



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Inês Marques Costa

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Carlos Cortes e pela Professora Doutora Bárbara Silva Rocha e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021





UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**

Inês Marques Costa

**Relatório de Estágio**  
Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Carlos Cortes e pela Professora Doutora Bárbara Silva Rocha e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021



## **Agradecimentos**

Gostaria de apresentar o meu sincero agradecimento a todos os que me ajudaram na execução do estágio e do Relatório.

À Professora Doutora Ana Miguel Matos e ao Dr. Carlos Cortes que possibilitaram a realização do estágio.

À Professora Doutora Bárbara Silva Rocha, minha orientadora interna, por todo o empenho que teve na correção do relatório.

Ao Dr. Joni Mota, às técnicas Ana Paula e Letícia Bastos, e em particular ao Dr. Hélder Alves e à técnica Daniela Marques por toda a disponibilidade que demonstraram em esclarecer todas as dúvidas e por todos os ensinamentos transmitidos.

Agradeço também a toda a equipa do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Médio Tejo pela excelente integração.

Aos meus pais e irmão que permitiram que isto fosse possível demonstrando sempre o orgulho e apoio.

Ao meu namorado por todo o apoio e incentivo ao longo desta etapa.

Às minhas amigas e colegas de mestrado, em especial à Juliana Simões por me ajudar e apoiar ao longo da minha vida académica.



## Índice

Agradecimentos.....	5
Índice de Figuras.....	9
Índice de Tabelas.....	10
Lista de Abreviaturas.....	13
Resumo.....	17
Abstract.....	17
1. Introdução.....	19
2. Caracterização do Laboratório de Estágio.....	19
3. Controlo de Qualidade.....	20
3.1 Controlo de Qualidade Interno.....	20
3.2 Avaliação Externa da Qualidade.....	21
4. Fase Pré-Analítica.....	21
4.1 Colheita de Amostras.....	21
4.2 Acondicionamento, envio e transporte de amostras biológicas.....	22
4.3 Receção e Triagem de Amostras.....	22
5. Hematologia.....	23
5.1 Hemograma.....	23
5.2 Esfregaço de sangue periférico.....	25
5.3 Velocidade de sedimentação.....	27
5.4 Hemoglobina Glicada.....	27
5.5 Hemoglobina e variantes.....	28
5.6 Metodologias.....	28
5.7 Estudo da hemostase.....	32
5.7.1 Parâmetros avaliados no estudo da hemostase.....	33
5.7.2 Metodologias utilizadas na hemostase.....	37
5.8 Caso Clínico 1.....	39
5.9 Caso Clínico 2.....	40
5.10 Caso Clínico 3.....	41
5.11 Caso Clínico 4.....	43
5. Bioquímica.....	44
6.1 Parâmetros Bioquímicos.....	45
6.1.1 Ionograma.....	45
6.1.2 Avaliação do metabolismo Ósseo.....	45
6.1.3 Avaliação do metabolismo do ferro.....	47
6.1.4 Análise das Proteínas.....	48
6.1.5 Avaliação do Metabolismo dos Lípidos.....	50
6.1.6 Avaliação do metabolismo dos Hidratos de Carbono.....	52
6.1.7 Marcadores de inflamação.....	53
6.1.8 Avaliação da lesão no músculo esquelético.....	54
6.1.9 Avaliação da Função Cardíaca.....	55
6.1.10 Avaliação da Função Hepática.....	56
6.1.11 Avaliação da Função Renal.....	60
6.1.12 Análise sumária de urina tipo II.....	61
6.1.13 Avaliação da Função Pancreática.....	64
6.2 Metodologias.....	65
6.3 Caso Clínico 5.....	68
6.4 Caso Clínico 6.....	70
6.5 Caso Clínico 7.....	71

6.6 Caso Clínico 8.....	72
7. Imunologia.....	75
8. Microbiologia.....	76
9. Conclusão .....	77
Bibliografia.....	79
Anexos.....	87



## Índice de Figuras

Figura 1. Fluxograma geral de receção e triagem de amostras..	23
Figura 2. Execução do esfregaço de sangue periférico.....	26
Figura 3. ESP bem efetuado à esquerda. ESP mal efetuado à direita.....	26
Figura 4. Histograma obtido por citometria de fluxo, contendo a dispersão normal dos leucócitos numa amostra de sangue total. SFL- Luz fluorescente lateral (do inglês, Side Fluorescence Light) SSC- Luz dispersada lateralmente (do inglês, Side Scatter Light).....	29
Figura 5. Conjunto de hemoglobinas separadas por HPLC. Da esquerda para a direita está representado o pico da Hb F (valor fora do intervalo esperado), Hb A1c, A0, Hb A2 (valor fora do intervalo esperado), Hb S e Hb C.....	31
Figura 6. Representação esquemática da mobilidade eletroforética das hemoglobinas normais (à esquerda) e das principais hemoglobinas anómalas (à direita), em gel de agarose e meio alcalino.....	32
Figura 7. Representação esquemática dos mecanismos da hemostase secundária. <sup>[20]</sup> .....	33
Figura 8. Esquema da cascata de coagulação com os respetivos de ensaios de coagulação (APTT, PT e TT).....	35
Figura 9. Observação do ESP.....	39
Figura 10. Histograma dos GVs obtido por impedância, com evidência de duas populações de eritrócitos ambas em grande quantidade. ....	40
Figura 11. Observação do ESP.....	40
Figura 12. Histograma de citometria de fluxo do caso clínico 3.....	41
Figura 13. Observação do ESP.....	42
Figura 14. Imagem do ESP do caso clínico 4.....	43
Figura 15. Perfil eletroforético de hemoglobinas do caso clínico 4. ....	44
Figura 16. Gráfico representativo da cinética dos vários biomarcadores cardíacos após enfarte agudo do miocárdio. ....	56
Figura 17. Esquema representativo do ensaio imunoenzimático não competitivo.....	67
Figura 18. Gráfico da eletroforese das proteínas plasmáticas .....	73
Figura 19. Gel da imunofixação sérica.....	74
Figura 20. Imunofixação- Bence Jones.....	74
Figura 21. Representação esquemática do diagnóstico diferencial das anemias microcíticas, normocíticas e macrocíticas.....	93

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Testes utilizados na investigação da hemostase.....	35
Tabela 2. Analitos analisados em Hematologia e respetivas amostra, metodologias e equipamentos. ....	38
Tabela 3. Valores do eritrograma do caso clínico I.....	39
Tabela 4. Valores de bioquímica do caso clínico I. ....	39
Tabela 5. Valores do eritrograma do caso clínico 2.....	40
Tabela 6. Hemograma do caso clínico 3. ....	41
Tabela 7. Hemograma do caso clínico 4. ....	43
Tabela 8. Analitos analisados em Bioquímica e respetivas amostra, metodologias e equipamentos. ....	68
Tabela 9. Valores bioquímicos do caso clínico 5.....	69
Tabela 10. Valores da análise sumária de urina Tipo II e Sedimento urinário do caso clínico 5.....	69
Tabela 11. Valores bioquímicos do caso clínico 6.....	70
Tabela 12. Valores da análise sumária de urina tipo II do caso clínico 6. ....	70
Tabela 13. Valores bioquímicos do caso clínico 7.....	71
Tabela 14. Valores da análise sumária de urina tipo II do caso clínico 7. ....	71
Tabela 15. Valores de análises imunológicas do caso clínico 7. ....	71
Tabela 16. Valores do hemograma do caso clínico 8.....	73
Tabela 17. Valores bioquímicos do caso clínico 8.....	73
Tabela 18. Valores da análise sumária de urina tipo II, Sedimento urinário e urina de 24h do caso clínico 8. ....	73
Tabela 19. Quantificação das proteínas séricas do caso clínico 8. ....	73
Tabela 20. Quantificação das imunoglobulinas da imunofixação sérica do caso clínico 8.....	74
Tabela 21. Quantificação das cadeias leves livres do caso clínico 8.....	74
Tabela 22. Analitos analisados em Imunologia e respetivas amostra, metodologias e equipamentos ....	75
Tabela 23. Observações do ESP de GV com alterações visualizadas no SPC de Tomar, usando a coloração de May-Grunwal Giemsa, e as principais causas.....	87
Tabela 24. Observações do ESP dos neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos e linfócitos assim como as principais alterações, visualizadas no SPC de Tomar, usando a coloração de May-Grunwal Giemsa, e as principais causas.. ....	90

Tabela 25. Observações do ESP de plaquetas assim como as principais alterações, visualizadas no SPC de Tomar, usando a coloração de May-Grunwal Giemsa, e as principais causas.. .....	92
Tabela 26. Dados laboratoriais típicos na anemia microcítica.....	94
Tabela 27. Classificação e características das lipoproteínas.....	95
Tabela 28. Estruturas que podem ser visualizadas na análise microscópica do sedimento urinário.....	96



## Lista de Abreviaturas

- ACTH - Hormona adrenocorticotrófica (*Adrenocorticotropic hormone*)
- ADP - Adenosina bifosfato
- AEQ - Avaliação Externa da Qualidade
- ALP - Fosfatase alcalina
- ALT - Alanina aminotransferase
- APTT - Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (*activated partial thromboplastin time*)
- AST - Aspartato aminotransferase
- AT - Antitrombina
- ATP - Adenosina trifosfato
- BHI - Caldo de enriquecimento (*Brain Heart Infusion*)
- BNP - Peptídeo natriurético cerebral (*Brain Natriuretic Peptide*)
- C4BP - Proteína transportadora do C4b
- Ca<sup>2+</sup> - Ião cálcio
- CaCl<sub>2</sub> - Cloreto de cálcio
- CE - Colesterol esterase
- CHMT - Centro Hospitalar Médio Tejo
- CID - Coagulação intravascular disseminada
- CK - Creatina cinase
- Cl<sup>-</sup> - Cloro
- CLED - Gelose diferencial para bactérias fermentadoras de lactose (*Cystine Lactose Electrolyte Deficient*)
- ClO<sup>-</sup> - Hipoclorito
- CMHG - Concentração média de hemoglobina glomerular
- CO - Colesterol oxidase
- CQ - Controlo de Qualidade
- CQI - Controlo de Qualidade Interno
- Cu<sup>2+</sup> - Cobre
- DvW - Doença de von Willebrand
- EDTA K<sub>3</sub> - ácido etilenodiaminotetracético tripotássio
- EGTA - Ácido egtazico (*egtazic acid*)
- ELFA - Imunoensaio fluoroenzimático (*Enzyme-Linked Fluorescent Assay*)
- ESP - Esfregaço de sangue periférico

FvW - Fator de von Willebrand  
G6PDH - Glucose-6-fosfato desidrogenase  
GK - Glicerol cinase (glycerol kinase)  
GLDH - Glutamato desidrogenase  
GPO - Glicerol fosfato oxidase  
GV - Glóbulos Vermelhos  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogénio  
HAE - Gelose seletiva para bactérias dos géneros *Haemophilus* spp. e *Neisseria* spp.  
Hb - Hemoglobina  
HbA - Hemoglobina A  
HbA<sub>1</sub> - Hemoglobina Glicada  
HbA<sub>2</sub> - Hemoglobina A<sub>2</sub>  
HbC - Hemoglobina C  
HbD - Hemoglobina D  
HbE - Hemoglobina E  
HbF - Hemoglobina Fetal  
HbS - Hemoglobina S  
HDL - Lipoproteína de alta densidade (*high density lipoproteins*)  
HGM - Hemoglobina glomerular média  
HK - Hexocinase  
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Pressão (*High Performance Liquid Chromatography*)  
hs Tnl - Troponina I de alta sensibilidade  
IDL - Lipoproteína de densidade intermédia (*intermediate density lipoproteins*)  
Ig - Imunoglobulina  
INR - Índice de normalização internacional (*international normalized ratio*)  
ISI - Índice de sensibilidade internacional  
K<sup>+</sup> - Potássio  
LCR - Líquido cefalorraquidiano  
LDL - Lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoproteins*)  
LLC - Leucemia Linfocítica Crónica  
Mg<sup>2+</sup> - Magnésio  
MGUS - Gamapatia monoclonal de significado indeterminado  
MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina  
Na<sup>+</sup> - Sódio  
NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida e Adenina Dinucleótido (forma oxidada)

NADH - Nicotinamida e Adenina Dinucleótido (forma reduzida)  
NT-proBNP - N-terminal pro-peptido natriurético cerebral  
O<sub>2</sub> - Oxigénio  
OH<sup>-</sup> - Ião hidróxido  
PC - Proteína C  
PCa - Proteína C ativada  
PCO<sub>2</sub> - Pressão de dióxido de carbono  
PCR - Proteína C reativa  
PCT - Plaquetócrito  
PDW - Coeficiente de variação do volume das plaquetas (*platelet distribution width*)  
PLT - Plaquetas  
PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> - Fosfato  
POD - Peroxidase  
PS - Proteína S  
PT - Tempo de Protrombina (*prothrombin time*)  
PVX - Gelose de chocolate enriquecida com PolyViteX  
RDW - Coeficiente de Dispersão dos Eritrócitos (*red cell distribution width*)  
SLS - Sulfato Lauril de Sódio (*sodium lauryl sulfate*)  
SPC - Serviço de Patologia Clínica  
TEP - Tromboembolismo pulmonar  
TFG - Taxa de filtração glomerular  
TIBC - Capacidade total de fixação do ferro (*total iron binding capacity*)  
TSDT - Técnicas superior de diagnóstico e terapêutica  
TT - Tempo de trombina (*thrombin time*)  
TVP - Trombose venosa profunda  
UCE - Unidade de Concentrado Eritrocitário  
UH - Unidade Hospitalar  
VGM - Volume glomerular médio  
VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade (*very low density lipoproteins*)  
VS - Velocidade de sedimentação  
WBC - Leucócitos totais (*white blood cells*)  
γ-GT - Gama-glutamil transferase





## **Resumo**

O presente Relatório de Estágio Curricular é um elemento de avaliação no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Neste documento serão abordadas as atividades laboratoriais desenvolvidas no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Médio Tejo, onde serão detalhadas as metodologias aplicadas nas áreas de Hematologia e Bioquímica. Será ainda feita uma breve referência a aspetos metodológicos mais relevantes nas áreas da Imunoquímica e Microbiologia. Nas áreas da Hematologia e Bioquímica serão descritos os parâmetros determinados rotineiramente bem como os tipos de amostras, equipamentos e técnicas mais utilizadas. Simultaneamente serão apresentados e discutidos casos clínicos que surgiram no decurso deste estágio.

**Palavra-chave:** Hematologia, Bioquímica, Análises Clínicas, Centro Hospitalar do Médio Tejo, Diagnóstico laboratorial.

## **Abstract**

The presente document is an evaluation element of the Master's Degree in Clinical Analysis of the Faculty of Pharmacy, University of Coimbra. This document will address the laboratory activities developed in the Clinical Pathology Service of the Centro Hospitalar Médio Tejo, which will detail the methodologies applied in the areas of Hematology and Biochemistry. A brief reference will also be made to the most relevant methodological aspects in the areas of Immunochemistry and Microbiology. In the areas of Hematology and Biochemistry, the parameters determined routinely as well as the types of samples, equipment and techniques most used will be described. Simultaneously, clinical cases that emerged during this internship will be presented and discussed.

**Keywords:** Hematology, Biochemistry, Clinical analysis, Centro Hospitalar Médio Tejo, Laboratory diagnosis.



## **I. Introdução**

O presente Relatório de Estágio, foi realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia de Coimbra. Este relatório contempla uma primeira parte onde é apresentado o Serviço de Patologia Clínico (SPC) de Tomar e uma segunda parte onde são descritas as atividades ali desenvolvidas. Nesta segunda parte são descritos, detalhadamente o controlo de qualidade, a fase pré-analítica, e as áreas de Hematologia e Bioquímica. A descrição destas áreas é acompanhada pela apresentação e discussão de casos clínicos, de modo a consolidar e integrar conhecimentos. O presente relatório culmina com uma breve referência às áreas de Imunologia e Microbiologia.

O estágio curricular realizado está incluído no plano de estudos do Mestrado em Análises Clínicas e tem vários objetivos, tais como: a adaptação ao meio laboral, pôr em prática conhecimentos adquiridos no curso em situações reais, desenvolver o espírito crítico face a determinados dados assim como resolução de problemas de cariz laboratorial e desenvolver a capacidade de realizar as tarefas diárias de um laboratório de Análises Clínicas.

O Laboratório de Análises Clínicas é fundamental no diagnóstico, no prognóstico de doenças e na monitorização de terapêuticas. O estágio foi realizado no SPC do Centro Hospitalar do Médio Tejo (CHMT), dirigido pelo diretor Dr. Carlos Cortes e decorreu entre março e julho de 2021. O SPC é constituído por 4 áreas: hematologia, bioquímica, imunologia e microbiologia, e tem como objetivo garantir uma resposta adequada e eficaz aos utentes do CHMT.

## **2. Caracterização do Laboratório de Estágio**

O CHMT é constituído por 3 unidades hospitalares, localizadas em Abrantes, Tomar e Torres Novas, abrangendo uma área geográfica de intervenção de 15 concelhos e servindo cerca de 266 mil habitantes.

Nos últimos 5 anos, no âmbito de tornar o serviço mais eficaz e com capacidade de uma resposta mais abrangente, o SPC do CHMT foi centralizado na Unidade Hospitalar (UH) de Tomar, com sede na Av. Maria de Lourdes de Mello Castro, 2304-909 Tomar, permanecendo, nas restantes Unidades Hospitalares, apenas um serviço apropriado para responder a situações de urgência e internamentos.

O SPC de Tomar é composto por 8 setores principais, o setor de Colheita de amostras, Receção e Triagem de amostras, Microbiologia, Hematologia, Imunologia, Bioquímica, Biologia Molecular e gabinetes de Validação. Para além destes sectores existe ainda uma sala de microscopia e uma sala de lavagem e tratamento de resíduos.

Desde de 2016, após a centralização, o SPC encontra-se certificado de acordo com a ISO 9001:2015.

Toda a equipa tem como objetivo garantir uma resposta adequada e eficaz satisfazendo as necessidades do doente e do hospital. O SPC é dirigido pelo Dr. Carlos Cortes médico Patologista Clínico e a equipa é formada por 61 Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT), 5 Técnicos Superiores de Saúde, 4 Médicos Patologistas Clínicos e 7 Médicos internos de formação específica em Patologia Clínica.

De forma a assegurar uma gestão eficiente de todas as secções do laboratório, é usado o sistema informático ModuLab. Este sistema está conectado a todos os analisadores e tem como principais funcionalidades a criação e gestão de dados principais e pedidos, recolha e receção de amostras, gestão de controlo de Qualidade (CQ), validação e elaboração de relatórios, permitindo assim a rastreabilidade de exames, amostras, utilizadores e doentes.

### **3. Controlo de Qualidade**

O CQ é essencial para garantir a satisfação do cliente, garantindo a conformidade das características do serviço e a qualidade dos dados obtidos. No Laboratório de Análises Clínicas, para atingir a qualidade é necessário a monitorização de todas as fases analíticas, sendo esta feita através do Controlo de Qualidade Interno (CQI) e a Avaliação Externa da Qualidade (AEQ).

#### 3.1 Controlo de Qualidade Interno

O CQI consiste no conjunto de ações com o objetivo de assegurar a qualidade dos resultados das análises à medida que estas são executadas. Permite essencialmente o controlo da reprodutibilidade dos métodos e resultados identificando tendências e erros fortuitos.<sup>[1]</sup>

No SPC de Tomar este controlo é feito através do processamento de níveis de controlos cuja sua frequência está estipulada nas instruções de trabalho do laboratório. No entanto, existem algumas circunstâncias em que é necessário processar novamente estes controlos, nomeadamente: sempre que são efetuadas calibrações, manutenções preventivas e corretivas, após abertura de novo reagente, quando identificadas tendências e sempre que o técnico achar vantajoso, registando sempre as ações efetuadas.

Os resultados destes controlos são registados em cartas de controlo (Carta de Levey-Jennings) e analisados diariamente aplicando as Regras de Westgard a fim de identificar erros aleatórios e sistemáticos.

### 3.2 Avaliação Externa da Qualidade

A AEQ consiste na avaliação, por uma entidade externa, da qualidade dos resultados emitidos pelo laboratório após processamento de amostra fornecida pela entidade externa do programa de AEQ. Permite a uniformidade e credibilidade do laboratório assim como melhora os níveis de desempenho do mesmo.<sup>[1,2]</sup>

No SPC de Tomar a maior parte dos parâmetros analisados estão inseridos num programa de AEQ, avaliando a inexatidão dos resultados. Sempre que existam não conformidades com os resultados são implementadas ações corretivas.

## **4. Fase Pré-Analítica**

A fase Pré-Analítica consiste em todas as etapas desde a requisição médica até ao início da fase analítica, incluindo a preparação do utente para a colheita, a colheita, preparação, distribuição e armazenamento da amostra. É descrita como a fase com maior probabilidade de ocorrência de erros laboratoriais, devido as diversas “variáveis pré-analíticas” de difícil controlo, tais como a identificação e preparação do utente, seleção do tipo de amostra, a colheita e identificação da amostra, transporte e erros associados ao operador dado ser a fase menos automatizada.<sup>[3]</sup>

Para reduzir os erros nesta fase é essencial o treino de pessoal, a padronização dos procedimentos e o registo das atividades.

O estágio teve início na fase pré-analítica que foi realizada nas enfermarias COVID da UH Abrantes e na sala de colheitas da UH de Tomar onde presenciei todo o processo de colheitas de sangue e efetuei colheitas de exsudato de nasofaringe e orofaringe no âmbito da pesquisa de SARS-CoV-2, tendo sido uma experiência enriquecedora a nível da formação prática.

### 4.1 Colheita de Amostras

As amostras são colhidas na sala de colheitas, na urgência e internamentos de cada UH. A colheita é um passo crucial para a obtenção de resultados representativos da realidade, sendo por isso essencial seguir as diretrizes e atender às particularidades para cada colheita.

Algumas diretrizes a seguir:

- Evitar a aplicação prolongada do garrote (podendo causar estase do fluxo sanguíneo, hemoconcentração e aumento da concentração de analitos).
- Evitar veias esclerosadas, locais edemaciados, hematomas, cicatrizes, queimaduras e tatuagens.

– Seguir sempre a ordem de colheita: hemoculturas, tubos sem aditivos, citrato, tubo com gel, heparina, EDTA K<sub>3</sub> (ácido etilenodiaminotetracético tripotássio, do inglês, *tripotassium ethylenediamine tetraacetic acid*), oxalato/fluoreto.<sup>[4,5]</sup>

Antes de efetuar a colheita é confirmada, de forma inequívoca, a identificação do utente e feita a etiquetagem dos recipientes ou tubos. As etiquetas de identificação possuem número de registo, códigos de barras, nome, n.º de processo e idade do utente, tipo anticoagulante usado ou amostra e a área analítica a que se destina.

De seguida é colhido o produto de acordo com os procedimentos preconizados e, a fim de efetuar a rastreabilidade das amostras, é registado no sistema informático ModuLab-Colheitas, a data, a hora, o local da colheita e quem colheu e ou recebeu a amostra.<sup>[4]</sup>

#### 4.2 Acondicionamento, envio e transporte de amostras biológicas

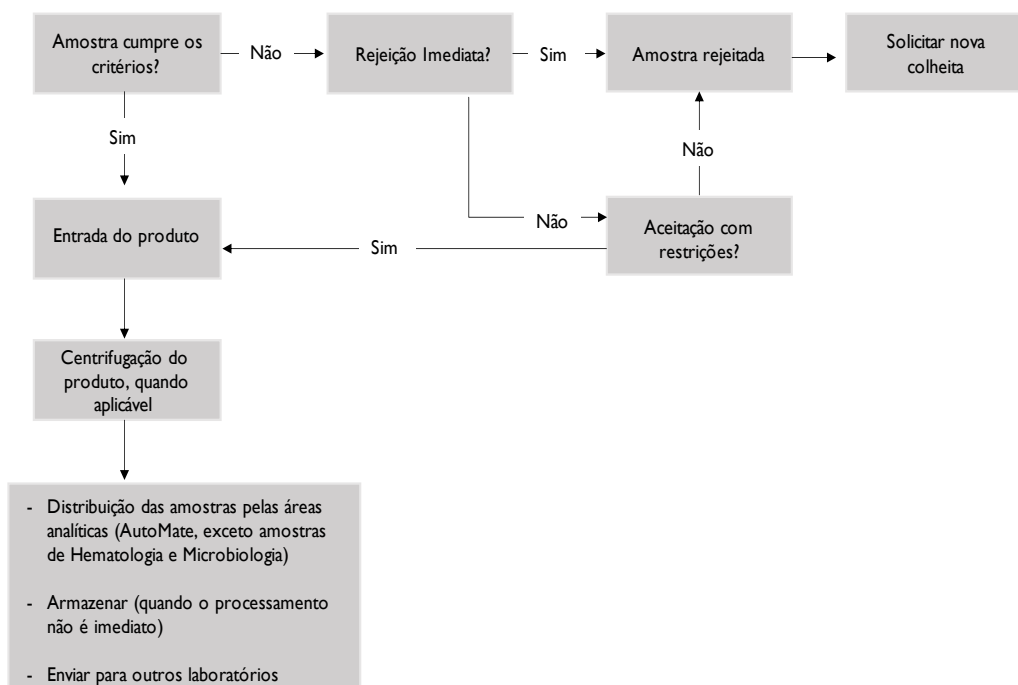
Dado o circuito de amostras entre os 3 laboratórios do SPC e os laboratórios externos é crucial a existência de um sistema coordenado e organizado para garantir a integridade e a rastreabilidade das amostras.

Todas as amostras colhidas nas UH de Torres Novas e Abrantes, à exceção das amostras urgentes e de internamentos, são devidamente identificadas, registadas no sistema informático e enviadas para a UH de Tomar. Para que as amostras mantenham a sua qualidade, são respeitadas as condições de conservação e regras de segurança, através de objetos que permitem a contenção e termoestabilização adequada, de modo a manter a integridade das amostras e evitar contaminações de colaboradores e do ambiente.

#### 4.3 Receção e Triagem de Amostras.

A receção dos malotes de transporte de amostras é feita pelos TSDT que são responsáveis por registar a data, a hora e o local, e verificar a integridade das amostras, a correta identificação e a temperatura de transporte tendo em conta as suas características e os exames a realizar. O colaborador deve aplicar critérios de rejeição de amostras tais como a identificação incorreta ou incompleta, volume inadequado, tubo de colheita incorreto, amostra hemolisada, lipémica ou ictérica caso haja interferência com os parâmetros a analisar, amostra coagulada, contaminação dos tubos/materiais usados para a colheita, armazenamento ou transporte incorretos, entre outras.<sup>[3,6]</sup>

Caso cumpram todos os critérios de aceitação, efetua-se o registo de entrada das amostras no sistema informático ModuLab, através do código de barras, e são colocadas no equipamento AutoMate que faz as alíquotas e organiza as amostras de acordo com os testes analíticos associados a cada equipamento, havendo como exceção as amostras de microbiologia e hematologia que são distribuídas manualmente.



**Figura 1.** Fluxograma geral de receção e triagem de amostras. (Adaptado de [3]).

## 5. Hematologia

O setor de Hematologia visa o estudo do sistema hematopoiético e da hemostase. Neste capítulo serão abordados todos os parâmetros hematológicos, a velocidade de sedimentação, a hemoglobina glicada e os parâmetros da avaliação da hemostase determinados no referido setor do SPC de Tomar, assim como as metodologias usadas.

### 5.1 Hemograma

O hemograma completo é dos exames de sangue mais pedidos em análises de rotina, sendo um grande auxílio no rastreio, no diagnóstico e na monitorização de diversas patologias. Esta análise consiste na determinação do eritrograma, do leucograma e do plaquetograma, obtendo informação quantitativa e qualitativa das linhas celulares.

