestada por disfunção de múltiplos órgãos ⁹.

A urina pode ser utilizada para avaliar a função renal verificando os parâmetros físico-químicos, assim como o sedimento urinário.

A creatinina, a ureia e o ácido úrico são depurados do organismo pelo rim após filtração glomerular. Em indivíduos saudáveis a ureia e a creatinina séricas não se elevam acima do intervalo estabelecido até que haja uma redução de 50 a 60% na taxa de filtração glomerular (TFG) ²⁰. As concentrações destes metabolitos são usadas como indicadores da função renal e de outras condições ⁶.

1.8.1 Urianálise ou Urina tipo II – Análise bioquímica e microscópica do sedimento urinário

A análise de urina é a terceira análise mais solicitada em laboratórios clínicos e pode ser usada para identificar pacientes com doenças renais, doenças hepáticas, infecções do trato urinário ou diabetes *mellitus* ²³.

A análise de urina tipo II permite a avaliação quantitativa das substâncias na urina, além de ser possível a observação do sedimento urinário ao microscópio onde se podem observar eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, cilindros, bactérias, parasitas e leveduras/fungos.

A técnica de colheita da amostra serve tanto para homens como para mulheres, colhendo o jato intermediário da urina da manhã, podendo também ser efetuado em amostras aleatórias ao longo do dia. No entanto, nas mulheres um procedimento de limpeza genital diminui o número de contaminações. A urina deve ser refrigerada se não for analisada imediatamente ²⁴.

A análise físico-química da urina permite avaliar parâmetros físicos (cor e densidade) e químicos (pH, glicose, proteínas, bilirrubina, urobilinogénio, hemoglobina, corpos cetónicos, nitritos). Na Tabela 5 estes parâmetros são relacionados com os aspetos clínicos mais relevantes.

A análise do sedimento urinário é indispensável na urianálise, devido à identificação de células (leucócitos, células epiteliais escamosas, células epiteliais não escamosas, eritrócitos), cristais (oxalato de cálcio, ácido úrico), bactérias e leveduras, cilindros (hialinos ou granulares), entre outras estruturas. A presença de leucócitos em grande número normalmente está

associada a uma infecção do trato urinário, já as células epiteliais escamosas são indicativas de contaminação. Os cristais são frequentemente encontrados nos sedimentos urinários, mas nem sempre indicam doença estando presentes em pessoas saudáveis ²⁴.

O exame microscópico da urina foi introduzido na prática clínica em 1830 e verificou-se a sua importância no diagnóstico de pacientes com suspeita de doença renal ²⁵. A presença de cilindros é geralmente indicativa de patologia renal, pelo que é necessário distinguir os cilindros patológicos dos não patológicos de forma a perceber a gravidade da situação.

Tabela 5 – Parâmetros analisados no exame físico-químico da urina e sua relação com a clínica ²⁴.

Cor	Alimentação, medicação, produtos metabólicos e infecções podem causar cores anormais na urina.
Odor	O odor normal da urina é <i>suis generis</i> , o odor pode ser forte em amostras concentradas. Cetoacidose diabética pode causar um odor frutado ou doce.
Densidade	Indica o estado de hidratação da pessoa e também reflete a capacidade de concentração renal.
pH	O pH urinário é normalmente ligeiramente ácido devido à atividade metabólica, este parâmetro varia consoante a alimentação. O pH urinário geralmente reflete o pH do soro exceto em pessoas com acidose tubular renal.
Sangue	Um teste positivo pode indicar hematuria, mioglobinúria ou hemoglobinúria. A visualização de eritrócitos intactos no sedimento urinário pode distinguir hematuria de outras situações.
Proteínas	Em pessoas saudáveis a parede glomerular é permeável apenas para proteínas com baixo peso molecular. A proteinúria é a perda de proteína na urina e é um marcador da doença renal. A microalbuminúria é um sinal precoce de doença renal, particularmente em diabéticos.
Glicose	Glicosúria ocorre quando a glicose filtrada pelo glomérulo excede a capacidade de reabsorção tubular.
Corpos cetónicos	Produtos do metabolismo dos ácidos gordos, muito associado a diabetes não controlada, também à alimentação e à hipoglicémia.
Nitritos	Nitritos não são encontrados geralmente na urina, mas resultam da redução dos nitratos a nitritos pela ação de bactérias.
Bilirrubina	A bilirrubina conjugada na urina pode indicar disfunção hepática ou obstrução biliar.
Urobilinogénio	Product final da bilirrubina conjugada depois de atravessar os ductos biliares e ser metabolizada no intestino. O urobilinogénio é reabsorvido para a circulação portal. Hemólise e doenças hepatocelulares podem elevar os níveis de urobilinogénio.

1.8.2 Creatinina

A creatina é principalmente sintetizada a nível renal, hepático e pancreático antes de ser transportada para os tecidos e órgãos, onde é metabolizada a creatinina. As concentrações de creatinina são utilizadas no diagnóstico e tratamento de doença renal. As medições de creatinina do soro são úteis na avaliação da função glomerular renal e na monitorização da diálise ²⁶.

A taxa de filtração glomerular (TFG) permanece notavelmente constante, mas em situações de doença (por exemplo, uma redução no fluxo sanguíneo intrarrenal, dano ou perda de glomérulos, obstrução do fluxo livre de ultrafiltrado ao longo do túbulo), a TFG diminui. A capacidade de eliminar metabolitos, regular o volume e a composição do fluido corporal diminuem. Esta situação manifesta-se com um aumento na ureia plasmática ou da creatinina ²⁰.

O nível de creatinina é muito menos dependente da dieta, mas está mais relacionado com a idade, sexo e massa muscular. O nível de ureia depende tanto da TFG como da taxa de produção. Este último é fortemente influenciado pela ingestão de proteínas e do seu catabolismo. Com isto, uma vez elevada, a creatinina sérica é um biomarcador mais exato para a avaliação da TFG do que a ureia. ²⁰.

O método utilizado para a determinação da creatinina é o de Jaffé. Este consiste na reação da creatinina com o ácido pícrico a um pH alcalino, formando um complexo amarelo-laranja, que é medido por espectrofotometria a 520/800 nm ⁶.

1.8.3 Clearance da creatinina

A creatinina sérica é o marcador de diagnóstico habitualmente utilizado para a estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG) na rotina clínica. Devido às interferências e limitações pré-analíticas e analíticas, a creatinina não pode ser considerada exata e surgiu a cistatina C, que é produzida em concentrações constantes por todas as células nucleadas e filtrada livremente no glomérulo. Contudo, a depuração da creatinina continua a ser a mais utilizada para avaliar a TFG e a função renal ²⁰.

Para a avaliação deste parâmetro analítico, é utilizada a idade, a massa corporal, uma amostra de soro para determinar a concentração da creatinina sérica, que é multiplicada por 72 para homem e 85 para mulher, de modo a permitir o cálculo, que se efetua consoante a seguinte equação:

$$\text{Clearance da creatina} = \frac{(140 - \text{Idade}) \times \text{Massa corporal}}{72 [\text{Creatinina sérica}]}$$

A clearance da creatinina é então expressa em mL/min.

Este parâmetro é um biomarcador mais sensível e específico para a detecção de disfunção renal do que a creatinina plasmática ⁶.

1.8.4 Ureia

A ureia é o principal metabolito do catabolismo das proteínas sendo que, o azoto dos aminoácidos é convertido em ureia, no fígado, pela ação das enzimas do ciclo da ureia ⁶.

Mais de 90% de ureia é excretada pelos rins e conseqüentemente, uma disfunção renal traduz-se no aumento de ureia no sangue. A filtração da ureia do sangue para a urina pelos glomérulos renais é o principal meio de eliminação do azoto ⁶.

A concentração de ureia é um biomarcador da função renal, mas é afetada por vários fatores extra renais que influenciam a concentração de ureia circulante, o que limita o seu valor como biomarcador da função renal. Por exemplo, a concentração sérica de ureia aumenta com uma dieta rica em proteína, desidratação ou aumento do catabolismo proteico ⁶.

Embora a ureia por si não seja um biomarcador sensível e exato para avaliar a função renal, em conjunto com a medição da creatinina sérica pode ser muito útil ⁹.

Na determinação da ureia, esta é hidrolisada pela urease a amónia e dióxido de carbono. A amónia e o α -oxoglutarato são convertidos em glutamato. Simultaneamente, o NADH é oxidado. A taxa de alteração na absorvância a 340 nm, devido ao desaparecimento de NADH, é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra ⁶.

1.8.5 Microalbuminúria

A primeira prova clínica de nefropatia consiste no surgimento de níveis baixos (> 30 mg/dia), porém anormais, de albumina na urina. Uma excreção de albumina entre 30 mg e 300 mg por dia é chamada de microalbuminúria e é um indicador clinicamente importante da deterioração da função renal em indivíduos diabéticos ²⁰.

Um rastreio regular da perda de albumina urinária é útil para monitorizar diabetes tipo I e 2. Um aumento na excreção de albumina urinária precede e é altamente preditivo de nefropatia diabética, doença renal crónica terminal e mortalidade cardiovascular. Além disso, um aumento na excreção de albumina urinária identifica um grupo de indivíduos não diabéticos que apresenta um risco acrescido de doenças coronárias ⁶.

É mais conveniente, prático e relativamente preciso testar a microalbuminúria usando amostras de urina aleatórias ²⁰.

O método utilizado para a determinação da microalbuminúria consiste na reação de anticorpos de albumina que se ligam à albumina da amostra para formar complexos imunes que dispersam a luz. A absorvância destes agregados é proporcional à concentração de albumina na amostra ⁶.

1.8.6 Ácido úrico

O ácido úrico é o produto final do metabolismo dos nucleosídeos de purina (adenosina e guanosina), os quais podem derivar da dieta, da síntese endógena de purinas e do catabolismo dos ácidos nucleicos. A concentração deste metabolito no sangue depende do equilíbrio entre a síntese da purina e a ingestão de purinas na dieta, e a eliminação do urato pelo rim (66%) e intestino (33%) ²⁰.

As medições de ácido úrico são utilizadas no diagnóstico e tratamento de vários distúrbios renais e metabólicos, incluindo insuficiência renal, gota, leucemia, psoríase, carência alimentar crônica ou outras condições de doentes que estejam a tomar medicamentos citotóxicos ⁶.

O método utilizado para a determinação do ácido úrico consiste na conversão deste pela uricase em alantoína e H₂O₂. O H₂O₂ reage com a 4-aminoantipirina na presença de sal dissódico N,N-bis(4-sulfobutil)-3,5-dimetilanilina para produzir um cromóforo que é lido espectrofotometricamente a 660/800 nm. A quantidade de corante formado é proporcional à concentração de ácido úrico na amostra ⁶.

Caso Clínico 5

Homem de 82 anos, apresenta valores de ureia e de creatinina elevados. A concentração de ureia é de 242 mg/dL, valor de referência é 17-43 mg/dL e a concentração de creatinina é de 4,69 mg/dL, valor de referência é 0,81-1,44 mg/dL. Estes valores são indicativos de uma **insuficiência renal**. O utente tem anemia macrocítica normocrômica (hemoglobina de 9,2 g/dl, valor de referência 13,6-18 g/dL e volume globular médio 103,0 fl, valor de referência é 80-97 fl) o que pode ser devido a uma deficiente produção da hormona eritropoietina, que é produzida no rim.