#### a. Eritrograma

Contagem de glóbulos vermelhos (GV) - Número de eritrócitos por unidade de volume de sangue (litros), sendo essencial nos cálculos dos índices eritrocitários.<sup>[7]</sup>

Hematócrito - Consiste no volume composto por GV num dado volume de sangue, e é expresso em percentagem.<sup>[7]</sup>

Concentração de Hemoglobina (Hb) - Este parâmetro é expresso em g/dl e é essencial na detecção, avaliação e vigilância terapêutica de anemias assim como no cálculo dos índices eritrocitários.<sup>[7]</sup>

Contagem de reticulócitos - Parâmetro que determina o número de GV recém-formados num determinado volume de sangue (litros), sendo essencial para avaliar a capacidade da medula óssea de produzir novos eritrócitos. No caso de anemias, os reticulócitos são importantes para as classificar em hiporregenerativas (reticulócitos <50 G/l) ou regenerativas (reticulócitos >100G/l).<sup>[7,8]</sup>

– Índices Eritrocitários

Volume Globular Médio (VGM) - Este parâmetro obtém-se através da divisão entre o volume ocupado dos eritrócitos pelo número total destes, sendo o resultado expresso em fentolitros (fl). É essencial para avaliar o tamanho dos glóbulos vermelhos e classifica as anemias como microcítica (VGM <80 fl), normocítica (VGM 80-100 fl) ou macrocítica (VGM >100 fl).<sup>[9]</sup>

Hemoglobina Glomerular Média (HGM) - Determina a hemoglobina existente em cada eritrócito, dividindo a concentração de hemoglobina pelo número de eritrócitos, sendo expressa em picogramas (pg).<sup>[9]</sup>

Concentração Média da Hemoglobina Glomerular (CMHG) - Trata-se da concentração de hemoglobina por unidade de volume de um eritrócito, calculado através da divisão da concentração de hemoglobina pelo hematócrito, e o resultado é expresso em g/dl.<sup>[9]</sup>

Coeficiente de Dispersão dos Eritrócitos (RDW, do inglês Red Cell Distribution Width) - Consiste no coeficiente de variação dos volumes dos GV, indicando o nível de heterogeneidade da distribuição do tamanho dos mesmos, é expresso em percentagem dado ser um coeficiente de variação. Este parâmetro é um índice de anisocitose eritrocitária e é muito útil no diagnóstico diferencial de anemias com população homogénea de eritrócitos (Talassémia minor - RDW normal) versus população heterogénea (anemia ferropénica - RDW aumentado).<sup>[9]</sup>

b. Leucograma

Contagem dos leucócitos totais (WBC, do inglês white blood cells) - Número total de leucócitos por unidade de volume de sangue (litros).

---

<sup>1</sup> A HGM e a CMHG são fundamentais na avaliação da alteração da cor do eritrócito podendo classificar os mesmos em hipocrómicos ou normocrómicos.



Contagem de neutrófilos - Número de neutrófilos por unidade de volume de sangue (litros). Os neutrófilos consistem em metade dos leucócitos circulantes e são fundamentais na defesa do organismo contra infecções bacterianas piogénicas.<sup>[10]</sup>

Contagem de eosinófilos - Número de eosinófilos por unidade de volume de sangue (litros). Os eosinófilos são muito importantes na resposta imune em situações de infecções por parasitas.<sup>[10]</sup>

Contagem de basófilos - Número de basófilos por unidade de volume de sangue (litros). Os basófilos representam <1% dos leucócitos em circulação.<sup>[10]</sup>

Contagem de monócitos - Número de monócitos por unidade de volume de sangue (litros). Os monócitos possuem um papel fundamental na fagocitose.<sup>[10]</sup>

Contagem de linfócitos - Trata-se do número de linfócitos por unidade de volume de sangue (litros). Cerca de 85% dos linfócitos circulantes são linfócitos T ou células *natural killer*. Os linfócitos estão envolvidos na resposta imunológica nomeadamente em situações de infecções virais.<sup>[10]</sup>

#### c. Plaquetograma

A contagem de plaquetas (PLT) - Número de plaquetas por unidade de volume de sangue (litros).<sup>[9]</sup>

##### - Índices plaquetários

Plaquetócrito (PCT) - Corresponde ao volume total de plaquetas num determinado volume de sangue.<sup>[9]</sup>

Coeficiente de variação do volume das plaquetas (PDW, do inglês *platelet distribution width*) - É o equivalente ao RDW dos eritrócitos e é calculado através do histograma de distribuição do tamanho plaquetário.<sup>[9]</sup>

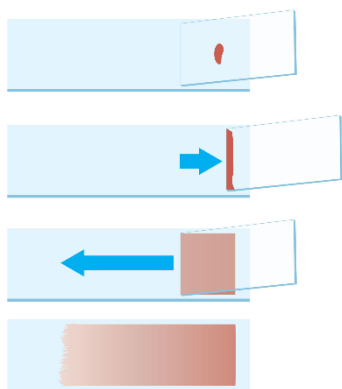
## 5.2 Esfregaço de sangue periférico

O esfregaço de sangue periférico (ESP) é um exame essencial em hematologia que complementa os resultados obtidos por métodos automáticos, permitindo avaliar qualitativamente e quantitativamente as células sanguíneas. Este é feito sempre que haja solicitação por parte do clínico ou sempre que na validação do hemograma seja necessário confirmar os resultados obtidos através do equipamento.

O ESP usa como amostra sangue total colhido sem adição de anticoagulante ou em EDTA K<sub>3</sub>. Geralmente, o sangue colhido para tubos de heparina não deve ser usado para realizar o esfregaço pois as suas características de coloração diferem das do sangue colhido com anticoagulante EDTA K<sub>3</sub>.<sup>[11]</sup>

Para efetuar o ESP coloca-se uma gota de sangue na extremidade da lâmina e, de seguida com outra lâmina ou uma lamela, num ângulo de 45° colocada na frente da gota desliza-se para trás até entrar em contacto com a gota. Quando a gota estiver completamente espalhada pela lâmina superior, num movimento único e uniforme faz-se a extensão da gota (Figura 2).<sup>[11]</sup>

A fiabilidade das informações obtidas depende muito de uma boa execução do ESP. Para tal é necessário respeitar o tempo máximo para a observação do ESP de modo a minimizar os artefactos de fixação ou de coloração, usar lâminas limpas, homogeneizar bem a amostra e evitar alguns erros na preparação do ESP que podem levar a uma má distribuição das células ao longo do esfregaço (Figura 3).<sup>[11]</sup>



**Figura 8.** Execução do esfregaço de sangue periférico.



**Figura 9.** ESP bem efetuado à esquerda. ESP mal efetuado à direita. (Fonte: SPC Tomar).

Para a realização da coloração das lâminas pelo método de May-Grunwal Giemsa é utilizado o aparelho RAL Stainer que tem a capacidade de corar várias lâminas em simultâneo. Após a coloração as células adquirem cores específicas.

O exame do ESP baseia-se na observação das linhagens eritróide, granulocítica, linfocítica, monocítica e plaquetar, sendo essencial saber observar a morfologia normal das células para identificar uma morfologia atípica e perante a história clínica e os restantes dados compreender se devemos valorizar ou não as observações feitas.

Relativamente à linhagem eritróide, existem várias alterações que é necessário ter em atenção para além da observação de células imaturas como os eritroblastos e os reticulócitos. Estas alterações refletem-se no tamanho (anisocitose), na forma (poiquilocitose), na cor (anisocromia) e nas inclusões eritrocitárias. Consoante as variações observadas, o clínico direciona o seu diagnóstico. (Consultar Anexo I).

Relativamente à linhagem branca, é necessário ter em conta a morfologia das células, o estado de maturação (relação núcleo/citoplasma) e as alterações no n.º de leucócitos, corrigindo a fórmula leucocitária facultada pelo equipamento, sempre que necessário. (Consultar Anexo II).

Relativamente à linhagem plaquetar, deve-se observar se existem agregados plaquetares que possam estar a causar uma falsa trombocitopenia (explicado na Tabela 2.), confirmar trombocitose ou trombocitopenia, anisocitose com ou sem presença de plaquetas gigantes e observar desgranulação das plaquetas. (Consultar Anexo III).

### 5.3 Velocidade de sedimentação

A velocidade de sedimentação (VS) consiste na distância, em milímetros, da sedimentação dos eritrócitos por ação da gravidade, num determinado período de tempo (1 hora). É um marcador de inflamação não específico, usado em associação com outros marcadores, para detetar processos inflamatórios, neoplásicos e infecciosos, assim como para monitorização de doença e da terapêutica.<sup>[12]</sup>

Existem fatores plasmáticos e eritrocitários que afetam as interações entre os GV (forças de repulsão), e conseqüentemente afetam a VS. O aumento da VS está associado a processos inflamatórios, infecciosos e neoplásicos em que as proteínas de fase aguda estão aumentadas, e a casos de anemia, policitemia, aumento do colesterol e gravidez em que as forças repulsivas entre os GV estão diminuídas. A diminuição da VS está associada com insuficiência cardíaca congestiva, poiquilocitose, aumento de albumina, e hipofibrinogénemia devido à dificuldade de agregação celular.<sup>[13]</sup>

### 5.4 Hemoglobina Glicada

O doseamento da Hemoglobina Glicada (Hb A<sub>1c</sub>) é um parâmetro muito utilizado no diagnóstico (desde 2009) e monitorização da Diabetes *mellitus*, uma vez que avalia os níveis médios de glicémia na corrente sanguínea nos últimos 120 dias, tempo médio de vida dos GV.<sup>[14]</sup> No entanto, existem fatores como hemoglobinopatias, situações de anemia com elevado turnover eritrocitário, perda crónica de sangue e insuficiência renal crónica, que podem condicionar negativamente esta análise.<sup>[15]</sup>

A nível clínico este doseamento tem grandes vantagens uma vez que os indivíduos não necessitam de estar em jejum no momento da colheita, dá indicação da concentração média de glucose na corrente sanguínea nos últimos 3-4 meses, ajuda na monitorização da terapêutica e indica a predisposição ao desenvolvimento de complicações microvasculares associadas a diabetes.<sup>[15]</sup>

A determinação da HbA<sub>1c</sub> é feita através da metodologia Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) utilizando o mecanismo de separação a troca iónica.

## 5.5 Hemoglobina e variantes

O conteúdo dos eritrócitos é formado por várias moléculas de hemoglobina e tem como principal função o transporte de oxigênio. A hemoglobina é uma proteína tetramérica constituída por dois pares de cadeias polipeptídicas, cada uma com um grupo heme que consiste num componente orgânico, a Protoporfirina IX, e um componente inorgânico, o ferro. Existem seis cadeias polipeptídicas diferentes nos indivíduos normais  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\xi$  sendo que as últimas duas formam quatro tipos de hemoglobinas presentes apenas no embrião. As hemoglobinas presentes na idade adulta são a Hb A ( $\alpha_2, \beta_2$ ), HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2, \delta_2$ ) e a HbF ( $\alpha_2, \gamma_2$ ), constituindo aproximadamente cerca de 97%, 2-3% e <1% da hemoglobina total, respetivamente.<sup>[16]</sup>

Alterações genéticas da hemoglobina originam síndromes talassémicas e hemoglobinopatias. As talassémias derivaram de alterações quantitativas que resultam da deficiência ou ausência da síntese de uma ou mais cadeias globínicas. As hemoglobinopatias são alterações qualitativas que resultam de alterações estruturais das cadeias globínicas, provocadas por mutações pontuais e não só, resultando em variantes de hemoglobina como HbS, HbC, HbD, HbE, entre outras.<sup>[16]</sup>

Para diagnóstico de talassémias e hemoglobinopatias é utilizada uma combinação de testes laboratoriais como hemograma, a observação do ESP, a HPLC como teste de screening e para quantificação da HbF e HbA<sub>2</sub> (descrito em 5.6.6) e a eletroforese das hemoglobinas (descrito em 5.6.7).<sup>[16]</sup> O método de HPLC não pode ser usado na identificação das variantes de hemoglobina pois existem variantes de hemoglobinas que podem co-eluir ao mesmo tempo, como é o caso da hemoglobina E e Lepore que têm o mesmo tempo de retenção que a HbA<sub>2</sub>. Assim é usado a eletroforese como teste confirmatório.<sup>[16]</sup>

## 5.6 Metodologias

### 5.6.1 Focagem Hidrodinâmica

A focagem Hidrodinâmica é usada tanto no método de impedância como no método de citometria de fluxo e consiste no alinhamento individual das células. À medida que as células passam pela câmara de fluxo, são revestidas por um fluido de baixa pressão que vai criar um fluxo laminar forçando as células a moverem-se para o centro e a alinharem-se de forma individual para serem analisadas.<sup>[15]</sup>

### 5.6.2 Impedância com Focagem Hidrodinâmica

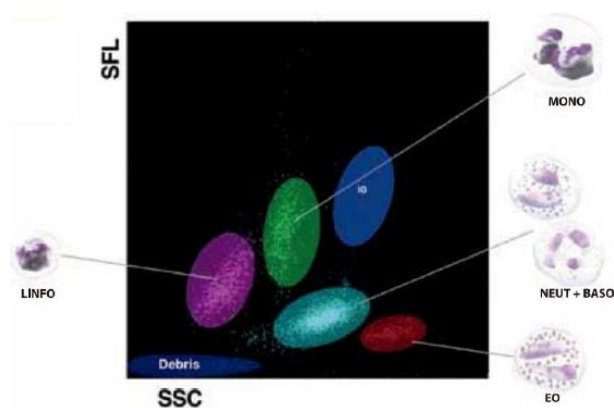
O método da impedância ou Princípio de Coulter, é baseado na variação da resistência elétrica que se faz sentir quando uma partícula com baixa condutividade elétrica, suspensa

num líquido condutor de eletricidade (diluyente), passa por uma abertura de dimensões específicas no meio de uma fonte constante de energia, que é mantida por 2 elétrodos. Em hematologia, estas partículas são células sanguíneas que à medida que vão sendo transportadas pela abertura, deslocam parte do líquido condutor e aumentam a resistência elétrica. Isto produz uma variação no potencial entre os elétrodos, cuja duração coincide com o tempo que o eritrócito leva para passar pela abertura. Isto leva a formação de um impulso elétrico que é detetado, amplificado e registado. A altura dos impulsos produzidos indica o volume das células que passam pela abertura sendo que partículas entre 2 e 20 fL são contadas como plaquetas, e as que medem mais de 36 fL são contados como eritrócitos. Por outro lado, o número de impulsos está diretamente relacionado à contagem de células.<sup>[15,7]</sup>

### 5.6.3 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica automatizada que visa detetar, qualitativa e quantitativamente, várias propriedades de células ou dos seus constituintes. O seu princípio baseia-se na passagem de células ou outras partículas suspensas numa câmara de fluxo, onde se faz incidir um feixe de luz (laser de diódo) e se deteta a luz dispersa frontal e lateralmente<sup>2</sup>. Também é possível detetar a fluorescência emitida no caso da célula estar marcada com um fluoróforo ou corada com um corante fluorescente específico, permitindo assim a quantificação e a avaliação da morfologia celular de forma detalhada.<sup>[15]</sup>

No equipamento XN-1000 são utilizados os corantes fluorescentes polimetina, específico para ácidos nucleicos, e a Oxazina específica para as superfícies do retículo endoplasmático rugoso e das mitocôndrias.



**Figura 4.** Histograma obtido por citometria de fluxo, contendo a dispersão normal dos leucócitos numa amostra de sangue total. SFL- Luz fluorescente lateral (do inglês, Side Fluorescence Light) SSC- Luz dispersada lateralmente (do inglês, Side Scatter Light). (Retirado de <sup>[70]</sup>)

<sup>2</sup> A luz desviada frontalmente mede o tamanho da célula e a dispersão lateral está relacionada com a complexidade celular e a irregularidade nuclear.

#### 5.6.4 Método de Sulfato Lauril de Sódio, livre de cianeto

Para o doseamento da hemoglobina o equipamento utiliza o método de Sulfato Lauril de Sódio (SLS, do inglês, *sodium lauryl sulfate*), isento de cianeto, que têm uma boa correlação com o método de referência (cianometahemoglobina). O reagente SLS lisa a membrana do eritrócito libertando a hemoglobina, e combina-se subsequentemente com a esta, formando um composto corado, estável, que é quantificado por espectrofotometria.<sup>[7]</sup>

#### 5.6.5 Fotometria Capital de Fluxo

O método de referência é o Método de Westergreen na determinação da VS que consiste na medição após 60min da distância percorrida pelos GV, e inclui 3 fases. A primeira fase consiste na agregação dos GV ou formação dos *rouleaux* ( $\pm 10$  min), a segunda corresponde a sedimentação dos *rouleaux* ( $\pm 40$  min) e a terceira corresponde ao acumular dos GV no fundo do tubo ( $\pm 10$  min).<sup>[12]</sup>

O método fotometria capital de fluxo baseia-se na leitura por fotometria de infravermelhos a 950 nm de um capilar com a amostra, após centrifugação a 20 G. O detetor de fotódiodo deteta o feixe de luz e regista o sinal num período de tempo específico, usando os dados para delinear uma curva de sedimentação para cada amostra. Estes dados são convertidos em valores equiparáveis com os valores do Método de Westergreen.

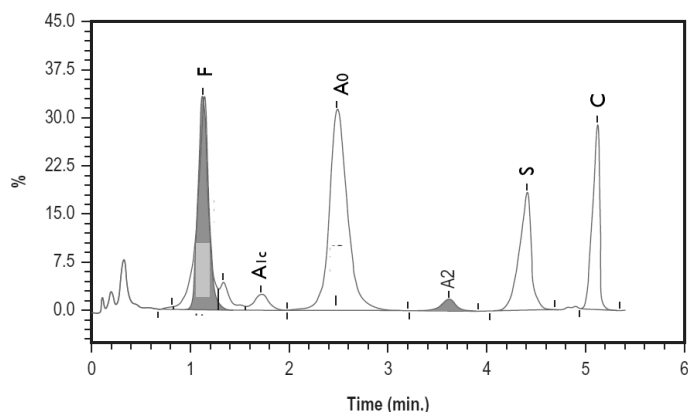
#### 5.6.6 Cromatografia líquida de alta pressão

A HPLC tem como aplicações na clínica o doseamento no sangue total da HbA<sub>1c</sub> e o doseamento das frações HbA<sub>2</sub> e HbF úteis no diagnóstico de doenças específicas (por exemplo, talassemia), discutidas no capítulo Hemoglobinas e variantes (ponto 5.5).<sup>[15]</sup>

A HPLC é uma técnica de separação que utiliza uma coluna cromatográfica (com resina de troca iónica) onde está adsorvida a fase estacionária, uma fase móvel líquida e bombas de alta pressão a fim de enviar um fluxo constante e reprodutível de fase móvel, onde a amostra é arrastada, obtendo assim tempos de análise mais curtos.<sup>[17]</sup>

Como mecanismo de separação o aparelho utiliza a troca iónica que separa os vários tipos de hemoglobinas com base na sua carga. As hemoglobinas, nas condições do ensaio, possuem carga positiva e têm diferentes afinidades para a resina de troca iónica (com carga negativa). O hemolisado é aplicado na coluna seguido de um tampão de eluição que tem um pH e uma força iónica específicos, fazendo com que os tempos de retenção sejam diferentes para os vários tipos de Hb (Figura 5).<sup>[17]</sup> A deteção do material eluído é feita por espectrofotometria fazendo a leitura da absorvância a 415 e 690 nm.

O tempo de retenção das várias hemoglobinas, normais e variantes, é comparado com uma hemoglobina conhecida usada como controlo (HbA<sub>2</sub> e /ou HbF) sendo possível quantificar, através das áreas dos picos cromatográficos, as hemoglobinas normais (HbA, HbA<sub>2</sub>, HbF) e obter uma determinação presuntiva das variantes como Hb S, C, D<sup>Punjab</sup> e G<sup>Philadelphia</sup>.<sup>[16]</sup> No caso da HbA<sub>1c</sub> o resultado do seu doseamento é expresso em percentagem em relação a HbA total.<sup>[17]</sup>



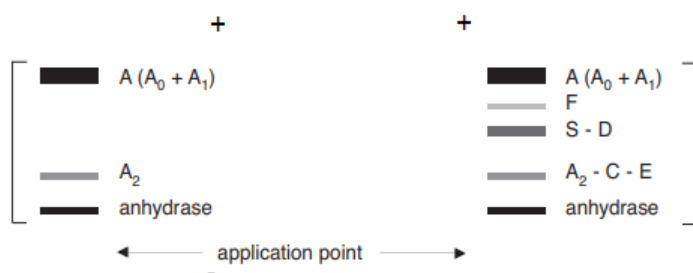
**Figura 5.** Conjunto de hemoglobinas separadas por HPLC. Da esquerda para a direita está representado o pico da Hb F (valor fora do intervalo esperado), Hb A<sub>1c</sub>, A<sub>0</sub>, Hb A<sub>2</sub> (valor fora do intervalo esperado), Hb S e Hb C. (Adaptado de <sup>[13]</sup>).

### 5.6.7 Eletroforese

No SPC a separação das Hb normais (Hb A e HbA<sub>2</sub>) e a deteção das principais hemoglobinas anómalas (Hb S ou Hb D e Hb C ou Hb E) faz-se por eletroforese em gel de agarose em meio alcalino (pH 8,5) no aparelho semi-automático HYDRASYS.<sup>[18]</sup>

A hemoglobina é composta por aminoácidos que possuem cadeias laterais ionizáveis devido aos grupos (-NH<sub>2</sub> e -COOH), tendo por isso características anfotéricas, ou seja, a sua carga vai depender do pH do tampão do gel e do pK dos seus aminoácidos. Assim as variantes de hemoglobinas, devido a substituição dos aminoácidos por mutação, têm diferentes cargas superficiais e, conseqüentemente, diferentes mobilidades eletroforéticas.<sup>[19, 20]</sup> Em meio alcalino as hemoglobinas humanas apresentam uma carga total negativa, migrando em direção ânodo (elétrodo positivo). Uma vez separadas, as diferentes bandas de hemoglobina são visualizadas após coloração com negro de amido e quantificadas por densiometria através de um scanner que lê o diagrama eletroforético (Figura 6) e determina as concentrações das diferentes hemoglobinas em percentagem relativamente à Hb A total, não sendo por este motivo método de referência para a quantificação. Os valores de referência para adultos são os seguintes: Hb A ≥ 96,5%, Hb A<sub>2</sub> ≤ 3,5% e Hb F ≤ 2,0%.<sup>[18,19]</sup>

Para a diferenciação das Hb S e Hb D ou Hb C e Hb E, que migram em posições idênticas na eletroforese em meio alcalino, utiliza-se a eletroforese em meio ácido.<sup>[19]</sup>



**Figura 6.** Representação esquemática da mobilidade eletroforética das hemoglobinas normais (à esquerda) e das principais hemoglobinas anómalas (à direita), em gel de agarose e meio alcalino. (Adaptado de [14]).

## 5.7 Estudo da hemostase

A hemostase é um processo fisiológico complexo que consiste num conjunto de mecanismos que atuam localmente, em caso de lesão no endotélio, a fim de controlar processos hemorrágicos. Este controlo é feito de forma autolimitada e de modo a não comprometer o normal fluxo sanguíneo, restabelecendo assim as suas normais funções.<sup>[21]</sup>

No sistema hemostático existem 3 componentes essenciais: 1) os vasos sanguíneos e células endoteliais, 2) as plaquetas e 3) as proteínas plasmáticas onde se incluem os fatores de coagulação, os inibidores da coagulação e o sistema fibrinolítico. É de notar, no entanto, que estes componentes são simultaneamente ativados e mutuamente dependentes uns dos outros.<sup>[21,22]</sup>

Ao ocorrer uma lesão no endotélio existe uma vasoconstrição local havendo exposição do colagénio e do fator de von Willebrand (FvW). Isto conduz a uma mudança na conformação das plaquetas, induzindo a sua adesão no local da lesão. A adesão ao endotélio e a ligação da GPIIb/IIIa ao FvW promove a ativação das plaquetas havendo secreção de grânulos e agregação plaquetar, formando de um trombo. Este processo é denominado de hemostase primária.<sup>[21]</sup>

A hemostase secundária engloba a ativação do sistema procoagulante, a formação de fibrina e a ativação do sistema inibidor. De acordo com o modelo clássico da coagulação existem duas vias: 1) a via extrínseca, que é ativada após lesão do endotélio pela ligação do fator tecidual, expresso na superfície do endotélio, ao fator VII em circulação e 2) a via intrínseca, que é ativada pela pré-caliceína (fator de Fletcher), pelo quiminogénio de alto peso molecular (fator Fitzgerald) e pela autoativação do fator XII quando contactam com os fosfolípidos carregados negativamente na superfície das plaquetas ativadas. No final, estas duas vias unem-se numa via comum a fim de formar grandes quantidades de trombina que hidrolisa o fibrinogénio formando monómeros de fibrina que, por ação do fator XIIIa, formam um coágulo de fibrina estável (Figura 7).<sup>[21]</sup>

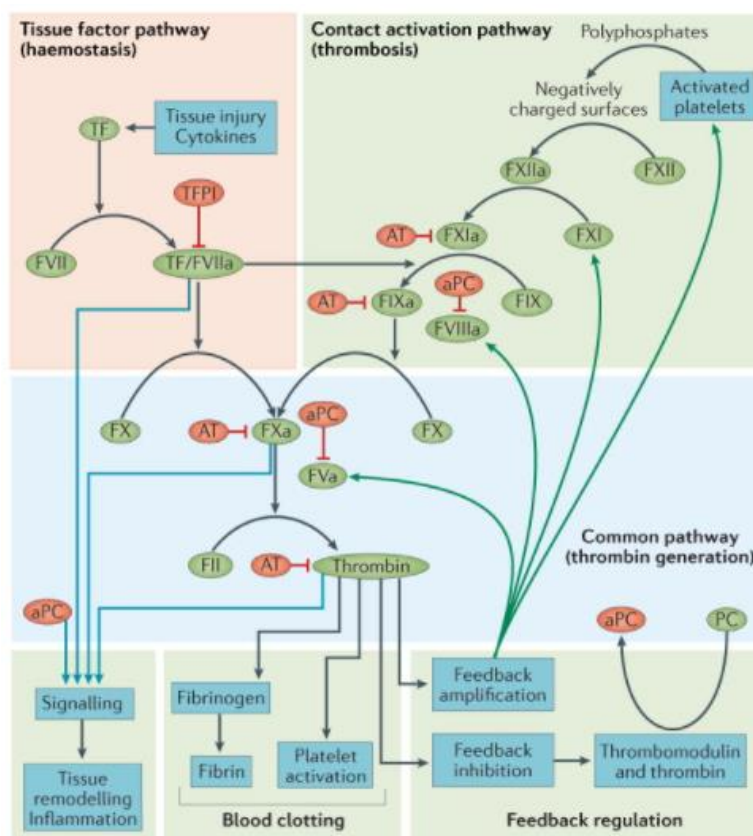
Existem vários mecanismos para garantir que a formação do coágulo de fibrina não se perpetue no tempo e que seja limitado ao local de lesão. Nestes mecanismos incluem-se os anticoagulantes naturais sendo eles o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), que inibe o



complexo FVIIa-TF, a proteína S (PS) e C (PC) que inibem os fatores Va e VIIIa e a antitrombina (AT) que é responsável pela inibição da protrombina (fator IIa) e do fator Xa (Figura 7).<sup>[21]</sup>

Por último, ocorre a fibrinólise que consiste na degradação do coágulo de fibrina e a sua dissolução, restabelecendo o normal fluxo sanguíneo e impedindo que o coágulo seja libertado na circulação e provoque acidentes vasculares. Na fibrinólise o plasminogénio é convertido em plasmina através do ativador de plaminogénio tecidular (t-PA) e do ativador de plasminogénio de urocina (UPA). A plasmina por sua vez degrada o coágulo de fibrina. No entanto para que não ocorram quadros hemorrágicos, este mecanismo é regulado também pelos inibidores da fibrinólise, nomeadamente o inibidor I do ativador de plasminogénio (PAI-1) que inibe a formação de plasmina e a  $\alpha$ 2- antiplasmina que inibe a plasmina.<sup>[21]</sup>

Alterações da hemostasia podem conduzir a processos hemorrágicos ou trombóticos e por isso é essencial realizar testes de avaliação de distúrbios na hemostase e monitorização de terapêuticas. Os testes devem ser executados de imediato e em caso de impossibilidade deve-se refrigerar ou congelar as amostras.



**Figura 7.** Representação esquemática dos mecanismos da hemostase secundária.<sup>[20]</sup>

### 5.7.1 Parâmetros avaliados no estudo da hemostase

- Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada: O tempo de tromboplastina parcialmente ativado (APTT, do inglês *activated partial thromboplastin time*), mede o tempo de coagulação do plasma após a ativação do fator de contacto (sem adição do fator tecidular) e

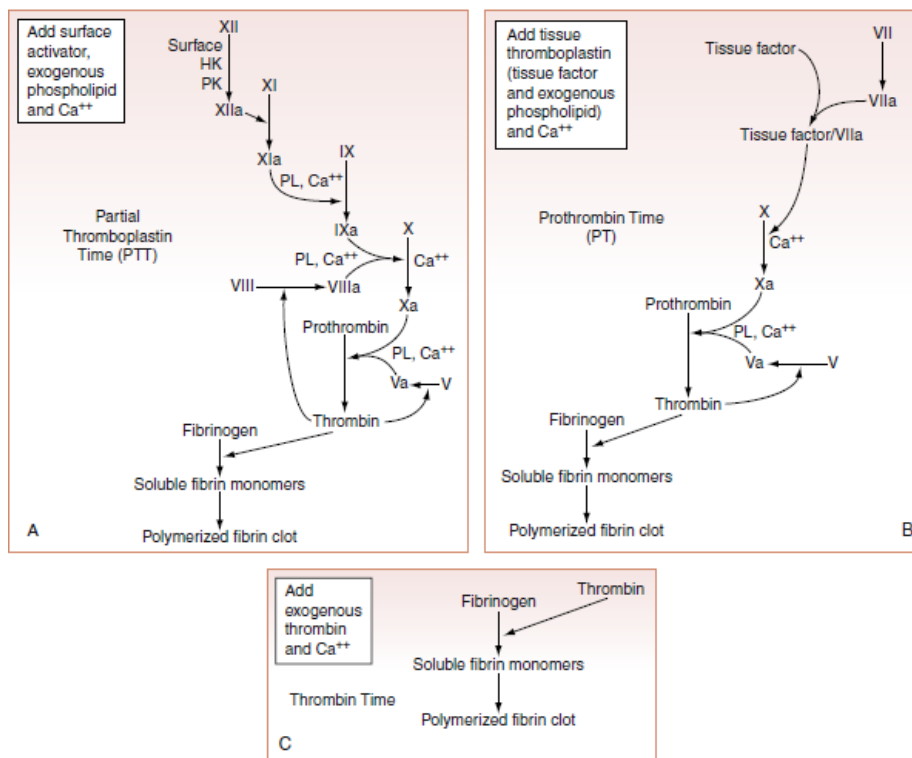
a adição de fosfolípidos e cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) indicando a eficiência geral da via intrínseca (fator XII, XI, IX e VIII) e comum (X, V, II e fibrinogénio). Permite ainda a deteção da deficiência do fator de contacto, a presença de inibidores, especialmente anticoagulantes tipo Lúpico e monitorização da terapêutica anticoagulante heparina (Figura 8). O método utilizado na deteção da formação do coágulo é a turbidimetria (descrito em 5.7.2.2.) através do ensaio coagulométrico.<sup>[21]</sup>

- Tempo de Protrombina: O tempo de protrombina, (PT, do inglês *prothrombin time*), mede o tempo de coagulação do plasma com adição de cálcio, na forma de  $\text{CaCl}_2$ , e tromboplastina (fator tecidual) avaliando a eficiência da via extrínseca e comum e é dependente dos fatores VII, X, V e II e da concentração de fibrinogénio no plasma (Figura 8).<sup>[21]</sup>

Devido ao facto de existirem diferenças entre os testes usados para determinação do TP entre os vários laboratórios, foi desenvolvido o índice de normalização internacional (INR, do inglês *international normalized ratio*) para padronizar a monitorização da terapêutica com anticoagulantes orais. O método utilizado na deteção da formação do coágulo é a turbidimetria (descrito em 5.7.2.2.) através do ensaio coagulométrico.<sup>[21]</sup>

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

- Tempo de Trombina: O tempo de trombina, (TT, do inglês *thrombin time*), trata-se do tempo decorrido até a formação de coágulo após a adição de trombina ao plasma. Este parâmetro é afetado pela concentração e atividade funcional do fibrinogénio e pela presença de inibidores, sendo utilizado para a avaliação da coagulação intravascular disseminada (CID), para a monitorização da terapêutica com heparina e outros anticoagulantes e anomalias quantitativas e qualitativas do fibrinogénio (Figura 8). O método utilizado na deteção da formação do coágulo é a turbidimetria (descrito em 5.7.2.2.) através do ensaio coagulométrico.<sup>[21]</sup>



**Figura 8.** Esquema da cascata de coagulação com os respectivos de ensaios de coagulação (APTT, PT e TT).

- **Fibrinogénio:** O fibrinogénio é uma proteína que é sintetizada no fígado, e que tem um papel muito importante na formação do coágulo de fibrina. Alterações na sua concentração podem conduzir a diversas patologias descritas na Tabela I.<sup>[22]</sup> A sua quantificação é feita pelo método de Clauss, que consiste na adição de trombina em excesso ao plasma diluído (para impedir a presença de inibidores), seguido da medição do tempo de formação do coágulo pelo método turbidimétrico (descrito em 5.7.2.2). Através de uma curva de calibração, obtém-se a quantidade de fibrinogénio na amostra que é inversamente proporcional ao tempo de formação do coágulo.<sup>[21]</sup>

**Tabela I.** Testes utilizados na investigação da hemostase. (Adaptado de <sup>[21]</sup>)

PT	APTT	Fibrinogénio	Plaquetas	Condições
N	N	N	N	Hemostase normal
				Deficiência do fator XIII
				Disfunção das plaquetas
				Alteração na fibrinólise
↑	N	N	N	Deficiência do fator VII
				Insuficiência hepática ou deficiência de vitamina K
				Ligeira deficiência do fator II, V ou X
N	↑	N	N	Deficiência nos fatores da via intrínseca
				Anticoagulante Lúpico
				Anticoagulantes orais (ex. heparina)
				Défice do fator VIII (devido a doença de von Willebrand (DvW))

↑	↑	N ou anormal	N	Deficiência/Alteração do fibrinogênio
				Hiperfibrinólise
				Terapêuticas com anticoagulantes
				Deficiência de múltiplos fatores devido a insuficiência hepática
				Deficiência de vitamina K
N	N	N	↓	Trombocitopenia
↑	↑	N ou anormal	↓	Insuficiência hepática
				CID

- **D-dímeros:** Os D-dímeros são péptidos obtidos após a proteólise da fibrina pela plasmina. O seu aumento sugere que está em curso a decomposição de um coágulo em circulação. A quantificação é útil no auxílio no diagnóstico de CID, tromboembolismo pulmonar (TEP) e trombose venosa profunda (TVP), em que os valores estão aumentados. O ensaio utilizado para a determinação dos D-dímeros é um ensaio imunoturbidimétrico utilizando anticorpos monoclonais altamente específico para o domínio D-dímero, sendo os complexos formados detetados por turbidimetria (descrita em 5.7.2.2).<sup>[22]</sup>

- **Fator de von Willebrand:** O FvW é uma glicoproteína sintetizada por células endoteliais e megacariócitos. Tem como função mediar a adesão das plaquetas à camada subendotelial e transportar e estabilizar o fator VIII. Este teste é pedido pois é essencial ao diagnóstico de DvW, sempre que exista história clínica relevante ou história familiar de hemorragias.<sup>[21]</sup> O ensaio usado para a determinação da quantidade de antigénio FvW é o imunoturbidimétrico e o método de deteção do complexo formado é a turbidimetria (descrito em 5.7.2.2).

- **Antitrombina:** A AT é uma proteína sintetizada pelo fígado, que exerce um efeito anticoagulante principalmente pela inibição do fator IIa e o fator Xa (Figura 7). O efeito inibidor da AT pode ser potencializado pela presença de heparina endógena e exógena.<sup>[22]</sup> Esta prova é utilizada para excluir ou diagnosticar o défice de AT congénito em doentes com tendência para o tromboembolismo<sup>[23]</sup>, na CID, síndromes nefróticas, hepatopatias e terapêutica com heparina ou concentrados de AT<sup>[24, 25]</sup>. O método de deteção da antitrombina é o ensaio enzimático indireto com deteção por espectrofotometria (descrito em 5.7.2.1).

- **Proteína C ativada (PCa):** A PCa é uma proteína dependente da vitamina K localizada na superfície das células endoteliais e é ativada pelo complexo trombina-trombomodulina. A deficiência da PCa está associada a um aumento do risco de tromboembolismo venoso, mas também se encontra diminuído em doentes com patologia hepática, deficiência de vitamina K e em situações de terapêutica antagonistas da vitamina K (ex. varfarina).<sup>[26]</sup> O método de

deteção da antitrombina é o ensaio enzimático direto com deteção por espectrofotometria (descrito em 5.7.2.1).

- Proteína S (PS): A PS é uma proteína dependente da vitamina K que atua como co-fator da PCa e do TFPI, amplificando os efeitos anticoagulantes e profibrinolíticos.<sup>[23,27]</sup> No plasma, 60% da PS circula ligada à proteína de ligação do C4b (C4BP) não tendo um papel significativo na hemostase. Os restantes 40% circulam na forma livre funcionando como um co-fator da PCa e do TFPI.<sup>[23]</sup> A deficiência de PS aumenta o risco trombótico e está associado a doenças hepáticas, deficiência de vitamina K, terapêuticas antagonistas da vitamina K (ex. varfarina), entre outras.<sup>[23,26]</sup> A PS livre é quantificada através de um ensaio imunoturbidimétrico (descrito em 5.7.2.2), recorrendo a C4BP purificada adsorvida em partículas de latex que reage com elevada afinidade para a PS livre no plasma do doente na presença de iões cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Este complexo, por sua vez, reage com um segundo reagente que possui anticorpos monoclonais, acoplados a partículas de latex, específicos para a PS. O grau de aglutinação é diretamente proporcional à concentração de PS livre presente no plasma.

## 5.7.2 Metodologias utilizadas na hemostase

### 5.7.2.1 Ensaio enzimático com substrato acoplado a um cromóforo detetado por espectrofotometria

As enzimas serina proteases da cascata de coagulação têm especificidade para um pequeno peptídeo sintético (substrato) que tem acoplado ao aminoácido terminal um cromóforo (*p*-nitroanilina). Quando o peptídeo sintético se liga à enzima, o cromóforo é clivado e detetado por espectrofotometria a 405 nm. A luz absorvida é detetada no fotodetector e é convertida num sinal elétrico. Através de logaritmos matemáticos que aplicam a Lei de Lambert-Beer, é feita a quantificação do analito que é proporcional ao sinal elétrico.

Os ensaios podem ser diretos ou indiretos. Os ensaios diretos são aqueles que o analito de interesse (ex. proteína C ativada- serina protease) reage diretamente com o peptídeo sintético, sendo a absorvância diretamente proporcional à atividade enzimática. Os ensaios indiretos são aqueles em que o analito de interesse (ex. AT) se liga a uma enzima (ex. fator Xa- serina protease) inativando-a, e as restantes enzimas ativas clivam o peptídeo sintético libertando o cromóforo. Neste caso a concentração de analito é inversamente proporcional à absorvância detetada.<sup>[21,22]</sup>

### 5.7.2.2 Turbidimetria

A turbidimetria baseia-se na medição do aumento da absorção de luz causada pela formação de partículas. Ao incidir um feixe de luz numa cuvete de reação, parte dela é absorvida pelas

partículas e outra parte é detetada por um fotodetector posicionado a 180° e convertida num sinal elétrico. A quantidade de luz absorvida por uma suspensão depende da concentração da amostra e do tamanho da partícula.<sup>[22, 28]</sup>

- **Ensaio Coagulométrico:** Consiste na detecção do coágulo de fibrina por turbidimetria a 405 nm, sendo que à medida que ocorre a formação do coágulo, a absorvância vai aumentando. Com base no sinal elétrico e através de logaritmos matemáticos é obtido o tempo de formação do coágulo.

- **Ensaio imunoturbidimétrico:** O ensaio imunoturbidimétrico consiste na utilização de micropartículas de látex, revestidas com anticorpos monoclonais ou policlonais específicos para o antígeno de interesse. Estes anticorpos são incubados com a amostra (plasma) formando um aglutinado de micropartículas de latex devido a formação do complexo antígeno-anticorpo. Esta aglutinação leva a um aumento da turvação do meio de reação e consequente aumento da absorvância medida por espectrofotometria a 450 nm. Usando logaritmos matemáticos e uma curva de calibração, é determinada a concentração do antígeno de interesse.<sup>[21]</sup>

**Tabela 2.** Analitos analisados em Hematologia e respectivas amostra, metodologias e equipamentos.

Analito	Amostra	Metodologia	Equipamento
GV, Plaquetas	*Sangue Total em EDTA K <sub>3</sub>	Impedância	Sysmex XN-1000
WBC		Citometria de fluxo	
Hb		SLS/Espectrofotometria	
VS	Sangue Total em EDTA K <sub>3</sub>	Fotometria por fluxo capilar	Alifax Test I THL
HbA <sub>1c</sub> , HbA, HbA <sub>2</sub> , HbF	Sangue Total em EDTA K <sub>3</sub>	HPLC	Arkray Adams A1c HA-8160
HbA, HbA <sub>2</sub> , HbS, HbF	Hemolisado da lavagem dos GV obtido de sangue total em EDTA K <sub>3</sub>	Eletroforese	HYDRASYS
APTT, PT, TT, Fibrinogénio	Sangue total colhido num tubo com anticoagulante citrato sódico na razão 1/9 e centrifugado a 1500 rpm/15 minutos	Ensaio coagulométrico /Turbidimetria	ACL Top 300 e 500
D-dímeros, antígeno FvW, PS		Ensaio imunoturbidimétrico /Turbidimetria	
PCa		Ensaio enzimático direto /Espectrofotometria	
AT		Ensaio enzimático indireto /Espectrofotometria	

Nota\*: O uso de anticoagulante EDTA K<sub>3</sub> é essencial uma vez que este funciona como agente quelante que complexa o Ca<sup>2+</sup> evitando que ocorra a ativação da cascata de coagulação e que a amostra fique coagulada. No entanto, este anticoagulante pode levar a fenómenos de falsa trombocitopenia dado que expõe e proporciona a ligação de anticorpos anti-criptoantígenos da glicoproteína IIb/IIIa levando à aglutinação plaquetar formando aglutinados. Nestes casos é necessário utilizar como anticoagulante o citrato ou a heparina.

## 5.8 Caso Clínico I

História Clínica - Mulher de 71 anos, enviada do lar para o serviço de urgência por alterações analíticas de novo (hemoglobina de 7.6 g/dL), cansaço fácil e mucosas descoradas.

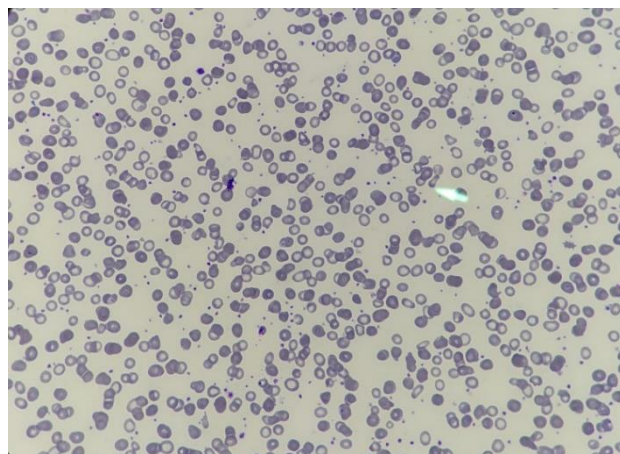
**Tabela 1.** Valores do eritrograma do caso clínico I.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
Eritrócitos	4.76 $10^{12}/L$	
Hemoglobina	7.4 g/dL	11.5 - 15.5
Hematócrito	26.9 %	34.0 - 46.0
VCM	56.7 fL	80.0 - 100.0
HCM	15.5 pg	27.0 - 32.0
CHCM	27.5 g/dL	32.0 - 35.0
RDW	27.9 %	11.6 - 14.0

**Tabela 2.** Valores de bioquímica do caso clínico I.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
Ferro sérico	10.0 $\mu g/dL$	60.0 - 180.0
Ferritina	12.1 $\mu g/dL$	11.0 - 306.8
TIBC	456.7 $\mu g/dL$	291.0 - 430.0
Saturação da Trasferina	3 %	20 - 50

### Observação do esfregaço



**Figura 9.** Observação do ESP. (Fonte: SPC de Tomar).

Observou-se uma população de eritrócitos hipocrômica microcítica, anisopoiquilocitose moderada a elevada com presença de anulócitos, células alongadas “pencil cells” e policromatofilia.

### Interpretação

Ao analisar o hemograma observa-se a presença de uma anemia (Hb - 7.4 g/dL) microcítica (VCM - 56.7 fL), hipocrômica (HCM - 15.5 pg; CHCM - 27.5 g/dL), com contagem de eritrócitos diminuída ( $4.76 \cdot 10^{12}/L$ ) e um aumento do RDW (27.9%) sendo muito sugestivo de uma anemia por deficiência de ferro. A observação do ESP confirmou estes resultados e revelou GV atípicos muito característicos de anemia por deficiência de ferro.

As anemias microcíticas hipocrômicas podem advir de várias causas (consultar Anexo IV). Assim foram pedidos testes de estudo do metabolismo do ferro (Tabela 3) para distinguir anemia sideropénica de anemia por doença crónica ou talassémia (consultar Anexo V). Os valores diminuídos de ferro sérico, ferritina e saturação da transferrina conjugados com o aumento da capacidade total de ligação do ferro (TIBC, do inglês *total iron binding capacity*) são confirmatórios de uma anemia sideropénica. O tratamento de anemia sideropénica pode

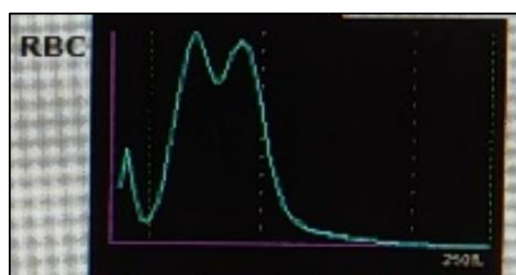
passar pela administração de ferro por via oral/endovenosa ou até administração de unidade de concentrado eritrocitário (UCE).

## 5.9 Caso Clínico 2

História Clínica - Doente de 55 anos, sexo feminino, com hérnia do hiato. Realizou endoscopia digestiva alta que revelou erosões antrais além de volumosa hérnia do hiato já conhecida. A pesquisa de *Helicobacter pylori* foi negativa. Resultante deste quadro clínico a paciente desenvolveu anemia sideropénica estando sob terapêutica com ferro oral. Na consulta apresentou os seguintes valores.

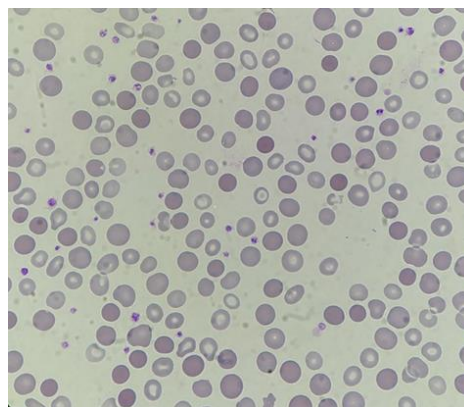
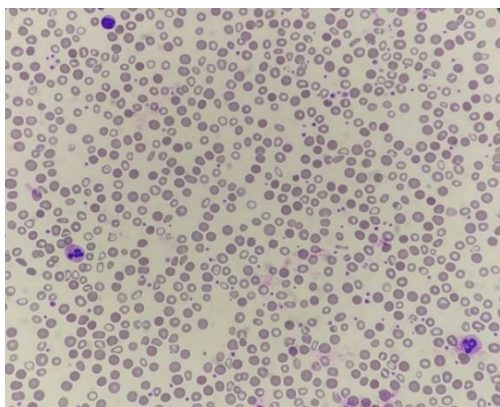
**Tabela 5.** Valores do eritrograma do caso clínico 2.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
Eritrócitos	4.99 $10^{12}/L$	
Hemoglobina	10.6 g/dL	11.5 - 15.5
Hematócrito	35.9 %	34.0 - 46.0
VCM	71.9 fL	80.0 - 100.0
HCM	21.2 pg	27.0 - 32.0
CHCM	29.5 g/dL	32.0 - 35.0
RDW	Não calculável	11.6 - 14.0



**Figura 10.** Histograma dos GVs obtido por impedância, com evidência de duas populações de eritrócitos ambas em grande quantidade.

### Observação do ESP



**Figura 11.** Observação do ESP. (Fonte: SPC de Tomar).

A série eritrocitária apresenta uma anisocitose marcada, observando-se a presença de duas populações distintas de eritrócitos, uma população microcítica e hipocrômica e outra população normocítica normocrômica. Apresenta também poiquilocitose com presença de algumas células em alvo, células alongadas “pencil cells” e policromatofilia. Não se observam eritroblastos nem inclusões eritrocitárias. A linhagem granulocítica, linfocítica e plaquetar apresentam-se normais em número e morfologia.



## Interpretação

A terapêutica com ferro é um estímulo direto à produção de GV pela medula óssea. Resulta numa reticulocitose em 3-5 dias após terapêutica e atinge o máximo aos 8-10 dias, seguindo-se um aumento significativo da concentração de hemoglobina até a concentração ser normalizada e existir síntese de GV normais (~3 semanas).<sup>[29]</sup> No entanto, dado o tempo médio de vida destas células ser de ~120 dias, ocorre uma co-existência de duas populações eritrocitárias distintas não sendo possível a determinação do RDW pelo equipamento.

Esta situação de co-existência de duas populações pode ainda observar-se em pacientes sujeitos a transfusão com UCE.

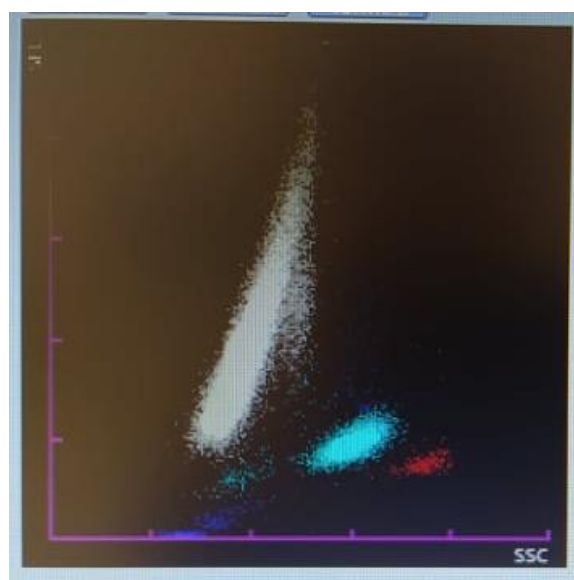
### 5.10 Caso Clínico 3

História Clínica - Doente de 67 anos do sexo masculino, apresentava adenopatias cervicais móveis, indolores à palpação e sem sinais inflamatórios, e ainda uma perda ponderal de peso (15 Kg). As análises de rotina revelaram uma leucocitose com linfocitose. Face ao quadro clínico foi pedida a biopsia ganglionar e estudo de citometria de fluxo do sangue periférico.

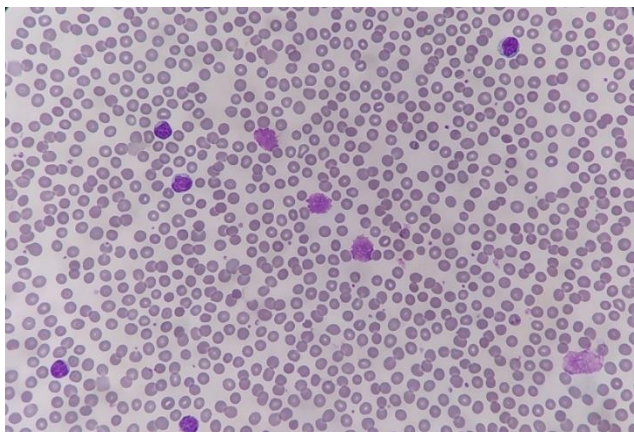
**Tabela 6.** Hemograma do caso clínico 3.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
Eritrócitos	4.23 $10^{12}/L$	
Hemoglobina	12.1 g/dL	11.5 - 15.5
Hematócrito	38.1 %	34.0 - 46.0
VCM	90.1 fL	80.0 - 100.0
HCM	28.6 pg	27.0 - 32.0
CHCM	31.8 g/dL	32.0 - 35.0
RDW	14.2 %	11.6 - 14.0
Leucócitos	71.13 $10^9/L$	4.0 - 10.0
Neutrófilos	9.25 $10^9/L$	1.5 - 7.0
Linfócitos	36.28 $10^9/L$	1.0 - 3.7
Monócitos	14.94 $10^9/L$	0.0 - 0.7
Eosinófilos	0.00 $10^9/L$	0.0 - 0.4
Basófilos	0.00 $10^9/L$	
Plaquetas	151.0 $10^9/L$	150 - 400

**Figura 12.** Histograma de citometria de fluxo do caso clínico 3. (Fonte: SPC de Tomar).



### Observação do esfregaço



Observa-se população linfocitária atípica caracterizada por células pequenas, com relação núcleo/citoplasma aumentada, cromatina nuclear densa, sem sinais de imaturidade. Observam-se ainda sinais de fragilidade do citoesqueleto linfocitário com presença de manchas de Gumprecht.

**Figura 13.** Observação do ESP. (Fonte: SPC de Tomar).

### Imunofenotipagem (citometria de fluxo do sangue periférico) (Análise feita no exterior)

O estudo fenotípico do sangue periférico revelou a presença de 82% de células B clonais Kappa e com fenótipo similar ao observado na LLC-B.

Fenótipo: CD5+, CD20+, CD38+, CD23+, CD200+, CD43+ e kappa+  
CD10-, CD79b- e lambda-

### Interpretação

O hemograma apresenta valores normais exceto na população de leucócitos onde existe um aumento derivado de uma linfocitose absoluta. Ao observarmos o histograma (Figura 12) verificamos a presença de uma grande quantidade de células no 1º quadrante esquerdo, onde se situam os linfócitos maduros, por apresentarem um tamanho pequeno e pouca complexidade. Posto isto, foi feita a observação do ESP que confirmou a linfocitose de linfócitos maduros e a presença de manchas de Gumprecht, muito característicos de situações de Leucemia Linfocítica Crónica (LLC).

A imunofenotipagem revelou a presença de CD5+, CD20+, CD23+ e monoclonalidade das cadeias leves de imunoglobulinas (kappa+, lambda-) muito característico de situações de LLC. Esta patologia é mais predominante no sexo masculino entre os 65 e os 70 anos de idade. Consiste numa neoplasia que se caracteriza pela acumulação de linfócitos maduros no sangue, na medula e nos tecidos linfoides devido a resistência das células aos mecanismo de apoptose.<sup>[30]</sup>

Dado o relatório clínico e os resultados da imunofenotipagem a hipótese mais provável foi uma LLC-B.<sup>[30]</sup> No entanto é necessário prosseguir os estudos e analisar os dados de Anatomia Patológica a fim perceber qual o prognóstico.