Caso Clínico 6

Mulher de 81 anos, apresenta uma microalbuminúria elevada e a concentração de albumina e de proteínas totais baixas (Tabela 6), o que corroboram a hipótese de perda de

proteínas na urina. A utente tem anemia normocítica e normocrómica e os leucócitos aumentados.

Tabela 6 – Boletim analítico do caso clínico 6.

Proteínas totais	*5,6	g/dL	6,6 - 8,3
Albumina	*2,9	g/dL	3,5 - 5,2
Microalbuminúria	*1289,34	mg/dL	< 20
Hemograma			
Hemoglobina	* 9,9	g/dL	11,5 - 16,0
Leucócitos	*13,8	10 ⁹ /L	4,0 - 10,0

Na urina asséptica há 8-10 leucócitos e eritrócitos por campo indicando que há inflamação e hematúria respetivamente, encontrando-se também descrita a presença de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a praticamente todos os antibióticos exceto a cefepima e a amicacina. De acordo com o caso clínico a utente pode sofrer de uma **síndrome nefrótica**.

1.9 Biomarcadores do metabolismo do ferro

O ferro é fundamental para a sobrevivência de quase todos os organismos vivos. No entanto, níveis inadequadamente baixos ou altos de ferro são prejudiciais e contribuem para uma ampla gama de doenças.

Os níveis de ferro são cuidadosamente equilibrados através da absorção de ferro a partir da alimentação, pois o corpo não possui um mecanismo fisiológico para excretar ferro. O corpo humano contém aproximadamente 3,5 g de ferro, dos quais a maioria é encontrada no grupo heme da hemoglobina (aproximadamente 2,3 g). O ferro restante está localizado na mioglobina das fibras musculares esqueléticas (0,35 g), fígado (0,2 g), macrófagos (0,5 g) e medula óssea (0,15 g) ²⁷.

Uma dieta ocidental típica fornece 15 mg de ferro/dia, dos quais apenas aproximadamente 10% é absorvido. A absorção de ferro pode, no entanto, aumentar até 20 vezes para se recuperar de uma situação de hemólise ²⁷.

1.9.1 Ferro

O ferro na dieta existe como ferro heme e não-heme. O ferro heme é encontrado na hemoglobina e na mioglobina e é derivado de carne vermelha, peixe e aves; o ferro não-heme existe principalmente em frutas e vegetais ²⁷.

Enquanto o ferro heme é absorvido por incorporação em porfirinas, o ferro não-heme existe principalmente como ferro férrico (Fe^{3+}) e para ser absorvido deve ser reduzido a ferro ferroso (Fe^{2+}). O ferro não-heme possui assim uma biodisponibilidade mais baixa que o ferro heme ²⁷.

A determinação da concentração de ferro é utilizada no diagnóstico e tratamento de doenças como anemia ferropénica, hemocromatose (uma doença associada ao depósito generalizado, nos tecidos, de dois pigmentos que contêm ferro, e que se caracteriza pela pigmentação da pele) e doença renal crónica. A transferrina é a principal proteína portadora de ferro no soro ⁶.

Num meio ácido, o ferro ligado à transferrina dissolve-se em iões de ferro livre e apotransferrina. O ácido clorídrico e o ascorbato de sódio convertem os iões de ferro no estado ferroso. Os iões ferrosos reagem depois com um cromogéneo para formar um complexo de cor azul que pode ser medido espectrofotometricamente. O aumento na absorvância a 600/800 nm é diretamente proporcional à quantidade presente de ferro ligado à transferrina ⁶.

1.9.2 TIBC

A capacidade total de fixação do ferro (TIBC) representa uma medida indireta da transferrina circulante e dos locais de ligação disponíveis para o ferro no plasma. Este parâmetro é determinado através da adição suficiente de Fe^{3+} para saturar locais de ligação do ferro na transferrina. Em seguida, o ferro que não se ligou é removido e obtém-se o valor da TIBC por imunoturbidimetria ⁶.

1.9.3 Saturação da Transferrina

No plasma, o Fe^{3+} circula ligado à transferrina, uma glicoproteína que possui dois locais de ligação ao ferro e mantém o ferro na forma solúvel. A transferrina tem duas funções importantes: limita a formação de radicais tóxicos e entrega ferro às células. Em pessoas saudáveis, cerca de 1/3 da transferrina é saturada com ferro ²⁸.

Os níveis de transferrina sobem em caso de deficiência de ferro e descem em caso de excesso de ferro. O aumento da transferrina pode ser observado em anemia por deficiência de ferro e também pode aumentar no final da gravidez e em mulheres que tomem contraceptivos orais. Esta diminui em condições associadas à perda elevada de proteínas, como síndrome nefrótica, insuficiência renal crónica, queimaduras graves, estados de deficiência de proteínas e doenças hepáticas graves. A transferrina é uma proteína de fase aguda negativa e

diminui durante qualquer estado inflamatório ou doença grave ⁶. O índice da saturação da transferrina é então calculado a partir da seguinte equação:

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

1.9.4 Ferritina

O nível de ferritina sérica reflete a quantidade de ferro armazenado. Na deficiência de ferro, uma ferritina sérica baixa confirma o diagnóstico. As medições de ferritina ajudam no diagnóstico de doenças que afetam o metabolismo do ferro, como a hemocromatose (excesso de ferro) e a anemia por deficiência de ferro ²⁰.

No entanto, a ferritina é um biomarcador de fase aguda e os níveis aumentam na presença de doenças inflamatórias ou malignas. Níveis muito altos de ferritina podem ser observados na hepatite ²⁰.

O método utilizado para a determinação da ferritina consiste na reação da ferritina presente no soro com anticorpos anti-ferritina que leva a uma aglutinação e o valor é obtido por imunotubidimetria ⁶.

1.10 Biomarcadores da lesão do miocárdio

Os biomarcadores da função cardíaca fazem com que seja possível a diminuição da taxa de mortalidade, que se tem vindo a verificar ao longo dos anos ²⁹.

1.10.1 Creatina Cinase (CK)

Existem três principais isoenzimas da creatina cinase (CK), duas estão presentes no citosol e uma nas mitocôndrias. As isoenzimas do citosol são do tipo muscular (cadeia M) e do tipo cerebral (cadeia B). As isoenzimas do citosol podem produzir o heterodímero CK-MB ou os dímeros CK-MM e CK-BB ³⁰.

O método utilizado para a determinação da CK consiste no aumento da absorvância devido à formação de NADH, que é medida a 340 nm e é diretamente proporcional à atividade de CK na amostra ⁶.

A CK-MB está presente principalmente no músculo cardíaco, a CK-MM no músculo esquelético e a CK-BB no músculo liso e na maioria dos tecidos não musculares, como o cérebro ³⁰.

Após lesão muscular, há um aumento da liberação da CK na corrente sanguínea. Assim, a CK é indicativa de dano muscular. CK-MB é um biomarcador mais específico de dano do músculo do miocárdio, enquanto CK-MM é um biomarcador de dano do músculo esquelético. Com isto, pode-se inferir que a avaliação da CK sérica é um biomarcador importante na monitorização de pacientes com fraqueza muscular ou mialgia e na avaliação de pacientes com miopatias ou rabdomiólise ³¹.

A CK-MB atinge o pico em 24 horas, começando a aumentar entre 4 a 9 horas após a lesão do miocárdio e diminuindo para o intervalo normal após 48 a 72 horas. Os níveis totais de CK e CK-MB estão correlacionados com a gravidade do enfarte ³⁰.

1.10.2 Lactato Desidrogenase (LDH)

A lactato desidrogenase encontra-se em todas as células do organismo, mais concretamente no citoplasma. Visto a concentração de LDH nos tecidos ser 500 vezes superior à existente no plasma, a ocorrência de danos numa pequena porção de tecido pode conduzir a um aumento significativo na atividade de LDH no soro. Por conseguinte, o principal papel da LDH reside na deteção de pequenas lesões ⁶.

O enfarte do miocárdio está habitualmente associado a uma elevação de 3 a 4 vezes do total de LDH; aumentos semelhantes na LDH podem ocorrer na miocardite e arritmias cardíacas ⁶.

A LDH catalisa a oxidação do lactato a piruvato juntamente com a redução de NAD⁺ a NADH. O aumento de NADH é medido a 340 nm e é diretamente proporcional à atividade enzimática na amostra, permitindo assim a sua determinação ⁶.

1.10.3 High sensitivity - Troponina cardíaca I

As troponinas cardíacas são proteínas estruturais do sistema contrátil dos miócitos cardíacos, estas são libertadas na circulação após a morte das células dos miócitos cardíacos. A determinação da concentração de troponina cardíaca circulante tornou-se um biomarcador importante no diagnóstico e tratamento do enfarte agudo do miocárdio ³².

O desenvolvimento de ensaios de alta sensibilidade permitiu a deteção da troponina I cardíaca (hs-cTnI) em concentrações mais baixas, o que levou a uma identificação mais precoce da lesão do miocárdio e aumentou a precisão diagnóstica em pacientes com suspeita de enfarte do miocárdio ³².

1.10.4 High sensitivity - Proteína C reativa

A proteína C reativa é uma proteína de fase aguda produzida pelos hepatócitos. A concentração de PCR aumenta 4 a 6 horas após a lesão aguda do tecido ou inflamação e diminui rapidamente com a resolução do processo lesivo ³³.

A High Sensitivity - Proteína C reativa (hs-PCR) é detetada em níveis mais baixos, o que permite uma deteção mais precoce do seu aumento. Este biomarcador demonstra um papel importante na avaliação do risco cardiovascular ³³.

1.11 Metabolismo mineral ósseo

O osso é constituído por células e uma matriz orgânica de proteínas e minerais inorgânicos. As principais funções do osso são: mecânica, protetora e metabólica. O sistema esquelético é constantemente remodelado pela degradação do tecido velho e sua substituição por matriz óssea nova. Dois tipos de células ósseas, osteoblastos e osteoclastos, são os principais responsáveis pela remodelação. É possível analisar tanto a formação quanto a reabsorção óssea por métodos clínicos e laboratoriais ²⁰.

1.11.1 Cálcio

A avaliação da concentração do cálcio é usada no diagnóstico e monitorização de distúrbios da paratiróide, diversas doenças ósseas e doença renal crónica. Os ossos funcionam como um reservatório de modo a que o cálcio sérico se mantenha relativamente constante, libertando cálcio, quando necessário para evitar a hipocalcemia e retendo o cálcio, para prevenir níveis excessivamente elevados de cálcio sérico. A absorção e a libertação de cálcio a nível ósseo são controladas pela hormona paratiroideia (PTH).

O cálcio é importante na transmissão dos impulsos nervosos, como um cofator em diversas reações enzimáticas, na preservação da contractilidade muscular normal, e no processo de coagulação. Uma redução significativa na concentração do cálcio resulta em tetania muscular. Uma concentração de iões de cálcio acima do normal produz uma excitabilidade neuromuscular diminuída e fraqueza muscular juntamente com outros sintomas mais complexos ⁶.

O método utilizado para a determinação do cálcio baseia-se na reação de iões de cálcio (Ca^{2+}) com Arsenazo III para formar um complexo de cor roxa intensa. O aumento resultante da absorvância a 660/700 nm é diretamente proporcional à concentração de cálcio da amostra⁶.

1.11.2 Fosfato

O fósforo apresenta duas formas, o fosfato inorgânico e o fosfato orgânico, este é um elemento amplamente distribuído no corpo humano. O fosfato inorgânico é a fração medida pelos laboratórios clínicos ⁶.