## 5.11 Caso Clínico 4

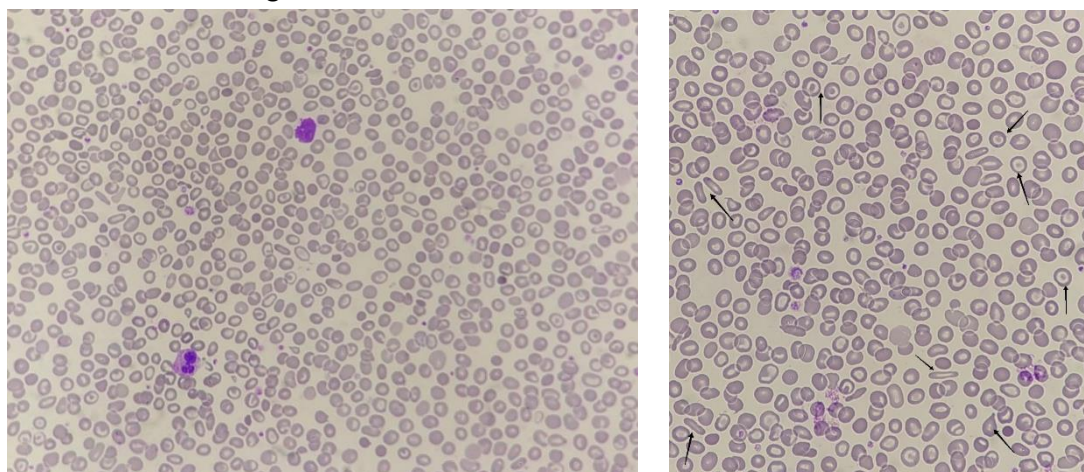
História Clínica - Doente de 81 anos do sexo feminino, que mantinha anemia microcítica hipocrômica com contagem eritrocitária normal e alteração insignificante do RDW. Dado o quadro clínico o médico pediu o despiste de talassémias e hemoglobinopatias.

**Tabela 7.** Hemograma do caso clínico 4.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
Eritrócitos	5.45 $10^{12}/L$	
Hemoglobina	10.1 g/dL	11.5 - 15.5
Hematócrito	33.4 %	34.0 - 46.0
VCM	61.3 fL	80.0 - 100.0
HCM	18.5 pg	27.0 - 32.0
CHCM	30.2 g/dL	32.0 - 35.0
RDW	14.7 %	11.6 - 14.0

O hemograma foi concordante com a presença de anemia (Hb- 10.1 g/dL) microcítica (VCM- 61.3 fL), hipocrômica (HCM- 18.5 pg; CHCM- 30.2 g/dL), com contagem de eritrócitos normal ( $5.45 \cdot 10^{12}/L$ ) e um ligeiro aumento do RDW (14.7%).

### Observação do esfregaço



**Figura 14.** Imagem do ESP do caso clínico 4 (Fonte: SPC do Tomar).

A série eritrocitária apresenta-se microcítica e hipocrômica com anisocitose e poiquilocitose. Apresenta células em alvo, células alongadas (*pencil cells*), cerca de 2 a 3 esquizócitos por campo e raros dacriócitos. Não se observam eritroblastos nem inclusões eritrocitárias. As linhagens granulocítica, linfocítica e plaquetar apresentam-se normais em número e morfologia.

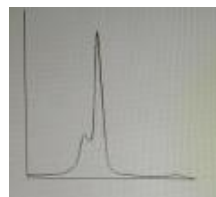
### Doseamento das hemoglobinas (HPLC)

	%	Valores referência
Hb A	95%	96.0-99.0
Hb F	0.4%	0.2-1.0
HbA <sub>2</sub>	4.5%	0.0-3.5

O perfil cromatográfico e tempos de retenção revela um aumento da Hb A<sub>2</sub>

## Eletroforese das hemoglobinas

	%	Valores referência
Hb A	96.5%	96.0-99.0
Hb A <sub>2</sub>	3.5%	0.0-3.5



**Figura 15.** Perfil eletroforético de hemoglobinas do caso clínico 4.

Traço eletroforético evidencia um aumento da Hb A<sub>2</sub> e uma diminuição da percentagem de Hb A.

## Interpretação

Existem dois tipos de síndromes talassémicas, as  $\alpha$ -talassémias e as  $\beta$ -talassémias que se caracterizam pela diminuição da síntese de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , respetivamente. As  $\alpha$ -talassémias afetam a síntese das 3 hemoglobinas fisiológicas (Hb A ( $\alpha_2, \beta_2$ ), HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2, \delta_2$ ) e a HbF ( $\alpha_2, \gamma_2$ )). As cadeias  $\alpha$  são codificadas por 4 genes e o silenciamento de 1, 2, 3 ou 4 genes leva a  $\alpha$ -talassémias.<sup>[31]</sup>

Nas  $\beta$ -talassémias apenas a Hb A é afetada sendo que existe um aumento da HbA<sub>2</sub> e a HbF para compensar a diminuição das cadeias  $\beta$ . Tendo em conta as características fenotípicas e genotípicas as  $\beta$ -talassémias dividem-se em *major*, intermédias e *minor*. As  $\beta$ -talassémias *major* ( $\beta^0/\beta^0$ ) caracterizam-se por uma anemia severa dependente de transfusões, não havendo produção de Hb A e aumento da Hb F como mecanismo compensatório. A  $\beta$ -talassémia intermédia ( $\beta^+/\beta^+$ ) aparece normalmente como uma anemia moderada hipocrômica e microcítica em que a produção de Hb A<sub>2</sub> é superior a 3.5% e a Hb F situa-se entre 10% e 60%. Por último, a  $\beta$ -talassémia *minor* é caracterizada por uma anemia ligeira, hipocrômica e microcítica com uma percentagem de Hb A<sub>2</sub> superior a 3.5%, e normalmente não apresenta sintomas associados.<sup>[31]</sup>

Ao analisar todos os dados quer hematométricos quer morfológicos foi sugerido um quadro de  $\beta$ -Talassémia minor. No entanto para confirmação teve que prosseguir com estudos genéticos.

## **5. Bioquímica**

Neste capítulo serão abordados os parâmetros bioquímicos de maior interesse na rotina laboratorial, encontrando-se agrupados pelos diferentes sistemas e órgãos. No final, serão abordadas todas as metodologias usadas na determinação dos parâmetros bioquímicos pelos equipamentos do SPC do Tomar.

## **6.1 Parâmetros Bioquímicos**

### **6.1.1 Ionograma**

O equilíbrio eletrolítico é essencial para a homeostasia e fisiologia celular e, por conseguinte, para a manutenção da saúde humana. Os principais eletrólitos são o sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) tendo diversas funções importantes como a regulação hídrica entre os vários compartimentos de fluidos corporais, a regulação do equilíbrio ácido-base, a manutenção da função cardíaca e muscular e ainda são utilizados como co-fatores enzimáticos. Todos estes iões são obtidos através da dieta sendo absorvidos a nível intestinal e excretados, quando em excesso, a nível renal.<sup>[32]</sup>

O  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  são os principais iões presentes no líquido extracelular, desempenhando um papel crucial na regulação da pressão osmótica e consequentemente na manutenção da distribuição normal da água.<sup>[32]</sup> A hiponatrémia pode ser devida a sobre-hidratação (hiponatrémia dilucional) ou devido a perda de  $\text{Na}^+$ , originando sintomas como náuseas, fraqueza generalizada e, em casos graves, convulsões. Por outro lado, a hipernatrémia tem como principais causas a desidratação (causa mais comum), hiperaldosteronismo, hipercortisolismo, entre outras e origina sintomas como tremores, irritabilidade, ataxia confusão e, eventualmente, coma.<sup>[33]</sup>

O  $\text{K}^+$  é o principal catião intracelular sendo a sua concentração mantida devido a uma bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase que transporta o  $\text{K}^+$  para dentro das células contra o gradiente de concentração.<sup>[32]</sup> A hipocalémia tem como principais sintomas a fraqueza muscular, irritabilidade e paralisia e ocorre devido perdas gastrointestinais (ex. vômitos e diarreia), consumo de diuréticos (ex. tiazídicos e diuréticos da ansa ascendente de Henle), alterações da função renal (ex. diurese osmótica e perda de  $\text{K}^+$  na urina), entre outras. As causas de hipercalemia são fundamentalmente lise celular, falência renal, acidose, pseudohipercalemia (devido a hemólise, leucocitose ou trombocitose) e origina sintomas como confusão mental, paralisia dos músculos respiratórios e bradicardia.<sup>[33]</sup>

A determinação do ionograma é feita por potenciometria (descrito em 6.2.3).

### **6.1.2 Avaliação do metabolismo Ósseo**

A determinação de cálcio total, fosforo inorgânico e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) nos fluidos biológicos fornece informações importantes sobre o metabolismo ósseo permitindo o diagnóstico de anomalias e doenças de múltiplos órgãos e tecidos.

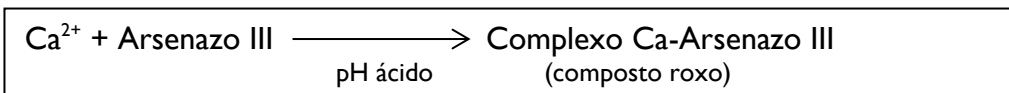
O  $\text{Ca}^{2+}$  é o catião mais prevalente sendo que, no plasma o  $\text{Ca}^{2+}$  apresenta-se de três formas: 50% livre/ionizado, 40% ligado às proteínas e 10% complexado. A sua concentração plasmática

é altamente regulada pela paratormona (PTH) e pela calcitriol (1,25 (OH)<sub>2</sub>D) que aumentam a reabsorção de Ca<sup>2+</sup> no intestino, no rim e no esqueleto quando os seus níveis plasmáticos estão baixos. O Ca<sup>2+</sup> é fundamental na contração muscular, na mineralização óssea e coagulação do sangue. A hipocalcemia pode dever-se a situações de hipoalbuminemia (mais frequente), insuficiência renal crónica e deficiências da vitamina D. Situações de hipercalcemia observam-se em hiperparatiroidismo e terapêuticas com vitamina D. A determinação do Ca<sup>2+</sup> na urina reflete a ingestão de cálcio, absorção intestinal, reabsorção esquelética, e filtração renal e reabsorção tubular.<sup>[34]</sup>

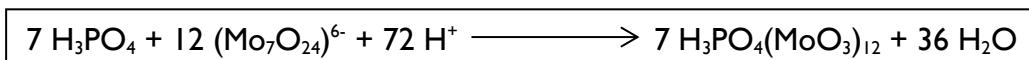
O fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) é um ião que circula na corrente sanguínea sendo que cerca de 10% está ligado as proteínas, 35% complexado e 55% na forma livre. O PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> é importante na estrutura óssea, bem como na formação de ácidos nucleicos, fosfolípidos, compostos de alta energia entre outros. A hipofosfatemia pode resultar da perda a nível renal e da diminuição da absorção intestinal. A hiperfosfatemia ocorre em situações de diminuição da sua excreção (ex. insuficiência renal crónica), hipotiroidismo e aumento da lise celular.<sup>[34]</sup>

O Mg<sup>2+</sup> é o segundo catião intracelular mais prevalente e é um cofator enzimático fundamental. É absorvido pelo intestino delgado e filtrado pelo rim onde volta a ser reabsorvido. A hipomagnesiemia é comum nas perdas gastrointestinais (ex. vômitos e diarreia) e renais, sendo que a hipermagnesiemia ocorre devido à ingestão excessiva no tratamento de determinados quadros clínicos.<sup>[34]</sup>

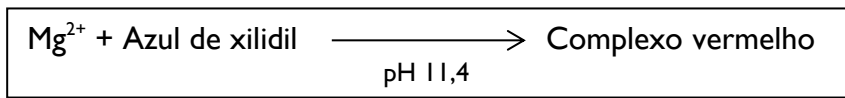
- Cálcio Total: A determinação do Ca<sup>2+</sup> é realizada através da reação química com Arsenazo III que forma um composto corado detetado por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). O reagente Arsenazo III, em pH ácido tem uma grande afinidade para o Ca<sup>2+</sup> ligando-se e formando um complexo roxo que absorve a 650 nm. A absorvância é diretamente proporcional à concentração de Ca<sup>2+</sup> na amostra.<sup>[34]</sup>



- Fosfato inorgânico: A determinação do PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> é realizada através da reação química com fosfomolibdato que forma um composto detetado por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). Esta reação é baseada na reação dos iões fosfato com o molibdato, em meio ácido, a fim de formar o complexo fosfomolibdato que absorve a 340 nm. A formação deste complexo é influenciada pelas proteínas e, por isso, são usados agentes solubilizantes para prevenir a precipitação de proteínas para eliminar esta interferência.<sup>[34]</sup>



- **Magnésio:** A determinação do  $Mg^{2+}$  é realizada através da reação química com Azul de Xilidil que forma um composto corado detectado por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). O reagente azul de xilidil, em meio alcalino, liga-se ao magnésio formando um complexo vermelho que absorve a 600 nm. A interferência do cálcio e das proteínas neste método são eliminadas usando um agente quelante de  $Ca^{2+}$  (EGTA, do inglês *egtazic acid*) e dimetilsulfóxido respectivamente.<sup>[34]</sup>



### 6.1.3 Avaliação do metabolismo do ferro

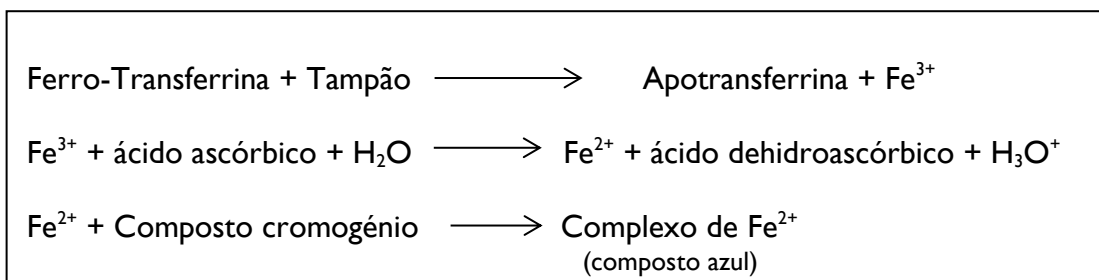
O ferro está envolvido em diversas funções biológicas como a ligação e transporte de oxigênio no grupo heme da hemoglobina. A sua homeostase é altamente regulada pelos enterócitos duodenais, responsáveis pela absorção do ferro da dieta, pelos precursores dos GV, que utilizam grandes quantidades de ferro para a formação de novos GV e pelas células responsáveis pelo seu armazenamento na forma de ferritina e hemossiderina (macrófagos e hepatócitos).<sup>[35]</sup>

A deficiência de ferro, a sua sobrecarga e a anemia por doenças crônicas são as causas mais prevalentes das alterações do metabolismo do ferro.<sup>[35]</sup>

A diminuição de ferro pode ser causada por aumento da necessidade fisiológica, em crianças, por perda de sangue estando maioritariamente associado a um quadro de anemia microcítica hipocrômica ou na anemia por doenças crônicas. Esta anemia é caracterizada por ser normocítica normocrômica, no entanto os valores de ferritina encontram-se elevados devido ao estado inflamatório subjacente.<sup>[35]</sup>

O aumento de ferro na corrente sanguínea pode dever-se a múltiplas transfusões com unidades de concentrados eritrocitários, suplementação e distúrbios no eixo hepcidina-ferroportina.<sup>[35]</sup>

- **Ferro sérico:** A determinação do ferro sérico é realizada através do acoplamento de reações químicas que no final originam um composto corado cuja a sua absorvância é lida por espectrofotometria (descrito em 6.2.1) e é proporcional à concentração de ferro na amostra.<sup>[35]</sup>



- Ferritina: A concentração de ferritina sérica reflete o armazenamento de ferro no organismo. Esta é um indicador muito sensível para a deficiência de ferro uma vez que diminui muito antes das alterações na concentração de hemoglobina, nos GV ou na concentração de ferro sérico.<sup>[35]</sup> A concentração plasmática de ferritina encontra-se aumentada em caso de sobrecarga de ferro sendo usada na monitorização de terapêuticas com quelantes de ferro e remoção de sangue (flebotomia). A ferritina é proteína de fase aguda positiva estando também aumentada em doenças inflamatórias.<sup>[35]</sup> A determinação da ferritina é feita através de um ensaio imunoenzimático não competitivo, com deteção por quimioluminescência (descrito em 6.2.6 e 6.2.4, respetivamente). Este ensaio utiliza um anticorpo monoclonal anti-ferritina fixo na fase sólida, um anticorpo monoclonal anti-ferritina acoplado com a enzima fosfatase alcalina e um substrato que ao ser hidrolisado pela fosfatase alcalina, forma um composto quimiluminescente. A deteção de luz é diretamente proporcional à quantidade de ferritina presente na amostra.<sup>[35]</sup>

- Transferrina: A transferrina é uma proteína sintetizada principalmente no fígado que transporta o ferro no plasma. A determinação dos níveis séricos de transferrina é muito útil no diagnóstico diferencial de anemia. A determinação da transferrina é realizada através de um imunoensaio com deteção por turbidimetria (descrito em 5.7.2.2). Este ensaio utiliza anticorpos anti-transferrina que reagem especificamente com a transferrina presente na amostra formando imuno-complexos que são detetados por turbidimetria. Sendo que a absorvância dos imuno-complexos é diretamente proporcional à quantidade de transferrina na amostra.<sup>[35]</sup>

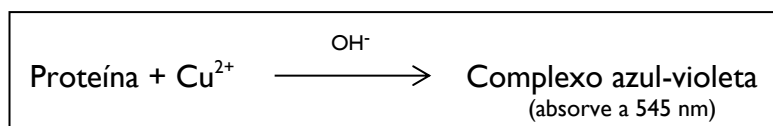
#### 6.1.4 Análise das Proteínas

As proteínas plasmáticas são sintetizadas essencialmente no fígado e fazem parte deste grupo principalmente a albumina, as globulinas e o fibrinogénio. Estas proteínas apresentam diversas funções como transporte, imunidade humoral, manutenção da pressão oncótica, catálise enzimática, entre outras.<sup>[36]</sup>

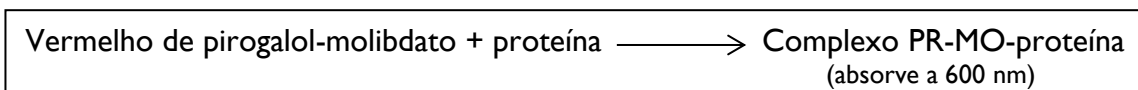
- Proteínas séricas totais: As proteínas séricas totais consistem no conjunto de todas as proteínas que circulam na corrente sanguínea. A determinação deste parâmetro é muito importante no diagnóstico e no tratamento de patologias associadas aos rins, fígado ou medula óssea. A alteração do normal valor das proteínas pode dever-se a erros pré-analíticos (hemoconcentração devido a erros na colheita), alterações na síntese, no catabolismo ou alterações no estado de hidratação.<sup>[36]</sup> A determinação das proteínas totais séricas realiza-se através da reação de Biureto pelo método de espectrofotometria (descrito em 6.2.1). Sob



condições fortemente alcalinas o íon cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) forma um complexo multivalente com as ligações peptídicas das proteínas. A formação deste complexo muda o espectro de absorção do íon  $\text{Cu}^{2+}$  para um comprimento de onda mais curto, levando a uma mudança de cor de azul para violeta. Posteriormente é lida a absorvância deste complexo a 545 nm, que é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra.<sup>[37]</sup>

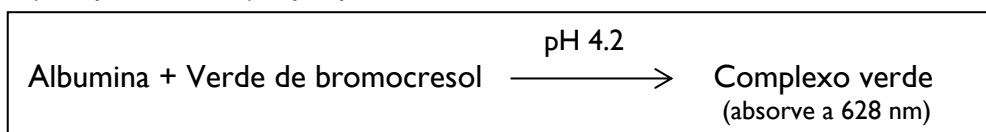


- Proteínas totais na urina/ líquido cefalorraquidiano (LCR): A determinação de proteínas totais na urina é muito importante principalmente no diagnóstico e tratamento de patologias associadas ao rim, tais como glomerulonefrites e insuficiência renal. A proteinúria pode ser de 4 tipos diferentes: proteinúria glomerular, proteinúria tubular, proteinúria por secreção e proteinúria por excesso (ex. proteinúria de Bence Jones). A determinação das proteínas totais do LCR é essencial no auxílio do diagnóstico de situações de infecção (ex. distinção de meningites bacterianas ou viral), hemorragias ou tumor cerebral. A determinação das proteínas totais na urina /LCR realiza-se através da reação com vermelho de pirogalol-molibdato pelo método de espectrofotometria (descrito em 6.2.1). O complexo vermelho pirogalol-molibdato possui cor vermelha com absorvância máxima nos 470 nm. Este complexo ao ligar-se aos grupos amina das proteínas forma um complexo azul púrpura aumentando o seu pico de absorvância para 600 nm. A absorvância deste complexo é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra.<sup>[38]</sup>



- Albumina: A albumina é a proteína plasmática mais abundante no plasma humano, representando cerca de 55-65% do total de proteínas plasmáticas. As suas principais funções são manter a pressão oncótica e o transporte de íons e substâncias lipossolúveis como o cálcio, hormonas, fármacos, bilirrubina não conjugada, ácidos gordos livres, entre outros.<sup>[37]</sup> A hipoalbuminémia pode ter várias causas tais como: diminuição da síntese (ex. malnutrição, insuficiência hepática), excreção anormal ou catabolismo excessivo (ex. síndrome nefrótico, enteropatias, neoplasias), diluicional (hiperhidratação) e distribuição anormal (ex. processos inflamatórios, ascite).<sup>[26]</sup> A hiperalbuminémia é menos frequente e tem como principal causa a desidratação grave. A determinação da albumina sérica realiza-se através da reação com verde de bromocresol pelo método de espectrofotometria (descrito em 6.2.1). A albumina em meio ácido (pH 4.2) encontra-se na forma catiónica e liga-se especificamente ao verde de

bromocresol produzindo um complexo corado que absorve a 628 nm. A intensidade da coloração (complexo verde) é proporcional à concentração da albumina na amostra.<sup>[39]</sup>



### 6.1.5 Avaliação do Metabolismo dos Lípidos

A avaliação de rotina do metabolismo dos lípidos faz-se através da determinação do colesterol total, colesterol HDL (do inglês, *high density lipoproteins*), colesterol LDL (do inglês, *low density lipoproteins*) e dos triglicéridos. Estes parâmetros são fundamentais no diagnóstico de hiperlipidémias e hiperlipoproteinémias, na avaliação do risco de doenças cardiovasculares e no controlo de doentes sujeitos a terapêuticas ou dietas hipolipemiantes.

Os desequilíbrios no metabolismo lipídico são um fator de risco elevado no desenvolvimento de aterosclerose e de doenças cardiovasculares. O aumento da concentração plasmática de colesterol em certas frações de lipoproteínas (nomeadamente LDL) pode resultar no aumento da deposição e retenção de colesterol na camada íntima levando à formação de lesões ateroscleróticas.<sup>[40]</sup>

No entanto, embora a associação com aumento do risco de doenças cardiovasculares o colesterol é um componente essencial das membranas das células e lipoproteínas e é igualmente um precursor para a síntese de hormonas esteróides e ácidos biliares. O valor de colesterol total pode ser influenciado pela idade, sexo, fatores genéticos e pela dieta.<sup>[40]</sup>

Outro lípido também muito importante são os triglicérideos que constituem uma importante fonte de energia. A sua determinação é muito utilizada na avaliação de fatores de risco aterosclerótico assim como no diagnóstico e tratamento de doentes com pancreatite aguda, Diabetes *mellitus*, obstrução biliar extrahepática, entre outras patologias.<sup>[40]</sup>

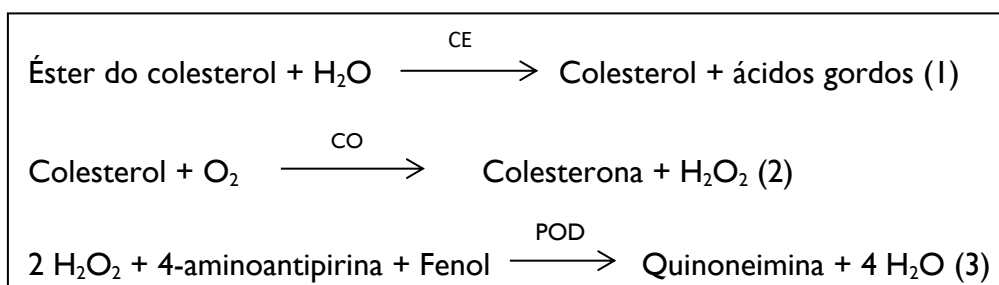
Tanto o colesterol como os triglicéridos circulam na corrente sanguínea através de lipoproteínas. Estas lipoproteínas são divididas em quilomicrons, VLDL (do inglês, *very low density lipoproteins*), IDL (do inglês, *intermediate density lipoproteins*), LDL e HDL.<sup>[41]</sup>(Ver classificação e características das lipoproteínas no Anexo VI).