Hipofosfatemia ou depleção de fosfato pode ser causada por perda renal ou diminuição da absorção intestinal. A hiperfosfatemia é geralmente secundária à incapacidade renal de excretar fosfato, como na insuficiência renal. Moderado aumento de fosfato no soro ocorre em indivíduos com baixo nível de PTH (hipoparatiroidismo) ou resistência ao PTH (pseudo-hipoparatiroidismo) ⁶.

Com isto a avaliação da concentração do fósforo permite realizar o diagnóstico e monitorização de vários distúrbios, incluindo doenças renais e das glândulas paratiróides.

O método utilizado para a determinação do fósforo consiste na reação do fosfato inorgânico que reage com o molibdato, formando um complexo heteropoliácido. A leitura é feita espectrofotometricamente a 340/380 nm ⁶.

1.11.3 Magnésio

O magnésio é um dos principais cátions intracelulares em termos de concentração, logo a seguir ao potássio. As medições de magnésio são utilizadas no diagnóstico e tratamento da hipomagnesemia (anormalmente baixa) e hipermagnesemia (anormalmente elevada). O magnésio é cofator de vários sistemas enzimáticos importantes, como a fosfatase alcalina, fosfatase ácida e creatina cinase ⁶.

Foram observados níveis reduzidos de magnésio no soro em casos de diabetes, alcoolismo, diurese, hipertireoidismo, hipoparatiroidismo, enfarte do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva e cirrose hepática. Níveis elevados de magnésio no soro foram detectados em casos de insuficiência renal, desidratação, acidose diabética grave e doença de Addison ⁶.

O método utilizado para a determinação do magnésio é um método direto no qual o magnésio forma um complexo colorido com azul de xilidil numa solução fortemente básica. A cor produzida é medida espectrofotometricamente a 520/800 nm e é proporcional à concentração de magnésio ⁶.

1.12 Equilíbrio hidro-eletrolítico

Os eletrólitos são aniões, iões carregados negativamente, ou catiões, iões carregados positivamente. Os eletrólitos fisiológicos mais importantes são: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} . Os principais eletrólitos (Na^+ , K^+ , Cl^- e HCO_3^-) estão presentes principalmente como iões livres, enquanto o Ca^{2+} e o Mg^{2+} se encontram ligados a proteínas, principalmente à albumina ⁶.

1.12.1 Sódio

O sódio é o principal catião do fluido extracelular. O corpo humano requer cerca de 1 a 2 mmol/dL, o excesso, obtido pela alimentação, é excretado pelos rins, que são os reguladores finais da quantidade de Na^+ (e, portanto, da água) ⁶.

A hipernatremia e a hiponatremia designam concentrações elevadas e baixas de sódio, respetivamente. A hipernatremia surge em situações de desidratação (hipovolémia) ou hidratação excessiva (hipervolémia). Os sintomas de hipernatremia são principalmente neurológicos. A maioria dos casos de hipernatremia ocorre em pacientes com estado mental alterado ou em recém-nascidos, os quais podem ter dificuldade na reidratação ⁶.

O método utilizado para a determinação do sódio é o elétrodo seletivo de iões (ISE), que consiste num elétrodo potenciométrico especial constituído por uma membrana seletivamente permeável a um único tipo ião; o potencial produzido na interface membrana/solução de amostra é proporcional ao logaritmo à concentração do ião em questão ⁶.

1.12.2 Potássio

O potássio é o principal catião intracelular. As concentrações intracelulares elevadas são mantidas pela bomba de Na^+/K^+ -ATPase, que funciona apenas com o fornecimento de energia oxidativa para transportar continuamente o K^+ contra o gradiente de concentração. O potássio absorvido no trato gastrintestinal é rapidamente distribuído, com uma pequena quantidade absorvida pelas células e o excesso excretado pelos rins, à semelhança do sódio ⁶.

Perturbações na homeostase de K^+ geram consequências graves. Por exemplo, a diminuição de K^+ extracelular (hipocaliemia) é caracterizada por fraqueza muscular, irritabilidade e paralisia. Altas concentrações de K^+ extracelular (hipercaliemia) podem gerar sintomas de confusão mental, fraqueza, formigamento e fraqueza dos músculos respiratórios. Efeitos cardíacos da hipercaliemia incluem bradicardia e defeitos de condução ⁶.

O método utilizado para a determinação do potássio é o eletrodo seletivo de iões (ISE), como descrito para o sódio.

1.12.3 Cloretos

O cloreto (Cl^-) é o principal anião extracelular e está significativamente envolvido na distribuição de água, na pressão osmótica e no equilíbrio anião-catião no fluido extracelular. Os iões cloreto são quase completamente absorvidos a partir do trato intestinal e são excretados pelos rins ⁶.

As concentrações de Cl^- no plasma geralmente acompanham as concentrações de Na^+ . No entanto, a determinação da concentração plasmática de Cl^- é útil no diagnóstico diferencial de distúrbios de desequilíbrio ácido-base. Alterações na concentração dos cloretos levam a situações de hipoclorémia, baixa concentração de Cl^- , normalmente acompanhado por um aumento de HCO_3^- , levando a situações de acidose respiratória. O aumento da concentração plasmática de Cl^- , ocorre em situações de desidratação ou diarreias prolongadas com perda de bicarbonato de sódio. Um aumento na concentração de Cl^- também pode ocorrer na alcalose respiratória devido à compensação renal ao excretar HCO_3^- ⁶.

O método utilizado para a determinação do cloreto é o eletrodo seletivo de iões (ISE), como descrito para o sódio.

1.13 Espermograma

O espermograma é um dos primeiros exames a praticar no caso de esterelidade de um casal. No Coimbralab esta é uma análise que se realiza no setor da bioquímica e é frequentemente pedida pelos utentes. O espermograma é recolhido após 3 ou 4 dias de abstinência. Uma abstinência mais longa implica o risco diminuir a mobilidade; mais curta, diminui a taxa de espermatozóides. A recolha faz-se por masturbação.

O esperma normal tem um volume de 2 de 6 ml e um aspecto branco e translúcido; liquefaz-se em menos de 30 minutos e o seu pH está compreendido entre 7,2 e 7,8. Contém entre 25 e 250 milhões de espermatozóides/ml, sendo mais de 60% de formas normais.

O estudo da mobilidade aborda a progressão linear rápida (tipo a), a progressão linear lenta (tipo b), movimento sem progressão (tipo c) e imobilidade (tipo d) dos espermatozóides. O tipo a e o tipo b quando somados tem que ser superior a 32% para ser normal. Para o estudo da vitalidade contam-se os espermatozóides vivos que coram de branco e os espermatozóides mortos que coram de rosa (Tabela 7).

Tabela 7 – Avaliação da vitalidade dos espermatozoides.

Imagem	Legenda
	Espermatozóide vivo
	Espermatozóide morto

No estudo morfológico verificam-se as formas e anomalias dos espermatozoides. Alguns exemplos de defeitos morfológicos estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 – Principais alterações encontradas na morfologia dos espermatozoides.

Imagem	Legenda
	Alteração da cauda (Bicéfalos)
	Alteração da peça intermédia
	Alteração da cabeça (duas cabeças)

A interpretação de um espermograma é sempre delicada porque numerosos factores influenciam a composição do esperma humano. Algumas perturbações são conhecidas como a azoospermia que se define pela ausência de espermatozoides e a oligospermia que se define por uma taxa de espermatozoides inferior a 20 milhões/ml ³⁴.

Parte II
Instituto Português de
Oncologia de Coimbra
(IPO)

CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE ESTÁGIO

O Instituto Português de Oncologia de Coimbra (IPO) integra a rede de prestação de cuidados de saúde do Serviço Nacional de Saúde (SNS) e é responsável pelo diagnóstico e tratamento da doença oncológica na Região Centro.

O estágio foi realizado no Serviço de Patologia Clínica (SPC), situado no edifício da Oncologia Médica e Laboratórios e é constituído por quatro setores distintos, sendo o diretor do serviço o Dr. Luís Nina, médico especialista em patologia clínica.

O utente dirige-se ao laboratório e o pessoal administrativo da secretaria é o responsável por documentar os dados do utente e, com base nas requisições médicas, registar quais as análises a efetuar. Após o registo, é atribuído a cada utente um número de identificação composto por 9 dígitos, que engloba a data da colheita e o número da amostra dessa mesma data, o que facilita o fluxo das amostras no laboratório.

A colheita é realizada para os contentores adequados, consoante as análises previamente requisitadas pelo médico. Quanto aos doentes internados no IPOCFG, as suas amostras são colhidas pelo pessoal técnico do SPC e depois são enviadas para o SPC, passando também pelo registo na secretaria. Por norma, são colhidas em média 350 amostras por dia.

Após a realização das colheitas, os contentores são devidamente etiquetados e, as requisições ficam no secretariado (ordens COVID), exceto a Microbiologia que regista as suas próprias análises. Os contentores são então distribuídos pelos diferentes setores – Hematologia, Microbiologia, Bioquímica e Imunologia/Hormonologia – onde se procede de imediato à receção da amostra e ao seu correto processamento analítico.

Após a obtenção dos resultados analíticos, os valores obtidos são enviados para o programa informático, de modo a efetuar-se a validação biopatológica e a emissão do boletim de resultados para o clínico.

ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS

Nos diferentes sectores os equipamentos apresentam uma grande importância, realizando a maioria das análises de forma automática, evitando erros analíticos e uma maior exatidão e precisão. Abaixo são descritos os equipamentos e os respetivos métodos e análises dos sectores de Microbiologia e Imunologia/hormonologia (Tabela 9).

Devido ao elevado número de parâmetros analisados em alguns equipamentos são descritos apenas alguns exemplos.

Tabela 9 – Equipamentos e respetivos métodos e análises dos sectores de Microbiologia e Imunologia/hormonologia.

Equipamento	Método	Análise
Microbiologia		
Vltek® 2	Método Viteck	Identificação dos microrganismos e estudo da suscetibilidade antimicrobiana.
Batec® 9050	Método BD (Fluorescência)	Incubação de hemoculturas.
Estufas a 37°C (com e sem CO ₂), 30°, 25° e 42°C	-	Incubação de primoculturas e sementeiras.
Imunologia		
Immulite® 2000 XPi	Quimioluminescência	CEA, Eritropoietina, AFP, Anticorpos anti-peroxidase (TPO), PSA total e livre, Gastrina, Beta 2 microglobulina, HCG total, Δ-4 – Androstenediona, HGH e IGF-1.
Advia Centaur® XP	Quimioluminescência	Ferritina, 25OH-vitamina D total, LH, TSH, FSH, PTH, Estradiol, Progesterona, Prolactina.
IDS Isys®	Quimioluminescência	Renina plasmática, Anticorpos anti-rubéola, anti- <i>Toxoplasma gondii</i> , anti-HSV 1 e 2 e anti-EBV
Viva-E®	Imunoensaio enzimático de multiplicação (EMIT)	Metotrexato, Carbamazepina, Ácido valpróico, Gentamicina, Fenitoína, Fenobarbital.
Cobas® 600 e 601	Eletroquimioluminescência	CA 19.9, CA 72.4, CA 125, Cortisol, Testosterona total, Ácido fólico, Vitamina B12, T3 total e livre, T4 total e livre.
Kryptor® Gold	<i>Time-Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE)</i>	NSE, Procalcitonina, CA 15.3, CGA, SCC.
Attelica® NEPH630	Nefelometria	Proteína-C reativa alta sensibilidade, Complemento C3 e C4, Transferrina, Recetores solúveis da transferrina.
Optilite®	Turbidimetria	Cadeias leves Kappa e Lambda, IgG4 e IgD.
ImmunoCAP® 200	FEIA	Anti-dsDNA, anti-Cardiolipina IgG e IgM, anti-β2-Glicoproteína I IgG e IgM, anti-CCP2, anti-RF IgM.