As lipoproteínas HDL possuem como principal função o transporte reverso do colesterol que consiste na remoção do excesso de colesterol das células e libertação do mesmo no fígado onde vai ser metabolizado. Assim, o colesterol HDL está inversamente relacionado com o risco de doenças cardiovasculares.<sup>[42]</sup>

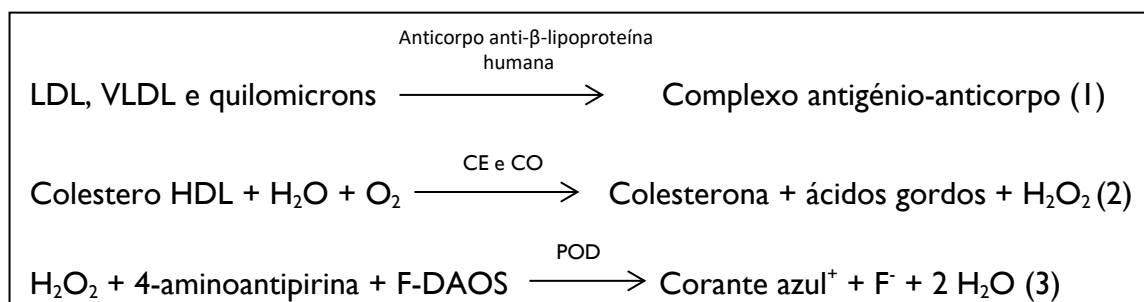
As lipoproteínas LDL são os principais transportadores de colesterol. Os níveis elevados de colesterol LDL estão associados à hipercolesterolemia familiar e ao risco acrescido de doenças

cardiovasculares. Por outro lado, níveis baixos de colesterol LDL podem ocorrer em situações de má absorção e má nutrição.<sup>[42]</sup>

- Colesterol total: A determinação do colesterol total é realizada através da reação enzimática com formação de quinoneimina quantificada por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). O colesterol esterificado presente na amostra é hidrolisado em colesterol livre e ácidos gordos por ação da colesterol esterase (CE) (reação 1). De seguida, o colesterol livre formado, juntamente com o colesterol livre existente na amostra são oxidados por ação da colesterol oxidase (CO), formando peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e colesteno (reação 2). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado na reação 2, juntamente com a 4-aminoantipirina e o fenol, na presença da enzima peroxidase (POD), dá origem à quinoneimina (reação 3), que absorve a 500 nm. A intensidade da coloração (quinoneimina) é proporcional à quantidade de colesterol presente na amostra.<sup>[43]</sup>



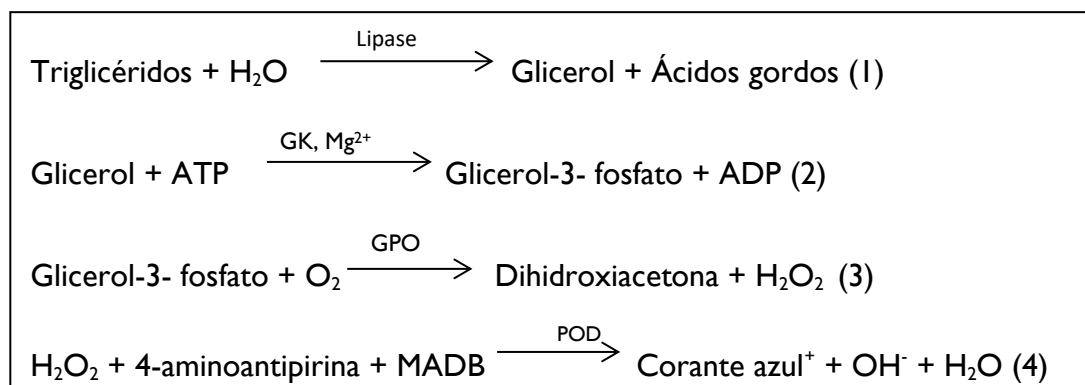
- Colesterol HDL: A determinação do colesterol HDL é realizado através da reação enzimática com formação de um composto azul quantificado por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). O anticorpo anti-β-lipoproteína humana liga-se especificamente às lipoproteínas VLDL, LDL e quilomicrons, excepto às HDL, formando um complexo antígeno-anticorpo (reação 1). A formação deste complexo impede a reação destas lipoproteínas com as enzimas CO e CE. Assim apenas o colesterol presente nas lipoproteínas HDL reage com as enzimas CO e CE formando colesteno, ácidos gordos e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reação 2). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> libertado, na presença da POD, 4-aminoantipirina e N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxi-4-fluoroanilina (F-DAOS) forma um complexo azul (reação 3). A intensidade da coloração do complexo azul é diretamente proporcional à concentração do colesterol-HDL.<sup>[42]</sup>



- Colesterol LDL: O colesterol-LDL é determinado aplicando a *Fórmula de Friedewald*, no entanto esta fórmula apenas é válida para valores de triglicéridos inferiores a 400mg/dL. Quando superiores a este valor a determinação é feita laboratorialmente com um método muito semelhante ao da quantificação do colesterol HDL.<sup>[42]</sup>

$$\text{Colesterol LDL} = (\text{Colesterol total}) - (\text{Colesterol HDL}) - \left( \frac{\text{Triglicéridos}}{5} \right)$$

- Triglicéridos: A determinação dos triglicéridos é realizada através da reação enzimática com formação de um composto azul, quantificado por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). Os triglicéridos sofrem hidrólise por ação da enzima lipoproteína lípase formando glicerol e ácidos gordos (reação 1). O glicerol é fosforilado, na presença de adenosina trifosfato (ATP), por ação da glicerol cinase (GK, do inglês glycerol kinase) (reação 2), por sua vez o glicerol fosforilado é oxidado, reação catalisada pela glicerol fosfato oxidase (GPO), formando dihidroxiacetona e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reação 3). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado reage com a 4-aminoantipirina e N,N-bis-(4-sulfobutil)-3,5-dimetilanilina sal dissódico (MADB) que na presença de peroxidase produz um composto corado (reação 4). A intensidade da coloração do complexo azul é diretamente proporcional à concentração dos triglicéridos presentes na amostra.<sup>[42]</sup>

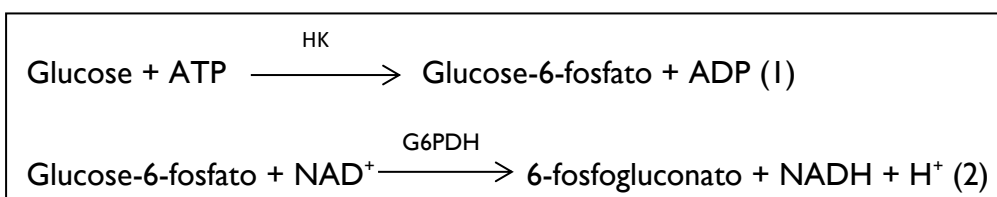


#### 6.1.6 Avaliação do metabolismo dos Hidratos de Carbono

- Glucose: A determinação da glucose no sangue é fundamental no rastreamento, diagnóstico<sup>3</sup> e monitorização da Diabetes *mellitus*, assim como na avaliação do metabolismo dos hidratos de carbono em patologias como diabetes gestacional, hepatite aguda, pancreatite aguda e doença de Addison.<sup>[44]</sup> A hiperglicémia tem como causa mais frequente a Diabetes *mellitus* devido a insuficiência ou ineficácia da insulina. A hipoglicémia pode surgir em pacientes com disfunção hepática, tumores pancreáticos produtores de insulina, devido a um jejum prolongado ou a deficiências enzimáticas e tem como principais sintomas a fraqueza muscular,

<sup>3</sup> Diagnóstico da Diabetes *Mellitus*: Glicémia plasmática em jejum  $\geq 126$  mg/dL; PTOG(2h)  $\geq 200$  mg/dL; Glicémia ao acaso  $\geq 200$  mg/dL se houver sintomas; Hemoglobina glicada (HbA1c)  $\geq 6.5\%$ .<sup>[69]</sup>

confusão mental ou, em casos mais graves, coma.<sup>[45]</sup> A determinação da glucose na urina é útil no diagnóstico e monitorização da diabetes *mellitus* assim como na avaliação de patologias renais nomeadamente a nível tubular. A determinação da glucose no LCR é importante no diagnóstico diferencial de meningites bacterianas, fúngicas e virais, e em caso de tumores.<sup>[44,45]</sup> A determinação da glucose é realizada através da reação enzimática com formação de NADH e quantificação por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). A glucose é fosforilada pela enzima hexocinase (HK) na presença de ATP formando glucose-6-fosfato e adenosina difosfato (ADP). A glucose-6-fosfato por sua vez é oxidada por ação da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) com redução de NAD<sup>+</sup> a NADH. A quantidade de NADH produzida é diretamente proporcional à quantidade de glucose na amostra e é medida a 340 nm.<sup>[46]</sup>



- Hemoglobina Glicada (descrito em 5.4)

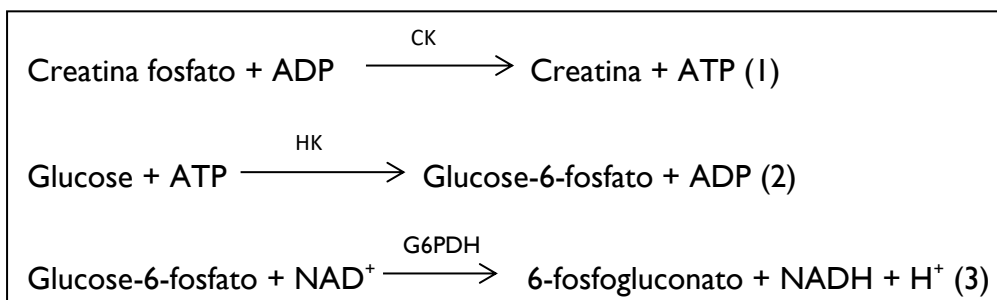
#### 6.1.7 Marcadores de inflamação

- Proteína C reativa: A proteína C reativa (PCR) é uma proteína plasmática de fase aguda muito sensível. A sua concentração plasmática está aumentada em situações de enfarte agudo do miocárdio, infeção, inflamação, após cirurgia ou proliferação neoplásica. No entanto, não é específica de nenhum órgão nem tecido, tendo que ser sempre interpretada em conjunto com outros marcadores de inflamação. O aumento da PCR, que é proporcional à extensão da lesão tecidual, ocorre 6 a 12 horas após a lesão, atingindo o pico às 48 horas.<sup>[37]</sup> Estudos epidemiológicos revelaram que concentrações ligeiramente aumentadas de PCR estão associadas a processos ateroscleróticos. Assim desenvolveram-se ensaios de alta sensibilidade (limite de deteção abaixo de 0.3 mg/L) para determinação da PCR sendo utilizada na avaliação do risco de doenças cardiovasculares.<sup>[37]</sup> A determinação da PCR é feita a partir de um imunoensaio com deteção por turbidimetria (descrito em 5.7.2.2). Neste ensaio são utilizadas partículas de latex revestidas com anticorpos anti-PCR. Ao adicionar a amostra a PCR presente no soro liga-se aos anticorpos formando aglutinados que são detetados por turbidimetria. A absorvância é diretamente proporcional à concentração de PCR na amostra.<sup>[37,47]</sup>

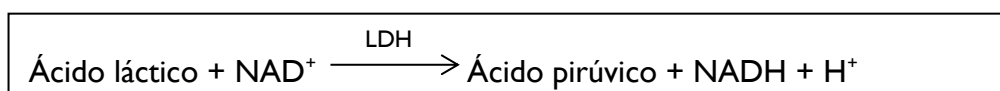
- Velocidade de Sedimentação (descrito no ponto 5.3)

### 6.1.8 Avaliação da lesão no músculo esquelético

- Creatina Cinase: A creatina cinase (CK, do inglês creatine kinase) possui duas isoenzimas principais, M e B, formando 3 tipos de dímeros: MM (presente principalmente no músculo esquelético), MB (predominante no músculo cardíaco) e BB (predominante no cérebro e no intestino). A CK é utilizada no diagnóstico de enfarte agudo do miocárdio, ainda que apresente baixa especificidade, e na lesão do músculo-esquelético. A lesão do músculo esquelético pode ocorrer devido a um trauma ou injeções intramusculares (aumentos de CK na ordem de 5 a 6 vezes dos limites de referência) e devido a necrose muscular, nomeadamente, rabdomiólise (aumento de CK 20 vezes o limite superior de referência).<sup>[48]</sup> A determinação da CK é realizada através da reação enzimática com formação de NADH e quantificação por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). A reação enzimática catalizada pela CK não possui nem um substrato nem um produto quantificável passível de quantificar esta enzima. Assim a reação 1 é acoplada à reação de determinação da glucose (descrito em 6.1.4.) para produzir NADH. O aumento da absorvância a 340 nm, devido à redução de NAD<sup>+</sup> a NADH, é proporcional à concentração de ATP formado como produto final da reação 1 e, conseqüentemente proporcional atividade enzimática da CK.<sup>[48]</sup>



- Lactato Desidrogenase: A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima que faz parte da via glicolítica e como tal é encontrada no citoplasma de todas as células e tecidos do corpo. Isto faz dela um marcador muito sensível à lesão de órgãos e tecidos, apesar da sua inespecificidade.<sup>[48]</sup> A determinação da LDH é realizada através da reação enzimática com formação e quantificação de NADH por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). A LDH catalisa reversivelmente a oxidação do lactato a ácido pirúvico, tendo como co-fator o NAD<sup>+</sup> que é reduzido a NADH. O último, absorve a 340 nm, sendo a atividade enzimática da LDH diretamente proporcional à absorvância lida a este comprimento de onda.<sup>[48]</sup>



### 6.1.9 Avaliação da Função Cardíaca

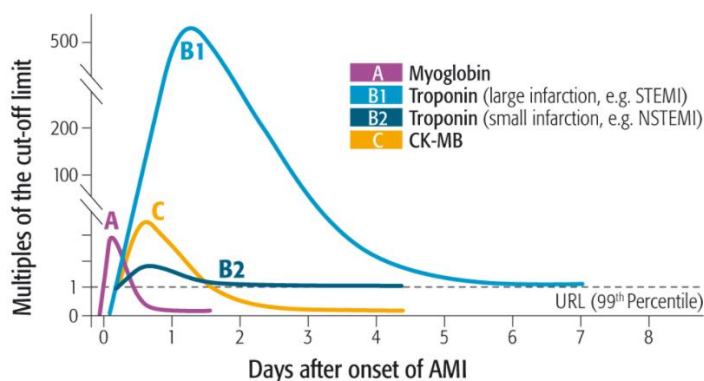
Os biomarcadores cardíacos desempenham um papel muito importante no auxílio do diagnóstico de doenças cardiovasculares.<sup>[49]</sup> No SPC os marcadores utilizados são marcadores de lesão (ex. CK-MB e hs cTnI) e marcadores de função (ex. NT- proBNP). A utilização destes marcadores juntamente com a avaliação de sintomas, o eletrocardiograma e técnicas de imagem do miocárdio permitem um diagnóstico precoce.<sup>[49]</sup>

- Isoenzima MB da Creatina Cinase (CK-MB): A quantificação da isoenzima CK-MB é utilizada com o objetivo de auxiliar o diagnóstico precoce de enfarte agudo do miocárdio, sendo o seu aumento proporcional à lesão do músculo cardíaco. No entanto, este biomarcador está a entrar em desuso uma vez que existem outros biomarcadores mais sensíveis e específicos (ex. hs cTnI).<sup>[49]</sup> A determinação da CK-MB é realizada através da reação enzimática com formação e quantificação de NADH por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). São utilizados anticorpos para inibir seletivamente as unidades CK-M presentes na amostra. Assim ficam inibidas metade das isoenzimas CK-MB e todas as isoenzimas CK-MM, permanecendo livres apenas as subunidades não M. De seguida, através da mesma reação química para a determinação da atividade da CK (descrita em 6.1.5) é determinada apenas a atividade enzimática da isoforma CK-MB que é proporcional à absorvância a 340 nm.<sup>[48]</sup>

- N- terminal pro-peptídeo natriurético cerebral (NT-proBNP): O peptídeo natriurético cerebral (BNP, do inglês *Brain Natriuretic Peptide*) é uma neuro-hormona libertada principalmente nos ventrículos. O BNP é formado nos cardiomiócitos em resposta à hipervolemia, promovendo a vasodilatação, natriurese e diurese.<sup>[50]</sup> A ativação do BNP resulta da produção de uma molécula precursora proBNP, a qual é clivado por endoproteases dando origem ao fragmento C terminal, ao BNP ativo e ao fragmento N terminal (NT-proBNP) inativo. As concentrações de BNP e NT-proBNP no plasma estão correlacionadas mas os níveis de NT-proBNP (semi-vida 120 minutos) são superiores aos níveis de BNP (semi-vida 60 minutos).<sup>[51]</sup> Os níveis elevados de NT-proBNP são muito importantes no diagnóstico de insuficiência cardíaca aguda e prognóstico de dispneia aguda, insuficiência crónica e angina instável. No entanto, também se encontram elevados em situações que afetam a função ventricular, como hipertensão arterial, embolia pulmonar e arritmias.<sup>[52]</sup> A determinação do NT-proBNP é realizado através do ensaio imunoenzimático não competitivo (descrito em 6.2.6), com deteção por fluorescência (descrito em 6.2.5) (ELFA, do inglês, *Enzyme-Linked Fluorescent Assay*). Neste ensaio são utilizados anticorpos monoclonais anti-NT-proBNP, anticorpos monoclonais anti-NT-proBNP marcados com fosfatase alcalina e o substrato

enzimático 4-metilumbeliferil fosfato. O valor do sinal de fluorescência detectado a 450 nm é proporcional à concentração de NT-proBNP presente na amostra.<sup>[51]</sup>

- Troponina I de alta sensibilidade (hs TnI): As troponinas (I, T e C) fazem parte de um complexo de proteínas que modulam a interação do cálcio com a actina e a miosina nos miócitos, promovendo a contração muscular. A troponina I é altamente específica do músculo cardíaco, já a troponina T e C podem aparecer quer no músculo cardíaco, quer no músculo esquelético.<sup>[51]</sup> No enfarte do miocárdio os níveis de TnI aumentam atingindo um pico às 24 horas e descem para níveis basais 5 a 10 dias depois. No entanto, o seu aumento pode ocorrer também em situações de miocardite, insuficiência cardíaca congestiva, toma de fármacos cardiotóxicos, entre outros.<sup>[51]</sup> A utilização de ensaios de alta sensibilidade permite a detecção da liberação de TnI em baixas concentrações, aumentando assim a sensibilidade da técnica de diagnóstico do enfarte agudo do miocárdio.<sup>[53]</sup> A determinação da hs TnI é realizada através de um ensaio imunoenzimático não competitivo, com detecção por quimioluminescência (descrito em 6.2.6 e 6.2.4, respetivamente). Este ensaio utiliza um anticorpo monoclonal anti-cTnI fixo na fase sólida, um anticorpo monoclonal anti-cTnI marcado com a enzima fosfatase alcalina e um substrato que, ao ser hidrolisado pela fosfatase alcalina, forma um composto quimiluminescente. A detecção de luz é diretamente proporcional à quantidade de cTnI presente na amostra.<sup>[49]</sup>



**Figura 16.** Gráfico representativo da cinética dos vários biomarcadores cardíacos após enfarte agudo do miocárdio.<sup>[54]</sup>

#### 6.1.10 Avaliação da Função Hepática

O fígado é composto por três componentes: o hepatócito que tem função de síntese, metabolismo de xenobióticos e metabólica; o sistema hepatobiliar responsável pela excreção da biliar; e o sistema reticuloendotelial (células de Kupffer) responsável pela resposta imunológica a bactérias e toxinas bacteriana derivadas do trato gastrointestinal. As funções do fígado podem ser avaliadas de forma não invasiva, determinando os níveis séricos dos analitos que a seguir se descrevem.<sup>[55]</sup>



As enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamil transferase ( $\gamma$ -GT) e a fosfatase alcalina (ALP, do inglês, *alkaline phosphatase*) são frequentemente utilizadas como marcadores de lesão hepática.<sup>[56]</sup>

A AST e a ALT são duas enzimas intracelulares presentes nos hepatócitos, sendo que a ALT se situa exclusivamente no citoplasma enquanto que a AST possui uma isoforma citoplasmática e uma isoforma mitocondrial. A AST pode ser encontrada no fígado, no músculo cardíaco e esquelético, enquanto que a ALT existe principalmente no fígado e no rim, sendo mais específica do fígado do que a AST.<sup>[57]</sup>

As transaminases encontram-se elevadas no plasma em situações de doença hepática, mesmo antes do paciente desenvolver icterícia. Habitualmente a ALT encontra-se mais elevada que a AST, no entanto, o contrário ocorre em situações de hepatite alcoólica ou devido a drogas ou fármacos, cirrose hepática e neoplasia hepática.<sup>[57]</sup>

A ALP está presente em vários tecidos como o fígado, o osso, o rim, o intestino e a placenta, no entanto as suas concentrações plasmáticas advêm essencialmente do fígado e do osso. No fígado está situada na superfície dos canalículos biliares sendo um marcador da lesão das vias biliares.<sup>[55]</sup> O aumento da concentração da ALP no plasma, está relacionado maioritariamente com situações de obstrução extra e intra-hepática e doença óssea com aumento da atividade dos osteoblastos.<sup>[57]</sup>

A  $\gamma$ -GT está presente nos canalículos biliares sendo utilizada em associação com a ALP para detetar lesões nas vias biliares, pois é sensível mas não específica da doença hepática. O aumento da sua concentração no plasma também está associado ao consumo crónico de álcool e terapêutica com alguns fármacos (ex. paracetamol, fenitoína e carbamazepina).<sup>[55]</sup>

A determinação da bilirrubina total, direta e indireta é essencial na avaliação da função excretora do fígado. A bilirrubina é um pigmento amarelo alaranjado insolúvel, derivado do grupo heme, que é biotransformado no fígado e excretado na bília.<sup>[35]</sup>

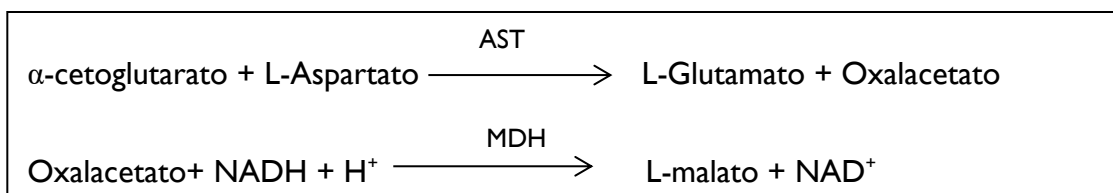
A hiperbilirrubinémia está associada ao aparecimento de icterícia que consiste na deposição do pigmento amarelo da bilirrubina na pele, mucosas e esclera. Este aumento pode dever-se tanto ao aumento da bilirrubina indireta como direta.<sup>[35]</sup>

O aumento da bilirrubina indireta (forma insolúvel, não conjugada) no plasma está associado principalmente a situações de hemólise, enquanto que o aumento de bilirrubina direta (forma solúvel, conjugada) ocorre essencialmente por obstruções extra e intra-hepática.<sup>[35]</sup>

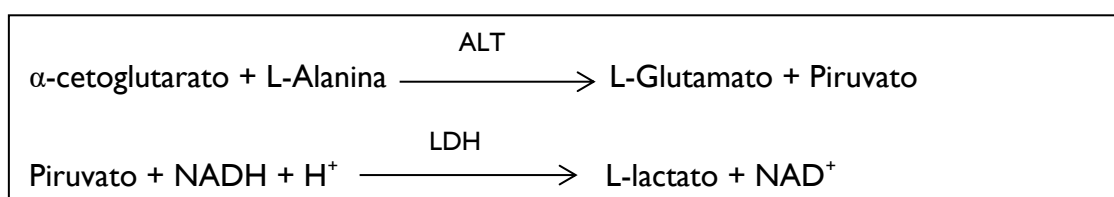
Para a avaliação da função de eliminação de compostos tóxicos a determinação da concentração de amónia é muito importante. A amónia é uma substância tóxica, derivada principalmente do metabolismo dos aminoácidos, sendo metabolizada exclusivamente no fígado pois é o único que processa o ciclo da ureia, convertendo a amónia em ureia para que

possa ser eliminada.<sup>[55]</sup> Situações de hiperamonémia podem surgir em situações de cirrose, insuficiência hepática fulminante, entre outras, em que as enzimas responsáveis pelo ciclo da ureia são destruídas provocando aumentos séricos de amônia que têm efeitos tóxicos no sistema nervoso central.<sup>[55]</sup>

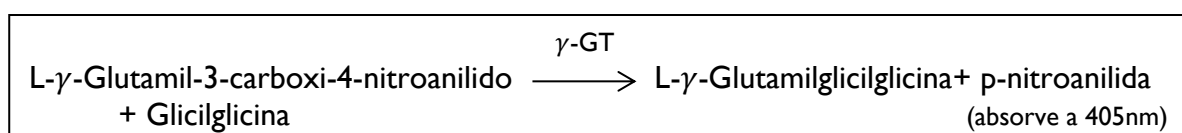
- Aspartato Aminotransferase: A determinação da AST é realizada através de uma reação enzimática com formação de  $\text{NAD}^+$  que é quantificado por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). A AST é uma enzima que catalisa reversivelmente a reação de transaminação entre o aspartato e o  $\alpha$ -cetogluturato originando oxalacetato. Este é reduzido a malato pela malato desidrogenase (MDH, do inglês malate dehydrogenase) e o NADH é oxidado a  $\text{NAD}^+$  provocando uma diminuição da absorvância a 340 nm. A absorvância é diretamente proporcional à concentração da AST na amostra.<sup>[57]</sup>



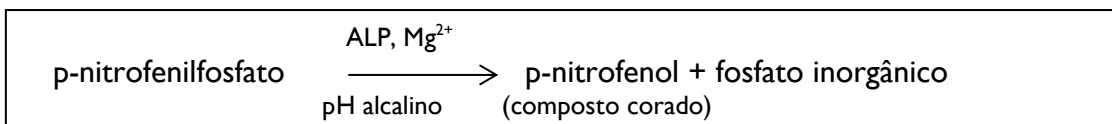
- Alanina Aminotransferase: A determinação da ALT é realizada a partir da reação enzimática com formação de  $\text{NAD}^+$  que é quantificado por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). A ALT é uma enzima que catalisa reversivelmente a reação de transaminação entre a alanina e o  $\alpha$ -cetogluturato originando piruvato. Este é reduzido a lactato pela LDH e o NADH é oxidado a  $\text{NAD}^+$  provocando uma diminuição na absorvância que é diretamente proporcional à concentração da ALT na amostra.<sup>[57]</sup>



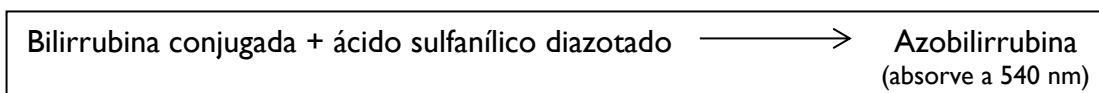
- Gama-Glutamil Transferase: A quantificação da  $\gamma$ -GT é feita a partir da reação enzimática com formação de um composto corado que é quantificado por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). A  $\gamma$ -GT catalisa a transferência do grupo glutamil da L- $\gamma$ -Glutamil-3-carboxi-4-nitroanilido para a glicilglicina formando a p-nitroanilida (composto corado). A absorvância do composto corado é diretamente proporcional à concentração da  $\gamma$ -GT na amostra.<sup>[57]</sup>



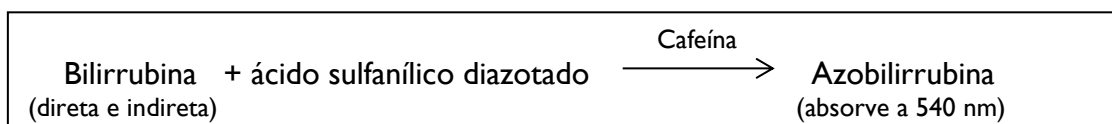
- **Fosfatase Alcalina:** A quantificação da ALP é realizada a partir da reação enzimática com formação de um composto corado que é quantificado por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). A ALP cataliza a transferência do grupo fosfato do substrato p-nitrofenilfosfato para o aceitador de fosfato, formando p-nitrofenol (composto corado). A absorvância do composto corado é diretamente proporcional à concentração da ALP na amostra.<sup>[57]</sup>



- **Bilirrubina direta:** A quantificação da bilirrubina direta é feita a partir da reação química com diazo, com detecção por espectrofotometria (descrito em 6.2.1).<sup>[35]</sup> A bilirrubina direta reage diretamente com sais diazotados (ex. ácido sulfanílico diazotado), formando azobilirrubina (composto vermelho) que absorve fortemente a 540 nm. A absorvância é proporcional à concentração de bilirrubina conjugada na amostra.<sup>[55,35]</sup>



- **Bilirrubina Total:** A quantificação da bilirrubina total é feita a partir da reação química com diazo, com detecção por espectrofotometria (descrito em 6.2.1).<sup>[35]</sup> A determinação da bilirrubina total utiliza o mesmo método que a determinação da bilirrubina direta (descrito em anteriormente) diferindo apenas a utilização de catalisadores como álcool ou cafeína que facilitam a reação da bilirrubina não conjugada com o ácido sulfanílico diazotado.<sup>[35,55]</sup>



- **Bilirrubina indireta:** A bilirrubina indireta é obtida por cálculo através da diferença entre a bilirrubina total e a bilirrubina direta.

- **Amónia:** A quantificação da amónia é feita através da reação enzimática com formação de NADP que é quantificado por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). A amónia é normalmente medida por uma reação enzimática usando a glutamato desidrogenase (GLDH), que catalisa a reação de  $\alpha$ -cetoglutarato e amónia para formar glutamato, com oxidação de NADPH a NADP ocorrendo uma diminuição na absorvância a 340 nm.<sup>[55]</sup>



### 6.1.1.1 Avaliação da Função Renal

O rim possui várias funções, sendo elas a manutenção do volume e da composição do fluido extracelular, a regulação hídrica e eletrolítica e funções endócrinas.<sup>[58]</sup> Para avaliar todas estas funções existem diversos testes laboratoriais a fim de diagnosticar e monitorizar patologias renais.<sup>[59]</sup>

Para avaliar a função glomerular são necessários testes que avaliem a capacidade de filtração e permeabilidade do glomérulo. Para tal a determinação da taxa de filtração glomerular (TFG), a concentração plasmática de compostos azotados não proteicos eliminados por filtração glomerular (creatinina, ureia e ácido úrico) e a determinação das proteínas na urina e GV indicativo de uma diminuída integridade da membrana glomerular, são utilizados no SPC de Tomar.<sup>[59]</sup>

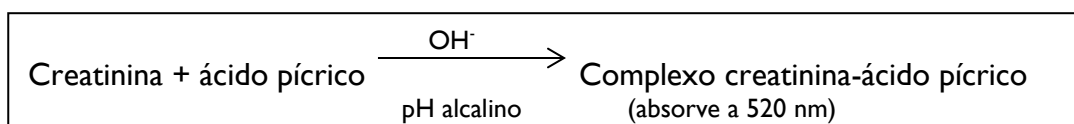
A determinação da densidade da urina, do pH, da glicosúria e de proteínas de baixo peso molecular são muito úteis na avaliação da função tubular.<sup>[59]</sup>

- Taxa de Filtração Glomerular: A TFG é um teste muito útil e sensível na avaliação da integridade do glomérulo assim como na monitorização de doenças renais como a insuficiência renal crónica.<sup>[58]</sup> Esta determinação é feita pelo *clearance* de creatinina, no entanto dado as variáveis não controladas relativas à colheita da amostra, a determinação da TFG é feita recorrendo a fórmulas matemáticas que estimam a TFG usando a creatinina sérica corrigida tendo em conta o sexo, a área corporal, a raça e a idade.<sup>[59]</sup>

#### **Equação I.** Fórmula de Cockcroft-Gault

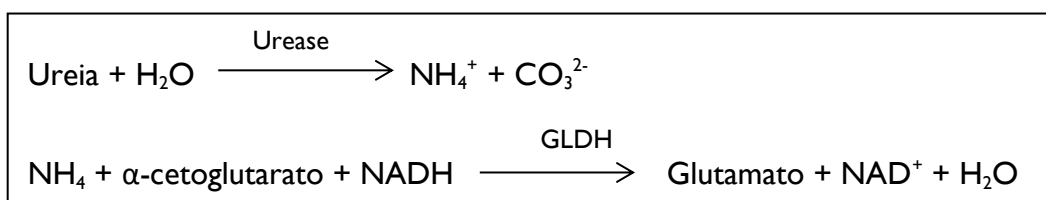
$$\begin{aligned} & \text{Clearance de creatinina calculada (mL/mn)} \\ & = \frac{[(140 - \text{idade(anos)}) \times \text{Peso(Kg)}]}{72 \times \text{Concentração sérica de creatinina(mg/dL)}} \times 0.85 \text{ (se mulher)} \end{aligned}$$

- Creatinina: A determinação da creatinina é feita através da reação de JAFFÉ com deteção do complexo creatinina-ácido pícrico por espectrofotometria (descrito em 6.2.1) a 520 nm. A absorvância é diretamente proporcional a concentração de creatinina a amostra.<sup>[59]</sup>

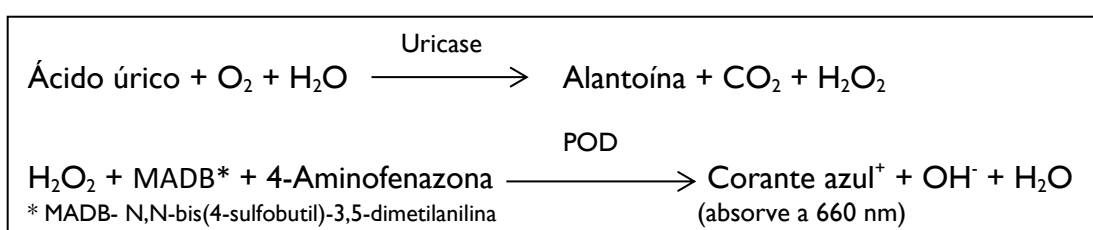


- Ureia: A determinação da ureia é feita através do acoplamento de duas reações químicas. A ureia na presença da enzima urease forma amónio, este por sua vez reage com o  $\alpha$ -cetogluturato e o NADH. Na presença da enzima GLDH o NADH é oxidado originando

NAD<sup>+</sup>. A diminuição da absorvância é lida por espectrofotometria (descrito em 6.2.1) e é diretamente proporcional à concentração de ureia presente na amostra.<sup>[59]</sup>



- Ácido úrico: O ácido úrico é determinado através do acoplamento de duas reações enzimáticas. O ácido úrico na presença de O<sub>2</sub>, água e a enzima uricase forma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, este por ação da peroxidase e na presença de MADB e 4-Aminofenazona forma um composto azul que absorve a 660 nm. A absorvância é lida por espectrofotometria (descrito em 6.2.1) e é diretamente proporcional á concentração de ácido úrico presente na amostra.<sup>[59]</sup>



- Albuminúria (Microalbuminúria): A Microalbuminúria é determinada através de um imunoensaio com detecção por turbidimetria (descrito em 5.7.2.2). Este ensaio utiliza anticorpos policlonais anti-albumina humana tendo maior sensibilidade (limite de detecção 1 mg/L) que o ensaio descrito em 6.1.2 permitindo a detecção de albumina de baixa concentração (30-300 mg/L).

- Proteínas totais na urina: A determinação das proteínas totais na urina descrito no ponto 6.1.2 também é muito importante na avaliação renal.

#### 6.1.12 Análise sumária de urina tipo II

A análise da urina tipo II, é um teste muito importante no *sreening* e na monitorização de um paciente com doenças renais, do trato urinário, assim como doenças hepáticas. Este exame compreende o exame físico e químico da urina e a análise microscópica do sedimento urinário. Para a realização desta análise o SPC de Tomar possui os equipamentos Aution Max e SediMax que utiliza como amostra a primeira urina da manhã.

- Exame físico e químico (Tira reagente): Esta análise é realizada através de tiras reagentes impregnadas com reagentes para o analito em questão (URIFLET S I0UB), detetado por refletometria (descrito em 6.2.2).

Densidade: Uma das principais funções do rim é a regulação da homeostase dos fluidos corporais e do equilíbrio ácido-base, assim o volume de urina e a concentração de solutos excretados pelo rim são variáveis resultando em valores de densidade diferentes. A densidade pode estar diminuída em situações de diabetes insípida e perda da capacidade de concentração da urina pelo rim, pelo contrário pode estar aumentada em situações de proteinúria, glicosúria, desidratação, insuficiência cardíaca congestiva, entre outras.<sup>[60]</sup> A determinação é feita pela tira reagente que possui um tampão, polímeros e um indicador de pH. A mudança do pKa dos polímeros consoante a concentração iónica da urina, diminui/aumenta o pH mudando a cor do indicador de pH para azul escuro (densidade de 1.000) ou para amarelo esverdeado (densidade 1.030).<sup>[60,59]</sup>

pH: A determinação do pH na urina é útil na avaliação de desequilíbrios hidro-eletrolíticos. A tira reagente é impregnada com dois indicadores de pH que mudam de cor consoante a quantidade de iões de H<sup>+</sup> na amostra.<sup>[60]</sup>

Leucócitos<sup>1</sup>: A presença de esterase leucocitária é indicativo de piúria. A reação é baseada na presença de esterase leucocitária que ao reagir com os reagentes impregnados na tira teste forma um composto corado (roxo).<sup>[59]</sup>

Nitritos<sup>1</sup>: A deteção de nitritos na urina é indicativa da presença de bactérias que reduzem os nitratos excretados na urina. A reação é baseada na presença de nitritos que ao reagir com os reagentes impregnados na tira teste forma um composto cor de rosa.<sup>[59]</sup>

<sup>1</sup> A deteção de leucócitos e de nitritos na urina é muito importante no diagnóstico de infeção do trato urinário.<sup>[59]</sup>

Proteínas: A presença de proteinúria é indicativa de lesão renal, no entanto pode aparecer após exercício exaustivo. O teste de tira reagente para a deteção de proteína total possui impregnada um indicador de pH e um tampão de citrato (pH 3). A reação é baseada no “erro de proteína” em que certos indicadores de pH alteraram a cor na presença de proteínas. Assim este indicador possui cor verde na presença de proteínas a pH 3 e amarelo na ausência de proteínas. Este método tem uma limite de deteção entre 150 a 300 mg de proteína/L.<sup>[59]</sup>

Glicose: A glicosúria acontece sempre que o limiar renal é ultrapassado (ex. Diabetes *mellitus*) ou quando a capacidade de reabsorção no túbulo proximal esta afetada. O método da tira teste é baseado na reação com glucose oxidase que forma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de glucose e na mudança de cor do composto cromogénio na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pela ação da peroxidase. Este método é específico para a glucose não havendo interferências na presença de lactose, galactose ou frutose.<sup>[60]</sup>

Corpos cetónicos: A presença de cetonúria está relacionada com o aumento de corpos cetónicos no plasma que acontece em situações de jejum prolongado, cetoacidose diabética, hipertiroidismo, entre outras. A tira possui impregnada nitroprússiato de sódio que reage com os corpos cetónicos, em meio alcalino, formando um composto de cor violeta.<sup>[60]</sup>

Urobilinogénio: O urobilinogénio é formado no cólon pelas bactérias a partir da bilirrubina conjugada excretada na bÍlis. Parte do urobilinogénio é reabsorvido na circulação porta e re-excretado maioritariamente no intestino e apenas uma minoria na urina. Em situações em que o fígado não consegue reabsorver o urobilinogénio do sistema porta este é excretado maioritariamente pela urina (ex. lesão hepatocelular). Em casos de hemólise o urobilinogénio pode estar aumentado na urina. A ausência de urobilinogénio na urina pode resultar de processos de colestase que impedem a sua formação.<sup>[60]</sup> Para a sua deteção a tira reagente possui uma solução tampão ácida e um sal diazónio que na presença de urobolinogénio forma um composto de coloração vermelho-acastanhado.<sup>[60]</sup>

Bilirrubina: A bilirrubina aparece na urina em concentrações vestigiais, o aumento da bilirrubina na urina ocorre em situações de aumento da bilirrubina conjugada no plasma (ex. colestase). A tira possui um sal diazotado que na presença de bilirrubina e em meio ácido muda de cor.<sup>[60]</sup>

Hemoglobina: A presença de hemoglobinúria/hematúria pode advir de doenças glomerulares, túbulo-intersticiais, pós-renal ou hemólise. A tira teste está impregnada com peróxido orgânico e tetrametilbenzidina (cromogénio). Este método é baseado na libertação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela ação da peroxidase do grupo heme presente na amostra. A mudança de cor varia de laranja claro a verde escuro podendo detetar hemoglobina livre, eritrócitos intactos ou mioglobina. Este método tem uma limite de deteção entre 150 a 600 µg de hemoglobina livre/L ou 2 a 20 eritrócitos intactos/ µL.<sup>[59,60]</sup>

- Análise microscópica do sedimento urinário: No SPC de Tomar esta análise é executada no equipamento SediMax que processa automaticamente as amostras e capta imagens da análise microscópica. Estas imagens são validadas e sempre que necessário confirmar algum resultado o processo é feito manualmente. O processo manual consiste na centrifugação da amostra a 1500 rpm durante 10 minutos, seguida da decantação do sobrenadante. O sedimento é então ressuspenso e usado para a observação a fresco ao microscópico. Esta análise permite a visualização de células (eritrócitos, leucócitos e células derivadas do trato urinário), cilindros, cristais e microrganismos (bactérias, leveduras e parasitas).<sup>[60]</sup> (Ver Anexo VII).

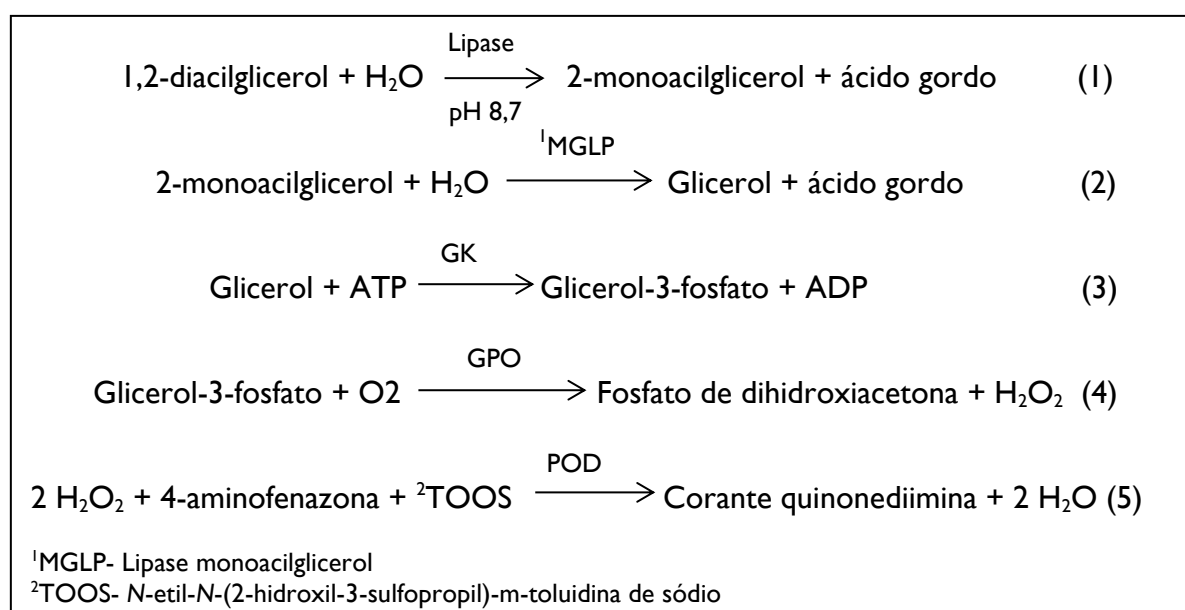
### 6.1.13 Avaliação da Função Pancreática

No SPC os biomarcadores mais utilizados na investigação de doenças pancreáticas, mais especificamente, na pancreatite aguda, são a lipase e a amilase.<sup>[57]</sup>

A lipase é produzida nas células acinares do pâncreas e tem como função a hidrólise da ligação éster de ácidos gordos de cadeia longa. Esta enzima é muito útil no diagnóstico de pancreatite aguda uma vez que, é mais específica e permanece mais tempo na corrente sanguínea após o episódio do que a amilase. No entanto, obstruções no ducto pancreático por cálculos ou carcinoma e insuficiência renal levam também a aumentos da lipase.<sup>[57]</sup>

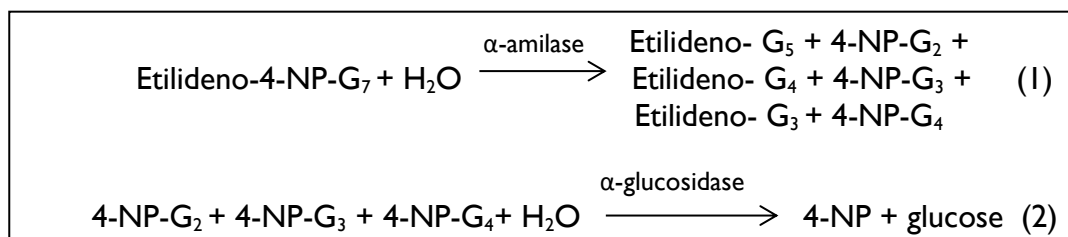
A amilase é uma enzima que catalisa a hidrólise da ligação 1,4- $\alpha$ -glucosídicas de polissacarídeos e encontra-se em maior concentração nas glândulas salivares (isoforma S) e no pâncreas (isoforma P). A atividade da amilase no sangue sofre grandes aumentos em situações de pancreatite aguda e inflamação das glândulas salivares, no entanto, a sua especificidade para o diagnóstico de pancreatite é baixa uma vez que esta também se encontra aumentada em diversos distúrbios agudos intra-abdominais (ex. obstrução intestinal) e extra-pancreáticos (ex. insuficiência renal). A determinação na urina desta enzima torna-se mais vantajoso uma vez que esta atinge concentrações mais elevadas e persiste durante mais tempo.<sup>[57]</sup>

- **Lipase:** A determinação da lipase é realizada através da reação enzimática com deteção de um composto corado por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). O substrato 1,2-diacilglicerol, específico do pâncreas, é hidrolisado pela lipase originando 2-monoacilglicerol (reação 1). Este através de várias reações enzimáticas acopladas forma numa reação final (reação 5) um composto corado (corante quinonediimina) que absorve a 550 nm. A absorvância deste composto é diretamente proporcional à atividade da lipase na amostra.<sup>[57]</sup>





- **Alfa-Amilase:** A determinação da  $\alpha$ -amilase é realizada através da reação enzimática com detecção de um composto corado por espectrofotometria (descrito em 6.2.1). Esta reação utiliza como substrato o 4,6-etilideno-4-nitrofenil-maltoheptaose que ao ser hidrolisado pela  $\alpha$ -amilase forma oligossacarídeos livres ( $G_5, G_4, G_3$ ) e 4-NP- $G_2$ , 4-NP- $G_3$  e 4-NP- $G_4$  (reação 1). De seguida, a  $\alpha$ -glucosidase hidrolisa os 4-NP-glicosídeos libertando o 4-nitrofenil (4-NP) (reação 2). O aumento da absorvância a 405 nm é diretamente proporcional à atividade da  $\alpha$ -amilase na amostra.<sup>[57]</sup>



## 6.2 Metodologias

### 6.2.1 Espectrofotometria

A espectrofotometria é uma metodologia essencial na determinação quantitativa de analitos em fluidos corporais, estando associadas a reações enzimáticas, colorimétricas e turbidimétricas.<sup>[15]</sup>

Este método tem por base a medição da radiação absorvida ou transmitida por uma solução contendo o analito, num determinado comprimento de onda. O espectrofotómetro é constituído por uma fonte de radiação, um seletor de comprimento de onda, um suporte para a cuvete, um fotodetector, um processador de sinal e um sistema de leitura.<sup>[61]</sup>

A intensidade de luz absorvida pela amostra é medida e a concentração do analito de interesse é calculada utilizando a lei de *Beer-Lambert* que relaciona a luz detetada com a concentração do analito em questão, sendo que esta relação é diretamente proporcional.<sup>[61]</sup>

Na quantificação do analito de interesse é essencial a utilização de uma solução de referência (solução padrão) com concentração conhecida, usando várias diluições da mesma a fim de obter uma curva de calibração, permitindo assim obter o valor da absorvidade molar utilizada na lei de *Beer*.

### 6.2.2 Refletometria

A refletometria consiste na detecção da luz refletida. O instrumento usado é um espectrofotómetro que mede a quantidade de luz refletida, após incidência de um feixe de luz num suporte sólido (tira reagente) onde foi dispensada a amostra. A quantidade de luz que é refletida é inversamente proporcional à concentração do analito de interesse porque ao incidir

o feixe de luz na tira reagente, os cromóforos aí absorvidos absorvem no comprimento de onda da sua cor e refletem a luz de todos os outros comprimentos de onda em vários ângulos diferentes.<sup>[15]</sup> No SPC esta técnica é utilizada na análise de tira reagente de urina no âmbito da determinação da sumária de urina tipo II.

### 6.2.3 Potenciometria

A potenciometria consiste na medição da diferença do potencial entre dois elétrodos numa célula eletroquímica em condições de corrente nula (célula galvânica). Esta célula é constituída por um voltímetro para medição do potencial e dois elétrodos, um eléctrodo de referência e um eléctrodo de medição<sup>4</sup>, que são conectados por uma solução eletrolítica. Esta solução é a amostra que, não obstante, pode ser substituída por uma solução de referência a fim de efetuar calibrações.<sup>[62]</sup>

O eléctrodo de medição é aquele que em que o seu potencial não é constante e é sensível a alterações na concentração de iões na solução. O potencial gerado pela sua semicélula é proporcional ao logaritmo da atividade iónica ou concentração do analito de interesse na amostra.<sup>[62]</sup> O eléctrodo de referência, por sua vez, é aquele em que o potencial da semicélula é conhecido, constante e insensível à composição da amostra, sendo utilizado para comparar o seu potencial com o potencial produzido pelo eléctrodo de medição.<sup>[15]</sup>

Assim através da diferença de potencial entre os elétrodos e da Equação de *Nernst* é determinado a concentração do ião de interesse na solução amostra.<sup>[15]</sup>

Na química clínica os elétrodos de membrana seletiva a iões são os mais utilizados. Os elétrodos de membrana seletiva a iões possuem uma permeabilidade seletiva para o ião em estudo, sendo o potencial produzido através da interação específica do analito na solução amostra com a membrana.<sup>[62]</sup>

### 6.2.4 Quimioluminescência

A quimioluminescência é a emissão de luz quando um eletrão regressa de um nível de energia excitado para um nível inferior de energia. O evento de excitação é causado por uma reação química que envolve a oxidação de um composto orgânico (tais como luminol, isoluminol, esteris de acridina), por um oxidante (por exemplo,  $H_2O_2$ ,  $ClO^-$ ,  $O_2$ ), sendo a luz emitida derivada do produto formado na reação de oxidação. Estas reações ocorrem na presença de catalisadores, como enzimas (fosfatase alcalina ou peroxidase de rábano), iões de metal ou complexos metálicos (por exemplo, hemina).<sup>[61]</sup>

---

<sup>4</sup>O eléctrodo de medição é também denominado de eléctrodo indicador.

### 6.2.5 Fluorescência

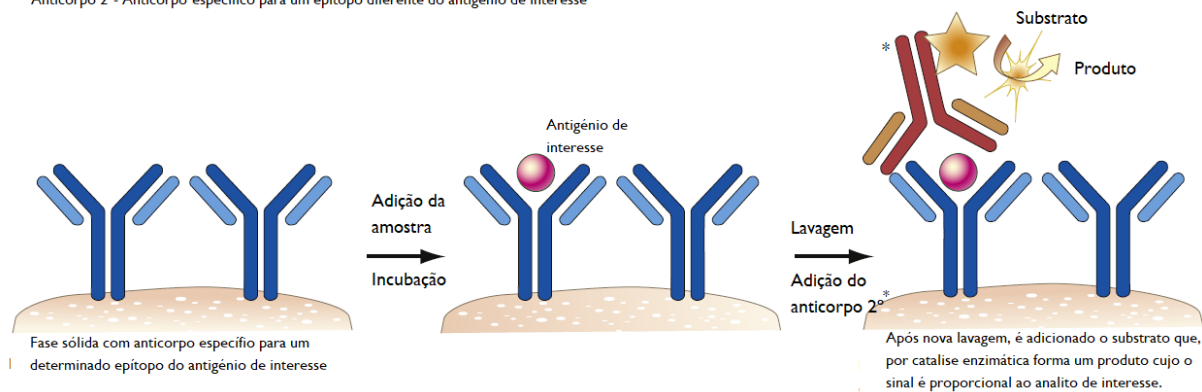
A fluorescência é a emissão de radiação eletromagnética, no ultravioleta ou visível, por uma molécula ou átomo, após ter sido excitada por uma fonte de luz. O átomo ou molécula que produz fluorescência é denominado de fluoróforo. A intensidade da luz emitida é diretamente proporcional à concentração das moléculas excitadas.<sup>[61,63]</sup> A fluorimetria é amplamente utilizada na automatização dos imunoenaios uma vez que é aproximadamente 1000 vezes mais sensível quando comparada a técnicas espectrofotométricas.<sup>[63]</sup>

### 6.2.6 Imunoensaio Enzimático não competitivo

O imunoenensaio é uma técnica extremamente específica e sensível que permite a detecção de analitos presentes nos fluidos biológicos em concentrações muito baixas. Nesta técnica são utilizados anticorpos específicos para detetar o antigénio de interesse, permitindo a identificação e a quantificação de substâncias por vários métodos de detecção.<sup>[64]</sup>

No ensaio imunoenzimático não competitivo são imobilizados anticorpos na fase sólida através da região Fab. Ao adicionar a amostra com o antigénio de interesse estes vão se ligar aos anticorpos presentes na fase sólida. Após lavagem é adicionado um segundo anticorpo marcado com uma enzima, que reage com o antigénio de interesse num epítopo diferente, é novamente efetuada uma lavagem e por fim adiciona-se o substrato enzimático (Figura 17). A quantidade de produto formado é proporcional à quantidade de antigénio na amostra.<sup>[64]</sup>

\* Anticorpo 2° - Anticorpo específico para um epítopo diferente do antigénio de interesse



**Figura 17.** Esquema representativo do ensaio imunoenzimático não competitivo. Adaptado de <sup>[47]</sup>.

**Tabela 8.** Analitos analisados em Bioquímica e respetivas amostra, metodologias e equipamentos.

Analito	Amostra						A fctXc	Equipamento	
	Soro	Plasma Heparina	Plasma EDTA	Plasma Heparina-lítio	Urina	LCR			
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup>	X	X			X	X	Potenciometria	DxC 700 AU	
Proteínas totais sérica, Albumina, Colesterol total, Triglicéridos, ALT, γ-GT, Bilirrubina Total	X	X	X				Espectrofotometria		
HDL, LDL, CK, CK-MB, AST, Bilirrubina direta, Lipase, Ferro	X	X							
Glucose	X	X	X		X	X			
Creatinina, ureia, ácido úrico	X	X	X		X				
Amónia	X		X	X					
PCR	X		X	X			Turbidimetria		
Transferrina	X	X	X						
Microalbuminúria	Urina de 24 horas								
Análise sumária de urina tipo II	1ª urina da manhã						Refletometria		Aution Max
NT-proBNP	X	X	X				Imunoensaio fluoroenzimático	VIDAS	
Ferritina	X	X					Imunoensaio quimioluminescente	Unicel Dxl 800	
hs Tnl	X			X			Imunoensaio quimioluminescente	Access 2	

### 6.3 Caso Clínico 5

História Clínica - Doente de 75 anos do sexo masculino com antecedentes de pneumonia por SARS-CoV-2, miocardiopatia hipertrófica e hiperuricémia. Foi encaminhado pelo médico assistente para o internamento de Nefrologia por edema dos membros inferiores associado ao agravamento da função renal nos últimos 6 meses, hematuria e proteinúria. As análises à entrada foram as seguintes.

**Tabela - .** Valores bioquímicos do caso clínico 5.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
Creatinina	8.4 mg/dL	0.8 - 1.4
Ureia	156 mg/dL	17 - 43
Ácido úrico	9.8 mg/dL	3.5 - 7.2
Sódio	127 mmol/L	136 - 146
Potássio	5.7 mmol/L	3.5 - 5.1
Cloro	87 mmol/L	101 - 109
Albumina	3.2 g/dL	3.5 - 5.2
Proteínas Totais	5.5 g/dL	6.6 - 8.3
Cálcio	2.18 mmol/L	2.20 - 2.65
Fósforo	2.88 mmol/L	0.81 - 1.45
Magnésio	2.2 mg/dL	1.8 - 2.6
Hemoglobina	7.7 g/dL	11.5 - 15.5
VCM	85.3 fL	80.0 - 100.0
MCH	29.8 pg	27.0 - 32.0
MCHC	35.0 g/dL	32.0 - 35.0

**Tabela %.** Valores da análise sumária de urina Tipo II e Sedimento urinário do caso clínico 5.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
Densidade	1.013	1.010 - 1.025
Leucócitos	500.0/ $\mu$ L	0.0 - 25.0
Proteínas	200.0 mg/dL	0.0 - 10.0
Hemoglobina	1.00 mg/dL	<0.03
Sedimento		
Leucócitos	>500/Campo	<4
Eritrócitos	>300/Campo	<4
Pesquisa de Cilindros: Presença de 26 cilindros granulosos e 4 cilindros eritrocitários		

### Interpretação

O paciente apresenta edema, este pode ser explicado pela diminuição da albumina no plasma, uma vez que esta é a principal responsável pela pressão oncótica existindo um desequilíbrio na distribuição da água entre os compartimentos. A causa mais provável para a diminuição do valor de albumina e conseqüentemente diminuição do valor de proteínas totais é a sua perda através do glomérulo que é fundamentada pela análise da urina tipo II que indica proteinúria.

O desequilíbrio entre a pressão oncótica e a pressão hidrostática leva a uma diminuição da depuração urinária e conseqüentemente à diminuição da taxa de filtração glomerular, evidenciada pelo aumento de creatinina, ureia e ácido úrico no plasma.

Os valores de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  séricos estão diminuídos, a hiponatrémia neste caso deve-se principalmente a duas causas: a diluição sérica provocada pela retenção de água devido à diminuição da taxa de filtração glomerular e devido à perda de  $\text{Na}^+$  a nível renal pois os mecanismos de reabsorção estão comprometidos (incapacidade do rim em manter a osmolaridade da medula). Os valores também indicam uma hipercalemiemia que pode ser explicada pela destruição dos túbulos renais não havendo excreção dos iões de  $\text{K}^+$ .

Na insuficiência renal crônica o rim perde a capacidade de sintetizar hormonas como a eritropoietina e o calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ). A eritropoietina é responsável pela estimulação das células progenitoras dos eritrócitos na medula óssea, sendo que sem esta hormona a

produção de GV fica comprometida. Isto explica a anemia normocítica normocrômica (Hb 7.7 g/dL, VCM 85.3 fl, MCH 29.8 pg e MCHC 35.0 g/dL) que é, de resto, muito típica nas situações de doença renal crônica. O calcitriol é uma hormona responsável pela absorção de cálcio e fósforo no intestino e, sem esta hormona, ocorre uma diminuição de cálcio. Apesar da diminuição da absorção de fósforo, este apresenta um valor elevado explicado pela diminuição da sua eliminação renal.

A presença de cilindros granulosos e eritrocitários é muito sugestivo de doença renal crônica.