I. Microbiologia

A área da microbiologia compreende o estudo do diagnóstico e controlo de doenças infecciosas, na qual é analisada uma ampla variedade de produtos biológicos, nomeadamente urina, sangue, fezes, cateteres, expetorações entre outros produtos.

Para a pesquisa de bactérias e leveduras, as amostras são inoculadas em meios adequados e são incubadas. Após a incubação, procede-se à observação das culturas,

analisando o possível crescimento microbiano. Na presença de crescimento é efetuada a avaliação da morfologia, cor e cheiro das colónias, o que permite uma identificação presuntiva dos microrganismos presentes.

Posteriormente, é efetuado o teste identificação de bactérias e leveduras e a sua suscetibilidade aos antimicrobianos, no VITEK® 2 (Tabela 9), cuja execução é crítica para o estabelecimento da terapêutica. O equipamento fornece o valor da concentração mínima inibitória (CMI) e indica se os antibióticos são suscetíveis, intermédios ou resistentes. É realizada uma avaliação externa de qualidade trimestralmente.

Caso Clínico 7

Mulher, de 46 anos, apresenta queixas de obstrução nasal de longa data. Foi encaminhada para uma consulta de Otorrinolaringologia no IPO de Coimbra para avaliação.

No exame objetivo é evidente a presença de uma massa na cavidade nasal direita, tendo-se realizado exames imagiológicos que revelaram a presença de um abscesso no seio maxilar direito, pelo que se efetuou a sua drenagem cirúrgica. Foi solicitada a análise microbiológica do drenado, mas a amostra só foi enviada para o Sector de Microbiologia no dia seguinte à colheita, em contentor estéril, tendo sido conservada no frio até esse momento, informação que só foi obtida após contacto com o clínico, devido a dificuldades de valorização das culturas.

O exame direto da amostra corado pela técnica de Gram apresentou alguns leucócitos polimorfonucleares e flora muito escassa com raros cocos Gram positivo e alguns cocobacilos Gram negativo pleomórficos (Figura 3).

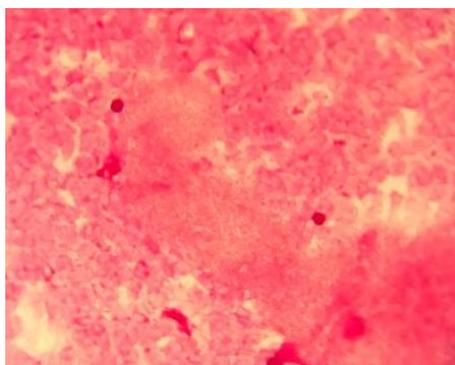


Figura 3 – Exame direto da amostra corado pela técnica de Gram do exsudato nasal purulento profundo.

As culturas foram repetidas 3 vezes, porque não se conseguiram recuperar os bacilos Gram negativo pleomórficos com morfologia característica de *Haemophilus influenzae*, mas

apresentaram desenvolvimento de colônias de *Staphylococcus aureus* (MSSA) e *Citrobacter Koseri*, que não integram a microbiota local, tendo sido valorizados (Figuras 4 e 5).

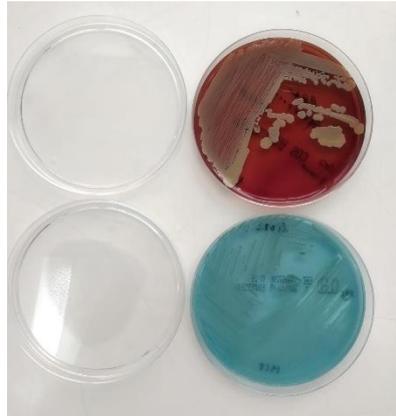


Figura 4 – *Staphylococcus aureus* e *Citrobacter koseri*.

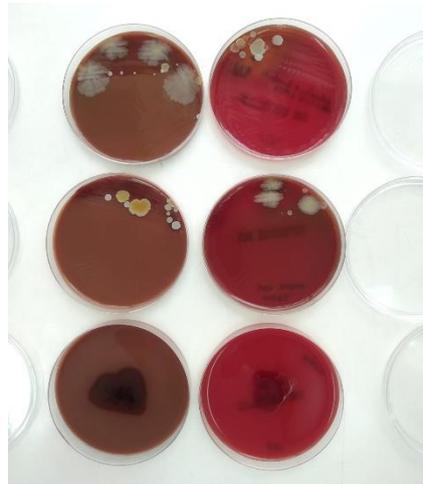


Figura 5 – Primoculturas repetidas 3 vezes, sendo que a última foi inoculada por inundação.

Após colheita iniciou terapêutica com amoxiciclina-ácido clavulânico, durante 8 dias e na consulta de avaliação verificou-se melhoria clínica.

Como se pode verificar foram cometidos três erros pré-analíticos nesta história clínica. O primeiro ocorreu colheita da amostra que foi feita em contentor e não em meio de transporte para anaeróbios ou seringa capsulada, visto tratar-se de um abscesso que foi drenado. O segundo observa-se no tempo de espera entre a colheita da amostra e o seu envio para o laboratório e o terceiro reside na refrigeração da amostra que pode ser responsável pela não viabilidade dos microrganismos a considerar.

2. Hematologia

A hematologia é ciência que se dedica ao estudo do sangue. São estudadas as células do sangue ou seja, os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas e os órgãos hematopoiéticos, como a medula óssea, gânglios linfáticos e baço ³⁵.

2.1 Equipamentos e métodos utilizados

Os equipamentos utilizados no setor da hematologia estão evidenciados na Tabela 10, assim como os respectivos métodos e análises que realizam.

Tabela 10 – Equipamentos e respectivos métodos e análises do sector de hematologia.

Equipamento	Método	Análise
Aerospray 7150 Slide Stainer Centrifuge®	Coloração	Coloração de esfregaços sanguíneos
Coulter DxH 900 Analyzer®	Princípio de Coulter	Hemograma
TestI BCL®	Fotometria cinética	Velocidade de sedimentação
ACL Top® CTS 350	Turbidimetria	Provas de coagulação
Cytomics® FC500	Citometria de fluxo	Imunofenotipagem
GeneXpert®	PCR em tempo real	Deteção do gene <i>BCR-ABL</i>

A coloração dos esfregaços sanguíneos é feita pelo Aerospray 7150 Slide Stainer Centrifuge®, usando a coloração de Wright (Tabela 10).

O Coulter DxH 900 Analyzer® é o equipamento usado para a realização dos hemogramas através da utilização do princípio de Coulter que consiste na passagem de uma partícula através de uma abertura, e quanto maior a partícula, maior a resistência, maior a voltagem. Cada pico de tensão é diretamente proporcional ao tamanho da célula ³⁶. Após a realização dos hemogramas, os tubos seguem para o TestI BCL® que permite avaliar a velocidade de sedimentação (Tabela 10).

O ACL Top® CTS 350 realiza as provas de coagulação como a protrombina (PT), o tempo de protrombina parcialmente ativado (PTTa), o tempo de trombina (TT), o fibrinogénio, os D-dímeros, a proteína C e S e o anticoagulante lúpico.

O Cytomics® FC500 permite realizar a imunofenotipagem de diferentes amostras (sangue, LCR, biópsias de gânglios, aspirados medulares, entre outras amostras) (Tabela 10).

2.2 Hematopoiese

A hematopoiese é o processo de maturação de células sanguíneas que inclui renovação celular, proliferação, diferenciação e maturação. Estes processos resultam na formação, desenvolvimento e especialização de todas as células sanguíneas funcionais que são libertadas da medula óssea para a circulação ³⁵.

Nos adultos, o tecido hematopoiético está localizado na medula óssea, nos gânglios linfáticos, no baço, no fígado e no timo. A medula óssea contém células eritróides, mielóides, megacariocíticas e linfóides em desenvolvimento ³⁵.

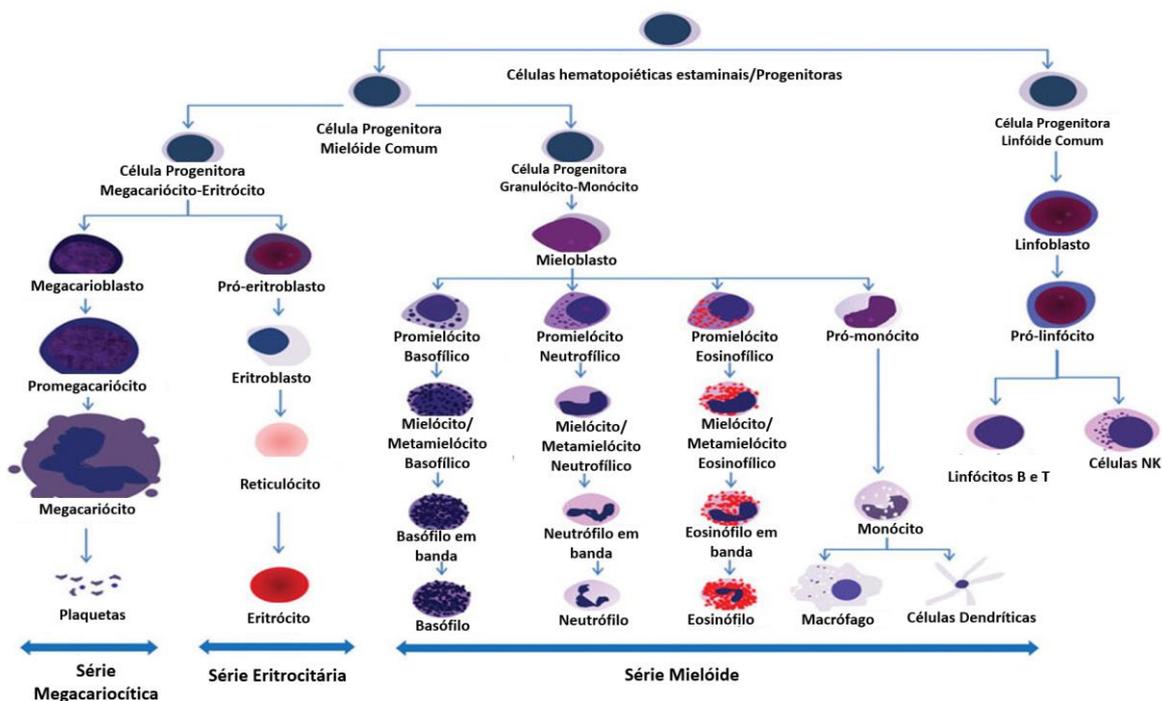


Figura 6 – Hierarquia das células hematopoiéticas durante a diferenciação normal de células estaminais derivadas da medula óssea em células sanguíneas de linhagem específica ³⁷.

As células estaminais hematopoiéticas, por definição, são capazes de autorrenovação, são pluripotentes e dão origem a linhas celulares diferenciadas. As células estaminais indiferenciadas podem-se diferenciar em células progenitoras da linhagem linfóide ou mielóide (Figura 6). As células progenitoras linfóides proliferam e diferenciam-se em linhagens T, B e linfócitos NK e linhagens dendríticas; as células progenitoras mielóides proliferam e diferenciam-se em linhagens granulocíticas, eritrocíticas, monocíticas e megacariocíticas individuais ^{35,37}.