### Conclusão

A análise dos valores e principalmente pela presença de edema, hematúria, leucocitúria e proteinúria levou o clínico a dar um diagnóstico de insuficiência renal crônica em contexto de glomerulonefrite, sem etiologia estudada por óbito em internamento.

## 6.4 Caso Clínico 6

História Clínica- Doente de 43 anos do sexo masculino com antecedentes patológicos de úlcera duodenal, síndrome psicótico e litíase renal e vesical. Dirigiu-se ao serviço de urgência por descompensação psiquiátrica e dor abdominal.

**Tabela I** % Valores bioquímicos do caso clínico 6.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
Glicose	120 mg/dL	74-106
Ureia	26 mg/dL	17-43
Creatinina	1.0 mg/dL	0.8-1.4
Bilirrubina total	2.3 mg/dL	0.3-1.20
Bilirrubina direta	1.97 mg/dL	<0.50
Bilirrubina indireta	0.33 mg/dL	
Fosfatase alcalina	468 IU/L	30-120
GGT	789 IU/L	0-55
AST	205 U/L	0-50
ALT	280 U/L	0-55

**Tabela I &** Valores da análise sumária de urina tipo II do caso clínico 6.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
Densidade	1.001	1.010-1.025
pH	6.5	5.0-8.0
Proteínas	0.0 mg/dL	0.0-10.0
Glicose	0.0 mg/dL	<30.0
Corpos cetónicos	0.0 mg/dL	<5.0
Urobilinogénio	0.2 mg/dL	<=0.2
Bilirrubina	0.8 mg/dL	<0.2
Hemoglobina	0.00 mg/dL	<0.03

### Interpretação

O valor de bilirrubina direta está aumentado, isto significa que não está a ocorrer a sua excreção no intestino passando para a corrente sanguínea. A presença de bilirrubina na urina também é indicativa de que esta não está a ser excretada a nível intestinal, mas sim na urina.

Os valores de AST e ALT estão aumentados indicando uma lesão nos hepatócitos, no entanto os valores ALP e  $\gamma$ -GT apresentam o dobro do aumento da AST e da ALT significando

que está a ocorrer uma lesão nos canalículos biliares responsável pela lesão nos hepatócitos. Estes dados são muito sugestivos de uma obstrução a nível biliar que não permite que a bilirrubina conjugada seja excretada no intestino.

### Conclusão

Devido a estas análises, juntamente com os sintomas e o historial do paciente, este foi internado na Unidade de Observação Cirúrgica para orientação terapêutica por colecistite litiásica. Após estabilização do quadro clínico teve alta para consulta de cirurgia geral com medicação sintomática.

## 6.5 Caso Clínico 7

História Clínica- Doente de 7 anos do sexo masculino dirige-se ao serviço de urgência por polidipsia e perda de peso (cerca de 5/6 quilos) com uma semana de evolução. No serviço de urgência apresentava Glasgow Coma Score de 15, lentificação do discurso, polipneia, palidez cutânea e glicémia de 472 mg/dL. Após estabilização clínica foram requisitadas as seguintes análises.

**Tabela 1'** . Valores bioquímicos do caso clínico 7.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
pH	6.89	7.35-7.45
pO <sub>2</sub>	51 mmHg	83-108
pCO <sub>2</sub>	14 mmHg	35-48
HCO <sub>3</sub>	<3.0 mmol/L	21.0-28.0
Glucose	464 mg/dL	74-106
Ureia	21 mg/dL	17-43
Creatinina	0.7 mg/dL	0.5-1.2
Sódio	133 mmol/L	136-146
Potássio	4.8 mmol/L	3.5-5.1
Cloro	106 mmol/L	101-109
Proteínas totais	6.9 g/dL	6.6-8.3
Colesterol Total	219 mg/dL	<190
Colesterol HDL	35 mg/dL	>40
Colesterol LDL	132 mg/dL	<115
Triglicéridos	795 mg/dL	<150
Hb A <sub>1c</sub>	12.6 %	4.0-6.0
Lactato	1.4 mmol/L	0.0-1.3

**Tabela 1 (.** Valores da análise sumária de urina tipo II do caso clínico 7.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
Densidade	1.020	1.010-1.025
pH	6.0	5.0-8.0
Leucócitos	0.0/μL	0.0-25.0
Proteínas	100.0 mg/dL	0.0-10.0
Glicose	1000.0 mg/dL	<10.0
Corpos cetónicos	150.0 mg/dL	<30.0

**Tabela 15.** Valores de análises imunológicas do caso clínico 7.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
Insulina	3.2 mU/L	1.9-23.0
Anticorpos anti-insulina	2.5 UI/mL	0.0-20.0
Peptido C	0.21 ng/mL	0.90-3.73
Ac. anti-descarboxilase do ácido glutâmico	87.2 UI/mL	0.0-17.0
Ac. anti-ilhéus pancreáticos	NEGATIVO	

### Interpretação

O valor de glicémia encontra-se extremamente elevado e, dada a idade do paciente e os sintomas apresentados, a hipótese de cetoacidose diabética é proposta.

Tal como demonstrado o doente apresenta valores de insulina próximos do limite inferior da normalidade (Tabela 15). Sem insulina a glicose não consegue entrar nas células, ficando

retida na corrente sanguínea (glicémia - 464 mg/dL). Além disso, as hormonas antagonistas da insulina (adrenalina e glucagina) são libertadas promovendo uma mobilização descontrolada de ácidos gordos do tecido adiposo, justificando os valores alterados do metabolismo lipídico (triglicéridos 795 mg/dL) e a perda de peso. Os ácidos gordos entram na corrente sanguínea e seguem para o fígado onde, nos hepatócitos, se processa a cetogénese formando cetoácidos ( $\beta$ -hidroxibutirato, acetoacetato e propanona) em grandes quantidades. Estes cetoácidos, quando em concentrações elevadas, são excretados pelo rim ( $\beta$ -hidroxibutirato, acetoacetato) e pelo pulmão (propanona). Estes dados são concordantes com a hipótese de diagnóstico de (corpos cetónicos na urina- 150.0 mg/dL).

Os cetoácidos em concentrações elevadas induzem acidose metabólica pois o aumento dos ácidos na corrente sanguínea conduz a uma diminuição do pH (pH - 6.89) e de  $\text{HCO}_3^-$  ( $\text{HCO}_3^-$  - <3.0 mmol/L). Como mecanismo compensatório o paciente começou a hiperventilar (polipneia) justificando os valores de  $p\text{CO}_2$  diminuída ( $p\text{CO}_2$ - 14 mmHg). Apesar de não ter sido calculado o hiato aniónico (do inglês, *Anion gap*) este estaria provavelmente aumentado.

A polidipsia pode ser justificada pela hiperglicémia que promove a diurese osmótica, justificando a glicosúria e diminuição dos valores de  $\text{Na}^+$  (glucose na urina - 1000.0 mg/dL,  $\text{Na}^+$  - 133 mmol/L), fazendo com que haja desidratação e hiperosmolaridade plasmática, ativando o centro de sede.

A presença glicémia ao acaso  $\geq 200$  mg/dL com presença de sintomas ou hemoglobina glicada (HbA1c)  $\geq 6.5\%$  faz o diagnóstico de Diabetes *mellitus*. Neste caso, o doente apresentava ambos os critérios.

O estudo imunológico revelou a presença de anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico superior ao normal sendo a possível causa da insuficiência de insulina.

### Conclusão

Conclui-se que o doente sofreu um episódio de cetoacidose diabética no contexto de uma Diabetes *mellitus* tipo I inaugural.

## **6.6 Caso Clínico 8**

História Clínica- Doente de 80 anos do sexo feminino a quem, por suspeita de gamapatia monoclonal, foram requisitadas as seguintes análises:



**Tabela 16.** Valores do hemograma do caso clínico 8.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
Leucócitos	6.61 10 <sup>9</sup> /L	4.0 - 10.0
Plaquetas	256 10 <sup>9</sup> /L	150 - 400
Hemoglobina	9.0 g/dL	11.5 - 15.5
Hematócrito	28.3 %	34.0 - 46.0
VCM	86.5 fL	80.0 - 100.0
HCM	27.5 pg	27.0 - 32.0
CHCM	31.8 g/dL	32.0 - 35.0

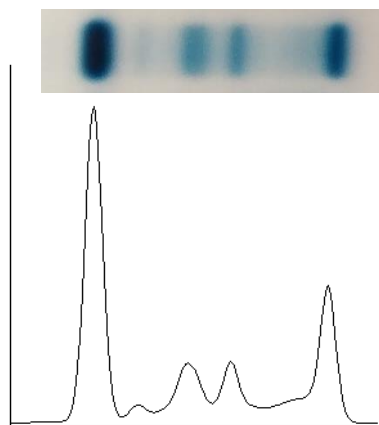
**Tabela 18.** Valores da análise sumária de urina tipo II, Sedimento urinário e urina de 24h do caso clínico 8.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
Densidade	1.009	1.010 - 1.025
pH	7.0	5.0 - 8.0
Leucócitos	25.0/μL	0.0 - 25.0
Proteínas	100.0 mg/dL	0.0 - 10.0
Hemoglobina	0.06 mg/dL	<0.03
Células epiteliais de descamação	<1 /Campo	<5
Leucócitos	8 /Campo	<4
Eritrócitos	<1 /Campo	<4
Microproteinúria, 24h	572.00 mg/24h	50.0 - 80.00
Micrialbuminúria, 24h	288.7 mg/24h	0.0 - 30.0

**Tabela 17.** Valores bioquímicos do caso clínico 8.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
Glicose	83 mg/dL	74 - 106
Ureia	118 mg/dL	17 - 43
Creatinina	2.0 mg/dL	0.8 - 1.4
Sódio	133 mmol/L	136 - 146
Potássio	4.2 mmol/L	3.5 - 5.1
Cloro	104 mmol/L	101 - 109
Albumina	3.43 g/dL	3.5 - 5.2
Proteínas Totais	8.67 g/dL	6.6 - 8.3
Fosfatase alcalina	152 UI/L	30 - 120
Cálcio	2.17 mmol/L	2.20 - 2.65
Fósforo	1.24 mmol/L	0.81 - 1.45

### Eletrforese das proteínas séricas

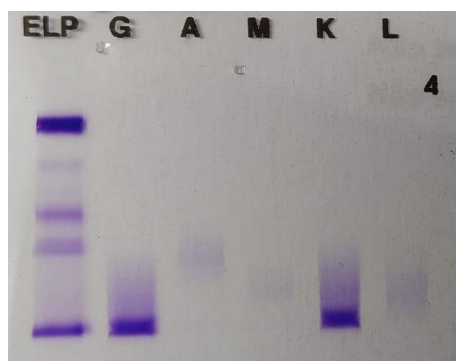


**Figura 18.** Gráfico da eletroforese das proteínas plasmáticas

**Tabela 19.** Quantificação das proteínas séricas do caso clínico 8.

Fração	%	Valores Referência	g/dL	Valores Referência
Albumina	46.1	60.3 - 71.4	3.67	3.70 - 5.60
Alfa 1	2.9	1.4 - 2.9	0.23	0.09 - 0.20
Alfa 2	13.6	7.2 - 11.3	1.08	0.40 - 0.90
Beta	11.4	8.1 - 12.7	0.91	0.50 - 1.00
Gama	26.0	8.7 - 16.0	2.78	0.50 - 1.30
Albumina/ Globulinas	0.86			

## Imunofixação séricas

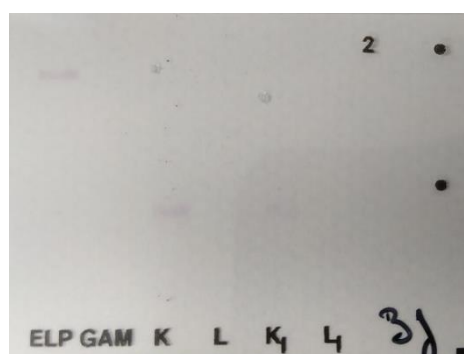


**Figura 19.** Gel da imunofixação sérica.  
(Fonte: SPC de Tomar)

**Tabela 20.** Quantificação das imunoglobulinas da imunofixação sérica do caso clínico 8.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
IgG	22.80 g/L	7.51– 15.60
IgA	0.93 g/L	0.82 – 4.53
IgM	0.78 g/L	0.46 – 3.04
Cadeias leves Kappa	27.90 g/L	6.29 – 13.50
Cadeias leves Lambda	2.47	3.13 – 7.23
Kappa/ Lambda	11.30	

## Imunofixação- Bence Jones



**Figura 20.** Imunofixação- Bence Jones  
(Fonte: SPC de Tomar).

**Tabela 21.** Quantificação das cadeias leves livres do caso clínico 8.

Parâmetros	Resultado	Valores Referência
Cadeia Kappa	318.3 mg/L	3.3 – 19.4
Cadeia Lambda	25.8 mg/L	5.7– 26.3
Relação K/L	12.34	0.26 – 1.65

## Interpretação

Os valores de ureia e creatinina são indicativos de uma taxa de filtração glomerular diminuída. Ao analisar os outros valores encontramos uma diminuição da albumina (hipoalbuminémia) e um aumento das proteínas plasmáticas (hiperproteinémia). Existe uma diminuição dos valores de  $\text{Na}^+$  que se pode dever à hiperproteinémia que faz aumentar o volume de plasma. Esta não é uma verdadeira hiponatrémia, mas sim uma hiponatrémia dilucional. O valor de cálcio também se encontra ligeiramente diminuído, o que pode estar relacionado com a hipoalbuminémia uma vez que parte do cálcio circula ligado à albumina. Com os valores baixos de albumina a determinação do cálcio pode sofrer interferência sendo um falso valor. A análise da urina tipo II e da urina de 24h revelou ainda a presença de proteinúria acentuada.

O padrão eletroforético (Figura 18) das proteínas séricas demonstra um aumento na zona gama que se assemelha a um pico de uma proteína monoclonal (pico M). A quantificação de proteínas (Tabela 19) revela uma diminuição da fração de albumina e um aumento da fração gama (hipergamaglobulinémia).<sup>[65]</sup>

A maioria das gamopatias monoclonais consistem na produção não controlada de um tipo de imunoglobulina por um clone de células B produtoras de imunoglobulinas formando um pico M. Foi realizada a imunofixação sérica (Figura 19 e Tabela 20) para identificar o tipo da imunoglobulina obtendo um pico monoclonal IgG/Kappa. Foi ainda realizada a imunofixação de Bence Jones (Figura 21) que revelou a presença de cadeias Kappa livres. O doseamento das imunoglobulinas e das cadeias leves livres (relação Kappa/Lambda) é fundamental no diagnóstico.<sup>[65]</sup>

O hemograma (Tabela 16) revelou ainda uma anemia normocítica normocrômica.

### Conclusão

As gamopatias monoclonais podem ser pré-malignas (ex. MGUS) ou malignas (ex. mieloma múltiplo). Apesar das informações úteis deste relatório clínico o diagnóstico desta paciente ainda não pode ser concluído sendo necessárias mais informações nomeadamente a realização do medulograma e estudos genéticos para juntamente com estes dados obter o diagnóstico mais correto.

## 7. Imunologia

No sector de imunologia são executadas análises que visam a determinação e quantificação de analitos úteis no estudo de imunologia, marcadores tumorais, autoimunidade e alergias. A amostra usada preferencialmente é o soro, no entanto o plasma (ex. ACTH e renina) e a urina (ex. cortisol urinário) são utilizados em determinadas análises.

**Tabela 22.** Analitos analisados em Imunologia e respetivas amostra, metodologias e equipamentos.

<b>Analitos</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Equipamento</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hormonas</li> <li>• Marcadores tumorais</li> <li>• Vitaminas</li> </ul>	Imunoensaio quimioluminescente	Unicel Dxl 800
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Doseamento de imunoglobulinas e cadeias leves;</li> <li>• Doseamento de proteínas de fase aguda;</li> <li>• Doseamento de Apolipoproteínas;</li> <li>• Doseamento de proteínas do complemento</li> </ul>	Imunoensaio-Turbidimetria /Nefelometria	Immage 800
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alergias</li> <li>• Autoimunidade</li> </ul>	Imunoensaio fluoroenzimático	Unicap 250
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serologia infecciosa</li> </ul>	Imunoensaio fluoroenzimático	VIDAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serologia infecciosa;</li> <li>• Autoimunidade</li> </ul>	Imunoensaio enzimático (ELISA)/ Imunofluorescência indireta	Mago Plus
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hormonas;</li> <li>• Serologia infecciosa</li> </ul>	Imunoensaio quimioluminescente	Maglumi 800

## 8. Microbiologia

O setor de microbiologia no SPC consiste numa variedade de procedimentos destinados ao diagnóstico e monitorização da terapêutica em infeções bacterianas, parasitológicas e fúngicas.

- Produtos: No SPC dão entrada diversos produtos a fim de realizar análises bacteriológicas, parasitológicas e micológicas, sendo eles, urinas, fezes, sangue, expetoração e aspirados brônquicos, líquidos (LCR, pleural, peritoneal e sinovial) e exsudatos (vaginais, uretrais, feridas purulentas, oculares, nasais e auriculares). De seguida as amostras são processadas respeitando o nível de prioridade.

- Exame direto: Esta análise é a primeira a realizar e determina a qualidade da amostra e é um grande auxílio no diagnóstico da doença infecciosa e na interpretação das culturas. Este exame pode ser a fresco ou corado (coloração de Gram, Ziehl-Neelsen e Auramina).

### Infeções bacterianas

- Inoculação em meios de cultura: Consoante o tipo de produto e o grupo de bactérias que se espera encontrar, estes são inoculados em caldos e meios de enriquecimento para microrganismos fastidiosos (ex. BHI, gelose de sangue e PVX), meios de isolamento seletivos que evitam o crescimento de determinadas bactérias (ex. CLED, HAE, gelose de Campyloset), meios seletivos e diferenciais que possuem substâncias permitem distinguir bactérias (ex. gelose Hektoen, gelose de MacConkey) e meios cromogénicos (ex. gelose strepto B, MRSA).

- Incubação: Os meios são incubados com condições apropriadas de temperatura, tempo de incubação e atmosfera consoante a suspeita de bactéria existente.

- Identificação: Após incubação é feita a identificação recorrendo ao método espectrofotometria de massa, no equipamento IVD Maldi byotiper, que faz a identificação bacteriana através da estrutura antigénica recorrendo a uma biblioteca de referência.

- Suscetibilidade aos antimicrobianos: Uma vez identificado o microrganismo causador da infeção são executados testes de suscetibilidade antimicrobiana através do equipamento Vitek 2 utilizando o método turbidimétrico, que orientam o clínico na terapêutica mais adequada a usar.

### Infeções fúngicas

- Inoculação em meios de cultura: Após o exame direto, os produtos são semeados em meio seletivo (Gelose de Sabouraud) e incubados.

- **Identificação:** A identificação fúngica é feita recorrendo ao exame macroscópico e microscópico das culturas através da observação de estruturas reprodutoras, hifas, etc. no caso de fungos filamentosos. No entanto no SPC a maioria das infeções fúngicas são por leveduras que são identificadas no equipamento IVD Maldi byotiper.

### **Infeções parasitológicas**

A sua identificação é feita recorrendo ao exame direto macroscópico e microscópico e usando como auxílio, testes imunocromatográficos (ex. Rida<sup>®</sup>Quick para pesquisa da *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/dispar* e *Cryptosporidium parvum*).

## **9. Conclusão**

O estágio curricular em Análises Clínicas no SPC de Tomar foi fundamental na consolidação de conhecimentos e na obtenção de experiência e competências no meio profissional apenas possível alcançar através da realização deste estágio.

O laboratório de Análises Clínicas é cada vez mais automatizado diminuindo os erros nas várias fases analíticas e aumentando a fiabilidade dos resultados, no entanto é cada vez mais necessária a presença de profissionais de saúde com espírito crítico e com conhecimento vasto na área clínica e laboratorial capazes de resolver eventuais erros. Neste sentido o conhecimento adquirido no Mestrado em Análises Clínicas foi bastante útil para a realização das tarefas de rotina do SPC de Tomar, no entanto os laboratórios de análises clínicas estão em constante evolução sendo necessário uma continua adaptação às novas metodologias.

Para finalizar, este estágio proporcionou ainda a aquisição de novos métodos de trabalho, que possibilitaram a execução das tarefas de forma planeada, organizada e autónoma.



## Bibliografia

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - Manual de Boas Práticas Laboratoriais. **Ordem dos Farmacêuticos**. Lisboa. 1:1 (2018) 1–18.
2. INSTITUTO PORTUGUÊS DE ACREDITAÇÃO - Guia para a aplicação da NP EN ISO 15189. **IPAC acreditação**. Lisboa. 004:3 (2017) 1–21.
3. DIÁRIO DA REPÚBLICA - Manual de Boas Práticas Laboratoriais de Patologia Clínica ou Análises Clínicas. **Diário da República n.º 212/2019, Série II**. (5 nov. 2019). 66–80.
4. DIÁRIO DA REPÚBLICA - Manual de Boas Práticas Laboratoriais de Patologia Clínica ou Análises Clínicas. **Diário da República**. Despacho n.º 10009/2019, série II de 5 de novembro (2019) 66–80.
5. WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Diretrizes da OMS para a tiragem de sangue: boas práticas em flebotomia**, atual. 2015. [Consult. 8 abr. 2021]. Disponível em : [https://www.who.int/infection-prevention/publications/Phlebotomy-portuges\\_web.pdf](https://www.who.int/infection-prevention/publications/Phlebotomy-portuges_web.pdf)
6. BONINI, Pierangelo et al. - Errors in laboratory medicine. **Clin Chem**. 48:5 (2002) 691–698.
7. BRIGGS, Carol; BAIN, Barbara J. - Basic Haematological Techniques. Em BAIN, BARBARA J. (Ed.) - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 12<sup>a</sup> ed. London : Elsevier, 2016. ISBN 9780702066962. p. 18–49.
8. ELGHETANY, M. Tarek; SCHEXNEIDER, Katherine I.; BANKI, Katalin - Erythrocytic Disorders. Em MCPHERSON, RICHARD (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. Twenty Th ed. Philadelphia : Elsevier, 2016. ISBN 9780323295680. p. 559-605.e2.
9. VAJPAYEE, Neerja; GRAHAM, Susan S.; BEM, Sylva - Basic examination of blood and bone marrow. Em MCPHERSON, RICHARD (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 23. ed. Philadelphia : Elsevier, 2016. ISBN 9780323295680. p. 510–539.
10. BAIN, Barbara J. - Blood Cell Morphology in Health and Disease. Em BAIN, BARBARA J. (Ed.) - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. Twelfth Ed ed. London : Elsevier, 2017. ISBN 9780702069353. p. 61–92.
11. BAIN, Barbara J. - Preparation and Staining Methods for Blood and Bone Marrow Films. Em BAIN, BARBARA J. (Ed.) - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 12. ed. London : Elsevier, 2016. ISBN 9780702066962. p. 50–60.

12. OSEI-BIMPONG, Andrew; BURTHEM, John - Supplementary Techniques Including Blood Parasite Diagnosis. Em BAIN, BARBARA J. (Ed.) - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 12. ed. London : Elsevier, 2016. ISBN 9780702066962. p. 93–111.
13. CHERNECKY, Cynthia - S. Em CHERNECKY, CYNTHIA (Ed.) - **Laboratory Tests and Diagnostic Procedures**. 6th. ed. Philadelphia : Elsevier, 2012. ISBN 9781455706945. p. 993–1052.
14. GEORGE, Francisco Henriques Moura - Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c. **Direção-Geral da saúde**. Lisboa. norma 033:2 (2011) 1–10.
15. PINCUS, Matthew R.; LIFSHITZ, Mark S.; BOCK, Jay L. - ANALYSIS: PRINCIPLES OF INSTRUMENTATION. Em MCPHERSON, RICHARD (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 23<sup>a</sup> ed. Philadelphia : Elsevier, 2016. ISBN 9780323295680. p. 33–59.
16. WILD, Barbara J.; BAIN, Barbara J. - Investigation of Variant Haemoglobins and Thalassaemias. Em BAIN, BARBARA J. (Ed.) - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 12<sup>a</sup> ed. London : Elsevier, 2016. ISBN 9780702066962. p. 282–311.
17. HAGE, David S. - Chromatography. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 266–294.
18. LUBIN, Bertram H.; KLEMAN, Klara; WITKOWSKA, Ewa - Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. **Clinical Biochemistry**. 24:4 (1991) 363–374.
19. BAZYDLO, Lindsay A. L.; LANDERS, James P. - Electrophoresis. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 250-265.e1.
20. STEINBERG MH, FORGET BG, HIGGS DR, Weatherall DJ. - Disorders of hemoglobin genetics pathophysiology and clinical management. **Journal of the Royal Society of Medicine**. 94:11 (2001) 602.
21. LAFFAN, Michael A.; MANNING, Richard A. - Investigation of Haemostasis. Em BAIN, BARBARA J. (Ed.) - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 12<sup>a</sup> ed. London : Elsevier, 2016. ISBN 9780702066962. p. 366–409.
22. SARODE, Ravi; KESSLER, Craig M. - Coagulation And Fibrinolysis. Em MCPHERSON, RICHARD (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 23<sup>a</sup> ed. Philadelphia : Elsevier, 2016. p. 827–846.e3.



23. LAFFAN, Michael A.; MANNING, Richard A. - Investigation of a Thrombotic Tendency. Em BAIN, BARBARA J. (Ed.) - **Dacie and Lewis Practical Haematology**. 12<sup>a</sup> ed. London : Elsevier, 2016. ISBN 9780702066962. p. 410–424.
24. SCHULMAN, S; TENGBORN, L. - **Treatment of Venous Thromboembolis, in Patients with Congenital Deficiency of Antithrombin**
25. SCHWARTZ, RS *et al.* - Clinical Experience with Antithrombin III Concentrate in treatment of Congenital and Acquired Deficiency of Antithrombin. **American Journal of Medicine**. 87:3 (1989) 53–60.
26. HIGGINS, Russell A.; KITCHEN, Steve; CHEN, Dong - Hemostasis. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 1732-1732.e56.
27. FJ, Walker - Regulation of Activated Protein C by a New Protein: A Possible Function for Bovine Protein S. **Journal of Biological Chemistry**. 255:12 (1980) 5521–5524.
28. BIGGS, R.; RIZZA, C. - **Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis**. III ed. England : Oxford, 1984
29. BRITTENHAM, Gary M. - Disorders of Iron Homeostasis: Iron Deficiency and Overload. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Seventh Ed ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 478–490.
30. AWAN, Farrukh T.; BYRD, John C. - Chronic Lymphocytic Leukemia. Em HOFFMAN, RONALD (Ed.) - **Hematology : Basic Principles and Practice**. Seventh Ed ed. Philadelphia : Elsevier, 2018. ISBN 9780323357623. p. 1244–1264.
31. CHAPIN, John; GIARDINA, Patricia J. - Thalassemia Syndromes. Em HOFFMAN, RONALD (Ed.) - **Hematology: Basic Principles and Practice**. Seventh Ed ed. Elsevier, 2017. ISBN 9780323357623. p. 546-570.e10.
32. SCHINDLER, Emily I.; BROWN, Sarah M.; SCOTT, Mitchell G. - Electrolytes and Blood Gases. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 604-625.e3.
33. CHENG, Steven; SCHINDLER, Emily I.; SCOTT, Mitchell G. - Disorders of Water, Electrolytes, and Acid–Base Metabolism. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 1324–1347.
34. FRASER, William D. - Bone and Mineral Metabolism. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz**

**Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.** Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 1422-1491.e15.

35. CAPPELLINI, M. Domenica; LO, Stanley F.; SWINKELS, Dorine W. - Hemoglobin, Iron, Bilirubin. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.** Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 719-775.e15.

36. SHIPMAN, William J. Marshall; Marta Lapsley; Andrew Day; Kate - Plasma proteins and enzymes. Em MARSHALL, WILLIAM J. (Ed.) - **Clinical Chemistry.** Ninth ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780723438816. p. 286–301.

37. DIETZEN, Dennis J. - Amino Acids, Peptides, and Proteins. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.** Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 373-403.e5.

38. N WATANABE , S KAMEI , UM OHKUBO , M YAMANAKA , S OHSAWA , K MAKINO, K. Tokuda - Urinary protein as measured with pyrogallol red-molybdate complex manually and in Hitachi 726 automated. **Clinical Chemistry.** 32:8 (1986) 1551–1544.

39. DOUMAS BT, WATSON WA, Biggs HG. - Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. **Clinical Chemistry.** 31:3 (1971) 87–96.

40. BREDEFELD, Cindy L.; LAU, Raymond; HUSSAIN, M. Mahmood - Lipids And Dyslipoproteinemia. Em MCPHERSON, RICHARD (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.** Twenty Fou ed. Philadelphia : Elsevier, 2016. ISBN 9780323295680. p. 244–266.e2.

41. LAPSLEY, Marta; DAY, Andrew; SHIPMAN, Kate - Lipids, lipoproteins and cardiovascular disease. Em MARSHALL, WILLIAM J. (Ed.) - **Clinical Chemistry.** Ninth ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780723438816. p. 303–323.

42. REMALEY, Alan T.; RIFAI, Nader; WARNICK, G. Russell - Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Other Cardiovascular Risk Factors. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.** Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 731–805.

43. ALLAIN, CC *et al.* - Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry.** 20:4 (1974) 470–475.

44. LOTHAR, Thomas - Blood Glucose. Em LOTHAR, THOMAS (Ed.) - **Clinical laboratory diagnostics : use and assessment of clinical laboratory results.** 1st. ed.

Frankfurt, Germany : TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998. p. 131–137.

45. SHIPMAN, William J. Marshall; Marta Lapsley; Andrew Day; Kate - Disorders of carbohydrate metabolism. Em WILLIAM J. MARSHALL (Ed.) - **Clinical Chemistry**. Ninth ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780723438816. p. 225–254.

46. SACKS, David B. - Carbohydrates. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 518–538.

47. AOYAGI, Katsumi; ASHIHARA, Yoshihiro; KASAHARA, Yasushi - Immunoassays And Immunochemistry. Em MCPHERSON, RICHARD (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 23<sup>a</sup> ed. Philadelphia : Elsevier, 2016. ISBN 9780323295680. p. 901–928.e2.

48. PINCUS, Matthew R.; CARTY, Robert P. - Clinical Enzymology. Em MCPHERSON, RICHARD (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 23<sup>a</sup> ed. Philadelphia : Elsevier, 2016. ISBN 9780323295680. p. 291–313.e3.

49. APPLE, Fred S.; GOETZE, Jens Peter; JAFFE, Allan S. - Cardiac Function. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 1201–1255.e17.

50. DANIELS, Lori B.; MAISEL, Alan S. - Natriuretic peptides. **American College of Cardiology**. 50:25 (2007) 2357–2368.

51. BOCK, Jay L. - Cardiac Injury, Atherosclerosis, And Thrombotic Disease. Em MCPHERSON, RICHARD (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. Twenty nin ed. Philadelphia : Elsevier, 2016. ISBN 9780323295680. p. 267–275.e2.

52. BAGGISH, Aaron L.; KIMMENADE, Roland R. J. Van; JANUZZI, James L. - The differential diagnosis of an elevated amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide level. **American College of Cardiology**. 101:3A (2008) 43–48.

53. HAMM, Christian W.; GIANNITSIS, Evangelos; KATUS, Hugo A. - Cardiac troponin elevations in patients without acute coronary syndrome. **Circulation**. 106:23 (2002) 2871–2872.

54. WU, A. H. *et al.* - National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases. **Clin Chem**. 45:7 (1999) 1104–1121.

55. DANIELS, Lynsey *et al.* - Evaluation Of Liver Function. Em MCPHERSON, RICHARD (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. Twenty Fou ed. Philadelphia : Elsevier, 2016. ISBN 9780323295680. p. 314–330.e4.
56. ROSENBERG, William; BADRICK, Tony; TANWAR, Sudeep - Liver Disease. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 1348-1397.e16.
57. PANTEGHINI, Mauro; BAIS, Renze - Serum Enzymes. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 404-434.e4.
58. DELANEY, Michael P.; LAMB, Edmund J. - Kidney Disease. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 1256-1323.e16.
59. LAMB, Edmund J.; JONES, Graham R. D. - Kidney Function Tests. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 479-517.e16.
60. BALANCE, Acid-Base *et al.* - EVALUATION OF RENAL FUNCTION ., Em MCPHERSON, RICHARD (Ed.) - **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 23<sup>a</sup> ed. Philadelphia : Elsevier, 2016. ISBN 9780323295680. p. 181–207.e1.
61. KRICKA, Larry J.; PARK, Jason Y. - Optical Techniques. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 200–223.
62. ORAZIO, Paul D. - Electrochemistry and Chemical Sensors. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 224-249.e4.
63. HAWKER, Charles D.; GENZEN, Jonathan R.; WITTWER, Carl T. - Automation in the Clinical Laboratory. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 370-370.e24.
64. KRICKA, Larry J.; PARK, Jason Y. - Immunochemical Techniques. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 348-367.e2.

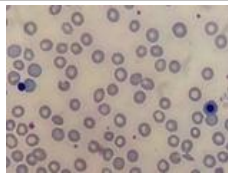
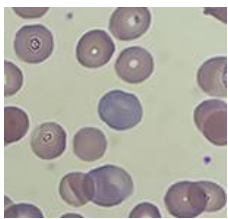
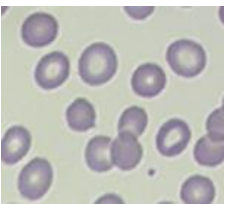
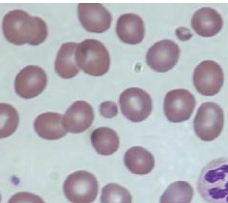
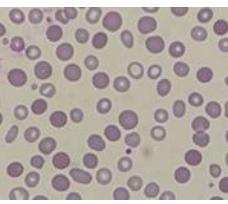
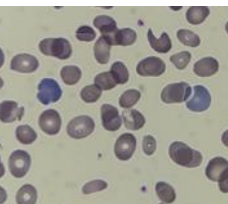
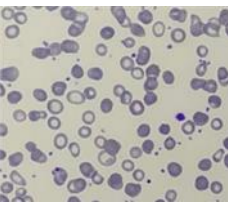
65. BASHITI, Ola - Accidental diagnosis of multiple myeloma in a 44-year-old white woman due to erroneous results via chemical analyzers. **Lab Medicine**. ISSN 19437730. 47:1 (2016) 5–11.
66. RASHIDI, Hooman H.; GREEN, Ralph - Red Blood Cell Morphology and Indices With Clinical Chemistry Interface. Em RIFAI, NADER (Ed.) - **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Sixth Edit ed. Missouri : Elsevier, 2017. ISBN 9780323359214. p. 1733-1733.e12.
67. HOWARD, Martin R.; HAMILTON, Peter J. - Megaloblastic anemia. Em HOWARD, MARTIN R. (Ed.) - **Haematology: An Illustrated Colour Text**. Fourth ed ed. London : Elsevier, 2013. ISBN 9780702051395. p. 26–27.
68. HOWARD, Martin R.; HAMILTON, Peter J. - Acute lymphoblastic leukaemia. Em HOWARD, MARTIN R. (Ed.) - **Haematology: An Illustrated Colour Text**. Fourth ed ed. London : Elsevier, 2013. ISBN 9780702051395. p. 42–43.
69. GEORGE, Fancisco Henriques Moura - Diagnóstico e Classificação da Diabetes *Mellitus*. **Direção Geral da saúde**. Lisboa. 002:2 (2011) 13.
70. SYSMEX - **Analisadores Hematológicos Automatizados Série - XN**, atual. 2012. [Consult. 8 abr. 2021]. Disponível em: <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XN-Português.pdf>.

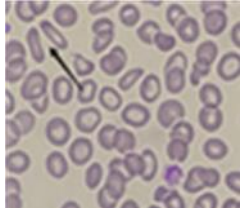
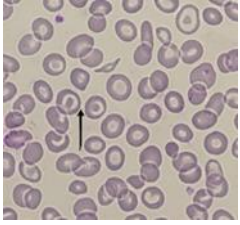
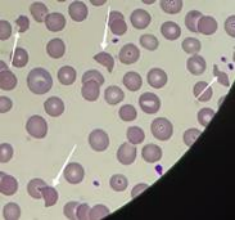
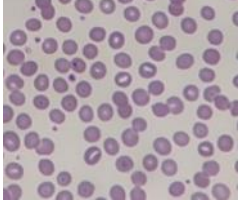
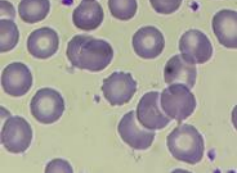
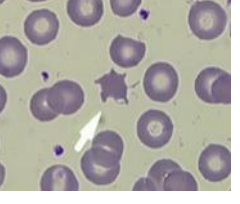
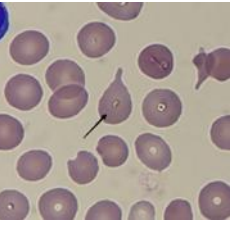


## Anexos

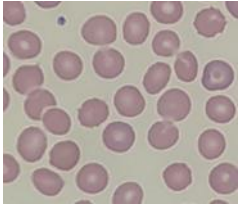
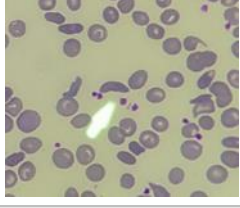
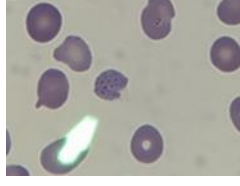
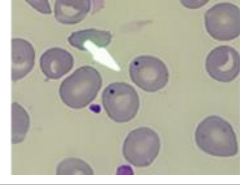
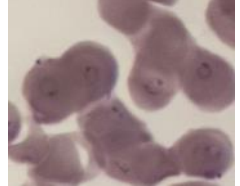
### Anexo I

**Tabela 23.** Observações do ESP de GV com alterações visualizadas no SPC de Tomar, usando a coloração de May-Grunwal Giemsa, e as principais causas. (Adaptado de [66])

Aparência	Alteração	Principais Causas
<b>Células imaturas</b>		
	Eritoblastos	Anemia hemolítica Síndrome mielodisplásica
	Suspeita de reticulócito (para confirmar fazer coloração supra-vital)	Anemia regenerativa
<b>Tamanho</b>		
	GVs microcíticos	Anemia por deficiência de ferro
		Hemoglobinopatias
		Anemia de doenças crônicas
		Anemia sideroblástica
 (Adaptado de [67])	GVs macrocíticos	Síndrome mielodisplásica
		Alcoolismo
		Anemias megaloblástica por deficiência de B <sub>12</sub> e ácido fólico
		Hepatopatias
	População dimórfica	Transusão
		Tratamento de anemia
		Síndrome mielodisplásica
<b>Cor</b>		
	Policromasia	Anemia regenerativa
		Tratamento de anemia
		Anemia Hemolítica
	Hipocromia	Causas semelhantes aos GV microcíticos.

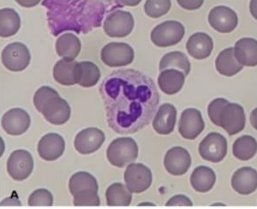
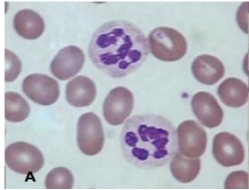
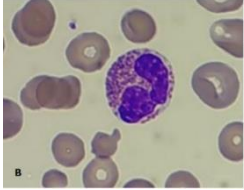
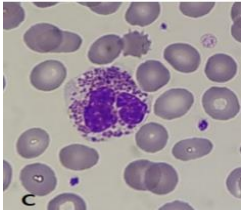
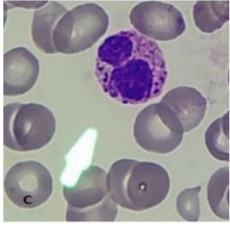
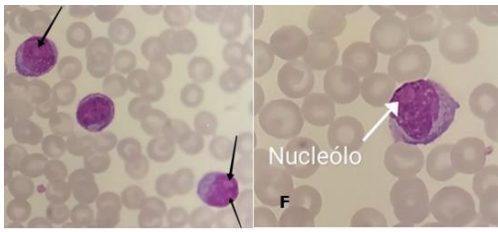
Forma		
	Eliptócitos ou células em “caneta” (do inglês, <i>pencil cells</i> )	Deficiência de ferro Eliptocitose Hereditária
	Células em alvo (do inglês, <i>target cells</i> )	Deficiência de ferro Talassemia Doenças hepáticas Artefactos
	Esquizócitos (fragmentos de GVs)	Coagulação Intravascular Disseminada (CID) Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT) Síndrome Hemolítico-Urémico (SHU)
	Estomatócitos	Doença hepática, Alcoolismo Artefacto (devido a secagem lenta em ambiente húmido)
	Equinócitos	Artefacto Urémia Deficiência da piruvato cinase
	Acantócitos	Doença hepática severa Abetalipoproteinémia Malnutrição Pós-esplenectomia Hipotireoidismo
	Dacriócitos	Mielofibrose Síndrome mielodisplásica Hematopoiese extracelular Deficiência de ferro severa Talassemia Anemia megaloblástica

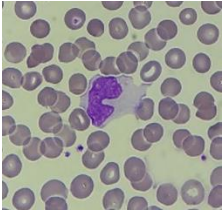
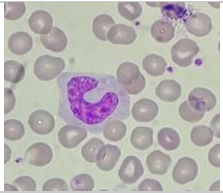
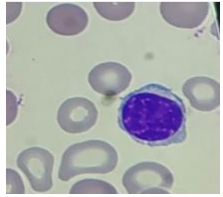
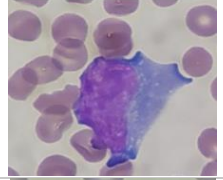
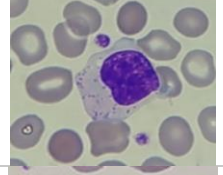
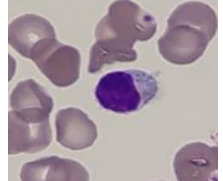
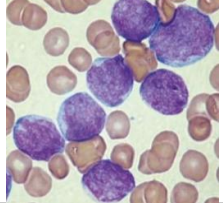
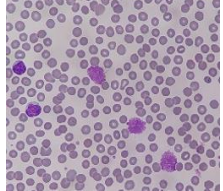
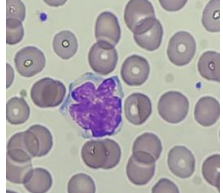


	Esferócitos	Esferocitose Hereditária
		Anemia hemolítica autoimune
		Incompatibilidade ABO
		Queimaduras severas
	Drepanócitos	Anemia Falciforme
<b>Inclusões</b>		
	Ponteados basófilos	Intoxicação por chumbo
		Anormal produção do heme
		Talassémia
		Síndrome mielodisplásica
	Corpos de Howell-Jolly	Esplenectomia
		Anemia megablástica
	Parasita <i>Plasmodium falciparum</i>	Malária
(Fonte: SPC de Tomar)		

## Anexo II

**Tabela 24.** Observações do ESP dos neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos e linfócitos assim como as principais alterações, visualizadas no SPC de Tomar, usando a coloração de May-Grunwal Giemsa, e as principais causas. (Adaptado de [10]).

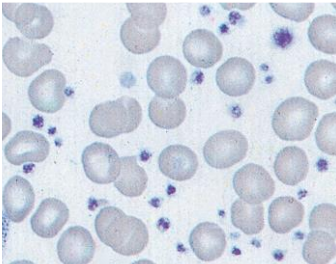
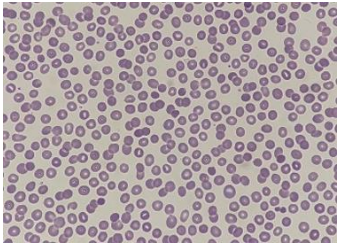
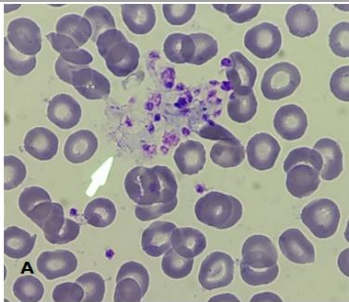
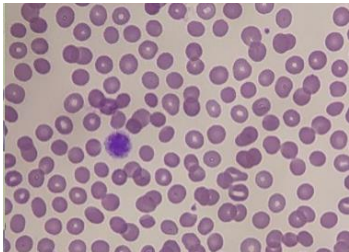
		Morfologia	Alterações	Principais causas
Leucócitos	Neutrófilos		Neutrofilia ( $>7,0 \times 10^9/L$ )	Infeções Tratamentos com corticosteroides Intoxicação Síndrome Mieloproliferativo
			Neutropénia ( $<1,5 \times 10^9/L$ )	Doenças hereditárias Anticorpos anti-neutrófilos
		 (Retirado de [67])	Hipersegmentação dos neutrófilos ( $>6$ lobulos ou $>3\%$ dos neutrofilos com 5 lobulos)	Anemia megaloblástica Ligeira em urémia Algumas terapêuticas
	Eosinófilo		Eosinofilia ( $>0,4 \times 10^9/L$ )	Alergias Infeções com parasitas Eosinofilia reativa Síndrome hiper eosinofílico idiopático Síndrome Mieloproliferativo
			Eosinopenia	Administração prolongada de esteroides
			Desgranulação do eosinófilo	Ativação dos eosinófilos
Basófilo		Basofilia ( $>0.15 \times 10^9/L$ )	Síndrome mieloproliferativo nomeadamento leucemia mieloide crónica	
Leucócitos imaturos			Blastos com nucléolos e razão núcleo citoplasma diminuída, típico de leucemia mieloblástica aguda	

Monócito		Monocitose ( $>0,7 \times 10^9/L$ )	Infeções (ex. tuberculose) Doença inflamatória (ex. doença de Crohn) Leucemias mieloides (ex. leucemia mielomonocítica crônica)
		Monocitopenia ( $<0,1 \times 10^9/L$ )	Terapêutica com glucocorticoides
		Promonócito	Célula imatura com núcleo irregular e citoplasma azul acinzentado com grânulos finos, sendo típicos em quantidades vestigiais
Linfócitos típicos		Linfócito pequeno de cromatina densa e cuja relação núcleo/citoplasma é igual a 1	
		Linfocitose ( $>3,7 \times 10^9/L$ )	Leucemia linfocítica crônica e aguda Infeções virais Mononucleose infecciosa
		Linfócito ativado	
		LGL (do inglês, large granular lymphocytes) razão núcleo citoplasma diminuída, cromatina laxa, e grânulos azurófilos.	
		Plasmócitos, núcleo redondo e excêntrico, com halo perinuclear.	
Linfócitos atípicos		Blastos com nucléolos e uma baixa razão núcleo/citoplasma, formas imaturas típicas de leucemia linfocítica aguda (retirado de [68])	
		Linfocitose, com linfócitos muito maduros, e presença de manchas de Gumprecht características de leucemia linfocítica crônica.	
		Linfócitos com núcleo polilobulado, característicos de infecções por HTLV-I e linfomas das células T.	

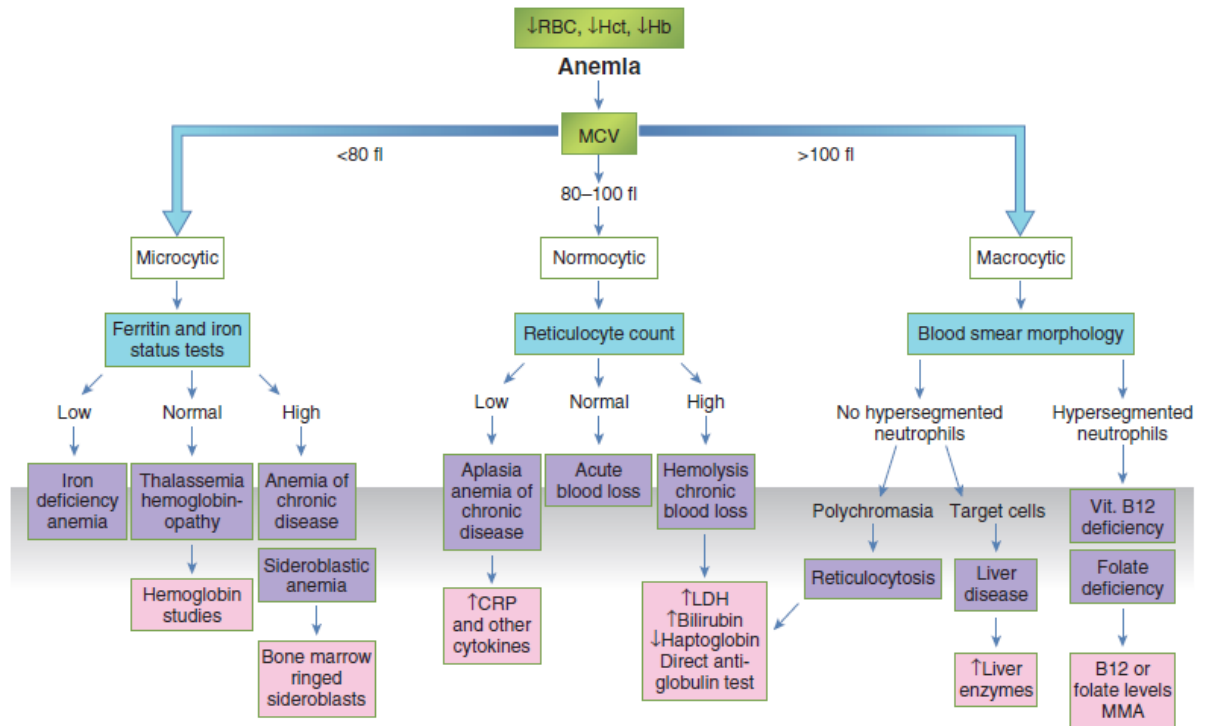
(Fonte: SPC de Tomar)

### Anexo III

**Tabela 25.** Observações do ESP de plaquetas assim como as principais alterações, visualizadas no SPC de Tomar, usando a coloração de May-Grunwal Giemsa, e as principais causas. (Adaptado de [10]).

Morfologia	Alterações	Principais causas
 <p>(Retirado de [10])</p>	Trombocitose	Síndromes mieloproliferativos
		Processos inflamatórios agudos
		Hemorragias
	Trombocitopenia	Trombocitopenia imune primária
		Púrpura Trombótica
		Coagulação intravascular disseminada
		Malária
		Síndrome mielodisplásica
	Pseudotrombocitopenia	Aglutinação plaquetar devido ao anticoagulante EDTA K <sub>3</sub>
	Plaqueta gigante	Síndrome de Bernar-Soulier
		Síndrome mieloproliferativo (anisocitose plaquetar)

## Anexo IV



**Figura 21.** Representação esquemática do diagnóstico diferencial das anemias microcíticas, normocíticas e macrocíticas. Retirado de [66]

## Anexo V

**Tabela 26.** Dados laboratoriais típicos na anemia microcítica. Adaptado de [66].

Testes Laboratoriais Doenças	Ferritina	Recetor da transferrina	TIBC	Ferro sérico	Percentagem da saturação do ferro	Hepcidina
Anemia por deficiência de ferro	↓ <sup>*</sup>	↑	↑	↓	↓ (<10%)	↓
Anemia por doenças crónicas	↑	Normal	↓	Diminuído ou Normal	Normal ou Aumentado (>10%)	↑
Talassémia	Normal ou Aumentado	Normal ou Diminuído	Normal	Normal ou Aumentado	Normal ou Aumentado (>10%)	Diminuído ou Aumentado

Notas: \* Um valor baixo de ferritina, na maioria das situações é consistente com uma anemia por deficiência de ferro. No entanto, a ferritina é uma proteína de fase aguda e pode estar normal ou até ligeiramente aumentada em alguns pacientes com anemia por deficiência de ferro. Portanto, um resultado normal de ferritina não exclui a anemia por deficiência de ferro.

A sobrecarga de ferro observada por vezes na talassémia, pode ser atribuída á diminuição da hepcidina observada em alguns desses pacientes, o que pode levar ao aumento da absorção de ferro e sobrecarga de ferro.

## Anexo VI

**Tabela 27.** Classificação e características das lipoproteínas. Adaptado de [41].

<b>Lipoproteína</b>	<b>Densidade (g/mL)</b>	<b>Media do diâmetro (nm)</b>	<b>Mobilidade eletroforética</b>	<b>Fonte</b>	<b>Função principal</b>
<b>Quilomicron</b>	<0.95	500	Origem	Intestino	Transporte exógeno dos triglicéridos
<b>VLDL</b>	0.96-1.006	43	Pré- $\beta$	Fígado	Transporte endógeno dos triglicéridos
<b>IDL</b>	1.007-1.019	27	Banda larga entre Pré- $\beta$ e $\beta$	Catabolismo das VLDL	Percursor das LDL
<b>LDL</b>	1.02-1.063	22	$\beta$	Catabolismo das VLDL, via IDL	Transporte do colesterol
<b>HDL</b>	1.064-1.21	8	$\alpha$	Fígado, intestino; catabolismo dos quilomicrons e das VLDL	Transporte reverso do colesterol


## Anexo VII

**Tabela 28.** Estruturas que podem ser visualizadas na análise microscópica do sedimento urinário. Adaptado de [60].

Imagem	Célula	Valores Referência	Patologias
	Leucócitos	<4/campo	Processos inflamatórios ou infecciosos
	Eritrócitos	<3/campo	Doença renal (ex. glomerulonefrite), doença do trato urinário inferior (ex. infecção, cálculo renal), causa extra-renal (ex. tumores), reações tóxicas (ex. drogas) e causas fisiológicas.
	Células epiteliais de descamação	<5/campo	Estão presentes na urina feminina, em maior quantidade. Não se encontram relacionadas com nenhum estado patológico.
	Células do epitélio de transição	<2/campo	Sem significado clínico, exceto quando presentes em aglomerados e com morfologia atípica indicativo de neoplasia das células de transição.
	Células tubulares renais	<2/campo	Rejeição de transplante renal, lesão tubular renal e lesões derivadas de processos isquêmicos.
<b>Cilindros</b>	Os cilindros formam-se nos túbulos renais a partir da glicoproteína de Tamm-Horsfall que é secretada pela ansa de Henle. A matriz desta glicoproteína capta elementos presentes no filtrado tubular como células, eritrócitos, leucócitos entre outros componentes formando os cilindros.		
Imagem	Cilindro	Patologias	
	Cilindros Hialinos	Doença renal, desidratação, terapêutica com diuréticos, febre e insuficiência cardíaca congestiva.	
	Cilindros Granulosos	Doenças glomerulares, doenças túbulo-intersticiais e rejeição de transplante renal.	
	Cilindros eritrócitários	Glomerulonefrites agudas e isquemia renal.	



	Cilindros Leucocitários	Pielonefrite, nefrite intersticial e síndrome nefrótica.
<b>Cristais</b>	Os cristais formam-se pela precipitação de sais urinários quando ocorrem alterações na sua solubilidade. Estas alterações podem ser no pH da urina, a temperatura ou a concentração dos sais.	
<b>Imagem</b>	<b>Cristais</b>	<b>Condições de formação / Patologias</b>
	Cristais de oxalato de cálcio	pH ácido ou neutro Sem significado clínico relevante.
	Cristais de ácido úrico	pH ácido Sem significado clínico relevante.
	Uratos amorfos (cálcio, potássio e magnésio)	Urina concentrada e com pH ligeiramente ácido. Sem significado clínico relevante.
	Cristais de cistina	pH ácido Paciente com cistinúria
	Cristais de tirosina	pH ácido Doenças tirosinemia
	Cristais de fosfato triplo	pH alcalino Infeção urinária por <i>Proteus sp.</i> ou <i>Klebsiella sp.</i>
<b>Imagem</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Patologias</b>
	Formas leveduriformes	Infeção por <i>Candida sp.</i>
	Parasita (ovo)	Infeção por <i>Schistosoma haematobium</i>
	Parasita	Infeção por <i>Trichomonas vaginalis</i>

	<b>Bactérias</b>	Infeção por bactérias ou contaminação da urina pela flora (depende do tipo colheita de urina usada na análise)
---	------------------	--