2.3 Hemograma

O hemograma completo é provavelmente um dos testes mais amplamente realizados no mundo ³⁸.

2.3.1 Parâmetros de avaliação eritrocitária

O eritrograma analisa os diferentes parâmetros relacionados com os eritrócitos, que inclui a contagem dos eritrócitos, concentração da hemoglobina, hematócrito e os índices eritrocitários: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) e distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW).

2.3.1.1 Contagem de eritrócitos

Todos os dias, são produzidos cerca de 10^{12} novos eritrócitos por meio de um processo complexo e regulado. Os eritrócitos têm a função de transportar o oxigênio dos pulmões para os tecidos, onde este é libertado. Isto é conseguido pela ligação do oxigênio à hemoglobina ³⁵.

A contagem de eritrócitos é um indicador da produção e tempo de meia vida dos eritrócitos e é expressa em número de células por microlitro ³⁵.

2.3.1.2 Concentração de Hemoglobina

A concentração da hemoglobina (Hb) é muito útil para a determinação de situações de anemia, sendo um biomarcador específico e exato ³⁹. A determinação da concentração de Hb é normalmente expressa em g/dL.

A anemia é então definida por uma concentração de hemoglobina abaixo do intervalo específico para idade, sexo ou estilo de vida. A concentração de hemoglobina pode ser influenciada por outros fatores, como altitude e hábito tabágicos ³⁹.

2.3.1.3 Hematócrito

O hematócrito corresponde à razão entre o volume ocupado pelos eritrócitos e o volume de sangue total é expresso na forma de percentagem. O valor do hematócrito pode ser influenciado pelo tamanho dos eritrócitos, sendo que se deve ter em consideração este fator quando se interpreta este parâmetro ³⁸.

O hematócrito é importante para o diagnóstico e monitorização de muitos distúrbios, como anemia falciforme, anemias macrocíticas, anemias hipocrômicas, esferocitose e

talassémia. Outras causas de alteração do hematócrito são hemólises recentes ou situações de desidratação ³⁵.

Índices de classificação dos eritrócitos

A classificação dos eritrócitos baseia-se em índices eritrócitarios, que permitem avaliar o tamanho, quantidade e a concentração de hemoglobina, sendo usados na classificação morfológica das anemias.

2.3.1.4 Volume corpuscular médio (VCM)

O volume corpuscular médio (VCM) representa o tamanho dos eritrócitos e pode diferenciar possíveis etiologias da anemia. Isso levou aos conceitos de anemia “microcítica”, “normocítica” e “macrocítica” ³⁸.

As anemias microcíticas apresentam volume corpuscular médio (VCM) diminuído e as causas que levam à diminuição deste parâmetro são a insuficiência de ferro, talassemia ou anemias sideroblásticas (defeito da síntese do heme) ³⁸.

As anemias macrocíticas caracterizam-se por VCM aumentado e distinguem-se dois tipos principais de perturbações, quer associado a defeitos de membrana, quer relacionado com defeitos de síntese de DNA. Os defeitos na membrana dos eritrócitos podem ocorrer em situações de doença hepática ou hipotireoidismo, já os defeitos na síntese de DNA observam-se na anemia megaloblástica ou em situações de quimioterapia ³⁸.

A dificuldade em usar o volume dos eritrócitos como meio de distinção de patologias que levam à anemia, reside no facto de os eritrócitos demonstrarem um tamanho normal, anemia normocítica, como se observa em estágios iniciais de deficiência de ferro ou quando duas patologias ocorrem em simultâneo, como por exemplo deficiência de ferro e doença hepática ou em situações de doenças crónicas ³⁸.

2.3.1.5 Hemoglobina corpuscular média (HCM)

A hemoglobina corpuscular média (HCM) representa o conteúdo médio de hemoglobina em cada eritrócito. Geralmente, não é utilizada na classificação das anemias, sendo preferível a utilização da CHCM ³⁵.

A HCM é calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{HCM} = \frac{\text{HGB (g/dL)} \times 10}{\text{RBC} (\times 10^{12}/\text{L})}$$

Sendo que, HGB é a concentração de hemoglobina e RBC a contagem de eritrócitos. É expresso em picogramas (pg).

2.3.1.6 Concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM)

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) representa a concentração média de hemoglobina em cada eritrócito, e permite classificar as anemias como hipocrômicas, quando diminuída, ou normocrômicas, quando dentro do intervalo de referência.

A CHCM é calculada a partir da seguinte equação:

$$\text{CHCM} = \frac{\text{HGB}(\text{g/dL}) \times 100}{\text{HTC}(\%)}$$

Em que HGB é a concentração de hemoglobina e HTC é o hematócrito. Este parâmetro é expresso em g/dL.

2.3.1.7 Distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW)

A distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW) é um parâmetro, que reflete o grau de heterogeneidade do tamanho dos eritrócitos (convencionalmente conhecido como anisocitose) e é tradicionalmente utilizado na hematologia laboratorial para diagnóstico diferencial de anemias ⁴⁰.

Um aumento da RDW reflete uma desregulação da homeostase eritrocitária, ou seja, uma eritropoiese alterada, que pode ser atribuída a uma variedade de perturbações fisiológicas subjacentes, como stress oxidativo, inflamação, dislipidemia, hipertensão, fragmentação dos eritrócitos e alteração da função da eritropoietina ⁴⁰.

Embora o esquema de classificação não seja exato, um VCM baixo com alta RDW sugere deficiência de ferro, enquanto um VCM alto e RDW alta sugere deficiência de folato e/ou vitamina B12 ou mielodisplasia ³⁵.

2.3.1.8 Reticulócitos

O reticulócito é o estágio imediatamente anterior ao amadurecimento do eritrócito e é o estágio que completa a produção de hemoglobina a partir do RNA mensageiro residual usando os ribossomas. Uma pequena quantidade de RNA ribossômico residual está presente e pode ser visualizado em coloração com azul de metileno. Os ribossomas residuais aparecem como pequenos pontos azuis ³⁵.

A contagem de reticulócitos varia entre 0,5 e 2,5% e estes valores podem elevar-se em situações de anemia. Níveis baixos de reticulócitos em pessoas anémicas sugerem diminuição da função da medula óssea ⁴¹.

2.3.2 Parâmetros de avaliação leucocitária

Os leucócitos são células dedicadas a proteger o hospedeiro de infecções e lesões. Uma contagem reduzida de leucócitos designa-se de leucopenia e uma contagem aumentada de leucócitos designa-se de leucocitose. A contagem dos leucócitos totais tem um valor clínico limitado, devendo ser avaliados os diferentes tipos de leucócitos no sangue.

2.3.2.1 Contagem total de leucócitos

A contagem de leucócitos consiste na determinação de vários parâmetros como, o número de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e células imaturas ou atípicas presentes no sangue. Tanto a leucocitose como a leucopenia, podem ser observadas numa ampla gama de condições, incluindo condições benignas e malignas. Ambas as situações requerem um exame diferencial e morfológico preciso, de forma a determinar qual a linha celular que está aumentada ou diminuída ⁴².

2.3.2.2 Fórmula leucocitária

A fórmula leucocitária refere-se às percentagens e número absoluto de cada linhagem leucocitária, ou seja, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos ¹⁷. Também é possível distinguir a presença de células imaturas das diferentes linhagens, tendo em conta que se avaliam vários fatores, como por exemplo volume e dispersão de luz.

2.3.3 Parâmetros de avaliação plaquetar

As plaquetas são fragmentos do citoplasma do megacariócito que contribuem para a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos, aderindo aos vasos sanguíneos danificados e formando agregados plaquetares, de forma a desencadear processos de formação de coágulos. As plaquetas são os principais fragmentos que controlam a hemostasia, ou seja, uma série de mecanismos celulares e plasmáticos que reparam os vasos evitando as hemorragias ³⁵.

A ativação descontrolada das plaquetas é responsável por patologias como, trombose venosa profunda, embolia pulmonar ou acidentes vasculares cerebrais ³⁵.

Uma contagem de plaquetas elevada (trombocitose) é sinal de possível inflamação ou trauma, sendo necessário confirmar estas situações usando outros biomarcadores. Uma baixa contagem de plaquetas (trombocitopenia) é uma consequência comum do tratamento com

quimioterápicos e pode ser fatal. Como as plaquetas são responsáveis pela manutenção e reparo normais dos vasos sanguíneos, a trombocitopenia geralmente é acompanhada de contusões fáceis e hemorragia descontrolada ³⁵.

2.4 Esfregaço sanguíneo

Um esfregaço de sangue periférico, corado e cuidadosamente examinado pode fornecer informações valiosas sobre a saúde de um paciente. A relevância diagnóstica de um esfregaço é enorme. O esfregaço deve avaliar todas as características da morfologia de cada linhagem hemopoética. A distribuição, tamanho, forma, cor, inclusões celulares das diferentes linhagens são cuidadosamente avaliadas ³⁵.

2.4.1 Morfologia dos eritrócitos

O eritrócito normal apresenta forma de disco bicôncavo, apresentando cor rosa quando corados com a coloração de Wright, porque o conteúdo de hemoglobina dos eritrócitos capta a eosina, componente acidofílico do corante. Variações anormais no tamanho, forma, cor, presença de inclusões intracelulares e arranjo patológico das células sugerem uma série de anormalidades ⁴³.

Normalmente, os glóbulos vermelhos exibem pequenas variações no tamanho, refletidas pela largura normal de distribuição de glóbulos vermelhos (RDW). Uma grande variação no tamanho das células é descrita como anisocitose. Anormalidades no tamanho das células podem ser micróцитos (menores) ou macróцитos (eritrócitos maiores). Os macróцитos podem ser ovais ou redondos e isso tem implicações no diagnóstico. A macrocitose oval está associada a anemias megaloblásticas (deficiência de folato ou cobalamina), mielodisplasia e uso de drogas. Os macróцитos redondos são vistos na doença hepática e no alcoolismo ⁴³.

A cor dos glóbulos vermelhos é refletida pelo seu conteúdo de hemoglobina, e de acordo com os índices hematimétricos MCH e CHCM pode classificar-se como normocromia ou hipocromia ⁴³.

2.4.2 Morfologia dos leucócitos

A confirmação em lâmina da contagem automatizada, através do esfregaço do sangue periférico, é normalmente realizada quando ocorrem situações de leucocitose ou sempre que a avaliação dos histogramas fornecidos pelo equipamento o justifiquem.

No sangue periférico, a proporção de células polimorfonucleares (PMN) representam cerca de 40 a 75% dos leucócitos, linfócitos de 20 a 45%, eosinófilos de 1 a 6%, monócitos de 2 a 10% e basófilos < 1%. Reduções ou aumento em qualquer série de células brancas podem ser absolutas ou relativas ⁴³.

A neutrofilia é geralmente uma resposta a infeções bacterianas, outras situações patológicas podem ser devidas a enfarte do miocárdio, queimaduras, uso de corticosteróides, malignidade, leucemia mielóide crónica. Um aumento anormal na proporção de neutrófilos precusores, designa-se por desvio à esquerda ⁴³.

O desvio à direita ou a hipersegmentação de neutrófilos é um recurso diagnóstico da anemia megaloblástica. É definido pela presença de pelo menos um neutrófilo com 6 ou mais segmentos nucleares. A hipersegmentação de neutrófilos pode estar associada a anemia por deficiência de vitamina B12 ou de folato ⁴³.

A linfocitose é devida a infeções virais agudas, doenças do tecido conjuntivo, tireotoxicose e alterações adrenocorticais. As causas de linfocitose absoluta incluem condições reativas como mononucleose infecciosa, hepatite, infeções por citomegalovírus, infeções bacterianas intracelulares crónicas (como tuberculose ou brucelose), leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda e derrames leucémicos de linfomas ⁴³.

Eosinofilia significativa pode ser observada em alergias e infeções por parasitas. No entanto, eosinofilia acentuada sugere síndrome hipereosinofílica ou uma entidade neoplásica, especialmente quando há displasia celular associada, como na leucemia eosinofílica crónica ⁴³.

A basofilia é vista em estados de hipersensibilidade e condições malignas, como linfomas e leucemia mielóide crónica ⁴³.

A monocitose é observada em infeções bacterianas crónicas, como tuberculose, condições inflamatórias como a doença de Crohn, neoplasias hematológicas como leucemia mielóide crónica e leucemia mielóide aguda ⁴³.

2.4.3 Morfologia das plaquetas

As plaquetas podem estar falsamente diminuídas devido à agregação plaquetária induzida por EDTA ou na presença de coágulos na amostra de sangue ⁴³.

Podem ser observadas plaquetas gigantes em condições hereditárias como a síndrome de Bernard Soulier, doença de May-Haggelin ou síndrome de Wiskott Aldrich e patologias adquiridas como anemia megaloblástica e distúrbios mieloproliferativos ⁴³.

2.5 Velocidade de sedimentação (VS)

A velocidade de sedimentação (VS) é baseada no princípio da sedimentação de glóbulos vermelhos no plasma de uma amostra de sangue durante um período de tempo específico e é expressa em milímetros/hora. A VS é influenciada por uma ampla variedade de fatores, incluindo alterações dos eritrócitos, bem como alterações nas concentrações normais de várias proteínas plasmáticas ⁴⁴.

Este parâmetro fornece uma medida do nível de proteínas da fase aguda e, portanto, de inflamação. Embora o teste não seja específico para nenhuma doença em particular, este permanece amplamente utilizado devido à sua utilidade clínica no estabelecimento de diagnóstico de várias doenças, além de permitir a monitorização da resposta terapêutica ⁴⁵.

2.6 Hemóstase

A hemóstase é um processo fisiológico complexo que quando ocorre uma lesão, produz um coágulo para interromper o sangramento, confina o coágulo ao local da lesão e, finalmente, dissolve o coágulo à medida que a lesão cicatriza ^{46,47}.

A hemóstase primária refere-se à vasoconstrição, que diminui o fluxo sanguíneo e à ativação das plaquetas, que aderem ao local da lesão e agregam-se com outras plaquetas para formar um tampão plaquetar. A vasoconstrição e a formação de agregados de plaquetas compreendem a resposta inicial, rápida e de curta duração aos danos nos vasos. A hemóstase secundária corresponde à ativação de diferentes proteínas de coagulação no plasma, para formar um coágulo de fibrina. Estas proteínas são ativadas durante o processo de coagulação. O evento final da hemóstase é a fibrinólise, ou seja a digestão e a remoção gradual do coágulo de fibrina à medida que a cicatrização ocorre ³⁵.

Quando os mecanismos de hemóstase estão desequilibrados, hemorragia (sangramento) ou trombose (coagulação patológica) podem ser fatais. A ausência de um único procoagulante plasmático pode levar o indivíduo a situações de hemorragia, inflamação crónica e dependência de transfusões. Por outro lado, a ausência de uma proteína de controlo permite que a coagulação continue sem controlo e resulta em trombose, acidente vascular cerebral, embolia pulmonar, trombose venosa profunda e eventos cardiovasculares ³⁵.

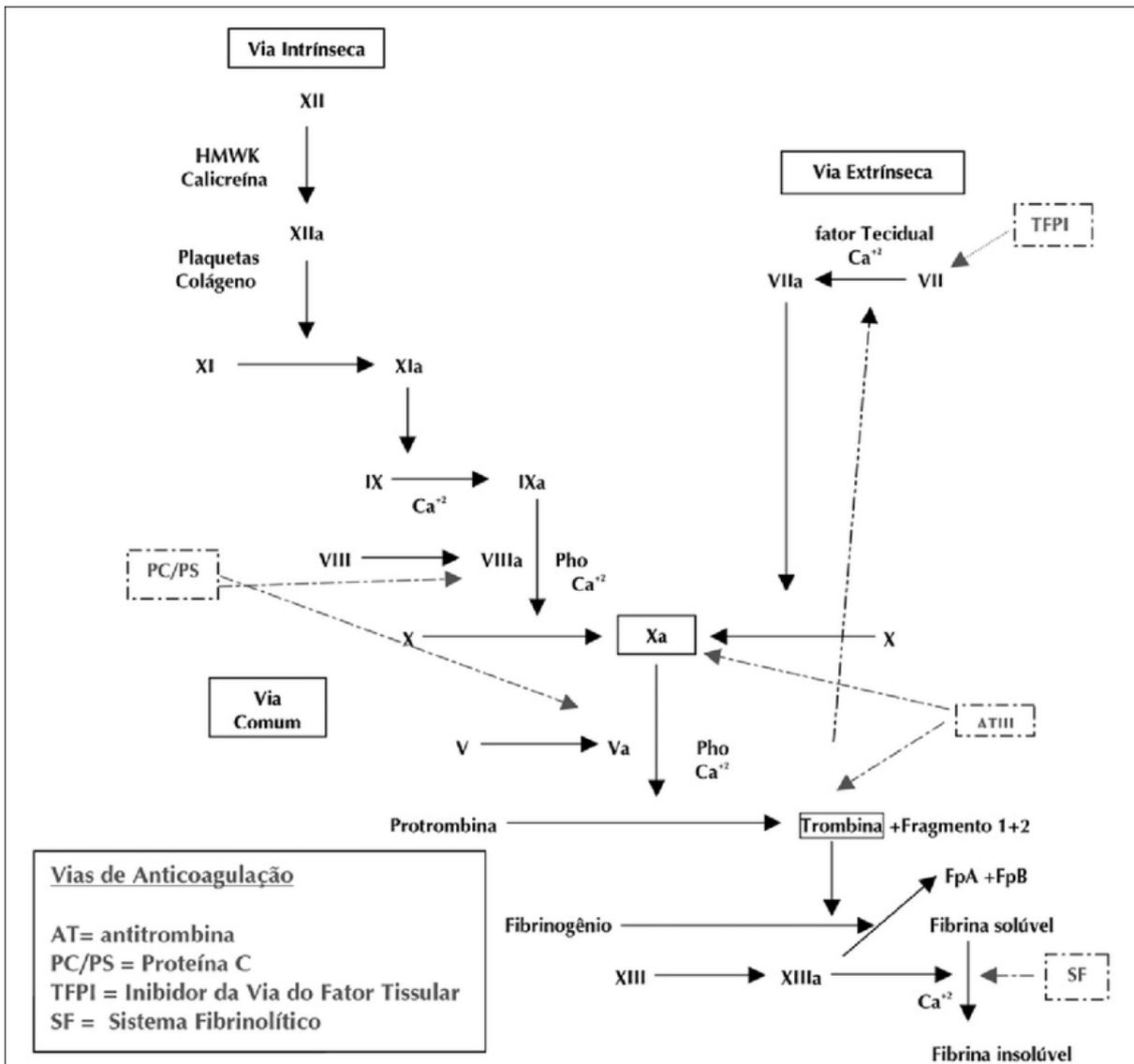


Figura 7 – Representação da cascata de coagulação ⁴⁷.

2.6.1 Testes de coagulação sanguínea

Os testes de coagulação sanguínea são ensaios que permitem avaliar uma fase particular da hemóstase. Estes testes são comumente usados para identificar defeitos das vias intrínseca, extrínseca e comum (Figura 7) da cascata de coagulação, para que testes mais direcionados possam ser realizados para identificar defeitos específicos ⁴⁸. Estes exames complementares permitem estabelecer um diagnóstico definitivo e correto.

Os testes utilizados são: o tempo de protrombina (PT), tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT) e o tempo de trombina (TT), para além do doseamento do fibrinogênio e D-dímeros que, numa abordagem sequencial, podem levar à determinação do anticoagulante lúpico, proteína C, proteína S e antitrombina.

2.6.1.1 Tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT)

O aPTT é usado para avaliar as vias intrínseca e comum da coagulação (Figura 7), deteta distúrbios hemorrágicos devido a deficiências dos fatores VIII, IX, XI, XII da via intrínseca e II, V, X da via comum ⁴⁹.

O aPTT é útil clinicamente como teste de triagem para deficiências de fatores herdados e adquiridos, bem como para a monitorização da terapia de heparina ⁴⁸.

2.6.1.2 Tempo de protrombina (TP)

O tempo de protrombina (TP) avalia a função da via extrínseca e comum da coagulação. O TP é sensível a fatores das vias extrínseca (VII) e comum (fatores II, V e X), bem como ao fibrinogénio ⁴⁸.

O TP é comumente usado para a monitorização da terapia anticoagulante de varfarina. A sensibilidade do TP varia de acordo com o fornecedor da tromboplastina, mas também varia de acordo com o instrumento utilizado. Para corrigir essas diferenças, o índice normalizado internacional (INR) foi desenvolvido para melhorar a padronização dos valores de PT globalmente. O INR representa a razão do TP que seria obtido se a tromboplastina de referência internacional tivesse sido usada para testar o paciente ⁴⁸, calcula-se através da seguinte equação:

$$INR = \left(\frac{TP_{pt}}{TP_{ref}} \right)^{ISI}$$

Em que o TP_{pt} indica o tempo de protrombina do paciente, o TP_{ref} indica o tempo de protrombina de referência e o ISI é o *International Sensitivity Index*.

2.6.1.3 Tempo de trombina (TT)

O tempo de trombina (TT) é usado para avaliar a conversão de fibrina em fibrinogénio na via comum da cascata de coagulação (Figura 7). O TT mede o tempo que demora até à formação do coágulo de fibrina quando a trombina é adicionada ao plasma ⁴⁸.

A trombina catalisa a conversão de fibrinogénio em fibrina, na última fase da formação final do coágulo ⁴⁸. O intervalo de referência normal do TT varia de acordo com o tipo e a concentração da preparação de trombina usada no ensaio e é estabelecido pelo laboratório.

2.6.1.4 Antitrombina

A antitrombina é o principal inibidor fisiológico da coagulação sanguínea. Inativa a trombina e o fator X ativado ⁵⁰.

A deficiência de antitrombina pode resultar de doenças hepáticas, má nutrição, cirurgias, queimaduras, heparina ou hemodiálise ⁵¹.

2.6.1.5 Proteína C e Proteína S

A proteína C é uma pró-enzima serina protease dependente de vitamina K, esta é convertida em proteína C ativada (aPC) pela trombina e pelo complexo de trombomodulina. Após a ativação, a aPC forma um complexo com a proteína S numa superfície fosfolipídica para inativar rapidamente os fatores Va e VIIIa ⁵⁰.

Deficiência de vitamina K, má nutrição, doenças hepáticas, coagulação intravascular disseminada ou sepsis podem ser algumas das causas que levam a uma diminuição de proteína C ⁵¹.

A proteína S é um cofator da proteína C, que aumenta a ligação da proteína C ativada à superfície dos fosfolípidos. Esta proteína circula ligada à proteína de ligação C4b, mas cerca de 30–40% permanece não ligada e ativa (proteína S livre) ²⁰. A proteína S também funciona como um cofator do inibidor da via do fator tecidual (TFPI), aumentando a inibição do fator Xa ⁵¹.

Causas como síndrome nefrótica, contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal, Lupus eritematoso ou gravidez, podem estar associadas ao decréscimo da proteína S ⁵¹.

2.6.1.6 Fibrinogénio e D-dímeros

A ativação do fibrinogénio pela trombina leva à formação de um coágulo eficaz ⁴⁸. Na maioria das ocasiões, o ensaio de fibrinogénio serve para fazer uma triagem hemostática geral em que se realiza em conjunto com o teste de PT e aPTT. O ensaio funcional do fibrinogénio é geralmente considerado o método mais confiável para uso generalizado ⁵².

Os ensaios de fibrinogénio são úteis para o diagnóstico de coagulação intravascular disseminada, fibrinólise primária e outras condições clínicas ⁴⁸.

O D-dímero é um produto específico da digestão apenas de fibrina reticulada e, portanto, é um marcador de trombose e fibrinólise, ou seja, trombina, fator XIIIa e ativação da plasmina. O imunoensaio D-dímero é usado para identificar a coagulação intravascular crónica e aguda e descartar tromboembolismo venoso ³⁵.

2.6.1.7 Anticoagulante Lúpico

O anticoagulante lúpico define um grupo heterogêneo de imunoglobulinas que inibem as reações de coagulação dependentes de fosfolípidios na ausência de deficiência de um fator de coagulação específico ⁵³.

De acordo com os critérios de classificação, anticoagulante lúpico persistente e/ou níveis médio-alto de IgG/IgM anti-β₂ glicoproteína I e/ou anticorpos IgG/IgM anticardiolipina constituem os critérios laboratoriais para o diagnóstico de síndrome antifosfolípida ⁵³.

A presença de anticoagulante lúpico é considerado o fator de risco adquirido mais importante para trombose, sendo também detetado em pessoas com acidente vascular cerebral, enfarte do miocárdio, trombose venosa profunda e abortos espontâneos ⁵³.

2.7 Análise genética do gene BCR-ABL

O teste molecular do gene de fusão BCR-ABL é o teste de rotina mais sensível para a monitorização da resposta à terapia em pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) ⁵⁴.

A LMC é uma neoplasia mieloproliferativa com incidência de 1 a 2 casos por 100 000 adultos. Esta resulta da translocação do gene ABL1, presente no cromossoma 9, para o gene BCR, presente no cromossoma 22. Este processo resulta no gene de fusão BCR-ABL1, também conhecido por cromossoma Filadélfia (Ph) ⁵⁵.

O diagnóstico da LMC é simples e consiste numa leucocitose inexplicável persistente (ou ocasionalmente trombocitose) e na presença do cromossoma Ph, que é detetado por citogenética de rotina, por fluorescência *in situ* hibridização (FISH) ou por estudos moleculares⁵⁵.

Caso Clínico 8

Mulher, de 66 anos, dirige-se ao IPO para uma consulta de Dermatologia, para repetida curetagem e crioterapia de várias verrugas plantares de ambos os pés. A avaliação do hemograma pela Dermatologia (27-07-2020) levou ao encaminhamento da doente para consulta de Hematologia Clínica, por trombocitose evidente, que foi confirmada com a doente persistir desde janeiro de 2020.

Na consulta de Hematologia Clínica foi requerido hemograma (10-09-2020), que confirmou a manutenção da trombocitose com ligeiro agravamento (Tabela II).

Tabela II – Hemograma do caso clínico 8.

Hemograma

	10-09-2020		27-07-2020		Valores de referência		Unidades	
Leucócitos	8,0		8,0		4,0 – 11,0		10 ³ /μL	
Neutrófilos	54,0	4,3	61,9	5,0	-	1,8 - 7,0	%	10 ³ /μL
Linfócitos	38,0	3,0	27,0	2,2	-	1,0 - 5,0	%	10 ³ /μL
Monócitos	3,0	0,2	7,8	0,6	-	0,1 - 1,2	%	10 ³ /μL
Eosinófilos	1,0	0,1	1,7	0,1	-	0,0 - 0,6	%	10 ³ /μL
Basófilos	2,0	0,2	1,6	0,1	-	0,0 - 0,2	%	10 ³ /μL
Mielócitos	1,0	0,08	-	-	-	-	%	10 ⁹ /L
Neut. em Bastão	1,0	0,08	-	-	-	-	%	10 ⁹ /L
Eritrócitos	* 3,9		* 3,77		4,0 - 5,5		10 ¹² /L	
Hemoglobina	* 11,5		* 11,1		12,0 - 16,0		g/dL	
Hematócrito	35,0		* 34,2		35,0 - 47,0		%	
VCM	89,7		90,6		85,0 - 95,0		fL	
HCM	29,4		29,3		27,0 - 32,0		pg	
CHCM	32,8		32,4		32,0 - 36,0		g/dL	
RDW	* 20,7		* 20,4		11,5 - 14,5		%	
Plaquetas	* 910		* 747		140 - 400		10 ³ /μL	
Plaquetócrito	* 0,862		* 0,706		0,160 - 0,350		%	
PDW	* 18,6		* 18,8		9,8 - 16,1		fL	

Dados os resultados o clínico efetuou colheita de aspirado de medula óssea, com pedido de pesquisa de mutação do Jak2^{V617F} de forma a confirmar a suspeita de diagnóstico (**Trombocitémia essencial**).

As amostras para pesquisa de mutação do Jak2^{V617F} são enviadas para o Hospital Pediátrico de Coimbra (CHUC) e analisado por PCR com *primer* específico.

Os resultados do medulograma estão representados a seguir (Tabela 12):

Tabela 12 – Medulograma e Citomorfologia do caso clínico 8.

Medulograma

	15/09/2020
Promielócitos	1
Mielócitos neutrófilos	1
Metamielócitos neutrófilos	1
Neutrófilos em bastão	2
Neutrófilos	58
Monócitos	5
Eosinófilos	2
Basófilos	2
Linfócitos	17
Eritroblastos policromáticos	2
Eritroblastos ortocromáticos	9

Citomorfologia

Megacariócitos	Alguns.
Fragmentos de medula óssea	Alguns. Observam-se fragmentos da medula óssea hipercelulares e megacariócitos.
Série eritróide	Pouco representada.
Série mielóide	Contaminação por sangue periférico com elevada contagem de neutrófilos maduros.
Razão mielóide/eritróide	5,73
Coloração de Perls	Poucos fragmentos de medula óssea. Não foi possível avaliar os depósitos de ferro.

Algumas imagens relativas ao esfregaço de sangue periférico e ao aspirado da medula óssea (megacariócitos e fragmentos) encontram-se a seguir (Figuras 8, 9 e 10):

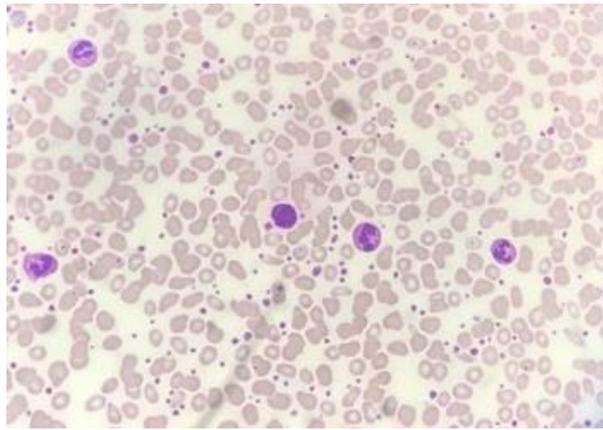


Figura 8 – Esfregaço de sangue periférico com marcada anisocitose plaquetar e eritrocitária com células em alvo e eliptócitos. Observam-se basófilos e neutrófilos.

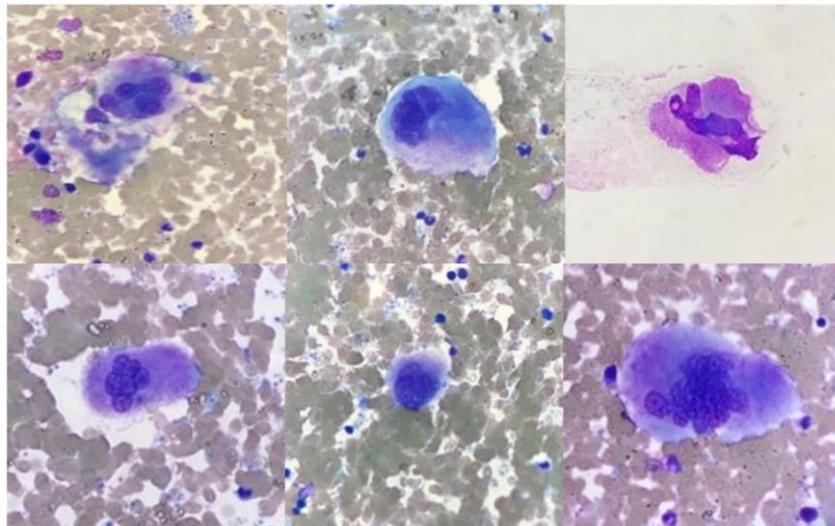


Figura 9 – Aspirado de medula óssea que mostra proliferação principalmente da linhagem megacariocítica, com aumento do número de megacariócitos maduros com núcleos hiperlobulados.

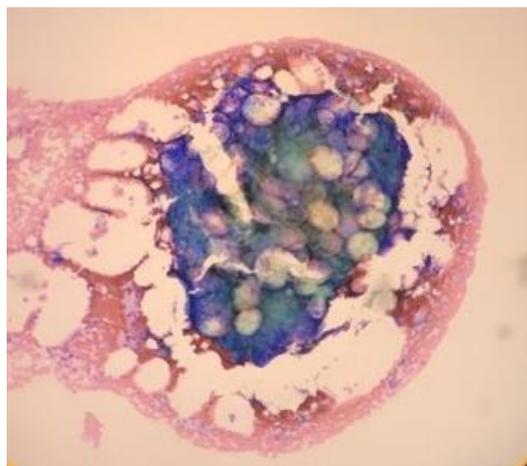


Figura 10 – Fragmento da medula óssea com hiper celularidade visível.

O JAK2^{V617F} foi positivo, confirmando a suspeita de diagnóstico previamente sugerido. O paciente iniciou ácido acetilsalicílico (AAS) para diminuir o risco trombótico.

A trombocitemia essencial é uma neoplasia mielóide crônica caracterizada por uma contagem de plaquetas $\geq 450 \times 10^9/L$ e histologia da medula óssea característica ⁵⁶.

A maioria dos pacientes com trombocitemia essencial (aproximadamente 50 a 60%) expressa a mutação JAK2^{V617F} e esta mutação leva à sinalização independente de citocinas aberrantes por meio da ativação constitutiva da via JAK-STAT. Mutações nas tirosina cinases levam à mieloproliferação que é independente ou hipersensível aos efeitos do fator de crescimento ⁵⁶.

O AAS interrompe a síntese do tromboxano A2 (TXA₂) levando à diminuição da agregação plaquetar e por sua vez, à diminuição do risco trombótico ⁵⁷.

3. Imunologia

Neste setor, é realizado um conjunto de determinações que possibilitam o diagnóstico e monitorização de doenças associadas ao sistema imunitário, assim como o acompanhamento de doentes oncológicos. As tecnologias utilizadas têm como base o imunoensaios, que permite quantificar marcadores tumorais e proteínas de fase aguda, e também para avaliar e monitorizar fármacos, bem como pesquisar auto-anticorpos. Estes biomarcadores em associação contribuem para a monitorização do doente oncológico e da sua terapêutica. A grande maioria das determinações são efetuadas por equipamentos automatizados.

As amostras biológicas mais comuns para a determinação dos parâmetros analíticos são o soro, plasma e a urina pontual e de 24h. O plasma e o soro são obtidos após a centrifugação durante 10 minutos a 2000g e as amostras são analisadas nos respetivos equipamentos, consoante os parâmetros analíticos requisitados.

Hormonas, marcadores de infeção ou marcadores tumorais são principalmente determinadas com base na reação antigénio-anticorpo, dada a afinidade entre os locais de ligação. Trata-se de uma interação altamente específica e sensível, pelo que se projeta como a base de funcionamento da generalidade dos equipamentos utilizados neste setor.

CONCLUSÃO

O estágio foi uma experiência muito enriquecedora e o ponto mais alto dos dois anos de mestrado. Foi possível experimentar a realidade de um laboratório clínico, e no meu caso, um laboratório privado e um laboratório público. Foram duas experiências muito diferentes devido ao número de amostras e tamanho de cada laboratório, assim como o acompanhamento de todo o processo de uma amostra e as técnicas e aparelhos utilizados.

A automatização das técnicas permite a obtenção de resultados mais exatos e precisos, diminuindo assim os erros na fase analítica, mas por outro lado faz com que o estagiário perca a noção de como é realizado e do porquê.

A necessidade de adquirir novos biomarcadores, assim como biomarcadores de previsão denota-se bastante na rotina laboratorial.

Foi uma experiência muito enriquecedora, adquiri novos conhecimentos assim como apliquei os ensinamentos das aulas. É uma mais valia para a minha formação profissional sendo que tive a possibilidade de visualizar duas realidades diferentes.

Um obrigado a todos os envolvidos que se disponibilizaram a ensinar tudo o que sabiam, todas as pessoas foram fantásticas e atenciosas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional de Estatística. Dia Mundial da Saúde - 7 de abril 2002-2012. *destaque - INE*. 2015;(24):1–17.
2. Instituto Nacional de Estatística. Dia Mundial da Saúde – 7 de abril 2008-2019. *destaque - INE*. 2020;(30):1–16.
3. Delbianco M, Bharate P, Varela-Aramburu S, Seeberger PH. Carbohydrates in supramolecular chemistry. *Chemical Reviews*. 2016;(116):1693–1752.
4. Ministério da Saúde. Retrato de Saúde. 2018;(25):1–88.
5. National Centre for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 5793, D-Glucose Consultado a 19 de outubro de 2020 em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Glucose>
6. Burtis CA, Bruns DE. *Tietz Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular*. 7ª. (ELSEVIER, ed.); 2016.
7. Schmidt AM. Highlighting Diabetes – the Epidemic Continues. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2018;(38):1–8.
8. Direção-Geral da Saúde. Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. *Norma da Direção Geral da Saúde (002/2011)*. 2011:1–13.
9. Benjamin IJ, Griggs RC, Wing EJ, Fitz JG. *Cecil Essentials of Medicine*. Vol 51. 9ª. (ELSEVIER, ed.); 2016.
10. Goldman L, Schafer AI. *Goldman-Cecil Medicine*. Vol 1. 25ª. (ELSEVIER, ed.); 2016.
11. Simón A. Colesterol e risco cardiovascular. *E-Publicação*. 2015;(10):5–7.
12. Direção-Geral da Saúde; Direção de Serviços de Informação e Análise. A Saúde dos Portugueses 2016. 2017:1–135.
13. Nessler K, Windak A, Grzybczak R, Nessler MB, Siniarski A, Gajos G. High-density lipoprotein (HDL) cholesterol – more complicated than we think? *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2018;(25):517–526.
14. Carr SS, Hooper AJ, Sullivan DR, Burnett JR. Non-HDL-cholesterol and apolipoprotein B compared with LDL-cholesterol in atherosclerotic cardiovascular disease risk assessment. *Pathology*. 2019;(51):148–154.

15. Direção Geral de Saúde. Abordagem Terapêutica das Dislipidémias no Adulto. *Norma da Direção Geral de Saúde (019/2011)*. 2017: 1-17.
16. Garg R, Rustagi T. Management of Hypertriglyceridemia Induced Acute Pancreatitis. *BioMed Research International*. 2018;(2018):1-12.
17. Valtueña JP. *La Clínica Y El Laboratorio*. 20ª. (ELSEVIER, ed); 2006.
18. Lee AYS, Cassar PM, Johnston AM, Adelstein S. Clinical use and interpretation of serum protein electrophoresis and adjunct assays. *British Journal of Hospital Medicine*. 2017;(78):18–20.
19. Ansar W, Ghosh S. C-reactive protein and the biology of disease. *Immunologic Research*. 2013;(56):131–142.
20. Tarigan PB. *KUMAR & CLARK'S Clinical Medicine*. 8ª. (ELSEVIER, ed); 2012.
21. Fevery J. Bilirubin in clinical practice: A review. *Liver International*. 2008;(28):592–605.
22. Ismail OZ, Bhayana V. Lipase or amylase for the diagnosis of acute pancreatitis? *Clinical Biochemistry*. 2017;(50):1275–1280.
23. Oyaert M, Delanghe JR. Semiquantitative, fully automated urine test strip analysis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2019;(33):1–7.
24. Simerville JA, Maxted WC, Pahlira JJ. Urinalysis: A comprehensive review. *American Family Physician*. 2005;(71):1153–1162.
25. Perazella MA. The Urine Sediment as a Biomarker of Kidney Disease. *American Journal of Kidney Diseases*. 2015;(66):748–755.
26. Cánovas R, Cuartero M, Crespo GA. Modern creatinine (Bio)sensing: Challenges of point-of-care platforms. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019;(130):110–124.
27. Backe MB, Moen IW, Ellervik C, Hansen JB, Mandrup-Poulsen T. Iron Regulation of Pancreatic Beta-Cell Functions and Oxidative Stress. *Annual Review of Nutrition*. 2016;(36):241–273.
28. Chifman J, Laubenbacher R, Torti SV. A Systems Biology Approach to Iron Metabolism. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2014;(844):1–27.
29. Programa Nacional para as Doenças Cérebro-Cardiovasculares. Programa Nacional Para As Doenças Cérebro-Cardiovasculares. 2017; 1–20.

30. Aydin S, Ugur K, Aydin S, Sahin İ, Yardim M. Biomarkers in acute myocardial infarction: Current perspectives. *Vascular Health and Risk Management*. 2019;(15):1–10.
31. Rawson ES, Clarkson PM, Tarnopolsky MA. Perspectives on Exertional Rhabdomyolysis. *Sports Medicine*. 2017;(47):33–49.
32. Willeit P, Welsh P, Evans JDW, et al. High-Sensitivity Cardiac Troponin Concentration and Risk of First-Ever Cardiovascular Outcomes in 154,052 Participants. *Journal of the American College of Cardiology*. 2017;(70):558–568.
33. Windgassen EB, Funtowicz L, Lunsford TN, Harris LA, Mulvagh SL. C-reactive protein and high-sensitivity C-reactive protein: An update for clinicians. *Postgraduate Medicine*. 2011;(123):114–119.
34. Caquet R. *Guia Prático Climepsi de Análises Clínicas*. 1ª. (Climepsi Editores, ed.); 2004.
35. Keohane EM, Smith LJ, Walenga JM. *Rodak's Hematology clinical principles and applications*. 5ª. (ELSEVIER, ed.); 2016.
36. Zwicker JI. Impedance-based flow cytometry for the measurement of microparticles. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2010;(36):819–823.
37. Mahalingaiah PK, Palenski T, Van Vleet TR. An In Vitro Model of Hematotoxicity: Differentiation of Bone Marrow–Derived Stem/Progenitor Cells into Hematopoietic Lineages and Evaluation of Lineage-Specific Hematotoxicity. *Current Protocols in Toxicology*. 2018;(76):1-18.
38. Cascio MJ, DeLoughery TG. Anemia: Evaluation and Diagnostic Tests. *Medical Clinics of North America*. 2017;(101):263–284.
39. Karakochuk CD, Hess SY, Moorthy D, Namaste S, Parker M, Rappaport A, Wegmuller R, Dary O. Measurement and interpretation of hemoglobin concentration in clinical and field settings: a narrative review. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2019;(2019):1–21.
40. Salvagno GL, Sanchis-Gomar F, Picanza A, Lippi G. Red blood cell distribution width: A simple parameter with multiple clinical applications. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2015;52(2):86–105.
41. Hoffbrand, A. V. Moss P a. H. *Fundamentos em Hematologia*. 6ª. (Copyright, ed.); 2013.
42. Chabot-Richards DS, George TI. White Blood Cell Counts. Reference Methodology.

Clinics in Laboratory Medicine. 2015;(35):11–24.

43. Nwogoh B, Transfusion B, State E, Transfusion B, State R. The Peripheral Blood Film. *Annals of Ibadan Postgraduated Medicine*. 2014;(12):71–79.
44. Bray C, Bell LN, Liang H, et al. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein measurements and their relevance in clinical medicine. *Wisconsin Medical Journal*. 2016;(115):317–321.
45. Kratz A, Plebani M, Peng M, Lee YK, McCafferty R, Machin SJ. ICSH recommendations for modified and alternate methods measuring the erythrocyte sedimentation rate. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2017;(39):448–457.
46. Hall JE. *Guyton & Hall Tratado de Fisiologia Médica*. 13^a. (ELSEVIER, ed.); 2017.
47. Mauro M, Wang R, Cristóvão S. Novos Inibidores da Trombina: Qual o Estado Atual das Pesquisas? *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*. 2004;(12):130–137.
48. Winter WE, Flax SD, Harris NS. Coagulation testing in the core laboratory. *Laboratory Medicine*. 2017;(48):295–313.
49. Chee YL. Coagulation. *Royal College of Physicians of Edinburgh*. 2014; (44):42–45.
50. Marlar RA, Gausman JN. Laboratory testing issues for protein C, protein S, and antithrombin. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2014;(36):289–295.
51. Linnemann B, Hart C. Laboratory Diagnostics in Thrombophilia. *Hamostaseologie*. 2019;(39):49–61.
52. Bronić A, Herak DC, Margetić S, Milić M. Croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine: National recommendations for blood collection, processing, performance and reporting of results for coagulation screening assays prothrombin time, activated partial thromboplastin time, thr. *Biochemia Medica*. 2019;(29):1–22.
53. Hoxha A, Banzato A, Ruffatti A, Pengo V. Detection of lupus anticoagulant in the era of direct oral anticoagulants. *Autoimmunity Reviews*. 2017;(16):173–178.
54. Cross NCP, White HE, Evans PAS, Hancock J, Copland M, Milojkovic D, Mason J, Craine S, Mead AJ. Consensus on BCR-ABL1 reporting in chronic myeloid leukaemia in the UK. *British Journal of Haematology*. 2018;(182):777–788.
55. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American Journal of Hematology*. 2018;(93):442–459.

56. Chuzi S, Stein BL. Essential thrombocythemia: a review of the clinical features, diagnostic challenges , and treatment modalities in the era of molecular discovery. *Leukemia & Lymphoma*. 2017;(58): 2786–2789.
57. Eizayaga F, Belon P, Desplat V, Aguejof O, Doutremepuich C. Effects of Ultra-Low-Dose Aspirin in Thrombosis and Haemorrhage. *Homeopathy*. 2018;(108):158–168.